



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

A importância do laboratório para a profilaxia e diagnóstico na cadeia produtiva do frango de carne

Inês Quental Miguel

Orientação | Prof. Doutor Luís Miguel Lourenço Martins
Dr. Jorge Miguel Nunes Tavares dos Santos Fontes

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Dissertação

Évora, 2017



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

A importância do laboratório para a profilaxia e diagnóstico na cadeia produtiva do frango de carne

Inês Quental Miguel

Orientação | Prof. Doutor Luís Miguel Lourenço Martins
Dr. Jorge Miguel Nunes Tavares dos Santos Fontes

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Dissertação

Évora, 2017

Agradecimentos

À Universidade de Évora, não só por ser a Universidade que me acolheu durante estes anos, mas também pelas experiências proporcionadas, pela constante aprendizagem e crescimento pessoal; ao meu orientador, o professor Luís Martins, por todo apoio durante esta longa jornada e por me ter proporcionado a participação num projeto de investigação, sem o qual teria sido impossível o seu desenvolvimento; ao meu coorientador, Dr. Miguel Fontes, pelo interesse no projeto e o apoio na realização do mesmo, cujo envolvimento no trabalho também foi imprescindível; ao Sr. Professor Manuel Chaveiro Soares, por todos os ensinamentos e orientação ao longo do período de estágio; à Dra. Teresa Contrim pelos ensinamentos mais direcionados à área da medicina veterinária e pelos constantes esclarecimentos de dúvidas; ao Eng. Pedro Teles Feio pelo apoio na gestão dos recursos laboratoriais.

À MSD Animal Health, mais precisamente, ao Dr. André Pereira, que proporcionaram o patrocínio para os “cartuchos” utilizados para a realização da atividade experimental.

À Campifarma e à Abbott pela disponibilização do aparelho *i-STAT*®, e sem o qual nunca teria sido possível a realização da parte mais importante do trabalho experimental, com aplicações no futuro da medicina de produção avícola.

A toda a equipa da Sociedade Agrícola da Quinta da Freiria S.A., a todos os que me acompanharam e ensinaram ao longo do estágio e aos meus professores universitários pela formação dada ao longo dos cinco anos anteriores.

Por último, mas não menos importante, à minha família que sempre me apoiou ao longo dos seis anos de curso, particularmente ao meu pai, por me ter feito desenvolver o gosto pelos animais e à minha mãe, que apesar de nunca ter sido grande fã, rendeu-se graças a nós e que sempre foi o meu maior suporte na minha vida académica; ao meu irmão Eduardo por ter sido sempre o meu melhor companheiro, aquele que esteve sempre presente na minha vida; à Malta pelos cafés que muitas vezes serviam para apoio moral e pelo apoio mais que constante; à Joana Andrade por tudo e, em particular, por ter reparado que o meu trabalho não tinha título; à minha prima Sofia pelo jeitinho dado nas muitas tabelas; aos meus amigos de Évora e à RAG, que foi a minha casa durante cinco anos; à Intaum, a minha família em Évora e que agora, apesar de longe, permanece sempre presente e ao Rui, por ser quem é.

Resumo

A presente dissertação foi desenvolvida no âmbito do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, realizado pela autora, e baseou-se no estágio curricular realizado na Sociedade Agrícola da Quinta da Freiria S.A., em produção de aves, mais especificamente reprodutoras pesadas, sob a orientação do Doutor Luís Miguel Lourenço Martins e do Dr. Jorge Miguel Nunes Tavares dos Santos Fontes.

A dissertação encontra-se dividida em três partes principais. A primeira aborda o manejo de reprodutoras pesadas (*parent stock*), a segunda consiste num estudo onde se avaliaram parâmetros hematológicos das aves e a terceira noutra estudo, em que se avaliaram parâmetros bioquímicos, determinados com recurso ao *VetScan® i-STAT® 1* (ABAXIS, Califórnia, EUA). Ambos os estudos foram efetuados sobre galinhas reprodutoras pesadas da *estirpe Ross 308*, provenientes de uma empresa de seleção *Aviagen* (*Aviagen*, Alabama, EUA).

Palavras-chave: Avicultura; reprodutoras pesadas; manejo; hematologia; bioquímicas.

Abstract

The importance of the laboratory for the prophylaxis and diagnosis of the broiler production chain

This dissertation was developed in the context of the Integrated Master's Degree in Veterinary Medicine carried out by the author and was based on her curricular internship in broiler breeders production at Sociedade Agricola da Quinta da Freiria S.A., under the supervision of Dr. Luís Miguel Lourenço Martins and Dr. Jorge Miguel Nunes Tavares dos Santos Fontes.

There are three main parts in this document. The first one focuses on the management of broiler breeders (parent stock), the second concerns the evaluation of hematological parameters and the third relates to biochemical parameters, using the *VetScan® i-STAT® 1* (ABAXIS, Union City, Ca, USA). Both studies were performed on *Ross 308* strain broiler breeders, provided by *Aviagen* (Huntsville, AL, USA) breeding company.

Keywords: Poultry production; broiler breeders; management; hematology; biochemical.

Índice geral

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract	iii
Índice geral	iv
Índice de tabelas, gráficos e figuras	vi
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos	ix
I. Introdução	1
II. O Grupo Valouro	2
III. O Pinto Valouro	2
IV. Breve nota sobre o setor de multiplicação avícola (<i>Gallus gallus</i>) de vocação creatopoiética	3
1. A evolução da produção de carne de frango a nível mundial	3
2. O desenvolvimento da avicultura em Portugal	8
V. Anatomia e fisiologia do sistema reprodutor feminino	10
VI. Maneio de reprodutoras pesadas de vocação creatopoiética	14
1. Recria	14
1.2. Fase de iniciação	15
1.2.2. Fatores essenciais	19
1.3. Estratégias para atingir a uniformidade do bando	21
1.3.1. Maneio alimentar	21
1.3.2. Triagem aos sete dias de vida	23
1.3.3. Pesagens totais	23
1.3.3.1. Quatro semanas	24
1.3.3.2. Dez semanas	24
1.3.4. <i>Fleshing</i> e conformação corporal	24
1.3.5. Transferência das aves	26
2. Reprodução	32
2.1. Fase inicial, da transferência aos 5% de postura	32
2.2. Fase desde os 5% de produção até ao pico de postura	36
2.3. Fase pós-pico de postura	37
3. Incubação	39
3.1. Parâmetros físicos na câmara de incubação e eclosão	42
3.2. Mortalidade embrionária e malformações	45
3.2.1. Infertilidade verdadeira	46
3.2.2. Mortalidade embrionária precoce	46

3.2.3. Mortalidade intermédia.....	46
3.2.4. Mortalidade tardia.....	47
3.2.5. Malformações	47
4. Biossegurança	48
4.1. Vazio sanitário	51
4.2. Vacinação	52
4.2.1. Vias de administração	53
VII. Avaliação de parâmetros hematológicos.....	54
1. Objetivo.....	54
2. Material e métodos.....	55
3. Breve revisão bibliográfica sobre hematologia em aves.....	60
4. Resultados	66
5. Discussão	71
VIII. Avaliação de parâmetros bioquímicos usando <i>VetScan® i-STAT® 1 - ABAXIS</i> ... 74	
1. Objetivo.....	74
2. Material e métodos.....	76
3. Revisão da bibliografia acerca dos parâmetros avaliados pelo <i>i-STAT®</i>	78
3.1. Gasimetria.....	78
3.2. Balanço eletrolítico.....	81
3.2.1. Iões sódio e potássio	81
3.2.2. Ião cálcio.....	83
3.3. Glucose	86
4. Resultados	87
5. Discussão	89
IX. Conclusão	92
X. Bibliografia	94

Índice de tabelas, gráficos e figuras

Tabela 1 - Peso vivo de frangos da estirpe ACRBC alimentada com a ração de 1957, em comparação com as estirpes <i>Arbor Acres</i> e <i>Ross 308</i> , alimentadas com as rações de 1991 e 2001, respetivamente (Adaptado de Havenstein <i>et al.</i> , 2003a; referido por Havestein, 2016) ^{6,8}	6
Tabela 2 - Proporção de nutrientes utilizados na satisfação de diferentes necessidades do frango de carne (manutenção versus crescimento) (Adaptado de Leeson e Summers, 1997; referidos por Chaveiro Soares, 2016) ^{3,15}	8
Tabela 3 - Fatores essenciais (Adaptado de <i>Aviagen</i> , 2013; <i>Cobb-Vantress</i> , 2013c e <i>Hubbard</i> , 2015) ^{36,37,54}	20
Tabela 4 - Parâmetros físicos na sala de incubação e eclosão (Adaptado de e <i>Cobb-Vantress</i> , 2008; <i>Aviagen</i> , 2011) ^{101,103}	42
Tabela 5 - Média, desvio padrão (σ), coeficiente de variação (CV), valor mínimo e máximo e número de amostras (n) de parâmetros hematológicos de machos com 14, 16, 18, 20, 30, 36 e 53 semanas de vida.	67
Tabela 6 - Coeficiente de correlação de <i>Pearson</i> entre os parâmetros hematológicos de machos com 14, 16, 18, 20, 30, 36 e 53 semanas de vida.	68
Tabela 7 - Média, desvio padrão, coeficiente de variação, valor mínimo e máximo e número de amostras de parâmetros hematológicos de fêmeas com 14, 16, 18, 20, 30, 36 e 53 semanas de vida.	69
Tabela 8 - Coeficiente de correlação de <i>Pearson</i> entre os parâmetros hematológicos de fêmeas com 14, 16, 18, 20, 30, 36 e 53 semanas de vida.	70
Tabela 9 - Valores padrão de hematologia para a espécie <i>Gallus gallus</i> . (Fonte: Johnson-Delaney CA e Harrison LR, 1996; referido por Hawkins <i>et al.</i> , 2013) ^{159,176}	74
Tabela 10 - Desordens ácido-base (Adaptado de Rose, 2001; referido por Irizarry e Reiss, 2009) ^{171,184}	80
Tabela 11 - Média, desvio padrão, coeficiente de variação, valor mínimo e máximo e número de amostras dos parâmetros bioquímicos avaliados com o <i>i-STAT</i> ®, às 23 e 27 semanas de vida de reprodutoras pesadas.....	87
Tabela 12 - Média, desvio padrão, coeficiente de variação, valor mínimo e máximo e número de amostras dos parâmetros bioquímicos avaliados com o <i>i-STAT</i> ®, às 23 e 27 semanas de vida de reprodutoras pesadas.....	87

Tabela 13 - Coeficiente de correlação de <i>Pearson</i> entre os parâmetros bioquímicos avaliados pelo <i>i-STAT</i> ®, às 23 e 27 semanas de vida de reprodutoras pesadas.	88
Tabela 14 - Coeficiente de correlação de <i>Pearson</i> entre os parâmetros bioquímicos avaliados pelo <i>i-STAT</i> ®, às 23 e 27 semanas de vida de reprodutoras pesadas.	88
Tabela 15 - Média, valor mínimo e máximo e número de amostras dos parâmetros bioquímicos avaliados com o <i>i-STAT</i> ®, em galinhas reprodutoras pesadas das estirpes <i>Ross 708</i> , <i>Ross 1108</i> e <i>Cobb 500</i> , com idades compreendidas entre as 25 e as 36 semanas de vida (Fonte: Martin <i>et al.</i> , 2010) ¹⁸³	91
Tabela 16 - Média, valor mínimo e máximo e número de amostras dos parâmetros bioquímicos avaliados com o <i>i-STAT</i> ®, em galinhas reprodutoras pesadas das estirpes <i>Ross 708</i> , <i>Ross 1108</i> e <i>Cobb 500</i> , com idades compreendidas entre as 25 e as 36 semanas de vida (Fonte: Martin <i>et al.</i> , 2010) ¹⁸³	92
Gráfico 1 - Relação entre as fases de desenvolvimentos das reprodutoras pesadas e o peso vivo (Adaptado de <i>Cobb-Vantress</i> , 2013b) ⁶⁰	15
Gráfico 2 - Exemplo de tabela de recolha de peso e gráfico de distribuição gaussiana dos pesos (Adaptado de Leeson e Summers, 2010; <i>Aviagen</i> , 2013 e <i>Cobb-Vatress</i> , 2013b) ^{15,37,60}	27
Gráfico 3 - Exemplo de tabela de recolha de peso e gráfico de distribuição gaussiana dos pesos (Adaptado de Leeson e Summers, 2010; <i>Aviagen</i> , 2013 e <i>Cobb-Vatress</i> , 2013) ^{15,37,60}	27
Gráfico 4 - Exemplo de tabela de recolha de peso e gráfico de distribuição gaussiana dos pesos (Adaptado de Leeson e Summers, 2010; <i>Aviagen</i> , 2013 e <i>Cobb-Vatress</i> , 2013) ^{15,37,60}	28
Figura 1 - Comparação entre as carcaças de frango da estirpe ACRBC e da estirpe <i>Ross 308</i> , ambas alimentadas com a ração de 2001 (Adaptado de Havenstein <i>et al.</i> , 2003a,b; referido por Havestein, 2016) ⁶⁻⁸	7
Figura 2 - Trato reprodutivo feminino da ave (Adaptado de Gill, 2007; referido por http://human-anatomy101.com/male-chicken-anatomy/male-chicken-anatomy-turkey-reproductive-anatomy-grut32bit/) ^{185,186}	12

Figura 3 - Classificação do <i>Fleshing</i> (Adaptado de http://www.cobb-vantress.com/academy/articles/article/academy/2016/12/28/fleshing-important-in-optimal-broiler-breeding) ⁶³	25
Figura 4 - Desenvolvimento embrionário em dias (Adaptado de <i>Cobb-Vantress</i> , 2008) ¹⁰³	45
Figura 5 - Material utilizado para a realização do hemograma e dos esfregaços sanguíneos, com a exceção das agulhas, da heparina líquida e do corante <i>Diff-Quick</i> ..	56
Figura 6 - Pipeta de <i>Potain</i> (Fotografia gentilmente cedida pelo orientador).	56
Figura 7 - Câmara de <i>Neubauer</i> melhorada (Fotografia gentilmente cedida pelo orientador).....	57
Figura 8 - Representação esquemática de uma plataforma de contagem da câmara de <i>Neubauer</i> melhorada, aquando da sua observação ao microscópio ótico. A azul encontram-se representados os quadrados onde se faz a contagem os eritrócitos (Adaptado de http://www.celeromics.com/en/cell-count-products/counting-chambers.php) ¹⁸⁷	58
Figura 9 - Eritrócitos (células alongadas) e leucócitos (células redondas no centro da imagem), (observação ao microscópio ótico, em câmara de <i>Neubauer</i> melhorada, na ampliação de 400x).	59
Figura 10 - Células sanguíneas (eritrócitos, heterófilos, linfócito, monócito, eosinófilo e basófilo) presentes nos esfregaços sanguíneos (Observação ao microscópio ótico na ampliação de 1000x).	60
Figura 11 - Material utilizado para a avaliação dos parâmetros bioquímicos do sangue periférico das aves. Podem ser observados o aparelho <i>i-STAT</i> ®, um “cartucho” CG8+, a micropipeta de 100µl, as pontas para a micropipeta e um tubo de <i>ependorf</i>	77

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

ACRBC – *Athens-Canadian Randombred Control*

B – Basófilos

BI – Bronquite infecciosa

Ca²⁺ – Ião cálcio

CaCO₃ – Carbonato de cálcio

CAV – *Chicken anemia virus* (Anemia infecciosa)

Cl⁻ – Ião cloro

CO₂ – Dióxido de Carbono

CO₃⁻ – Ião carbonato

CT – Calcitonina

CV – Coeficiente de variação

DEB – Balanço eletrolítico na dieta

DGAV – Direção-Geral de Alimentação e Veterinária

E – Eosinófilos

Ex – Exemplo

EB – Excesso de base

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

F1 – Maior folículo

F2 – Segundo maior folículo

Glu – Glucose

GnRH – Hormona libertadora de gonadotrofina

HCO₃⁻ – Bicarbonato

H – Heterófilos

H⁺ – Ião hidrogénio

Hb – Hemoglobina

Htc – Hematócrito

H₂CO₃ – Ácido carbónico

H₂O – Água

IBD – *Infectious bursal disease* (doença de Gumboro)

ILT – *Infectious Laryngotracheitis* (laringotraqueite infecciosa)

K^+ – Ião potássio
L – Linfócitos
LH – Hormona luteinizante
Log – Logaritmo
M – Monócitos
MDV – *Marek's disease virus* (doença de Marek)
MG – *Mycoplasma gallisepticum*
MS – *Mycoplasma synoviae*
n – Número de amostras
 Na^+ – Ião sódio
ND – *Newcastle disease* (doença de Newcastle)
 NH_4^+ – Amónia
 O_2 – Oxigénio
 PCO_2 – Pressão parcial de dióxido de carbono
pK – Cologaritmo da constante ionização
 PO_2 – Pressão parcial de oxigénio
PTH – Hormona paratiroide
RBC – Contagem de eritrócitos
 sO_2 – Saturação de oxigénio
 TCO_2 – Dióxido de carbono total
TRT – *Turkey rhinotracheitis* (síndrome da cabeça inchada)
WBC – Contagem de leucócitos
 σ – Desvio padrão
< – menor que
> – maior que
 \leq – menor ou igual que
 \geq – maior ou igual que
↑ – Aumento
↓ – Diminuição
*** – Erro/resultado não fiável

I. Introdução

A presente dissertação foi desenvolvida na sequência do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, realizado pela autora, e baseou-se no estágio curricular realizado na Sociedade Agrícola da Quinta da Freiria, SA., localizada na freguesia da Roliça, concelho do Bombarral, em medicina de produção de aves, mais especificamente de reprodutoras pesadas. O referido estágio teve início a 20 de setembro de 2016 e término a 31 de janeiro de 2017. Por questões de interesse médico-produtivo e de disponibilidade do equipamento de bioquímica *VetScan® i-STAT® I* (Aviagen, Alabama, EUA), parte das colheitas e respetivas determinações seriam realizadas posteriormente, nos meses de maio, junho e julho de 2017. Este estágio realizou-se sob a orientação do Doutor Luís Miguel Lourenço Martins e do Dr. Jorge Miguel Nunes Tavares dos Santos Fontes.

A dissertação inicia-se com uma breve contextualização da empresa onde o estágio decorreu, seguida de uma introdução sobre o desenvolvimento da produção de carne de frango no mundo e em Portugal e de um resumo sobre a anatomia e fisiologia do sistema reprodutivo da fêmea.

Posteriormente, a dissertação encontra-se dividida em três partes principais. A primeira aborda o manejo das reprodutoras pesadas (*parent stock*), que se divide nas fases de recria, reprodução e incubação dos ovos, com discriminação dos principais aspetos de cada uma destas fases, que contribuem para um melhor manejo na cadeia produtiva. O tema da biossegurança, cuja pertinência é fundamental na produção de bens de consumo, e sem o qual não se atingiria a eficiência produtiva pretendida, será igualmente abordado a par e passo. A segunda parte da dissertação consiste num estudo realizado para avaliação da relevância dos principais parâmetros hematológicos na medicina profilática da produção. Na terceira parte estudou-se a importância médico-produtivo de alguns dos mais frequentes parâmetros bioquímicos. Ambos os estudos foram efetuados a partir de amostras sanguíneas de galinhas reprodutoras pesadas da estirpe *Ross 308*, fornecidas pela empresa de seleção *Aviagen* (*Aviagen*, Alabama, EUA) as quais eram utilizadas na Sociedade Agrícola da Quinta da Freiria S.A..

O principal objetivo deste estágio foi proporcionar à autora a oportunidade de estar em contacto com a realidade da produção aviária, desenvolvendo competências na área,

e, ao mesmo tempo, realizar um trabalho de investigação com aplicações futuras na prática da medicina de produção de aves.

Esta dissertação foi elaborada com o auxílio do Microsoft Office Word e Excel 2016 e do gestor bibliográfico QIQA.

II. O Grupo Valouro

Em 1966 a família Santos, que trabalha na comercialização de aves desde 1875, começou a modernizar e a expandir o negócio com a construção de um centro de abate de aves (o segundo matadouro de aves privado instalado no país). Esta unidade, conhecida hoje em dia como o Edifício Avibom, funciona como o núcleo do Grupo Valouro, S.A..

Em 1978, com o objetivo de complementar a fileira avícola, foi instalada uma fábrica de rações na Marteleira, concelho da Lourinhã, à qual se seguiu, 10 anos mais tarde, outra unidade situada junto à estação de caminho-de-ferro, no Ramalhal, concelho de Torres Vedras.

Em 1986 deu-se início à instalação de unidades de multiplicação avícola. Para esse fim foi criada a Sociedade Agrícola da Quinta de Freiria, S.A., que veio a dedicar-se à produção de aves do dia, designadamente pintos, patos, perus e codornizes.

A expansão do Grupo tem continuado, nomeadamente com a implantação de um circuito fechado na Herdade da Daroeira, situada no Alentejo, com 2343 hectares, onde são criados e abatidos 15 milhões de frangos por ano. Adicionalmente, o Grupo dedica-se ainda à produção agrícola, com destaque para a cultura de milho e olival ¹.

III. O Pinto Valouro

A sede da Pinto Valouro é a Sociedade Agrícola da Quinta da Freiria, S.A., empresa do Grupo Valouro, S.A. que se dedica à produção agrícola, florestal e, sobretudo, animal, nomeadamente no sector da multiplicação avícola (frangos, patos, perus e codornizes) e da produção de carne de aves.

A atividade começou com a multiplicação de galinhas reprodutoras pesadas, com uma capacidade de produção de 250 000 aves do dia por semana. Atualmente a capacidade semanal é de três milhões de aves para pintos do dia, produzidas no Bombarral, Tondela, Serpa e Tomar. Em 1991 a empresa estendeu a sua atividade à multiplicação de patos, criando as instalações adequadas na Quinta da Lapa, em Torres Vedras, onde atualmente se produz 70 mil patos semanalmente, quanto aos perus o centro de incubação tem a capacidade semanal de 70 mil perus, e relativamente às codornizes a capacidade semanal é 250 mil codornizes.

A implementação das corretas normas de biossegurança, de bem-estar animal e ambiental, são domínios onde a empresa foi pioneira a nível nacional e levou à certificação da fileira de frango e de pato segundo a norma ISO 9001:2008. São estas ferramentas que permitem a obtenção de ovos para incubação e de aves do dia, de elevado potencial zootécnico e com um nível sanitário notável ².

IV. Breve nota sobre o setor de multiplicação avícola (*Gallus gallus*) de vocação creatopoiética

1. A evolução da produção de carne de frango a nível mundial

Ao longo dos últimos 70 anos, a produção de aves da espécie *Gallus gallus*, nomeadamente no que toca à fileira da carne, sofreu avanços significativos³. Estes avanços deveram-se a um intenso processo de seleção, levando a um aumento do peso da carcaça, tornando-a mais rentável e diminuindo os custos com a sua produção, nomeadamente devido à crescente eficiência alimentar, que leva a que se alcance o peso de abate com menor tempo de vida. O consumidor consegue, deste modo, obter uma proteína de elevada qualidade a preços cada vez mais baixos.

Segundo Crawford (1990) a galinha doméstica tem como principal precursora a galinha vermelha da selva (*Gallus gallus*), sendo que alguns autores defendem que descendeu de outras três espécies selvagens⁴.

O mesmo autor refere que a evolução da galinha para a ave que hoje conhecemos passou por quatro etapas principais: A primeira etapa da evolução das aves deu-se aquando da sua domesticação, que se crê ter tido origem no continente asiático, mais especificamente na China e na Índia. Os fins iniciais dados às aves domésticas eram religiosos, decorativos e de entretenimento. Só muito mais tarde foram usadas como fonte de alimento. A segunda etapa da evolução resultou da sua difusão para outros países e continentes, com a adaptação a outras culturas e ambientes e a terceira etapa foi caracterizada como a “*hen crazy*” do século XIX, em que as aves eram usadas para exibição. Nessa altura teve início a seleção e criação das raças que existem atualmente e deu-se a expansão e crescimento das indústrias e agricultura na Europa e no continente americano. A quarta e última fase evolutiva decorreu na primeira metade do século XX, em que surgiram pequenas unidades de produção especializadas, que utilizaram para seleção as raças existentes na época, constituindo as linhas puras.

A descoberta das leis de Mendel constituiu um passo importante para o entendimento da hereditariedade e, através da introdução dos ninhos ratoeira, os quais permitiram a observação dos ovos, relacioná-los com a galinha que os pôs e o registo da sua produção, conseguiu-se seleccionar aves com melhor aptidão para produção de ovos⁴.

Dominic Elfick *et al.* (2012)⁵ referiram que, por volta dos anos 80 e 90 do século XX, unidades de produção maiores e mais especializadas foram desenvolvidas nos Estados Unidos da América e na Europa, desencadeando o desenvolvimento de programas de melhoramento genético mais avançados. As então linhas puras começaram a ser utilizadas para cruzamentos, dando origem às estirpes comerciais.

Antes da década de 1940, os cruzamentos eram aplicados exclusivamente em linhas de reprodução de raça pura. Hoje, os frangos são um cruzamento de três ou quatro vias específicas de linhas puras, havendo quatro gerações entre a linha de criação pura e a linha de frango final.

A partir de 1940 as empresas de seleção passaram a prestar especial atenção à seleção de características relacionadas com o crescimento e a produção, e, também, às características de reprodução³. A satisfação das exigências dos consumidores, sendo estas a conformação da carcaça, e o peso vivo ao abate, também conseguiu-se o desenvolvimento da produção de carne de frango. Com efeito, as aves primeiramente

utilizadas para consumo tratavam-se de machos obtidos por sexagem das galinhas poedeiras, não possuindo, de todo, a conformação apreciada pelos consumidores. Em relação à conformação da carcaça deu-se ênfase à região do peito (músculos peitorais), sendo esta a mais apreciada pelos consumidores, nomeadamente os americanos, sendo os Estados Unidos da América, um dos maiores produtores de carne de frango.

Foi em 1945 que o grupo americano *A&P (Atlantic & Pacific Tea Company)* criou um concurso televisivo chamado “*Chicken of Tomorrow*” no qual os frangos foram avaliados em relação à taxa de crescimento, conversão alimentar, quantidade de carne, entre outros, e no qual o consumidor apresentou o seu interesse por determinados aspetos como a conformação da carcaça, o peso vivo ao abate e o preço^{3,5}. Esta competição permitiu aos criadores, como *Peterson, Vantress, Cobb, Hubbard, Pilch e Arbor Acres* tornarem-se marcas distintas⁵.

Com a introdução dos cruzamentos, o número de pequenas empresas de seleção sofreu um decréscimo drástico, uma vez que não foram capazes de suportar o custo associado a estes programas, tendo cerca do ano 2000, subsistido apenas três empresas, devido à globalização do mercado, constituindo ainda hoje as três únicas empresas de seleção no segmento da carne: *Cobb-Vantress* (com as marcas *Cobb, Avian, Sasso e Hybro*) *Aviagen* (com as marcas *Ross, Arbor Acres, Lohmann Indian River e Peterson*) e *Groupe Grimaud* (com as marcas *Hubbard e Grimaud Frere*)⁵.

Ao longo de todo este período de seleção, a eficiência alimentar e o peso ao abate sofreram grandes alterações, como demonstrado por Havenstein *et al* (2003a)⁶, sendo os resultados de dois estudos efetuados em 1991 e 2001, observados na tabela 1, na qual se compara o peso vivo de frangos de uma estirpe controlo: *Athens-Canadian Randombred Control (ACRBC)* alimentada com a ração de 1957, com as estirpes *Arbor Acres* e *Ross 308* (as estirpes modernas dos respetivos anos), alimentadas com as rações de 1991 e 2001, respetivamente.

Na figura 1, também adaptada dos estudos de Havenstein *et al.* (2003a,b)^{6,7}, observa-se o aumento do volume e conseqüentemente do peso da carcaça, comparando as estirpes *ACRBC* e *Ross 308*, alimentadas com a mesma ração de 2001. Nota-se que a estirpe *Ross 308*, estirpe moderna, apresentou uma carcaça mais volumosa, logo mais pesada, observando-se especificamente esse aumento nos músculos do peito, ao longo

dos dias. Esta alteração comprova que o aumento de peso tem a ver com o melhoramento genético e não diretamente com evolução na nutrição⁸.

Os estudos de Havenstein *et al.* (2003a,b)^{6,7} demonstraram concordância com os resultados dos estudos já realizados antes por Sherwood (1977)⁹ e Havenstein *et al.* (1994a,b)^{10,11}.

Havenstein *et al.* (2003a,b)^{6,7} demonstraram que a seleção genética, provocada pelas empresas de seleção, promoveram um aumento de 85 a 90% na taxa de crescimento do frango e peso da carcaça nos 40 anos decorridos. A alteração na nutrição das aves forneceu um aumento de 10 a 15%^{6-8,12}.

Tabela 1 - Peso vivo de frangos da estirpe ACRBC alimentada com a ração de 1957, em comparação com as estirpes *Arbor Acres* e *Ross 308*, alimentadas com as rações de 1991 e 2001, respectivamente (Adaptado de Havenstein *et al.*,2003a; referido por Havestein, 2016)^{6,8}.

Estirpe	Comparação 1991		Diferença	Comparação 2001		Diferença	Aumento entre 1991 a 2001
	<i>Arbor Acres</i>	ACRBC		<i>Ross 308</i>	ACRBC		
Dieta	1991	1957		2001	1957		
Idade (dias)	Peso vivo (gramas)						
21	700	190	510	743	176	567	57
42	2132	508	1624	2672	539	2133	509
56	3108	790	2318	3946	809	3137	819
70	3812	1087	2725	4806	1117	3689	964
84	4498	1400	3098	5521	1430	4091	993

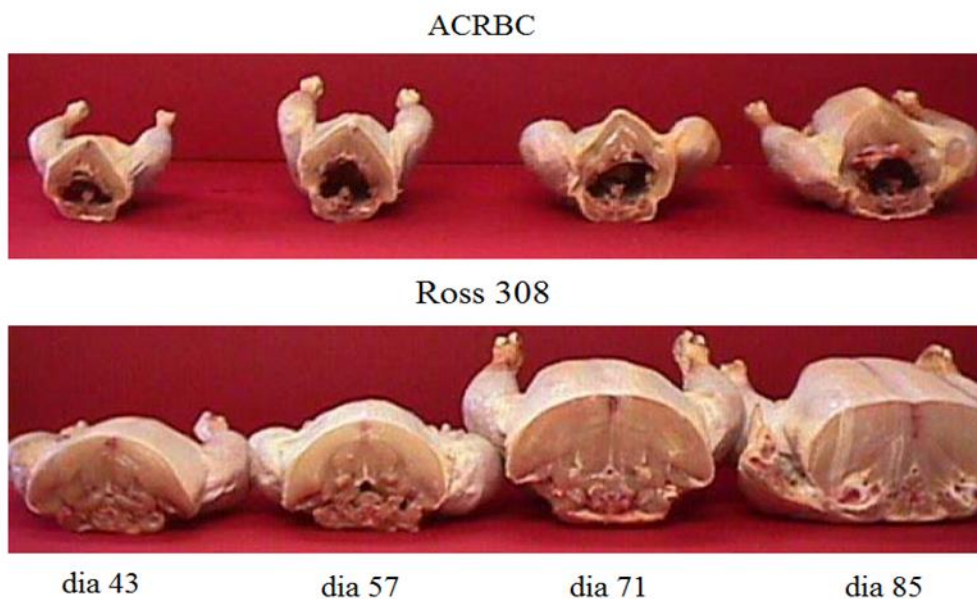


Figura 1 - Comparação entre as carcaças de frango da estirpe ACRBC e da estirpe *Ross 308*, ambas alimentadas com a ração de 2001 (Adaptado de Havenstein *et al.*,2003a,b; referido por Havestein, 2016)⁶⁻⁸.

Outros estudos mais recentes, realizados por Schmidt *et al.* (2009)¹³ e Zuidhof *et al.* (2014)¹⁴, comprovam, respectivamente, a evolução crescente no peso da carcaça e na eficiência alimentar^{13,14}.

A crescente seleção para a melhoria destas características promoveu uma maior velocidade de crescimento e, assim, menores despesas de manutenção, reduzindo o índice de conversão, como demonstrado na tabela 2. Com isto, verifica-se que mais energia é destinada ao crescimento em vez de às necessidades de manutenção (que dependem do peso vivo, da temperatura ambiente, da emplumação e da atividade voluntária), reduzindo, dessa forma, a idade ao abate.

Tabela 2 - Proporção de nutrientes utilizados na satisfação de diferentes necessidades do frango de carne (manutenção versus crescimento) (Adaptado de Leeson e Summers, 1997; referidos por Chaveiro Soares, 2016)^{3,15}.

Idade (semanas)	Manutenção (%)	Crescimento (%)
1	20	80
2	30	70
3	40	60
4	50	50
5	60	40
6	70	30
7	85	25
8	80	20

Em apenas 50 anos, a produção de carne de frango passou de uma indústria fragmentada, com muitas pequenas unidades especializadas de seleção, multiplicação, incubação, crescimento e transformação, para grandes empresas integradas, de produção, separadamente, de carne de aves e ovos^{3,16}.

Em 2004, associado à publicação do genoma completo da galinha, na revista *Nature*¹⁷, ocorreu um avanço significativo nos critérios de seleção, permitindo atualmente abranger e prever o seu mérito genético, graças aos recursos da engenharia genética, encontrando-se as empresas de seleção presentemente voltadas para esse objetivo geral. Na realidade, na fileira do frango de carne, a seleção inclui mais de 40 características^{3,18,19}.

Outros fatores que contribuíram para o crescimento na indústria da carne de frango foram os avanços registados na área da saúde animal, ao nível da prevenção de doenças (biossegurança, vacinas e outros fármacos); a nível nutricional, foi possível disponibilizar às aves um alimento sólido, composto completo, a par de outros avanços tecnológicos, a nível do controlo ambiental, incluindo pisos radiantes e sistemas de arrefecimento evaporativos³.

2. O desenvolvimento da avicultura em Portugal

Em Portugal, a moderna avicultura iniciou-se após a segunda grande guerra, principalmente na zona do centro do país, com maior desenvolvimento no setor dos ovos

para consumo, aproveitando-se os machos então para a produção de carne. Neste último setor, que iremos analisar mais em detalhe, verificou-se que o desempenho dos machos era medíocre e passou-se a importar linhas de pais (*parent stock*), nomeadamente da Holanda, alojando-se então as aves reprodutoras em pequenos parques com 10 fêmeas e um macho, cada.

No início da década de 1960 é instalado o primeiro matadouro de aves do estado, seguindo-se o início de atividade de outros matadouros privados, nomeadamente o centro de abate Aviar do Freixial, instalado em Bucelas, e o matadouro que é hoje da família Santos, proprietária do atual Grupo Valouro, situado na Marteleira, concelho da Lourinhã.

Ulteriormente, o setor avícola veio a experimentar uma expansão crescente, em particular após o regresso dos portugueses, até então residentes nas colónias portuguesas em África, instalando aviários sobretudo em regiões de minifúndio, vindo a designar-se esse tipo de atividades como pecuária sem terra.

Paralelamente, o setor da multiplicação avícola expandiu-se, sobretudo na região do centro, atingindo-se o número de 42 centros de incubação, aquando da entrada de Portugal na então designada Comunidade Económica Europeia, em 1986.

Posteriormente, a atividade conheceria uma liberalização total, vindo a emergir três empresas, que hoje dominam o mercado nacional e também exportam pintos do dia e ovos para incubação, tornando assim o setor da multiplicação avícola, excedentário para as necessidades nacionais.

A informação atrás avançada, sobre o desenvolvimento da avicultura em Portugal foi gentilmente disponibilizada pelo Sr. Professor Manuel Chaveiro Soares, Engenheiro Agrónomo, Gestor do Pinto Valouro e Empresário Agrícola.

V. Anatomia e fisiologia do sistema reprodutor feminino

O aparelho genital da galinha é composto por um ovário e um oviduto, que se localizam do lado esquerdo da cavidade celômica da ave.

Durante o período embrionário também estão presentes um oviduto e um ovário do lado direito. No entanto, a produção de substâncias inibidoras do ducto de *Müller* pelo ovário, resulta em regressão do ducto direito, mas não do esquerdo. O ducto esquerdo apresenta maior número de recetores para estrogénio, sendo assim mais sensível a esta hormona do que o ducto direito. A ação do estrogénio impede o efeito de substâncias inibidoras do ducto de *Müller*²⁰.

O oviduto esquerdo da galinha doméstica desenvolve-se rapidamente após as 16 semanas de idade e torna-se totalmente funcional, apenas antes do início da postura. O oviduto encontra-se suspenso dentro da cavidade peritoneal por ligamentos dorsais e ventrais, e é dividido em cinco regiões: infundíbulo, magnum, istmo, útero ou glândula da casca e vagina, terminando na cloaca. Um esquema do oviduto da ave é apresentado na figura 2, onde se pode observar a sua divisão nas regiões referidas²¹.

A ovulação dá-se na região do estigma do ovário (região sem vasos sanguíneos) e o óvulo cai no infundíbulo, que não contacta diretamente com o ovário, onde permanece por aproximadamente 18 minutos. A fertilização do óvulo ocorre no infundíbulo e é aí que a primeira camada de albúmen é produzida. O óvulo fertilizado segue para o magnum, que é a região mais longa do oviduto, constituída por uma extensa região glandular na parede do ducto. É nesta região que se forma a maior parte do albúmen.

No magnum a gema recebe as proteínas constituintes do albúmen, sintetizadas na respetiva parede. A gema permanece no magnum aproximadamente duas a três horas²¹.

O início da deposição da casca do ovo dá-se na região seguinte, o istmo, que é a mais curta. Primeiro, dá-se a formação das duas membranas de casca. A membrana interna da casca forma-se em torno do albúmen e a segunda tem a função de suporte para a formação da casca do ovo. Na última parte do istmo são formados os núcleos mamilares, que funcionam como locais de cristalização e ancoram a casca na membrana externa²²⁻²⁴. O ovo permanece nesta parte do oviduto durante aproximadamente uma a duas horas²¹. O tecido glandular do istmo é menor que o do magnum²¹.

Em seguida, a gema entra na glândula de casca. Ainda antes da calcificação, o ovo absorve sais, designadamente sódio, cálcio, magnésio e cloro, e fluidos das células glandulares tubulares, um processo denominado "*plumping*" ou hidratação da clara. O óvulo permanece na glândula de casca durante 18 a 22 horas, sendo que, durante este período, ocorre a deposição do material da casca a partir dos núcleos mamilares. A calcificação inicia-se cinco a seis horas depois do ovo entrar na glândula da casca, durante o processo, já falado, de "*plumping*"²¹.

O cálcio para a formação da casca do ovo é fornecido através da circulação sanguínea. Após a absorção no intestino (duodeno e jejuno proximal) ou reabsorção de osso (principalmente de osso medular, mas também osso cortical, em condições de déficit de cálcio). A absorção de cálcio (Ca^{2+}) aumenta significativamente na altura de formação da casca do ovo²⁵.

A osteopontina (uma fosfoproteína) é segregada pelas células epiteliais da glândula da casca e é incorporada no desenvolvimento da casca de ovo. A sua função foi associada à integridade estrutural do ovo e à extinção da calcificação da casca. Além disso, a expressão da ligação ao cálcio e proteína de transporte de cálcio, calbindina, ocorre no início da produção do ovo e termina com a sua postura²¹.

Podem-se distinguir quatro camadas no ovo: a camada calazífera, o albúmen espesso e o albúmen líquido (interno e externo); as quais só se tornam visíveis após a hidratação do albúmen.

Ao longo do oviduto formam-se as calazas. Estas são estruturas constituídas por fibras de mucina da camada calazífera que se encontra junto à gema e com a forma de cordas torcidas, devido à rotação que a gema vai sofrendo, sobretudo na porção inferior do oviduto. As calazas suspendem a gema no interior do ovo.

Por último, é formada a cutícula^{20,22} e o ovo segue para a vagina, onde permanece por alguns minutos antes da ovopostura²⁵.

A vagina é separada da glândula da casca pelo esfíncter uterovaginal e termina no urodeu da cloaca. A vagina não tem papel na formação do ovo, mas, em coordenação com a glândula da casca, participa na sua expulsão²¹.

O armazenamento de esperma dá-se nas glândulas na junção uterovaginal (armazenamento principal) e na porção inferior do infundíbulo (armazenamento secundário)^{15,20}.

A cloaca é dividida em três compartimentos, O coprodeu (mais anterior), urodeu e proctodeu. Durante a oviposição, uma dobra no urodeu pode formar uma fina membrana através do reto para evitar contaminação do ovo pelas excreções²¹.

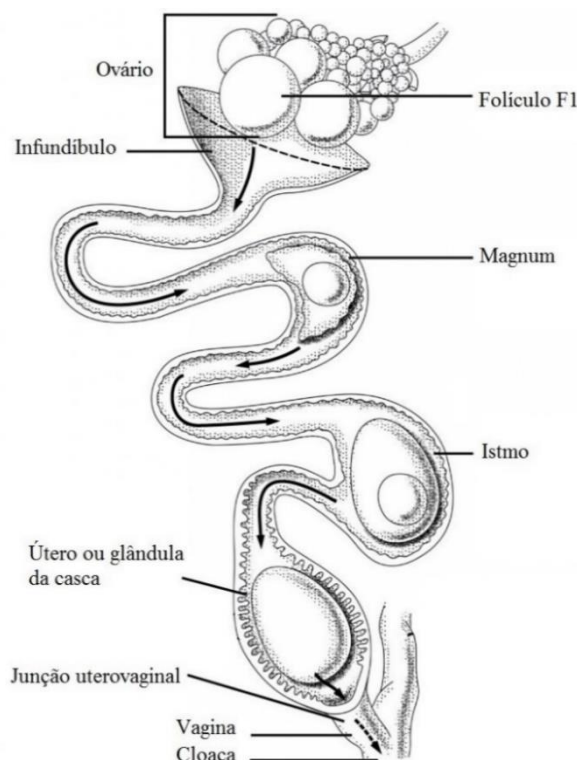


Figura 2 - Trato reprodutivo feminino da ave (Adaptado de Gill, 2007; referido por <http://human-anatomy101.com/male-chicken-anatomy/male-chicken-anatomy-turkey-reproductive-anatomy-grut32bit/>)^{185,186}.

A ovulação é controlada pelo eixo hipotalâmico hipofisário gonadal.

O ovário da ave é formado pelo estroma, que é a estrutura de suporte, e por um vasto número de folículos, formados antes da eclosão da ave. Os folículos podem ser classificados pelo tamanho e pela cor. Os folículos mais pequenos são de cor branca, enquanto os maiores são amarelos, sendo funcionalmente mais relevantes aqueles de mais de um centímetro. Os folículos são numerados de acordo com a sua dimensão, sendo que,

quanto maior é o folículo mais próximo está de ovular. O controlo da hierarquia folicular, que permite a ovulação diária, é estabelecido pelos folículos pequenos (de seis a oito milímetros). O folículo amarelo que ultrapassar oito milímetros de diâmetro, entra na hierarquia, continuando a desenvolver-se até à ovulação. O número ideal de folículos maiores na maturidade sexual deve ser de sete ou oito²⁶.

Cada folículo é composto por anéis concêntricos de gema de ovo e, em torno destes anéis, existe uma única camada de células, designada de camada granulosa. Ao contrário dos mamíferos, é aí, no folículo maior (F1), que se irá produzir progesterona. Em torno da granulosa existe a teca, que produz hormonas esteroides²⁶. É importante salientar que as células da granulosa não luteinizam, porque não existe a necessidade de formação de corpo lúteo, uma estrutura associada à gestação²⁰.

Os folículos são responsáveis pela produção de hormonas. A produção de hormonas esteróides é mantida pelos folículos mais pequenos no ovário. Há aumento da produção de androgénios, nomeadamente testosterona, no segundo maior folículo (F2) e, antes da ovulação, o maior folículo (F1) começa a produzir progesterona. Assim, o aumento de hormona luteinizante (LH) antes da ovulação não é induzido pelo estrogénio como nos mamíferos, mas pela progesterona²⁷. É esse aumento de progesterona que, através de um mecanismo de *feedback* positivo, vai induzir a libertação de hormona libertadora de gonadotrofina (GnRH) pelo hipotálamo (existem fotorreceptores específicos no hipotálamo, sensíveis ao estímulo luminoso, quando os dias se tornam mais longos e quando a intensidade da luz aumenta) sendo, desta forma, importante a transmissão de luz através da calote óssea craniana²⁷. A GnRH atua na hipófise, promovendo o desencadeamento do pico de LH, cerca de seis horas antes da ovulação (pico pré-ovulatório)²⁵.

A produção de estrogénios e androgénios a partir dos folículos mais pequenos no ovário começa na maturidade sexual. Sabe-se que os estrogénios induzem o desenvolvimento do oviduto, do osso medular, da plumagem, o alargamento do osso pélvico e outras características sexuais secundárias; relativamente aos androgénios, crê-se estarem envolvidos no padrão das penas, no seu crescimento e também no desenvolvimento de características sexuais secundárias, como o desenvolvimento da crista e barbeta^{20,25,26}.

Muito importante no fornecimento do cálcio para a formação da casca do ovo é o osso medular. As aves têm três tipos de tecido ósseo, cortical, esponjoso (osso trabecular ou osso esponjoso) e ossos medulares. O osso cortical é o osso estrutural compacto e o osso esponjoso, não tão compacto, está localizado na parte final dos ossos longos, como o fêmur, úmero e tibia^{21,25}. O osso medular desenvolve-se na maturação sexual, devido ao aumento da concentração de estrogénios no plasma²⁸⁻³⁰ e é o local de armazenamento principal de cálcio para a formação de casca³¹.

Os ossos corticais e esponjosos contribuem para a força do esqueleto. Indiretamente, o osso cortical e osso esponjoso contribuem para a formação da casca do ovo, uma vez que esses tipos de osso são reabsorvidos para manter o osso medular, que constitui um terço do cálcio total necessário para a casca do ovo^{28,32}. A quantidade de osso medular é constantemente remodelada²⁵.

VI. Maneio de reprodutoras pesadas de vocação creatopoética

1. Recria

A fase de recria é determinante para toda a performance do bando. Nesta fase dá-se relevo à uniformidade do bando, sendo todos os esforços realizados nesse sentido. Com uma uniformidade superior a 80%, é possível que todas as aves respondam da mesma forma ao estímulo luminoso, aquando da entrada na postura, e decidir facilmente qual a data da transferência para os respetivos pavilhões. Com aves uniformes consegue-se atingir um elevado pico de postura e uma persistência da produção de ovos após o pico.

Esta fase é crucial para a obtenção de bons resultados e para atingir a meta pretendida na postura, de 141,7 pintos/ave³³ às 60 semanas de vida das mães, só assim permitindo o alcance de lucro económico na exploração.

O gráfico 1 representa o aumento do peso vivo em relação à idade das aves, em semanas. Observamos que o período de recria pode ser dividido em três fases. A fase de iniciação, que decorre das zero semanas até às quatro semanas de vida, em que se dá um rápido crescimento e desenvolvimento da ave; a fase de manutenção, que decorre das cinco semanas até às 12 semanas de vida, na qual há crescimento, mas mais controlado de forma a maximizar a uniformidade do bando e evitar o sobrepeso, e a fase de

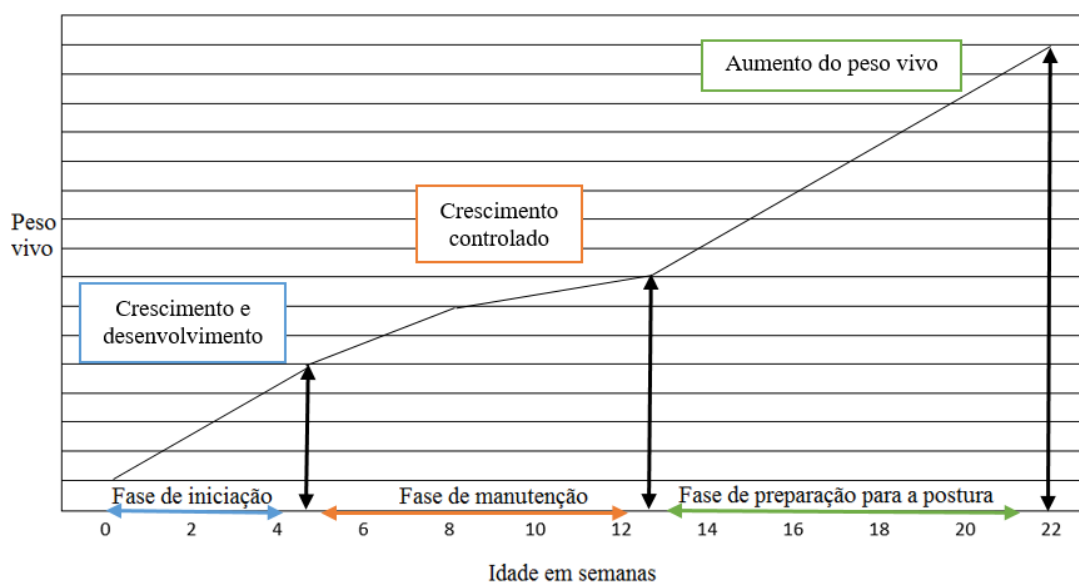
preparação para a postura, em que se dá um aumento do peso vivo com aumento de massa muscular e alguma gordura, de forma a aumentar as reservas energéticas para o período seguinte.

De seguida, vão ser abordados os aspetos mais importantes a ter em consideração na fase de recria, que, globalmente, decorre desde a chegada das aves aos pavilhões, até à transferência, pelas 21-22 semanas de vida.

1.2. Fase de iniciação

Nesta fase inicial, que decorre desde a chegada das aves ao pavilhão, até às quatro semanas de vida, há um desenvolvimento rápido do esqueleto (que se prolonga até às 12 semanas de vida³⁴) das penas, dos sistemas imunológico³⁵ e cardiovascular³⁶. Assim, à chegada aos pavilhões de recria, as aves têm um desenvolvimento imaturo, sendo de extrema importância o controlo ambiental para o correto crescimento e desenvolvimento da ave, de forma a manter a temperatura corporal dentro da gama de neutralidade térmica³⁷, uma vez que a emplumação é ainda reduzida, e promover uma maximização da ingestão de alimento para um correto desenvolvimento do sistema digestivo³⁸.

Gráfico 1 - Relação entre as fases de desenvolvimentos das reprodutoras pesadas e o peso vivo (Adaptado de *Cobb-Vantress*, 2013b)⁶⁰.



Em relação ao sistema imunológico, o timo e a bolsa de Fabricius são os principais órgãos do sistema imune das aves, sendo os secundários o baço, medula óssea e o tecido linfóide associado à conjuntiva, aos brônquios e ao intestino³⁸.

O saco vitelino é o maior órgão hematopoético durante o desenvolvimento embrionário, sendo a principal fonte de células-tronco. Estas células migram e povoam o timo, a bolsa de Fabricius, o baço e a medula óssea rudimentares e também outros futuros órgãos hematopoéticos³⁹.

No timo rudimentar os precursores linfóides proliferam e diferenciam-se em células T, na bolsa de Fabricius rudimentar o mesmo acontece para dar origem às células B. As células T e B deixam o órgão primário e povoam o baço e outros órgãos linfóides secundário, nos quais se diferenciam e adquirem a capacidade de responder a antígenos³⁹.

Os órgãos imunológicos são parcialmente desenvolvidos na eclosão, e são capazes de responder eficazmente apenas aos 10 dias de vida, sendo apesar disso se consegue adquirir imunidade através da vacinação, logo ao primeiro dia de vida. Foi observado que, apesar de existirem linfócitos maduros nas aves na altura da eclosão, são funcionalmente imaturos e adquirem gradualmente capacidade imunitária. A resposta humoral fica madura apenas após a primeira semana de vida³⁸.

O desenvolvimento do tecido linfóide, associado ao intestino, é essencial para a sobrevivência das aves, particularmente, durante as duas primeiras semanas de vida. A resposta imune local depende de vários órgãos especializados, como placas de *peyer* e também de células linfóides, células apresentadoras de antígenos e células *natural killers*. As células precisam de um período de adaptação de forma a conseguirem produzir citocinas. O tecido linfóide do intestino contém linfócitos B na altura da eclosão, mas o seu número aumenta dos quatro dias às duas semanas de vida. A capacidade de produzir uma resposta humoral aumenta depois disso³⁸.

Existe transferência de anticorpos maternos, nomeadamente imunoglobulina Y, através da absorção do saco vitelino, que deve ser gradual, por forma a existir uma maior continuidade dessa imunidade. O saco vitelino continua a ser transferido por, pelo menos,

48 horas, após a eclosão⁴⁰, sendo que idealmente deve ser absorvido por um período de sete dias.

É de salientar que os sacos vitelinos provenientes de mães jovens apresentam dimensões relativamente menores⁴¹.

À chegada dos pais (*parent stock*) os primeiros procedimentos consistem em: *i*) colheita de amostras de sangue para realização da prova de seroaglutinação, para pesquisa de *Mycoplasma synoviae* (MS) e *Mycoplasma gallicepticum* (MG)⁴² (o sangue é centrifugado para obtenção do plasma, onde se inoculam antigénios de MS e MG, realizando-se também um controlo negativo (sem antigénios); *ii*) colheita de mecónio dos fundos das caixas para pesquisa de *Salmonella spp.* (segundo a norma Salmonela 6579); *iii*) colheita de amostra com zaragatoa do saco vitelino, também para pesquisa de *Salmonella spp.* e *iv*) colheita de uma amostra com zaragatoa de pulmão (ou mesmo de uma porção do pulmão) para pesquisa de *Aspergillus spp.*

No pavilhão procede-se à vacinação contra a coccidiose, nomeadamente contra *Eimeria acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima* (duas estirpes), *E. mitis*, *E. necatrix*, *E. praecox* e *E. tenella*⁴³⁻⁴⁶. Assim, que todos os pintos são vacinados, são libertados no solo do pavilhão e, a partir daí, deve-se ter especial atenção à maximização de ingestão de alimento e água (H₂O) nas primeiras 48 horas de vida. Para tal, é estimulada a alimentação das aves e verificada a disponibilidade de água *ad libitum*^{35,38}.

A importância da maximização da ingestão após a chegada ao pavilhão prende-se com o facto de, segundo Maiorka *et al.* (1967) promover o desenvolvimento do trato gastrointestinal, sendo que as aves se encontram aptas a digerir hidratos de carbono assim que termina a eclosão⁴⁷. Estes autores observaram que, em frangos, o tamanho e peso de duodeno, jejuno e íleo aumentavam 24 horas após ingestão. Verificaram, também, que as vilosidades intestinais, nomeadamente o seu peso e densidade, aumentavam após a ingestão^{47,48}.

Quando os nutrientes de origem alimentar não são disponibilizados, as aves recorrem ao saco vitelino para suprir a carência. Contudo, o uso dos nutrientes provenientes do saco vitelino para fins nutricionais pode privar a ave da correta absorção de anticorpos, fornecidos por este³⁸.

De forma a garantir a correta ingestão de alimento sólido e água, aquela deve ser estritamente monitorizada durante as primeiras 48 horas, sendo que as primeiras 24 horas são consideradas as mais críticas. Recolhe-se uma amostra de 30 a 40 aves em três ou quatro lugares diferentes do pavilhão para avaliação da ingestão de água e de alimento sólido através da palpação do papo. Se o papo estiver cheio e suave indica que encontrou água e alimento sólido. Esta avaliação deve ser realizada às duas, oito, doze, vinte e quatro e quarenta e oito horas após a sua libertação no pavilhão, com o objetivo de aumentar gradualmente, ao longo das primeiras horas, o número de aves com o papo cheio³⁷.

Durante todo o período devem-se observar as temperaturas no pavilhão (medidas através de sondas colocadas próximo do solo, o nível mais importante, por ser aquele no qual as aves se encontram) e observar se estão de acordo com as estipuladas para a idade e clima. Para tal, observa-se também o comportamento das aves, designadamente se estão dispersas ou concentradas e próximas ou afastadas da fonte de calor. Se próximas da fonte de calor e amontoadas é indicativo de estarem com frio e se afastadas, indicativo de estarem com calor^{36,37}.

A avaliação da temperatura das patas (que devem estar “quentes”) também indica se a temperatura do solo é a correta ou não⁴⁹. A temperatura da cama é ainda mais importante que a temperatura ambiente, uma vez que as aves estão diretamente em contacto com ela, devendo encontrar-se entre os 28 e os 30 graus³⁷.

Outras formas de avaliação do bem-estar das aves à chegada devem ser realizadas, como a observação geral das aves e do seu comportamento; o cálculo da contagem da mortalidade durante o transporte e do peso médio³⁷, comparando com o peso *standard*³³.

É utilizado o *tone* ou *pasgar score* (analogia ao teste de *apgar* para a espécie humana) como um teste qualitativo da condição física das aves. Utilizando-se uma amostragem, avaliam-se os seguintes parâmetros: reflexos, que se avaliam colocando a ave em decúbito dorsal e medindo o tempo em segundos que demora a repor a estação, sendo que deve demorar menos de três segundos e, idealmente, dois segundos; estado dos olhos, que devem encontrar-se abertos, brilhantes e com um olhar alerta; estado do bico, que deve ser forte e limpo, sem um ponto de sangue ou malformações, e das narinas, que não devem estar contaminadas com albúmen; região do pescoço, que deve ter uma aparência seca e limpa; região umbilical, que deve estar fechada, sem pontos brancos ou

negros, sem sangue, gema e albúmen ou restos de cordão umbilical e, por último, membros pélvicos, que devem ser fortes, sem hiperémia ou edema dos jarretes, nem malformações. Deve ser fácil para a ave manter a estação. Realiza-se também a palpação do abdómen, não devendo o mesmo encontrar-se dilatado. O peso médio à chegada deve ser de, aproximadamente, 40 gramas e a perda de peso durante o transporte deve ser, idealmente, de duas gramas⁵⁰⁻⁵³.

O cálculo do *pasgar score* faz-se, atribuindo, no máximo, 10 pontos a cada critério e subtraindo-se um ponto por cada não conformidade registada, dentro dos cinco critérios morfológicos, por forma a obter-se a média. Uma ave com 10 pontos considera-se de qualidade superior. Em todo o caso, devemos ter em conta que se trata de uma classificação com apreciável grau de subjetividade⁵³.

1.2.2. Fatores essenciais

A temperatura, a humidade relativa, o fotoperíodo, a intensidade de luz e a qualidade do ar, são fatores determinantes para o desempenho produtivo das aves, estando estes parâmetros indicados na tabela 3, adequando-se a temperatura, horas e intensidade de luz aos dias de vida, de acordo com a bibliografia disponibilizada pelas empresas de seleção.

Tabela 3 - Fatores essenciais (Adaptado de *Aviagen*, 2013; *Cobb-Vantress*, 2013c e *Hubbard*, 2015)^{36,37,54}.

Idade (dias)	Temperatura ambiente (°C)	Horas de luz	Intensidade de lux (lux)
1	31-32	24	60
2	30-31	23	60
3	29-30	22	60
4	28-29	21	40
5	28-29	20	30
6	26-27	19	20
7	26-27	18	15
8	25-26	17	10
9	25-26	16	10
10	25-26	15	10
11	25-26	14	10
12	25-26	13	5-10
13	25-26	12	5-10
14	25-26	11	5-10
15	25-26	10	5-10
16	25-26	9	5-10
17	25-26	8	5-10

Na tabela 3 pretende-se condensar a evolução de três parâmetros nas primeiras quatro semanas de vida das aves, sendo que:

- i) um fotoperíodo decrescente, inicialmente elevado, visando, juntamente com uma intensidade de mais de 20 lux, facilitar a visão, para um fácil acesso aos bebedouros e comedouros (o que é essencial para conseguir um ganho de peso adequado nos primeiros dias de vida, sem o qual se compromete todo o desenvolvimento corporal futuro da ave);
- ii) por volta dos 16 dias de vida o fotoperíodo passa a constante e a intensidade luminosa baixa para cinco lux (como se pode ver na tabela 3), de modo a não se estimular o desenvolvimento sexual, pretendendo-se que este seja sincronizado com o desenvolvimento corporal, para que, após o estímulo luminoso que é dado no final da recria, as aves atinjam a maturidade sexual (expressa pelo início da postura) às 23 semanas

(conforme recomendado pela respectiva empresa de seleção); o facto de o fotoperíodo passar a ser de oito horas prende-se com o facto de estas aves apresentarem reprodução sazonal, ou seja, têm que passar por um período de dias curtos (inverno) para que, à chegada dos dias mais longos (primavera) se desencadeie o processo reprodutivo; tudo isto porque, inicialmente, as aves apresentam foto-refratividade e o período de dias mais curtos é necessário para que elas a percam; para além de que, se as aves forem criadas em dias longos, a produção de ovos será substancialmente menor; esta será, por exemplo (ex), a consequência de uma precipitada foto-estimulação, sem que se tenha dissipado completamente a foto-refratividade, ainda que o seu crescimento seja acelerado⁵⁵;

iii) conforme se ilustra na tabela 3, a temperatura ambiente aquando da receção das aves do dia no pavilhão é da ordem dos 32°C, baixando progressivamente durante as primeiras quatro semanas de vida para valores situados dentro da zona de neutralidade térmica³⁷, a fim de manter a homeotermia, dado que os mecanismos de termorregulação são inicialmente incipientes, e a emplumação é também insuficiente. Numa fase posterior, já as aves têm capacidade de regulação da temperatura corporal, não estando tão dependentes da temperatura ambiente.

1.3. Estratégias para atingir a uniformidade do bando

1.3.1. Maneio alimentar

Durante a primeira semana de vida pratica-se uma alimentação *ad libitum* para que as aves maximizem a ingestão de alimento e exista um correto crescimento e desenvolvimento corporal, característicos desta fase inicial e em consonância com os pesos padrão definidos pela respectiva empresa de seleção³³. A partir desse período, em geral, passa a haver a necessidade de restrição alimentar, nomeadamente no que respeita à estirpe *Ross 308*, uma estirpe de reprodutoras pesadas para produção de carne de frango (*Broilers*), normalmente voraz, com uma descendência também voraz, permitindo uma elevada velocidade de crescimento (expressa por baixo índice de conversão alimentar), logo menor custo de produção⁵⁶. Contudo, esse comportamento alimentar nem sempre se

verifica, pois existem bandos com pouca voracidade, tendo que se recorrer a medidas para estimular o seu apetite, como o varrimento dos papéis de distribuição de alimento, entre outras⁵⁷.

Se não se realizasse uma alimentação restringida as aves ficariam excessivamente pesadas, o que futuramente, nas fêmeas, iria diminuir a postura e a fertilidade e aumentar a incidência de prolapsos vaginais. Nos machos causaria problemas locomotores, que dificultariam a cópula, diminuindo, dessa forma, a fertilidade.

Um dos conceitos mais importantes é o de fornecer alimento de acordo com o peso e condição corporal do bando e não de acordo com a idade.

Entre os 18 e os 21 dias de vida altera-se a alimentação, de migalha para alimentação granulada aérea, de forma a permitir maior tempo de alimentação e melhorar comportamentos naturais (esgravatar). Só assim se consegue atingir grandes densidades populacionais. Só após as aves estarem habituadas a este novo modo de alimentação, se poderá dar início à pesagem total das quatro semanas. No entanto, no momento de distribuição do alimento, deve-se certificar que todas as tulhas estão a distribuir granulado e que a intensidade de luz é temporariamente aumentada para 20 a 30 lux, de forma a permitir uma correta visualização da ração e assim conseguir uma ingestão uniforme. Também é aconselhável apagar as luzes 10 a 15 minutos antes de iniciar a distribuição da ração, para que não haja migração das aves e estas se encontrem uniformemente distribuídas ao longo do pavilhão, no momento em que as luzes se acendem e dá início à alimentação^{57,58}.

A partir da primeira pesagem total, que será abordada mais adiante, pode iniciar-se a prática do *skip a day*. Esta prática realiza-se como forma de melhorar as uniformidades, minimizando a competição pelo alimento. Na prática o que se faz é dividir o alimento que seria dado em sete dias por seis dias, aumentando assim a disponibilidade diária de ração, ainda que, em bandos muito uniformes, possa não se justificar esta prática^{59,60}. No *skip a day* a quantidade diária de alimento é maior que aquela que seria se não se aplicasse a medida, o que pode reduzir a competição entre aves e ajuda a garantir que as aves menos agressivas também obtenham a sua porção de ração. Deve-se ter em atenção que esta medida pode não ser eficaz em todos os bandos e que pode ela mesma ser um fator de agressividade.

A redução da competição resulta na melhoria da uniformidade do peso corporal do bando⁶¹ o que leva a um melhor desempenho global, porque os requisitos de nutrientes e a gestão alimentar das aves uniformes são semelhantes⁶².

1.3.2. Triagem aos sete dias de vida

Aos sete dias de idade efetua-se a primeira triagem das aves, procedendo à separação de 25% dos indivíduos mais leves.

Esta primeira triagem tem em vista segregar as aves de menor peso e colocá-las num parque específico, onde as mesmas recebem um suplemento alimentar, de modo a experimentarem um crescimento que lhes permita atingir o peso vivo das aves mais pesadas e em consonância com os pesos *standard*³³. Esta prática reverte-se de especial importância porque é nas primeiras semanas de vida que a formação do esqueleto sofre um maior crescimento, razão pela qual, cerca das quatro semanas, se volta a fazer a triagem individual, com idêntico propósito³⁷.

1.3.3. Pesagens totais

De forma a melhorar a uniformidade (sendo a aceitável de 80%, com a ideal, embora muito difícil de alcançar, de 90%) realizam-se duas pesagens totais ao longo da recria, uma às quatro e outra às dez semanas de vida, ainda que, com objetivos diferentes^{37,60}.

Na pesagem total das quatro semanas o objetivo é fazer com que as aves mais leves cresçam e atinjam o tamanho das restantes, uma vez que, nesta altura, o esqueleto da ave ainda está em claro desenvolvimento.

Por volta das 10 semanas o esqueleto da ave atingiu praticamente o seu crescimento máximo³⁴, sendo, então, o objetivo da pesagem total, condicionar a conformação da ave, pretendendo também que as aves “leves” atinjam o tamanho *standard*³³, mas por via da conformação corporal.

1.3.3.1. Quatro semanas

A pesagem das quatro semanas de vida tem por objetivo fazer a separação em três categorias/grupos (grupo de médias, de grandes e de pequenas), em que as médias estão no *standard*³³, as grandes estão 10% acima e as pequenas 10% abaixo. Ajusta-se, então, a quantidade de alimento a cada parque, com a finalidade de conseguir colocar as pequenas no *standard*³³ (crescimento do esqueleto) e tentar que as grandes não excedam demasiado o peso *standard*^{33,37,60}.

Com esta separação consegue-se diminuir a competição, uma vez que as aves maiores são as mais vorazes, enquanto as mais pequenas são aves que comem mais devagar, permitindo que, numa primeira fase, as mais leves ganhem peso, as maiores percam peso, e as médias se mantenham no *standard*³³.

1.3.3.2. Dez semanas

Na pesagem total das 10 semanas utiliza-se o mesmo procedimento que na pesagem anterior para a separação das aves, mas o objetivo é diferente.

Deve-se traçar um novo objetivo de pesos para as aves mais pesadas, paralelo ao *standard*³³, não se reduzindo a sua alimentação, uma vez que tentar fazer com que as aves se aproximem do objetivo original nesta etapa reduzirá o percentual de pico de produção. Já para as aves “leves”, aumenta-se a quantidade de ração para que consigam atingir o peso *standard*^{33,37,60}.

A importância da triagem centra-se no facto de às seis a sete semanas o esqueleto atingir 80% da sua formação, sendo que o tamanho do esqueleto fica completo entre as 11 e as 12 semanas de vida³⁴. Dessa forma, se o bando não se apresentar uniforme a esta idade nunca mais se encontrará uniforme.

1.3.4. *Fleshing* e conformação corporal

A partir das 12 semanas de vida o objetivo é controlar o peso e o *fleshing*, termo este usado para definir a conformação do peito, nomeadamente o desenvolvimento da massa muscular. Esta avaliação, juntamente com a avaliação da deposição de gordura na

região pélvica, deve começar às 12 semanas e progredir regularmente a partir daí⁶³. Na figura 3 observam-se os diferentes tipos de conformação de peito.

A partir das 12 semanas de vida a conformação do peito deve aumentar gradualmente, para que tenham uma conformação dois a três às 16 semanas de vida e três a quatro às 20 semanas de vida⁶³. Essa condição constituirá uma reserva energética quando se iniciar o período de postura.

As aves nunca devem atingir a conformação cinco, que já indica sobrepeso com deposição de gordura no peito e não apenas massa muscular, e também não devem apresentar a conformação um, que representa caquexia.

Nesta altura não basta apenas fazer o controlo do peso das aves, sendo que se deve recolher uma amostra de aves e avaliar a conformação do peito. Pode-se classificar o *fleshing* de acordo como a figura 3 e calcular a percentagem de aves que possuem cada conformação. Isto fornece uma indicação útil para avaliar o estado do bando e eventualmente melhorar se não for esse o indicado⁶³.

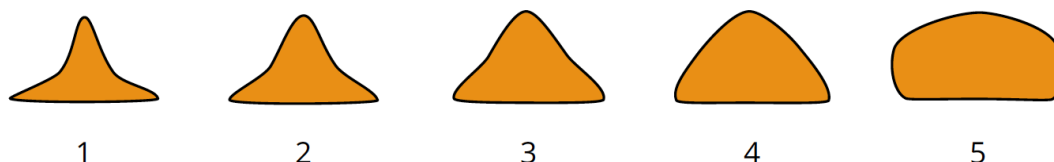


Figura 3 - Classificação do *Fleshing* (Adaptado de <http://www.cobb-vantress.com/academy/articles/article/academy/2016/12/28/fleshing-important-in-optimal-broiler-breeding>)⁶³.

No final desta fase, para verificação do desenvolvimento da maturidade sexual, devem iniciar-se observações semanais da abertura dos ossos pélvicos, nas fêmeas, e da coloração e humidade da cloaca nos machos^{37,60}.

Os erros de sexagem devem ser eliminados nesta fase e, de preferência, antes do início do acasalamento³⁷.

1.3.5. Transferência das aves

Existem dois parâmetros que caracterizam a forma de crescimento do bando: a uniformidade e o peso médio³⁷.

Para além da já mencionada pesagem total, realizam-se pesagens semanais a uma amostra do pavilhão, para observar qual a relação com o peso *standard*³³ e calcular o coeficiente de variação, permitindo assim traçar uma curva de pesos em relação à curva *standard*³³, o que permitirá avaliar a evolução do bando. Os registos das pesagens servem também para mostrar a distribuição gaussiana dos pesos.

Nos gráficos 2,3 e 4 pode-se observar o registo dos pesos das aves e a distribuição gaussiana, indicando se os indivíduos apresentam pesos muito próximos ou dispersos uns dos outros^{15,37,60}. O gráfico 2 indica uma boa uniformidade, uma vez que os pesos se encontram próximos uns dos outros e predominantemente no centro do gráfico. O gráfico 3 apresenta uma má uniformidade, pois apresenta o que se chama uma cauda, onde se observam maior número de aves “leves”, o que pode ser indicativo de desigual distribuição de alimento sólido. Por último, o gráfico 4 demonstra falta de uniformidade extrema, porque os pesos estão muito dispersos, observando-se um elevado número de aves mais leves e mais pesadas. Esta situação pode ser indicativa de condições muito deficientes de manejo, alta densidade de aves, má distribuição da ração ou resultado de uma situação de doença^{15,37,37,60}.

da capacidade de estabelecer uma hierarquia no ovário. O folículo F2 parecia ser funcionalmente semelhante ao folículo F1, na medida em que produzia progesterona e não estava envolvido na produção de testosterona, o que seria o esperado. Este estudo demonstrou que as aves alimentadas *ad libitum* perdem a capacidade de regular o recrutamento de folículos para a hierarquia⁶⁵.

As aves alimentadas *ad libitum* durante a recria têm ovários mais pesados do que a aves sujeitas a um plano de alimentação restringida⁶⁶. O aumento do peso do ovário está associado ao desenvolvimento de folículos pré-ovulatórios maiores⁶⁷, que, por sua vez, está ligada ao aumento da libertação de folículos durante o dia e este aumento leva a um tempo de ovopostura errático, ou seja, à ovopostura de mais do que um ovo por dia, maior incidência de ovos com duas gemas e ovulações internas, causando falha do folículo em cair no oviduto, aquando da ovulação, entrando na cavidade celômica. Estes folículos podem ser reabsorvidos dentro de 48-72 horas³⁰ ou, se isto não suceder, causar peritonite, o que leva à morte das aves. Esta incidência prende-se com o facto de haver várias ovulações no mesmo dia, o que aumenta a probabilidade dos folículos não caírem no oviduto^{15,26,68}.

Múltiplas ovulações estão também associadas a maiores defeitos na casca do ovo, uma vez que, no caso do tempo de ovopostura errática, mais do que do que um ovo pode estar presente no oviduto, levando a que a casca fissure ou mesmo não se forme em locais de colisão entre os ovos. Podem surgir mesmo ovos sem casca¹⁵.

Devido às múltiplas ovulações nas aves mais pesadas a subida para o pico de produção será mais lenta e nunca atingirão picos tão elevados como seria de esperar (pico de 86,3%³³), para além da persistência de postura após o pico também não se verificar, havendo antes uma caída brusca na postura^{26,34,69}.

A alimentação *ad libitum* pode também levar a atrésia, verificando-se um aumento do número de folículos atrésicos nestas aves, em relação às aves que sofreram alimentação restringida²⁶.

A obesidade leva também à redução do armazenamento de esperma nas glândulas da junção uterovaginal e na porção inferior do infundíbulo, locais de armazenamento no oviduto¹⁵.

Para além disso, foi demonstrado que aves submetidas a uma alimentação restringida na recria, apresentam durante o período de postura maiores sequências de ovulações⁷⁰ e maior permanência na postura⁷¹, em comparação com aves que não sofreram este tipo de restrição⁶².

Os prolapsos vaginais são outra consequência que surge do excesso de peso das aves, uma vez que, quando estas põem os ovos a vagina atravessa a cloaca. Quando os ovos são grandes, como no caso dos já referidos ovos de duas gemas, associado ao facto de haver gordura abdominal acumulada na região pélvica, a vagina pode não retrair de imediato, deixando-a exposta durante um curto período de tempo, que pode propiciar o comportamento de picacismo. As lesões causadas pelo picacismo constituem uma porta de entrada para agentes infecciosos a partir da região cloacal. Esta infeção ascendente por agentes oportunistas como *Escherichia Coli* e *Staphylococcus spp.* (mais frequente o *Staphylococcus aureus*) conduz, frequentemente a septicémia e morte^{69,72,73}.

Outro resultado do sobrepeso, muito associado a dietas de alta energia e exercício restrito (mais frequentes no tempo quente) é o aumento de deposição de gordura no fígado, que pode conduzir a esteatose e rotura hepática.

O teor de gordura no fígado aumenta geralmente com o início da postura e é influenciado pelos estrogénios. Para provar esta evidência foram realizados estudos em que se administrou estradiol a frangos e o resultado foi o desenvolvimento de esteatose hepática e hemorragia consequente⁷⁴. Um procedimento similar em galinhas poedeiras levou a aumento do volume hepático e morte por hemorragia hepática⁷⁵.

O tratamento com estrogénios sintéticos verificou-se mais prejudicial a uma temperatura ambiente de 34°C do que a 21°C⁷⁶ o que confirma as observações de campo, de que a rotura hepática é mais frequente durante o tempo quente.

O consumo excessivo de dietas de alta energia, independentemente da fonte, em aves cujo exercício é restrito, resulta em excesso de deposição de gordura e gordura excessiva pode alterar a arquitetura do fígado.

Como o balanço energético é um fator nesta problemática, muitos estudos concentraram-se na influência da dieta na rotura hepática. No entanto, quando as dietas isocalóricas foram comparadas, uma dieta que forneceu energia em forma de gordura e

não de hidratos de carbono reduziu a incidência desta doença⁷⁷. A hipótese era de que as dietas ricas em gordura poderiam ter reduzido o metabolismo hepático, por diminuição da síntese de ácidos gordos *de novo* no fígado. Além disso, o tamanho do fígado, em vez do conteúdo lipídico ou do alto teor de gordura da dieta, estava diretamente relacionado com a rotura hepática^{73,78}

Em relação aos machos, uma restrição alimentar adequada durante o período de recria evita o sobrepeso e juntamente com um programa de luz adequado, permite que após a estimulação luminosa se dê o maior crescimento testicular, que ocorre entre as 18 e 24 semanas de vida^{26,34,69}.

A falta de uniformidade dificulta a tomada de decisão: como e quando iniciar a estimulação luminosa, quando transferir as aves, quando introduzir a ração de postura. Deve-se, pois, certificar que machos e fêmeas estejam sincronizados em termos de maturidade sexual, sendo recriados de acordo com o mesmo programa de luz e os respetivos objetivos de peso corporal para a idade³³.

O processo da transferência é executado cerca das 21 semanas. Os machos são transferidos dois a três dias antes das fêmeas (por razões de natureza territorial, habituação aos comedouros e maturidade sexual)⁶⁹.

As aves devem ser transferidas de manhã ou à noite, para evitar as horas de calor e, dessa forma, prevenir mortalidade no transporte, devida ao acréscimo de *stress* associado pelo calor.

A data da transferência depende, em grande parte, de as aves irem ser transferidas para pavilhões abertos ou fechados. Se a transferência for para pavilhões fechados, a tomada de decisão é mais simples, uma vez que as aves vão transitar de um ambiente controlado para outro também controlado. Assim, neste caso, as aves podem mesmo ser transferidas por volta das 18 semanas, sem implicações no seu desempenho produtivo. Como continua a haver um controlo sobre as horas de luz, as aves não correm o risco de ser sobreestimuladas, o que desencadearia uma menor produção do que seria esperado e nunca alcançariam o pico de produção, para além de um aumento na mortalidade²⁶.

No caso da transferência para pavilhões abertos, esta deve ser realizada cerca das 21 semanas, devido às consequências apontadas anteriormente, no caso de se realizar

mais cedo, e deve ter-se em atenção a altura do ano, nomeadamente se no verão ou no inverno, pois existem, respetivamente, dias com mais e com menos horas de luz relativamente às do programa em curso³⁷.

2. Reprodução

Neste período pretende-se um manejo adequado das aves, de forma a permitir que estas alcancem uma elevada produção, designadamente a nível de pico de postura (picos de mais 86,3% ³⁷) e que continuem um alto nível produtivo após o pico.

A fase da reprodução é dividida em três etapas: a fase inicial que compreende o espaço de tempo entre a transferência e os cinco por cento de postura; a fase do pico de postura e a fase pós-pico.

O manejo conducente aos fins pretendidos nestas fases é detalhado a seguir.

2.1. Fase inicial, da transferência aos 5% de postura

Após o estímulo luminoso dá-se um rápido desenvolvimento do oviduto e ovários nas fêmeas e testicular nos machos, alcançando-se a maturidade sexual das aves. Assim, deve-se suprir todas as suas necessidades nutricionais, de forma a maximizar esse crescimento, uma vez que, qualquer falha pode comprometer a futura fertilidade do bando.

Nesta fase, em relação aos machos, importa controlar a evolução do peso em consonância com o estabelecido na curva *standard* ³³, nomeadamente assegurando que ingerem apenas a quantidade de ração que lhes é destinada e não têm acesso aos comedouros das fêmeas⁷⁹.

O conceito de dimorfismo sexual é de extrema importância na fase de reprodução, uma vez que, desta forma, se pode praticar a alimentação separada por sexos³⁷. Os comedouros das fêmeas são do tipo calha, com uma abertura de acesso apropriada para o tamanho da sua cabeça (os machos como têm uma crista maior não conseguem ter acesso). No entanto, nesta fase inicial, os machos ainda são pequenos, tendo mais fácil acesso aos comedouros tipo calha e, daí, a atenção referida anteriormente. O sistema de

alimentação dos machos é mais elevado, ficando, desta forma, fora do alcance das fêmeas, que não devem também elas ingerir maior quantidade do que a previamente estabelecida⁷⁹.

É, ainda, necessário aferir com precisão a hora de alimentação, sendo que machos e fêmeas devem ter o alimento disponível à mesma hora, de forma a evitar comportamentos de agressividade, por competição pela ração. É importante que o alimento esteja disponível sempre à mesma hora, todos os dias, e que seja corretamente distribuído, ou seja, observando se chega ao fim da linha dos machos e se dá uma volta completa nas calhas das fêmeas. O período de alimentação deve ocorrer nos primeiros 30 minutos após se acenderem as luzes, de forma a não coincidir com o período de postura (medida para prevenir ovos de chão), dado as aves se encontrarem mais ativas para a alimentação nos primeiros 30 a 40 minutos após se iluminar o pavilhão, reduzindo-se a atividade de ingestão nas duas a quatro horas seguintes, até ao esvaziamento das linhas de alimentação¹⁵.

Em algumas aves o desejo de ingestão é maior que a necessidade de fazer ninho e colocar o ovo, tendo como consequência a postura de chão. Este problema prende-se mais com os primeiros ovos da série ovular, os quais são postos mais precocemente¹⁵. Uma série ovular é uma sequência de ovos colocados até um dia de pausa (dia em que não ocorre postura). Esta sequência é influenciada pelo ritmo de ovulação, que é o tempo de formação do ovo no oviduto até à expulsão pela vagina. Este período é de mais de 24 horas (entre 23 e 28 horas). A ovulação ocorre cerca de 30 minutos (15-75 min) após a ovopostura, o que, juntamente com o facto de o ovo poder permanecer mais de 24 horas no oviduto, vai fazer com que os ovos não sejam colocados todos à mesma hora, de cada dia²¹.

A série ovular obedece a uma série de regras, uma das quais é de que o primeiro ovo da série é colocado uma a duas horas após as luzes serem acesas. A partir daí, cada ovo da sequência será colocado mais tarde. Outra regra consiste no facto de o último ovo da série ovular ser colocado tipicamente nove a dez horas depois de se acenderem as luzes. Este intervalo entre a postura dos ovos de uma série ovular é variável, podendo em aves de alta produção compreender apenas um período de 24 horas, mas o normal é compreender um período entre 40 a 44 horas²⁶.

Assim, em resumo, o mecanismo da ovulação é controlado pelo eixo hipotalâmico hipofisário gonadal, sendo que, havendo um folículo pré-ovulatório maduro, com capacidade de produzir progesterona, haverá um pico de LH que desencadeia a ovulação. No entanto, este fenómeno não ocorre quando as aves põem os ovos ao fim da tarde, próximo do fim do período luminoso. Nesse caso não vai haver ovulação seguinte após à ovopostura e, sendo assim, não se vai desencadear o mecanismo de *feedback* anteriormente referido, não ocorrendo postura no dia seguinte. O folículo F1 permanece no ovário durante a noite e vai ovular na manhã seguinte, e, demorando a formação do ovo cerca de 24 horas, haverá uma pausa de um dia e só no dia seguinte se dará início à próxima série ovular^{15,26}.

Outros fatores que podem também contribuir para o aumento do número de ovos de chão estão relacionados com os ninhos como: *i*) a dificuldade no acesso ao ninho, no caso de grande densidade de aves, ou mesmo o seu número e *design* serem incorretos; *ii*) pressão incorreta nas linhas de água, que as faz evitar a zona dos ninhos, pois não havendo água disponível, elas não se deslocam para essa região; *iii*) agressividade dos machos; *iv*) manipulações perto dos ninhos; *v*) intensidade luminosa inferior à recomendada (entre 40 a 60 lux)³⁷; *vi*) problemas derivados do material dos ninhos (que pode não agradar às aves) e *vii*) a altura do *slat*, que deve ser de 40 a 45 centímetros^{54,80}.

A percentagem de ovos de chão ao longo de todo o período de postura não deve exceder os dois a três por cento do número total de ovos produzidos num dia⁸¹. O seu número será maior no início do período de postura, mas na altura do pico devem apenas apresentar um a dois por cento do total de ovos produzidos num dia⁸¹. Se tal não se verificar, então terão de se investigar as causas subjacentes.

O maneo conducente à minimização da postura no chão, nomeadamente estimulando as aves a se deslocarem para os ninhos, é de extrema importância, pois esses ovos representam, não só um elevado risco sanitário, como também exigem mais mão-de-obra para a sua recolha.

O risco sanitário dos ovos de chão prende-se com o facto de estes terem mais probabilidade de contaminação bacteriana, associado ao facto de poderem ser lavados e, com a lavagem, se perder a cutícula⁸². Esta é uma membrana exterior, protetora do ovo, e, sem ela, o ovo fica mais exposto à entrada de microrganismos, para além do próprio

interior, dessa forma mais acessível, constituir um excelente meio de cultura. Assim, estes ovos têm uma reduzida incubabilidade e representam maior risco de onfalites em aves que eclodam.

É também relevante aferir a pressão correta das linhas de água, de modo a que não ocorra falta de água, nem excessiva pressão, o que, em períodos em que as aves não estão a consumir água, provoca humidade das camas.

É relativamente fácil controlar a humidade das camas, nesta fase inicial do bando, mas é de extrema importância que se implemente um manejo correto desde o início, pois, uma vez o problema instalado a sua correção torna-se bem mais complexa.

Múltiplas causas podem levar a uma má qualidade das camas, incluindo deficiente ventilação, aumento da humidade do ar, pouca profundidade da cama, mau manejo da mesma, aumento da excreta das aves (que pode estar relacionado com desequilíbrios nutricionais, doenças e aumento do consumo de água), entre outras⁸³.

As camas húmidas estão associadas ao bem-estar animal, estado de saúde do bando, impacto ambiental e eficiência produtiva. Problemas como pododermatite plantar, lesões articulares e bursite esternal, podem ser consequências desta situação⁸³; são doenças que vão afetar diretamente o acasalamento, logo diminuindo a fertilidade, para além da procura de alimento e postura; outro problema associado é o aumento dos níveis de amoníaco no ar, desencadeado pela grande concentração de microorganismos, que transformam o ácido úrico dos dejetos em amoníaco, que tem como consequência a lesão das vias respiratórias das aves; também ocorre perda de integridade intestinal, que leva a maior conspurcação das camas; por último, acarretam despesas de manutenção, mais mão-de-obra, entre outros aspetos⁸³.

Um aspeto importante é também o suprimento nutricional de carbonato de cálcio (CaCO_3), da parte da tarde. Uma vez que a formação do ovo se dá à tarde ou à noite e a utilização do cálcio proveniente da ração fornecida de manhã^{83,84} não é suficiente para satisfazer o alto consumo metabólico de cálcio para a formação da casca do ovo, haverá mobilização do cálcio do osso medular para satisfazer estas necessidades. O reservatório ósseo é posteriormente reabastecido com cálcio proveniente da absorção intestinal

quando a glândula de casca não está em atividade. O osso medular é, desta forma, a principal fonte de cálcio durante a noite^{73,84}.

Assim, o fornecimento de carbonato de cálcio à tarde fornece uma fonte alternativa de cálcio, reduzindo a sua mobilização óssea e também evita situações de tetania do cálcio. Para além disso, o uso de partículas maiores aumenta o tempo de permanência das partículas no trato digestivo, estando mais disponível para utilização do cálcio durante o período noturno⁸⁵.

A relevância de, numa fase inicial, se aferirem os aspetos acima indicados, é evitar possíveis falhas na água ou alimento sólido, pois estas provocarão *stress* nas aves, diminuindo drasticamente a postura^{37,60}.

Nesta fase também deve prestar-se atenção ao equilíbrio da proporção machos/fêmeas. Um rácio macho/fêmea baixo leva a baixa fertilidade ou, pelo contrário, uma relação demasiado alta pode ocasionar acasalamento excessivo e acasalamento interrompido. Neste último caso, é observado um desgaste de penas na região dorsal, parte posterior da cabeça e base da cauda, podendo originar queda de penas. Em casos mais graves pode mesmo levar à abertura de feridas na região dorsal da fêmea, provocadas pelas unhas dos machos, situação em que as fêmeas se assustam e fogem dos mesmos, chegando mesmo a esconder-se. Este ato vai levar a uma diminuição da fertilidade^{37,60}.

O excesso de machos leva também a que estes entrem em conflitos entre si, por razões hierárquicas, levando ao aparecimento de lesões.

A resposta reprodutiva das aves é maximizada com um fotoperíodo de 13 a 14 horas, na etapa de postura. Isso atrasará o início da foto-refratividade adulta e minimizará a incidência de ovos de chão, ao assegurar que a maioria dos ovos são postos depois das luzes acenderem. Deve ser fornecida uma intensidade média de 30 a 60 lux³⁷.

2.2. Fase desde os 5% de produção até ao pico de postura

Os incrementos na ração não se realizam até se alcançar os cinco por cento de postura, o que deve ocorrer por volta das 25 semanas de vida, momento em que se passa da ração pré-postura para a ração de postura, a qual contém maior concentração de proteína e cálcio em virtude das maiores necessidades nesta fase, associadas à postura.

Nesta fase tem de se conseguir um equilíbrio delicado entre as crescentes necessidades nutricionais das fêmeas e a ocorrência de prolapsos vaginais (que estimulam o picacismo, com consequências negativas em termos sanitários e na própria sobrevivência da ave)⁷³ e produção de ovos de duas gemas (estes, obviamente, não apresentam qualquer interesse para a atividade reprodutiva). Ainda no que respeita às fêmeas os aumentos de ração têm de ser definidos em função das necessidades de conservação, com relevo para o peso vivo e a temperatura ambiente, e das necessidades de produção, especialmente no que respeita à massa de ovo e algum crescimento que ainda ocorre nesta fase.

Os incrementos de ração realizados após os cinco por cento de postura têm em conta o peso vivo, a observação das aves (podem apresentar comportamento característico de fome, por exemplo), nível produtivo, massa do ovo [que é igual à média do peso do ovo (120 ovos pesados) a multiplicar pela percentagem de postura], ovos de duas gemas, tempo de consumo da ração, grau de *fleshing* e mortalidade. Devem realizar-se incrementos pequenos, porém frequentes.

2.3. Fase pós-pico de postura

Nesta fase, que decorre entre as 36 e as 60 semanas de vida, o objetivo é manter a fertilidade dos machos e maximizar o número de ovos férteis produzidos, garantindo a continuidade da produção após o pico, uma vez que após o pico de postura as séries ovulares começam a ser mais curtas, levando a uma diminuição da postura ²⁶.

Em relação ao manejo das fêmeas, nesta fase devem fazer-se reduções graduais da dose de ração, uma vez que, com a passagem do pico de postura, o nível de produção vai diminuir, reduzindo-se também as necessidades de produção. Estas reduções são realizadas com base no peso vivo, no peso do ovo e na percentagem de postura, devendo-se comparar estes valores com os valores *standard* ³³, para se certificar que as reduções estão a ser feitas corretamente.

As reduções na ração evitarão, quer uma excessiva deposição de gordura abdominal, quer o tamanho exagerado do ovo (situação em que alguns ovos podem aparentar ser de duas gemas, quando na verdade não são).

A perda de fertilidade do bando com o avançar da idade está inerente a vários fatores, que abrangem tanto os machos como as fêmeas. Nos machos observa-se o declínio na motivação para a cópula, o que não é causado pela fadiga, mas pela habituação ao estímulo feminino. O declínio relacionado com a idade, na fertilidade masculina, é devido a um declínio na libido, mudanças na conformação corporal que inibem o acasalamento e, em parte, à redução do volume de sémen⁸⁶. O acasalamento foi observado ser mais frequente em machos jovens (20 a 29 semanas de idade) que em machos mais velhos (35 a 37 semanas de idade) quer com fêmeas jovens, quer com mais velhas^{87,88}.

As perdas de peso ou *fleshing* nos machos levam a que ocorra uma regressão do tamanho testicular com a consequente perda de qualidade do esperma. Assim, devem-se respeitar os aumentos de peso semanais estipulados pela estirpe, sem, no entanto, os exceder, e evitar perdas de peso corporal.

O surgimento de problemas locomotores nos machos leva também a uma incapacidade para a realização da cópula e consequente diminuição da fertilidade, tendo estes machos de ser refugados. Estes problemas locomotores são muitas vezes resultado de humidade nas camas, que leva a problemas como a pododermatite plantar, podendo provocar a supressão do apoio no membro afetado ou o decúbito, se os dois membros estiverem afetados. O sobrepeso pode também agravar esta situação, devido ao maior peso sobre os membros.

As primeiras lesões observadas são de abrasão e consequente formação de feridas, com agravamento devido ao trauma frequente. Estas lesões criadas servem de porta de entrada a microorganismos como o *Staphylococcus aureus*, podendo levar a uma infeção, com o desenvolvimento de pústulas e abscessos plantares em fases mais avançadas. A pústula é o obstáculo mais evidente à cicatrização espontânea. A localização da lesão e a sua relação com a pressão, contusão, movimento e contaminação representam barreiras significativas para a cicatrização⁸⁹.

O centro da lesão é ocupado por uma massa necrótica de detritos celulares, que podem encerrar material da cama e bactérias⁷³. A tumefação é normalmente coberta por uma crosta devida a hiperqueratinização⁸⁹.

A infecção pode ascender ao longo das bainhas dos tendões até à articulação tibiotarso-tarsometatársica e provocar a tumefação inflamatória da articulação^{73,89}.

Relativamente às fêmeas, com o envelhecimento a capacidade de armazenamento de esperma nas glândulas, na junção uterovaginal e na porção inferior do infundíbulo, diminui^{20,90}. A libertação de esperma em galinhas velhas (65 semanas) foi menor do que em galinhas jovens (39 semanas) e as mudanças que ocorrem com a idade, na composição do fluido uterino da galinha, também se podem relacionar com o declínio da viabilidade dos espermatozoides no oviduto e com a redução da fertilidade⁹¹. Outro estudo mostrou serem necessários mais espermatozoides em galinhas de 49 e de 52 semanas de idade, que em aves de menos de 21 a 28 semanas de idade, para obter fertilidade máxima⁹². A diminuição da fertilidade nas galinhas mais velhas pode ser reduzida pelo aumento do número de espermatozoides⁹², sendo para isso importante que os machos copulem um maior número de vezes, algo que não se verifica devido aos aspetos apresentados anteriormente⁸⁸.

Uma das medidas a tomar para contrariar esta tendência, é o *spiking*, termo utilizado para definir a introdução de machos novos para compensar o declínio da fertilidade do bando. Estes machos novos vão estimular os mais velhos, aumentando o interesse destes pelas fêmeas com acréscimo do número de cópulas. A sua introdução também permite equilibrar o rácio macho/fêmea, caso tenha sido afetado pela mortalidade e refugo de machos. Contudo, há que ter em atenção a introdução de novos machos por poderem ser portadores de agentes infecciosos para o bando. Um controlo laboratorial antes da sua entrada é necessário para evitar este risco^{54,60,79,93}.

Do exposto, podemos afirmar que é crucial um bom manejo dos machos para evitar quebras de fertilidade.

3. Incubação

Os ovos produzidos na fase da reprodução são então postos a incubar de forma a se obter os frangos de carne. Nesta etapa deve-se ter especial atenção ao manejo dos ovos e aos fatores físicos que são determinantes para se obter um alto rendimento.

Após a postura o embrião presente no ovo já apresenta aproximadamente 50000 células (de 40000 a 60000 células)⁵³, daí deve-se ter especial atenção na manipulação dos ovos para evitar que ocorra mortalidade embrionária precoce. Os ovos embrionados não devem também encontrar-se a uma temperatura acima do chamado “zero fisiológico”.

O “zero fisiológico” foi reportado em diferentes estudos, nos quais foram apresentados diferentes valores. Num primeiro estudo realizado por Edwards (1902)⁹⁴ a temperatura correspondente ao “zero fisiológico” foi considerada de 21°C. Mais tarde, um estudo realizado por Frunk and Biellier (1944)⁹⁵ indicou que esta temperatura correspondia antes a 28°C. Outro estudo, mais recente, levado a cabo por Fassenko *et al.* (1992)⁹⁶ estabeleceu essa temperatura como sendo de 14°C. No entanto, a principal empresa produtora de incubadores e eclosoras, a *Petersime*⁹⁷, indica que, pela experiência deles, uma temperatura de 21°C é suficiente para parar o desenvolvimento embrionário por alguns dias.

À chegada ao centro de incubação os ovos, juntamente com os carros onde são transportados nos tabuleiros alveolares, são fumigados, uma vez que os ovos, mesmo os colocados nos ninhos, não são estéreis^{15,98}. Depois, podem seguir para a sala de conservação, que é mantida a aproximadamente 18°C e com humidade relativa de 60-65%⁵³, ou seguir diretamente para as incubadoras, onde permanecem durante 18 dias. Ao 18º dia são transferidos para bandejas de eclosão e colocados nas eclosoras, por mais três dias, sendo que o chamado “pinto do dia” (*Day old chick*) eclode do ovo 21º dia.

O “pinto do dia” corresponde a 68% do peso inicial do ovo, ou seja, há a perda de 12% do peso inicial, resultado da perda de água, primeiramente por difusão e, secundariamente, por oxidação dos lípidos da gema, processo que liberta água como produto metabólico⁹⁹. A perda de água permite que ocorra o aumento da câmara-de-ar, que deve ter o tamanho adequado, por forma a estimular a ventilação pulmonar na altura em que o feto bica a membrana interna da casca e penetra na câmara-de-ar, ao 19º dia de incubação⁹⁹⁻¹⁰¹.

A determinação do rendimento da ave (o peso da ave no nascimento, em percentagem do peso do ovo incubado) é um método que permite verificar se o tempo e os parâmetros de incubação estão corretos. Se estes não estiverem corretos podem observar-se aves com baixo rendimento (< 67%) devido a excesso de tempo nas bandejas

de nascimento, a incubação a uma temperatura elevada ou a baixa humidade. Estas aves apresentam maior risco de desidratação e vão ter um fraco rendimento nos pavilhões. Aves com alto rendimento (> 68%) surgem quando são retiradas muito cedo da bandeja de nascimento ou em incubação a uma temperatura baixa ou com elevada humidade. Quando colocadas nos pavilhões estas aves vão permanecer deitadas, sem procurar ração ou água. Se a evaporação for excessiva pode mesmo levar à desidratação do próprio embrião e, conseqüentemente, à sua morte¹⁰¹.

O tipo de incubadora utilizada é do modelo vertical, que pode ser de carga única ou de carga múltipla. Nas incubadoras de carga única (as utilizadas na empresa Sociedade Agrícola da Quinta da Freiria S.A.) realiza-se um pré-aquecimento dos ovos, o que evita o choque térmico e a condensação na superfície da casca, condensação essa que promoveria o desenvolvimento de fungos. Este pré-aquecimento ocorre dentro da própria incubadora e dá-se durante oito horas até se atingir a temperatura de incubação¹⁰²⁻¹⁰⁴.

As incubadoras de carga única foram feitas para que apenas ovos de uma idade fossem colocados ao mesmo tempo a incubar. Assim, o controlo dos fatores físicos como a temperatura, humidade relativa e composição do ar pode ser realizado e os valores modificados ao longo do desenvolvimento do embrião, satisfazendo as suas necessidades.

Os ovos para incubação devem estar colocados nos tabuleiros alveolares com o polo mais largo do ovo voltado para cima¹⁰⁴ para que, ao 19º dia de incubação, dia em que o bico do embrião perfura a membrana interna da casca e penetra na câmara-de-ar, se possa dar início à respiração pulmonar¹⁰⁴.

Aos 18 dias os ovos são transferidos para bandejas de eclosão, que permitem uma melhor movimentação dos pintos, após o nascimento aos 21 dias, e uma correta secagem dos mesmos.

Os chamados “pintos do dia” correspondem a pintos retirados nesse mesmo dia da eclosora, ainda que possam ter nascido com 24 horas de diferença.

Após a secagem dos pintos, as bandejas são levadas para um local onde se realiza a triagem dos mesmos, que são depois transportados para os pavilhões. Na triagem deve atender-se à qualidade dos pintos e das cascas dos ovos de cada lote. As cascas devem estar limpas e rosadas (cascas muito sujas indicam que os nascimentos ocorreram há

muito tempo). Pintos com malformações, prolapsos cloacais, onfalites, sujidade, “enfezados”, entre outros, são refugados¹⁰¹.

De seguida, os pintos são transportados e colocados em tabuleiros por uma máquina; podem ser vacinados com por *spray* de gota fina, contra, por exemplo, bronquite infecciosa (BI) e/ou doença de Newcastle (ND), e seguem para transporte¹⁰¹.

3.1. Parâmetros físicos na câmara de incubação e eclosão

Nas salas de incubação e eclosão é de grande importância o controlo dos parâmetros físicos (tabela 4) como a temperatura, humidade relativa, volteio e composição do ar¹⁰⁵⁻¹⁰⁷.

Os principais fatores que podem afetar a taxa de eclosão dos ovos férteis são a manipulação dos ovos, o armazenamento dos ovos, parâmetros físicos da incubação, higiene dos ovos e das instalações.

Tabela 4 - Parâmetros físicos na sala de incubação e eclosão (Adaptado de e *Cobb-Vantress*, 2008; *Aviagen*, 2011)^{101,103}.

Parâmetros físicos		
	Incubadoras	Eclosoras
Temperatura (°C/°F)	99,5 °F, variação aceitável igual a 99,3-99,7 °F	98,5-98,8 °F
	Variação da temperatura da casca do ovo em relação à temperatura da incubadora de mais ou menos 0,2 °F	
Humidade relativa (%)	55-62	55-62
Ventilação (m ³ /h/1000)	13,5	28,7
Volteio dos ovos	Sim	Não
Composição do ar	Controlado através da ventilação	

O conhecimento da temperatura da casca do ovo permite que as temperaturas das incubadoras sejam ajustadas para maximizar o desempenho, levando-se em conta as diferentes fases do desenvolvimento embrionário¹⁰¹.

A medição da temperatura da casca do ovo deve ser usada para estabelecer a temperatura correta das máquinas, sendo que a temperatura de superfície da casca é próxima à temperatura interna do ovo¹⁰¹ que pode facilmente ser medida, usando um termómetro de infravermelhos, sendo a ideal de 100-101°F¹⁰¹ durante todo o período dentro da incubadora. O objetivo é que a maioria dos ovos esteja dentro da gama de temperatura ideal durante todo o período de incubação.

Romijn e Lokhorst (1960)¹⁰⁸ foram os primeiros a provar que existia produção de calor pelo embrião.

A temperatura da casca do ovo aumenta a partir do segundo terço da incubação e este aumento está relacionado com a maior produção de calor metabólico pelo feto durante esta fase de alta taxa de crescimento¹⁰⁹. Após o rompimento da membrana interna da casca, ao redor do 19º dia de incubação, a troca de gás através da corioalantóide é gradualmente substituída pela respiração pulmonar e, conseqüentemente, a produção de calor pelo feto quase duplica^{110,111}.

De acordo com as leis da termodinâmica, o calor é transferido entre os ovos e o ambiente de incubação, isto é, sempre da região mais quente para a mais fria. Portanto, a temperatura de incubação precisa ser ajustada de acordo com os requisitos do embrião para otimizar a eficiência da incubação. A temperatura constante da casca de ovo durante a incubação resulta de um equilíbrio entre a produção de calor do embrião e a transferência de calor entre o ovo e o meio ambiente¹¹². A manutenção desta temperatura a 100-101°F¹⁰¹ ao longo do período de incubação promove alta capacidade de incubação e boa qualidade da ave¹¹³⁻¹¹⁶.

A transferência de calor dá-se por diferentes mecanismos: por condução, que ocorre entre o embrião e a casca e entre a casca e o meio ambiente; por convecção, através das correntes de ar; por radiação, que se dá da superfície do ovo pela emissão de ondas de calor que se propagam pelo ambiente e por evaporação, quando há perda de água pelo ovo¹¹⁶.

Uma correta humidade relativa permite também a transferência de calor para o ovo e criar um ambiente mais uniforme no início da incubação, uma vez que o ar húmido transfere o melhor o calor do que o ar seco. Como a transferência de calor é maior para o

ar húmido do que para o ar seco, isso diminui a variação na temperatura e, portanto, a variação no desenvolvimento embrionário¹⁰⁰.

Nas incubadoras existem um sistema de volteio automático dos ovos, que é executado de hora a hora, atingindo uma inclinação de 45 a 90°C. Este mecanismo tem particular importância, uma vez que assegura o crescimento máximo das membranas extraembrionárias, promove uma eficiente utilização do albúmen pelo embrião e o aumento das trocas gasosas. Sem a execução do volteio ocorreriam aderências à membrana interna da casca, incidência de distocias, malformações, retardamento embrionário, com a conseqüente mortalidade embrionária. Este sistema de volteio mimetiza o volteio dos ovos realizado pelas aves no meio natural^{104,117}.

A renovação do ar e a sua movimentação são fatores importantes, pois promovem um ambiente uniforme, fornecendo oxigênio (O₂) e removendo dióxido de carbono (CO₂)¹¹⁸.

Após a transferência, a ventilação deve ser reduzida e a humidade aumentada por forma a proporcionar a rotura da membrana da casca, uma vez que a amolece e desencadeia a respiração pulmonar, respetivamente.

A redução da ventilação tem como objetivo o aumento do CO₂ (até um por cento) durante os três últimos dias de incubação e resulta numa diminuição da concentração de O₂, quando o feto perfura a membrana interna da casca, o que acelera o processo e promove a saída do mesmo da casca, para obter O₂¹⁰⁰.

A velocidade do ar é particularmente importante nos primeiros dias, quando o ovo precisa de calor, e depois dos 12 dias de incubação, quando há o aumento de produção de calor pelo embrião e este precisa de ser libertado. Uma elevada velocidade de ar favorece a capacidade de transferência de calor do ar e reduz as variações de temperatura na casca e no embrião¹⁰⁰.

As máquinas de incubação e de eclosão possuem sondas para controlo automático da temperatura, humidade, ventilação, alarmes e leituras digitais que leem a temperatura, humidade, ventilação e horas de incubação, o que facilita o controlo destes fatores.

3.2. Mortalidade embrionária e malformações

Uma prática comum e recomendada é a abertura dos ovos que não eclodiram para averiguar a causa da não eclosão¹⁰¹. A maior parte dos casos observados são de infertilidade e morte embrionária precoce (não é fácil a sua distinção) e de mortalidade tardia, sendo a maior parte dos casos devido a ovos muito grandes (ovos de reprodutoras mais velhas) ou muito pequenos (de reprodutoras jovens), em que ocorre pouca ou muita desidratação do embrião, respetivamente, como observado no estudo realizado por Kirk *et al.* (1980)¹¹⁹.

Outras causas de mortalidade encontradas prendem-se com fraturas na casca do ovo, o que leva a contaminação bacteriana.

Também surgem casos de malformações que levam a refugo, como o “botão negro”, “mau fechamento do umbigo”, “conspuração com gema”, prolapsos cloacais, presença de cordão umbilical e pintos muito sujos e “enfezados”, assunto que será abordado mais à frente.

A figura 4, em que se observa o desenvolvimento embrionário em dias, permite compreender melhor qual a base para distinguir as várias fases de desenvolvimento e assim perceber de que tipo de mortalidade se trata.



Figura 4 - Desenvolvimento embrionário em dias (Adaptado de *Cobb-Vantress*, 2008)¹⁰³.

3.2.1. Infertilidade verdadeira

A infertilidade verdadeira pode dever-se a uma incorreta relação macho/fêmea (maior ou menor), bandos mais velhos ou muito novos, machos ou fêmeas com excesso de peso, problemas locomotores nos machos, entre outros. Esta é difícil de distinguir da mortalidade embrionária precoce devido ao não desenvolvimento embrionário, contudo as empresas de seleção indicam que é possível a sua distinção na medida em que o blastoderme fértil apresenta a forma de um anel de bordas uniformes e lisas, e sem a presença de bolhas, quando pelo contrário o blastodisco infértil é caracterizado como um ponto branco, com bordas irregulares e aspeto de bolhas^{53,101,103,120,121}.

3.2.2. Mortalidade embrionária precoce

A mortalidade embrionária precoce, de um a sete dias de incubação, pode resultar de uma armazenamento prolongado e inapropriado¹²², pré-incubação prolongada, fumigação excessiva, transporte inapropriado e condensação na superfície do ovo.

Esta mortalidade pode também dever-se a causas incidentes no pavilhão (tendo em conta que na altura da postura um ovo já tem aproximadamente 50000 células embrionárias). Essas causas poderão ser uma menor frequência na recolha dos ovos, ovos contaminados (sujos ou de chão) e má manipulação dos mesmos^{53,101,103,120,121}.

Neste caso, se a mortalidade ocorrer nos três a quatro dias de incubação observa-se o aparecimento de sangue; com quatro a cinco dias observa-se o anel de sangue e com seis a sete dias visualiza-se o olho negro (figura 4)¹⁰³.

3.2.3. Mortalidade intermédia

A maioria dos embriões tende a sobreviver a este período de crescimento rápido, que decorre dos sete aos catorze dias de incubação. No entanto, deficiências nutricionais das mães aumentam a mortalidade neste estágio, assim como a contaminação do ovo e condições inadequadas de incubação^{53,101,103,120,121}.

Neste período, aos sete dias começa a aparecer o bico, aos nove apresenta folículos das penas em várias regiões e, a partir do 11º dia surge a penugem que aumenta progressivamente (figura 4)¹⁰³.

3.2.4. Mortalidade tardia

A mortalidade tardia, que ocorre entre os 15 e os 19 dias de incubação/eclosão, altura em que o feto já está completamente formado, pode ser devida a danos causados nos ovos na altura da transferência, fumigação excessiva na eclosora, ovos invertidos, volteio inadequado, temperatura e humidade relativa não adequadas na incubadora e eclosora¹²³, contaminação dos ovos, insuficiente perda de água ou, pelo contrário, desidratação excessiva (ex: no caso dos ovos de maiores dimensões estes têm maior dificuldade em perder água; no caso dos ovos mais pequenos, estes ficam mais facilmente desidratados). Podem surgir também ovos bicados, por exemplo devido a volteio inadequado^{53,101,103,120,121}.

Da mesma forma que na mortalidade intermédia, carências nutricionais das mães podem também ser uma causa de mortalidade^{53,101,103,120,121}.

Neste caso o que se observa na abertura do ovo é: aos 15 dias começa a haver a absorção das vísceras para o interior da cavidade celómica, aos 17 dias o feto está posicionado com a cabeça entre os pés, aos 18 dias o feto ocupa praticamente todo o ovo e tem a cabeça posicionada por baixo da asa direita, aos 19 dias o saco vitelino é absorvido para o interior da cavidade celómica e o líquido amniótico é totalmente absorvido, e, por último, aos 20 dias apresenta a cabeça na câmara-de-ar e o ovo pode estar bicado, figura 4¹⁰³.

3.2.5. Malformações

Aquando da triagem dos pintos podem ser encontradas as seguintes malformações:

- i)* presença do cordão umbilical, que é devida a humidade muito alta durante a incubação;
- ii)* “botão negro” na região do umbigo, que é resultado de alta temperatura durante a incubação e eclosão ou baixa temperatura e alta humidade na eclosora e contaminação (consiste fundamentalmente de uma onfalite);
- iii)* “cérebro exposto”, que resulta de altas temperaturas no início da incubação;

- iv) “vísceras expostas”, que são devidas a altas temperaturas na fase intermédia da incubação;
- v) presença de membros extra (hipermelia), que se deve à brutalidade no maneiio dos ovos (coleta e transporte);
- vi) presença de aves muito sujas nalgumas bandejas de eclosão significa, que se encontravam numa região da eclosora em que a ventilação não era a adequada^{53,101,103,120,121}.

4. Biossegurança

Em termos de biossegurança, dois aspetos podem ser equacionados. O primeiro diz respeito à natureza da produção animal, extensiva ou concentrada. Na realidade, quanto mais elevada for a eficiência alimentar, menor será o impacto ambiental por unidade de massa alimentar produzida, uma vez que será proporcionalmente menor a quantidade de alimentos ingeridos pelos animais. Dessa forma, menor será a quantidade de alimento de origem vegetal produzida e ingerida por unidade de massa alimentar de origem animal, produzida¹²⁴. A ideia de que é mais ecológica a produção animal extensiva pode constituir um mito; aquele de que, associada a uma elevada eficiência dos animais de produção estarão consequências nefastas para o ecossistema, quando se verifica o contrário. O segundo diz respeito à segurança alimentar propriamente dita, e que integra aspetos *food security e food safety*¹²⁵. A União Europeia pressupõe uma alimentação abundante, a custo acessível e de elevado valor nutritivo, o que estará inevitavelmente associado à maximização da eficiência produtiva, também na vertente animal.

Em todo o caso, o risco está sempre presente, também na indústria alimentar, devendo ser analisado, compreendido e minimizado, de acordo com perspectivas científica e racional, psicológica, ideológica, política e económica. A questão do risco em segurança alimentar terá de ser analisada, gerida e comunicada. Na análise é necessário identificar e caracterizar o perigo, avaliar a exposição e caracterizar o risco. Na gestão do risco é necessário regulamentar e controlar em conformidade¹²⁵.

Em biologia o risco zero não existe, mas, ao longo da cadeia alimentar, desde a produção até ao prato, o risco sanitário dos alimentos pode e deve ser minimizado¹²⁶. Além disso, novos desafios em biossegurança se levantam na atualidade, como a

expansão da alimentação coletiva (cantinas, catering, etc.), alimentos preparados industrialmente e distribuídos à escala mundial e uma maior proporção de indivíduos imunocomprometidos (HIV, sob quimioterapia, diabéticos, idosos, etc.)¹²⁵.

A biossegurança em avicultura consiste nas normas e medidas preventivas aplicadas na exploração, de modo a evitar a introdução de agentes infecciosos e prevenir a disseminação de uma doença que afeta um determinado bando. Se as medidas forem corretamente aplicadas obtêm-se um rendimento ótimo das aves e o seu bem-estar, assim como se salvaguarda a segurança alimentar. Todos os biocidas utilizados têm que ser devidamente aprovados pela Direcção-Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV)¹²⁷. De salientar que os desinfetantes não são eficazes na presença de matéria orgânica^{15,37,104}.

Estas medidas devem estar presentes logo na criação das instalações. Os pavilhões devem ser suficientemente distantes uns dos outros, estar localizados numa área isolada, a, pelo menos, 3,2 km de distância dos demais, e serem construídos longe de vias por onde possam circular viaturas para o transporte de aves ^{15,37}. Na prática, muitas doenças são transmitidas por via aérea, principalmente doenças do sistema respiratório como a bronquite infecciosa, a laringotraqueite infecciosa (ILT) e outras, causadas por agentes de grande importância como o *Mycoplasma gallisepticum* ou os vírus da influenza e da doença de Newcastle.

Os pavilhões devem possuir um perímetro vedado para impedir a entrada de visitantes e a construção deve ser projetada de forma a evitar a entrada de aves silvestres e roedores, que são vetores de doenças ^{37,104,123,128}; para além disso a área envolvente deve ser limpa, de forma a impedir a criação de habitats para estas espécies^{15,37}.

À entrada da exploração os veículos são lavados e desinfetados com uma máquina de água sob pressão, dando especial atenção às rodas^{37,104}. Os rodolúvios não devem ser utilizados, pois são eles próprios um meio de cultura de agentes infecciosos e, adicionalmente, devido ao facto da maior parte dos desinfetantes serem pouco eficazes na presença de matéria orgânica.

Antes da entrada de pessoal nos núcleos, existe o filtro sanitário^{15,37,104}, que é dividido em duas zonas. A zona suja, onde se deixa a roupa que veio do exterior, de seguida toma-se banho (medida obrigatória) e, por último, existe a zona limpa, onde se veste a

roupa a utilizar unicamente no núcleo. À entrada dos pavilhões deve-se trocar de calçado, porque no pavimento que rodeia os pavilhões podem existir dejetos de animais silvestres, nomeadamente aves, os quais, como já referido, constituem um meio de propagação de agentes infecciosos.

O calçado a utilizar nos pavilhões é passado por um pedilúvio (por exemplo uma esponja embebida numa solução à base de iodo, sendo que o iodo é mais efetivo na presença de matéria orgânica).

Todos os objetos devem ser fumigados antes da sua entrada no núcleo, pois podem ser vetores mecânicos de agentes infecciosos.

A ração e a água de bebida podem também ser veículos de agentes patogénicos, sendo assim fundamental fazer uma correta desinfeção da água com hipoclorito de sódio, no tanque de abastecimento, que apresenta um período de atuação de 48 horas, para a sua ação ser efetiva. O cloro deve ser medido pelo menos uma vez por semana na extremidade da linha mais afastada do tanque, para averiguar se a desinfeção está a ser feita corretamente¹⁵.

Quanto à ração granulada, esta é submetida a tratamento térmico (são necessários aproximadamente 86°C, durante seis minutos, para que as contagens totais de bactérias viáveis caiam para menos de 10 organismos por grama) com o fim de destruir agentes infecciosos, sendo o principal a eliminar garantidamente, a *Salmonella spp.*⁵⁷.

Por último, mas não menos importante, todos os trabalhadores da exploração não devem ter contato com outras aves, nem mesmo aves domésticas, como psitacídeos, por exemplo, como forma de evitar contaminações cruzadas.

É de extrema importância que todas estas medidas sejam cumpridas com o máximo rigor, uma vez que só assim se consegue a prevenção da entrada e disseminação de uma doença na exploração e evitar perdas drásticas na produção.

4.1. Vazio sanitário

O vazio sanitário é realizado quando as aves saem do núcleo. É usado um sistema “tudo dentro, tudo fora”¹⁵, que determina que as aves entrem todas de uma só vez no pavilhão e saiam todas também ao mesmo tempo.

Durante o vazio sanitário a primeira coisa a fazer, após a retirada da cama, é a aplicação de cipermetrina ou espinosade¹²⁹ por pulverização, ambos inseticidas aprovados para uso pecuário pela DGAV¹²⁷. O uso destes inseticidas objetiva o controle de tenebríões (*Alphitobius diaperinus*), uma vez que, mal a temperatura desce no pavilhão, após a retirada das aves, eles fogem para as paredes, para se esconderem. Estes são insetos que existem na cama e são vetores de agentes como *Clostridium perfringens*¹³⁰, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*¹³⁰⁻¹³², *Campylobacter spp.*¹³³, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus spp.* e também vírus como o da influenza e das doenças de Gumboro, Newcastle e Marek, entre outros, e são considerados hospedeiros paraténicos de nemátodos e disseminadores de oocistos de *Eimeria spp.*¹³⁴. Para além disso, as aves podem também alimentar-se deste inseto, que liberta toxina que pode levar à sua morte e acabam também por não consumir o alimento que lhes é devidamente destinado¹³⁵. O seu controlo é importante para minimizar a população e assim reduzir as consequências apresentadas, tendo em conta que a sua eliminação é praticamente impossível^{136,137}.

A desinfecção não deve ser executada antes que todo o aviário (inclusive a área externa) tenha sido totalmente limpo e que todos os consertos necessários tenham sido efetuados.

Um passo muito importante durante o vazio sanitário é a fumigação das instalações. Esta é uma operação extremamente delicada, que só deve ser realizada por um profissional experiente e com máscara apropriada. Para esta ser eficaz a temperatura mínima dos pavilhões deverá ser de 21°C (o procedimento não produz o efeito desejado a temperaturas mais baixas, necessário para volatilização dos preparados). São realizadas duas fumigações, uma antes da colocação da cama, na qual as superfícies deverão estar húmidas (aumenta a humidade relativa, promovendo assim maior eficácia, uma vez que o formaldeído atua não só na sua forma gasosa, mas também quando condensa, na forma polimerizada) e outra após a montagem completa dos pavilhões. A instalação deve ficar

completamente selada durante 24 horas (para promover uma condensação uniforme e também para não haver perdas) e é feita a restrição à entrada de pessoal, durante esse período^{37,53,60,121,138}. Entre as duas fumigações é realizada uma nova desinfecção com um desinfetante à base de iodo e outro de alto espectro de ação, e podem ser efetuadas provas de crescimento em placa de cultura, verificando se existe algum crescimento nas mesmas, como forma de aferir se a fumigação anterior foi eficaz.

4.2. Vacinação

Dentro do tema abordado nesta dissertação encontra-se também o plano vacinal, sendo as vacinas, também elas, uma medida preventiva no combate aos agentes infecciosos.

As doenças abrangidas pelo plano vacinal são principalmente de origem vírica, relativamente às quais se verifica maior proteção vacinal, mas também de origem não vírica. As viroses contra as quais se realiza a vacinação são a doença de Newcastle (única vacina obrigatória para aves, no geral, em Portugal), a bronquite infecciosa, a doença de Marek (MDV), a doença de Gumboro (IBD), a varíola aviária, a encefalomielite, a anemia infecciosa (CAV), a síndrome da cabeça inchada (TRT) e a laringotraqueíte.

Os agentes de origem não vírica, contra os quais se vacina são a *Salmonella spp.*, MG, MS e Coccídias.

Numa primeira fase são utilizadas vacinas vivas, que promovem um elevado título de anticorpos e que estimulam o sistema imunitário através de estirpes normalmente atenuadas. Este estímulo traduz-se numa produção de anticorpos de curta duração; para proteção especialmente das próprias aves às quais são administradas. Na segunda fase podem utilizar-se as vacinas inativadas nas galinhas reprodutoras, nomeadamente na altura da transferência das aves, como meio de promover altos títulos de anticorpos específicos com a transferência de imunidade materna para a descendência. As vacinas inativadas promovem uma imunidade durante um longo período de tempo, pretendendo-se que dure um período de postura^{37,40}.

Nota: as estirpes vacinais devem estar de acordo com as estirpes de campo epidemiologicamente relevantes para a exploração.

4.2.1. Vias de administração

As vacinas utilizadas têm as seguintes vias de administração:

- i) in ovo (vacina viva) (ex: MDV);
- ii) via oculonasal através de *spray* de gota fina (vacina viva), que penetra nas vias respiratórias, levando ao desenvolvimento de imunidade celular eficaz contra agentes que atingem as vias respiratórias (ex: ND e BI).
- iii) via oronasal por *spray* de gota fina (vacina viva), de forma a atuar nas vias respiratórias e promover a imunidade celular, o que a faz dela uma via eficaz contra agentes infecciosos que afetam o sistema respiratório (ex: MG e MS);
- iv) via ocular (vacina viva), com função de estimular a imunidade celular, tornando-se uma via eficaz contra agentes que afetam o sistema respiratório (ex: ILT).
- v) via oral, na água de bebida com a ação de estimular a imunidade celular (vacina viva). Neste tipo de vacinação é muito importante a certificação de que a água não tem cloro, porque, por esta ser uma vacina viva, inutiliza-a. Abrem-se as embalagens da vacina dentro de água destilada e utiliza-se um protetor para a vacina, para evitar a sua destruição. Esse protetor pode também ter a função de corante, permitindo a visualização do encarregado, da correta ingestão da vacina pelas aves. Como regra geral, depois de abertas, estas vacinas apresentam uma validade de duas horas, pelo que se deve fazer uma *check-list*, de forma a não se perder tempo após a abertura da embalagem. O tempo é crucial, porque desde a abertura do frasco da vacina até à ingestão da mesma, é necessário executar os seguintes passos: sangra-se as linhas de água de bebida (demora aproximadamente 15-45 min, dependendo do pavilhão), acende-se as luzes e espera-se até se observar o corante azul na água. O período de duas horas abrange todo este tempo e ainda o tempo necessário para que as aves ingiram a vacina (ex: IBD, CAV, *Salmonella spp.*);
- vi) via oral, por ingestão de gota grossa (vacina viva) (ex: Coccídias, por ingestão dos oocistos);
- vii) por transfixação na membrana “alar” ou por escarificação sobre a face externa da coxa (vacina viva) (ex: varíola aviária e encefalomielite);

- viii) via intramuscular no músculo do peito ou da coxa (vacina viva ou inativada). Via usada no caso das vacinas inativadas, por estas terem um excipiente muito oleoso (ex: ND, BI, TRT à transferência das aves; MDV à saída da eclosora);
- i) via subcutânea na região do pescoço (vacina viva ou inativada) (alternativa ND em alguns casos, à via intramuscular) (ex: ND, BI, TRT à transferência das aves; MDV à saída da eclosora)^{15,37,139}.

VII. Avaliação de parâmetros hematológicos

1. Objetivo

Uma das maiores dificuldades na produção de aves é fazer um diagnóstico precoce em situações patológicas, sendo que este tipo de aves, que é uma presa na natureza, oculta sinais de doença, que só se manifestam em situações mais tardias.

O hemograma é uma ferramenta que permite a realização de um diagnóstico precoce, avaliar o estado de saúde das aves, a progressão clínica de uma doença e a resposta à terapêutica, para além de informar sobre o estado de saúde de populações, tendo em conta que é um espelho das condições orgânicas dos animais. Esta ferramenta já é utilizada na medicina de animais exóticos em aves, para além dos animais domésticos tradicionais e dos humanos.

Os eritrócitos e os leucócitos aviários podem ser avaliados com recurso a técnicas automáticas ou manuais. No caso específico deste estudo, no qual se recorreram a técnicas manuais, apenas se conseguiu contabilizar o número de eritrócitos (RBC) na corrente sanguínea e avaliar a sua morfologia, assim como realizar a contagem de leucócitos (WBC) e a fórmula leucocitária. Não se determinou o hematócrito (Htc), a concentração de hemoglobina, nem o número de reticulócitos ou de plaquetas.

Deve-se notar que, embora tenham sido estabelecidos intervalos de referência hematológicos para muitas espécies aviárias, os valores determinados podem variar de acordo com a estirpe, idade, sexo, estação do ano, ambiente e influência hormonal. O hematócrito e a contagem total de eritrócitos tendem a ser maiores em aves do sexo masculino, comparativamente a aves do sexo feminino e também tendem a aumentar com a idade. O valor do hematócrito tende a variar entre 35 e 55% ¹⁴⁰.

Assim, o objetivo do estudo em questão foi o estabelecimento das gamas hematológicas padrão para RBC, WBC e fórmula leucocitária, em galinhas reprodutoras pesadas da estirpe *Ross 308*, em várias idades e em ambos os sexos, no contexto de exploração na Sociedade Agrícola da Quinta da Freiria S.A.

2. Material e métodos

Para este estudo foram usadas galinhas reprodutoras de núcleos da Sociedade Agrícola da Quinta da Freiria S.A. As aves provieram de sete núcleos diferentes, sendo que de um desses núcleos (São Mamede) foram realizadas duas colheitas. Contudo, as aves usadas provieram de pavilhões diferentes, para não se correr o risco de colher sangue às mesmas aves, duas vezes. As idades escolhidas para as colheitas foram: 14, 16, 18 e 20 semanas de vida, no período de recria, e 30, 36 e 53 semanas de vida, no período de postura. Foram colhidas 20 amostras de cada grupo etário, das quais cinco pertencentes a machos e as restantes a fêmeas. Os pavilhões escolhidos dentro de cada núcleo foram selecionados, tendo em conta o estado de saúde das aves, que foi avaliado com base em parâmetros que incluíram a mortalidade e a uniformidade do bando. Para avaliar a uniformidade foram escolhidos os pavilhões com a média do peso das aves próximo do *standard* para a idade ³³.

A colheita foi realizada por venopunção, com recurso a seringas previamente preparadas com anticoagulante (solução comercial de heparina sódica), tendo o cuidado de eliminar o excesso do mesmo (apenas algumas gotículas são suficientes). A venopunção para colheita foi realizada usando uma agulha de calibre adequado ao tamanho dos animais, acoplada a uma seringa de insulina (1 mL) na veia ulnar superficial. Imediatamente após a colheita, as seringas foram invertidas várias vezes, para homogeneizar o sangue com a solução de heparina, promovendo a anticoagulação. As seringas de insulina podem ser observadas na figura 5.



Figura 5 - Material utilizado para a realização do hemograma e dos esfregaços sanguíneos, com a exceção das agulhas, da heparina líquida e do corante *Diff-Quick*.



Figura 6 - Pipeta de *Potain* (Fotografia gentilmente cedida pelo orientador).

Os anticoagulantes como o caso do ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA) causam eritrólise em muitas espécies de aves¹⁴¹⁻¹⁴³. Contudo, o uso de solução de heparina, também apresenta algumas consequências negativas para as tarefas propostas. Aquando da realização do esfregaço de sangue periférico a heparina causa alterações na morfologia das células e o esfregaço torna-se mais difícil de executar após várias horas de exposição¹⁴¹⁻¹⁴³. Os núcleos surgem como que manchados e os grânulos dos leucócitos podem não ficar devidamente corados¹⁴².

O sangue heparinizado deve ser analisado dentro de 12 horas (pode ocorrer alguma coagulação, após esse tempo) e os esfregaços de sangue devem ser executados imediatamente após a colheita (de preferência sem anticoagulante) para garantir uma coloração adequada dos leucócitos ¹⁴².

As colheitas foram realizadas pela manhã, cerca das nove horas, e as amostras levadas para o laboratório, para a determinação dos parâmetros referidos.

Para as determinações, nomeadamente para a contagem de eritrócitos e leucócitos, utilizou-se o método de contagem em câmara de *Neubauer* melhorada, que se pode observar na figura 7. Na figura 8 está esquematizado o plano de contagem celular da câmara de *Neubauer* ao microscópio ótico, o qual apresenta um quadriculado com 3 mm de lado e 0,1 mm de profundidade. Seguiram-se, ainda, os princípios gerais estabelecidos para a contagem em câmara de *Neubauer*^{142,143}. A contagem dos eritrócitos é realizada nos cinco quadrados centrais e a dos leucócitos em todo o quadriculado com 3 mm de lado (figura 8) e não apenas nos quatro quadrados grandes com 1 mm de lado, pois a impossibilidade prática de apenas lisar os eritrócitos, obriga à contagem dos leucócitos em conjunto com aqueles, na mesma diluição (200x) requerendo um volume maior para o efeito, de forma a permitir a necessária fiabilidade.



Figura 7 - Câmara de *Neubauer* melhorada (Fotografia gentilmente cedida pelo orientador).

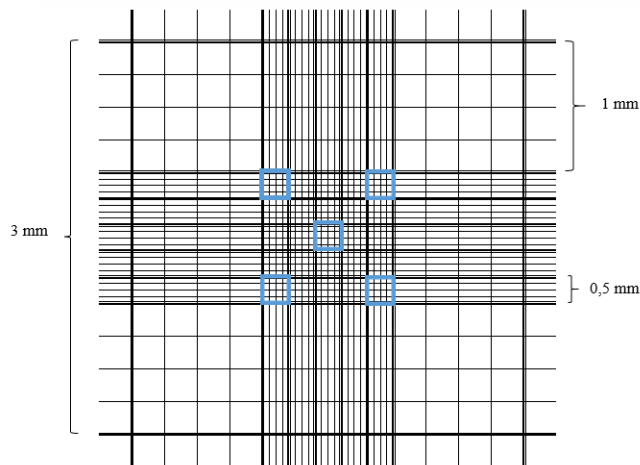


Figura 8 - Representação esquemática de uma plataforma de contagem da câmara de *Neubauer* melhorada, aquando da sua observação ao microscópio ótico. A azul encontram-se representados os quadrados onde se faz a contagem os eritrócitos (Adaptado de <http://www.celeromics.com/en/cell-count-products/counting-chambers.php>)¹⁸⁷.

Para a diluição do sangue (1:200 em solução de *Natt e Herrick*¹⁴²) aspirou-se a partir de um vidro de relógio para uma pipeta de *Potain* (figura 6), com o auxílio de uma pró-pipeta, sangue anticoagulado até à marca respetiva, e, de seguida, aspirou-se a solução de *Natt e Herrick* até à marca superior, obtendo-se a diluição de 1:200¹⁴³.

A pipeta foi agitada por rotação suave durante três a quatro minutos para diluição homogênea do sangue, e, após desprezo das primeiras quatro a cinco gotas, dispensado na câmara de *Neubauer*, previamente preparada. De seguida, colocou-se a câmara de *Neubauer* no microscópio ótico e procedeu-se à contagem dos eritrócitos e dos leucócitos (figura 9), na ampliação de 400x^{142,143}. Fez-se o registo da contagem e os cálculos relativos à diluição e aos volumes em que se contaram as células, para obter o número de eritrócitos e de leucócitos por mm³ de sangue. Basicamente, para determinar o número de eritrócitos por mm³ de sangue, consideraram-se os eritrócitos contados no volume dos cinco quadrados centrais (Figura 8), ou seja, em 0,02 mm³, fazendo a correspondência para 1 mm³ e multiplicando então pelo fator de diluição (200). Para determinar o número de leucócitos consideraram-se os leucócitos contados em toda a quadrícula da plataforma, ou seja, em 0,9 mm³, fazendo a correspondência para 1 mm³ e multiplicando então pelo fator de diluição (200).

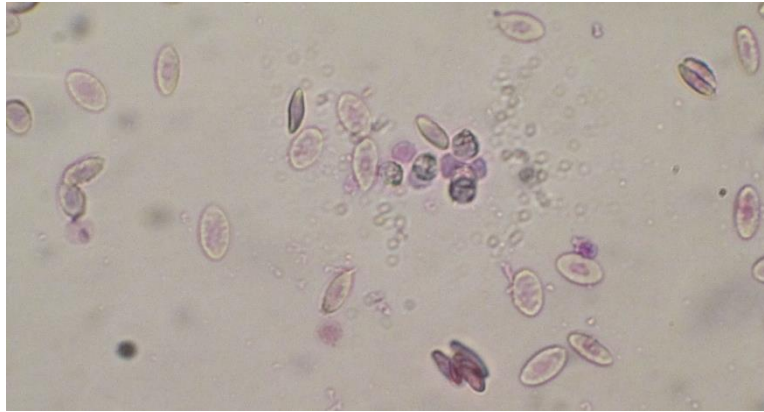


Figura 9 - Eritrócitos (células alongadas) e leucócitos (células redondas no centro da imagem), (observação ao microscópio ótico, em câmara de *Neubauer* melhorada, na ampliação de 400x).

Para determinação da fórmula leucocitária procedeu-se à contagem diferencial de leucócitos [heterófilos (H), linfócitos (L), monócitos (M), eosinófilos (E) e basófilos (B)] (figura 10) em citologia de esfregaço por escorregamento de sangue, corado segundo o método comercial de *Diff-Quick*.

Os esfregaços por escorregamento foram realizados, deslizando uma lâmina sobre a outra, num ângulo de 45°, arrastando e esgotando a pequena gota de sangue colocada sobre a primeira¹⁴³.

Para obtenção de uma citologia suficientemente homogênea e com monocamada celular, é fundamental realizar um movimento contínuo da segunda lâmina sobre a primeira. Desta forma, o esfregaço fica dividido em várias porções: cabeça, bordas, corpo e cauda. A sua observação faz-se ao microscópio ótico numa ampliação de 1000x, com objetiva de imersão. A contagem diferencial dos leucócitos é realizada na monocamada de células, que se encontra imediatamente antes da cauda do esfregaço.

Os esfregaços por escorregamento, primeiramente executados, são então deixados a secar ao ar e posteriormente corados pelo método comercial *Diff-Quick*, deixando-se novamente secar ao ar, antes de observados. O método *Diff-Quick* é composto por corantes de *Romanovsky*, que, para além do seu uso corrente em mamíferos, também é adequado para corar esfregaços de aves. No entanto, os resultados obtidos com diferentes tipos de

corantes *Romanovsky* podem ser ligeiramente diferentes¹⁴³. O *Diff-Quick* tem a vantagem de ser de rápida e fácil utilização.

Segundo Samour (2006)¹⁴³ os corantes de ação rápida como o *Diff-Quick* não permitem, contudo, qualidade adequada para a diferenciação de estruturas subtis de células sanguíneas e de hematozoários. Isto é particularmente importante no que diz respeito às características morfológicas dos granulócitos. O exame da citologia sanguínea oferece mais informações, para além da determinação da fórmula leucocitária, permitindo ainda avaliar a morfologia dos eritrócitos e dos leucócitos, incluindo variações da cor, dimensão e forma, e deteção de possíveis inclusões (ex: hemoparasitas, que igualmente poderão ser observados no sangue circulante).

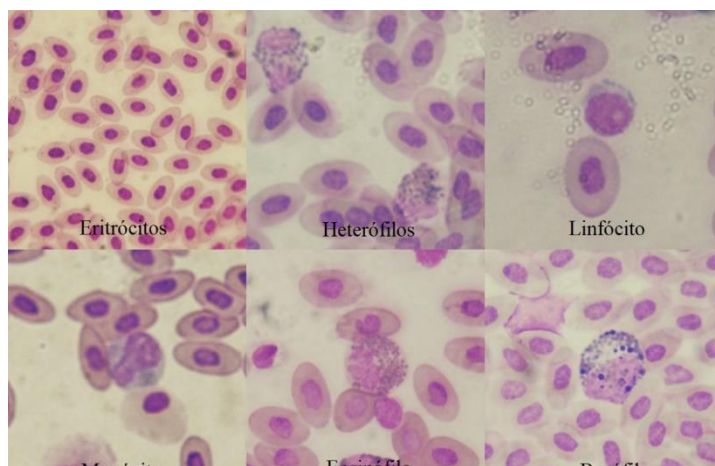


Figura 10 - Células sanguíneas (eritrócitos, heterófilos, linfócito, monócito, eosinófilo e basófilo) presentes nos esfregaços sanguíneos (Observação ao microscópio ótico na ampliação de 1000x).

3. Breve revisão bibliográfica sobre hematologia em aves

Todas as células do sistema imunitário são derivadas das células-tronco pluripotenciais, que se localizam principalmente na medula óssea dos ossos longos. Essas células dão origem a diversos tipos de elementos figurados do sangue, da linhagem mieloide (mastócitos, monócitos que maturam nos tecidos, dando origem aos macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, eritrócitos, trombócitos e células dendríticas) e da linhagem linfóide (linfócitos T, linfócitos B e células *natural killer*)¹⁴⁴.

Existem diferenças entre o sistema imunitário das aves e dos mamíferos, e mesmo nas células sanguíneas observadas.

Os eritrócitos das aves são nucleados e de dimensões superiores às dos mamíferos, e os leucócitos apresentam também diferentes morfologias e funções. Os eritrócitos das aves têm um tempo de semivida mais curto que o dos mamíferos, variando entre 28 e 45 dias, de acordo com a espécie¹⁴⁵. Como o *turnover* dos eritrócitos é muito mais rápido do que nos mamíferos é possível observar policromasia em aves saudáveis, associada à maior abundância de eritrócitos jovens¹⁴⁰. A policromasia é definida como a variação na cor ou tonalidade dos eritrócitos¹⁴⁵. Os eritrócitos jovens, designados de reticulócitos, podem ser observados no esfregaço sanguíneo e caracterizam-se como sendo eritrócitos ligeiramente maiores e com a cromatina nuclear menos condensada¹⁴⁵. Fisiologicamente constituem um a dois por cento dos eritrócitos e são indicativos de processo regenerativo, ao qual corresponderá o grau de policromasia. Há, porém, outras variações morfológicas eritrocitárias como a poiquilocitose, anisocitose, macrocitose (eritrócitos de maiores dimensões) e microcitose (eritrócitos de menores dimensões).

A anisocitose consiste na variação do tamanho dos eritrócitos, sendo ocasionalmente observada nas citologias de sangue periférico¹⁴⁶. Uma ligeira anisocitose não apresenta relevância clínica^{140,145}. A poiquilositose é definida como a variação na forma dos eritrócitos. Essas células têm uma meia vida mais reduzida que a dos outros eritrócitos e podem parecer redondas, alongadas ou irregulares. Os núcleos dos eritrócitos também podem variar em aparência, localização e número, ou mesmo estar ausentes. Os eritrócitos que parecem redondos com núcleos ovais são indicativos de maturação assíncrona, associada a eritropoiese acelerada. Eritrócitos binucleados indicam eritropoiese anormal e são frequentemente associados a doenças inflamatórias ou processos neoplásicos¹⁴⁵.

Apesar de, neste caso prático, não se ter calculado o hematócrito ou a concentração de hemoglobina, através do esfregaço sanguíneo também é possível perspetivar uma situação de anemia. Sendo estas classificadas em anemia ligeira (cinco a dez células policromáticas por campo de imersão), moderada (10 a 20 células policromáticas por campo de imersão) e grave (40 a 50 células policromáticas por campo de imersão)¹⁴⁷, e

também como regenerativa ou não regenerativa. A ausência de policromasia em situações de anemia aponta para um estado arregenerativo.

As anemias não regenerativas são mais frequentes em aves e estão geralmente associadas a uma diminuição da eritropoiese. As etiologias incluem doenças inflamatórias crônicas, doenças infecciosas crônicas como tuberculose, colibacilose, salmonelose e aspergilose, algumas doenças virais, exposição a tóxicos como chumbo ou aflatoxinas, deficiência em ferro, endocrinopatias como o hipotireoidismo e leucemia¹⁴⁵.

A anemia regenerativa está mais frequentemente associada a perda aguda de sangue ou a hemólise¹⁴⁰.

As anemias hemolíticas são muitas vezes de natureza regenerativa e indicadas pelo aumento da policromasia, macrocitose, anisocitose e reticulocitose. Transtornos que podem causar uma anemia hemolítica incluem a destruição de eritrócitos por septicemia bacteriana e toxicose aguda como nas aflatoxicoses^{140,145}.

As anemias hemorrágicas resultam de perda de sangue por traumatismo, parasitismo gastrointestinal, distúrbios da coagulação, rotura ou ulceração de órgãos, aneurismas e algumas doenças virais^{140,141,145,146}.

A policitemia é a condição na qual existe um aumento do hematócrito, nomeadamente dos eritrócitos, e é rara nas aves^{140,141,146}. A policitemia pode ser categorizada como absoluta ou relativa. A policitemia relativa deve-se a redistribuição de eritrócitos, a hemoconcentração primária ou a perda de volume plasmático, como resultado da desidratação^{145,148}.

Nas aves não há armazenamento de eritrócitos de reserva no baço, logo a policitemia relativa devida a redistribuição de eritrócitos não se observa. A policitemia absoluta encontra-se dividida em policitemia primária (policitemia vera) ou policitemia secundária. A policitemia vera é rara em aves^{140,146} e é causada por uma doença mieloproliferativa que resulta numa produção aumentada de eritrócitos^{140,148}. A policitemia secundária deriva de uma produção aumentada de eritropoietina como resposta a uma situação de hipoxia¹⁴⁵.

As condições de doença que levam a policitemia secundária incluem doença pulmonar crônica, doença cardíaca, doença de armazenamento de ferro, raquitismo, doença renal ou uma resposta fisiológica a elevada altitude^{140,148}.

As causas gerais de uma leucocitose em aves incluem inflamação, que pode estar associada a causas infecciosas, não infecciosas, hemorragia numa cavidade corporal, toxicidade e neoplasia de rápido crescimento, entre outras^{146,149}.

Leucopénia e heteropénia com a presença de heterófilos imaturos sugerem exaustão do armazenamento de heterófilos, devida à excessiva demanda de heterófilos, em caso de inflamação grave. Uma resposta degenerativa é refletida por uma leucopénia, heteropénia e presença de heterófilos imaturos e tóxicos¹⁴⁶.

Em muitas espécies de aves uma heteropénia absoluta leva a uma leucopénia. Em situações como septicémia bacteriana ou doença viral, uma produção reduzida de heterófilos na medula óssea ou ineficaz granulopoiese, devida a paragem de maturação, são possíveis causas que levam a leucopénia¹⁴⁶.

Uma leucopénia associada a uma heteropénia, anemia e trombocitopénia sugerem lesão na medula óssea, que pode ser associada a uma condição neoplásica¹⁴⁶.

Os leucócitos dividem-se em granulócitos (heterófilos, eosinófilos e basófilos) que contêm abundantes grânulos no seu citoplasma, e agranulócitos (linfócitos e monócitos).

Os heterófilos têm uma função semelhante aos neutrófilos dos mamíferos e são a principal célula responsável pela resposta imunitária¹⁴⁰. Os heterófilos constituem a primeira linha de defesa contra agentes patogénicos, tendo funções como a fagocitose desses agentes¹⁴⁰.

Condições que causam uma heterofilia periférica incluem infeção (ex: bacteriana, fúngica, viral e parasitária), inflamação, *stress*, toxicidade, trauma e leucemia¹⁴⁰.

Situações de micobacteriose e aspergilose conduzem a heterofilia, geralmente associada a monocitose¹⁴⁰.

Existem dois tipos comuns de alterações observadas nos heterófilos durante o curso dos processos de doença nas aves. Uma delas é a presença de heterófilos imaturos

no sangue periférico, no qual raramente estão presentes em estado fisiológico. No entanto, quando surgem em maior quantidade que os heterófilos maduros, a situação resulta da sua utilização periférica excessiva, com o esgotamento do seu armazenamento no tecido hematopoiético, o que indica uma resposta inflamatória severa, especialmente quando associada a uma leucopénia¹⁴⁰. A outra alteração importante observada nos heterófilos durante a doença é uma modificação tóxica¹⁴⁰. A presença de heterófilos tóxicos está associada a doenças sistémicas graves. O grau de toxicidade dos heterófilos relaciona-se, geralmente, com a gravidade da condição da ave^{140,149}, mas deve-se ter em atenção na interpretação da citologia sanguínea, porque alterações indicativas de toxicidade dos heterófilos, como é o caso da desgranulação, podem resultar de um artefacto do esfregaço e não de uma situação real¹⁴⁰.

As populações de leucócitos são marcadamente influenciadas pelo *stress*, sendo que, nestas situações, se verifica um aumento da população de heterófilos e uma diminuição do número de linfócitos. Uma heteropénia pode ocorrer durante uma situação de *stress* grave¹⁵⁰.

As funções apontadas para os linfócitos das aves são as mesmas que nos mamíferos. Os linfócitos B são, no entanto, produzidos na bolsa de Fabricius até à maturidade sexual da ave, sendo que, depois, a sua produção decorre no baço, sendo essencialmente responsáveis pela imunidade humoral, enquanto os linfócitos T, dependentes do timo, atuam diretamente na imunidade celular.

A relação heterófilos: linfócitos (H:L) é utilizada com forma de medir o nível de *stress* nas aves. No entanto, parece ser um indicador pouco fiável, devido à falta de correlação entre essa proporção e as concentrações plasmáticas de corticosterona¹⁴⁹.

Os linfócitos apresentam grande variação no seu tamanho, aquando da observação do esfregaço sanguíneo, o que faz com que seja de difícil distinção de outras células. Quando são de pequenas dimensões podem confundir-se com trombócitos, se de maiores dimensões, por vezes, podem ser confundidos com monócitos¹⁴⁰.

A presença ocasional de um linfócito reativo pode verificar-se em esfregaços de sangue de aves em situação normal, ainda que a sua ocorrência sugira estimulação antigénica associada a doença infecciosa. Esse aumento é justamente observado em aves

com doenças infecciosas. Essas células podem, igualmente ser neoplásicas, indicando leucemia linfóide ou uma fase leucêmica de linfoma¹⁴⁰.

Os monócitos diferenciam-se em macrófagos nos tecidos e constituem a primeira linha de defesa imunológica contra agentes patogênicos. Realizam a fagocitose de agentes patogênicos e produzem interleucina 1, atuando, assim, como mediadores da inflamação. Atuam também como células apresentadoras de antígenos e realizam a fagocitose de detritos celulares¹⁴⁶.

A monocitose é observada em doenças infecciosas ou inflamatórias, especialmente com componente granulomatosa¹⁴⁶, como a aspergilose ou a micobacteriose. Outros granulomas bacterianos ou necrose maciça do tecido podem induzir também a monocitose^{140,141}. É mais comum em situações de inflamação crônica, no entanto, situações de infecções agudas, como infecções por *Mycoplasma spp.*, podem levar a monocitose, além de heterofilia e linfopénia^{140,151}. Outras causas como a reação a corpos estranhos ou deficiências alimentares, como a deficiência em zinco¹⁵² podem levar a monocitose^{140,146}.

A função exata dos eosinófilos das aves ainda não está clara, mas a composição dos seus grânulos é semelhante à dos mamíferos. Alguns estudos revelam certa associação entre o incremento dos eosinófilos e infecções parasitárias em algumas espécies, mas em geral, os antígenos parasitários não induzem eosinofilia nas aves. Outros estudos indicam que existe eosinofilia em situações inflamatórias^{140,149,151}.

É possível que os eosinófilos das aves tenham papel nas respostas de hipersensibilidade tardia, mas não são observados em respostas de hipersensibilidade aguda ou de anafilaxia^{140,146,149}. Apesar do conhecimento limitado sobre a função dos eosinófilos nas aves, a eosinofilia periférica pode ser interpretada vagamente como sendo uma resposta ao parasitismo interno ou externo ou à exposição a antígenos (ou seja, resposta de hipersensibilidade)^{146,149}.

Uma situação de eosinopénia pode ser difícil de documentar em aves, mas quando presente espera-se que esteja associado a uma resposta ao *stress*^{146,149}.

As funções dos basófilos não estão totalmente estabelecidas. Parecem estar envolvidos nas fases iniciais da inflamação aguda, mas nem sempre esta situação vem

acompanhada de basofilia¹⁵³. Suspeita-se que tenham um papel nas reações de hipersensibilidade tipo IV ¹⁴¹. Como os basófilos das aves produzem, armazenam e libertam histamina¹⁴⁶, eles podem ter uma função semelhante à dos basófilos e mastócitos de mamíferos^{140,149}.

O *stress* ambiental, a restrição alimentar, o parasitismo e a exposição a tóxicos conduzem frequentemente a basofilia^{30,154}.

Os trombócitos são também observados no esfregaço sanguíneo e, no caso das aves, têm origem numa célula-tronco, ao contrário das plaquetas de mamíferos que provêm de megacariócitos^{140,145,146}.

Pode realizar-se a contagem dos trombócitos através do método manual, no qual se considera normal a presença de um ou dois trombócitos por campo de imersão (1000x)¹⁵⁵.

A função dos trombócitos é a de promover a hemostase e a coagulação, perante danos vasculares. Para além disso, apresentam capacidade fagocitária, auxiliando na remoção de detritos celulares. Detêm também a função adicional de poderem substituir os eritrócitos em situações de anemia grave¹⁴⁵.

Uma situação de trombocitopénia pode ocorrer devido ao aumento da destruição ou da demanda excessiva, como em situações de septicémia ou coagulação intravascular disseminada, supressão da medula óssea, neoplasias do tecido hematopoiético e em algumas doenças virais^{145,146}.

4. Resultados

Os resultados obtidos com o hemograma estão apresentados nas tabelas 5 (machos) e 7 (fêmeas) e as correlações entre os parâmetros avaliados são apresentadas nas tabelas 6 (machos) e 8 (fêmeas).

Tabela 5 - Média, desvio padrão (σ), coeficiente de variação (CV), valor mínimo e máximo e número de amostras (n) de parâmetros hematológicos de machos com 14, 16, 18, 20, 30, 36 e 53 semanas de vida.

		RBC (μ l)	WBC (μ l)	H (%)	L (%)	M (%)	E (%)	B (%)
14 semanas	Média	3.180.000,00	6.177,40	41,60	56,80	4,20	0,80	0,60
	σ	2.820.496,41	5.068,51	24,18	16,51	2,39	0,84	0,89
	CV (%)	3.180.000,00	6.177,40	41,60	56,80	4,20	0,80	0,60
	Mínimo	1200000,00	1555,00	22,00	31,00	1,00	0,00	0,00
	Máximo	8000000,00	14222,00	83,00	74,00	7,00	2,00	2,00
	n	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
16 semanas	Média	3.198.000,00	11.066,66	34,20	54,00	7,00	4,60	0,20
	σ	552.286,16	3.187,16	13,31	18,41	1,87	4,93	0,45
	CV (%)	17,00	29,00	39,00	34,00	27,00	107,00	224,00
	Mínimo	2520000,00	8222,20	24,00	23,00	5,00	0,00	0,00
	Máximo	4060000,00	16222,20	54,00	66,00	10,00	13,00	1,00
	n	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
18 semanas	Média	2.368.000,00	10.577,78	39,20	49,00	8,40	2,80	0,60
	σ	510.068,62	8.408,70	18,02	19,69	2,88	0,84	0,55
	CV (%)	22,00	79,00	46,00	40,00	34,00	30,00	91,00
	Mínimo	1980000,00	3333,30	12,00	28,00	5,00	2,00	0,00
	Máximo	3170000,00	25111,12	58,00	79,00	12,00	4,00	1,00
	n	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
20 semanas	Média	2.796.000,00	27.199,60	46,80	44,60	9,20	1,20	0,60
	σ	727.550,69	24.958,75	23,05	22,59	4,32	0,84	1,34
	CV (%)	26,00	92,00	49,00	51,00	47,00	70,00	224,00
	Mínimo	1970000,00	10888,00	19,00	23,00	2,00	0,00	0,00
	Máximo	3790000,00	71111,00	71,00	68,00	13,00	2,00	3,00
	n	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
30 semanas	Média	3.401.000,00	14.311,11	44,80	41,40	10,80	2,80	0,20
	σ	1.460.018,84	12.513,30	8,67	6,27	6,94	0,84	0,45
	CV (%)	43,00	87,00	19,00	15,00	64,00	30,00	224,00
	Mínimo	1780000,00	666,67	30,00	33,00	5,00	2,00	0,00
	Máximo	4570000,00	33555,56	50,00	49,00	22,00	4,00	1,00
	n	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
36 semanas	Média	6.864.000,00	18.311,11	36,20	51,80	10,60	0,40	1,00
	σ	2.330.843,20	8.658,97	12,81	12,99	5,03	0,55	0,71
	CV (%)	34,00	47,00	35,00	25,00	47,00	137,00	71,00
	Mínimo	6440000,00	9777,78	22,00	37,00	8,00	0,00	0,00
	Máximo	10230000,00	28444,44	54,00	61,00	15,00	1,00	2,00
	n	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
53 semanas	Média	5.482.000,00	27.733,34	63,00	26,60	9,80	0,40	0,20
	σ	1.365.639,04	15.396,33	5,43	7,33	4,44	0,55	0,45
	CV (%)	25,00	56,00	9,00	28,00	45,00	137,00	224,00
	Mínimo	4150000,00	11555,56	56,00	18,00	6,00	0,00	0,00
	Máximo	6850000,00	48666,67	71,00	37,00	16,00	1,00	1,00
	n	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00

Tabela 6 - Coeficiente de correlação de *Pearson* entre os parâmetros hematológicos de machos com 14, 16, 18, 20, 30, 36 e 53 semanas de vida.

		RBC	WBC	H	L	M	E	B
14 semanas	RBC	1,000						
	WBC	-0,471	1,000					
	H	-0,350	-0,595	1,000				
	L	0,353	0,637	-0,976	1,000			
	M	0,163	-0,734	0,565	-0,684	1,000		
	E	-0,566	0,561	-0,363	0,250	-0,350	1,000	
	B	0,165	0,669	-0,622	0,772	-0,773	-0,134	1,000
16 semanas	RBC	1,000						
	WBC	-0,248	1,000					
	H	0,399	-0,207	1,000				
	L	-0,195	0,064	-0,970	1,000			
	M	-0,237	0,391	0,683	-0,813	1,000		
	E	-0,336	0,214	0,634	-0,799	0,840	1,000	
	B	0,873	-0,499	0,328	-0,091	-0,299	-0,522	1,000
18 semanas	RBC	1,000						
	WBC	-0,093	1,000					
	H	-0,050	-0,856	1,000				
	L	-0,011	0,881	-0,985	1,000			
	M	0,321	-0,565	0,297	-0,454	1,000		
	E	0,491	-0,509	0,617	-0,713	0,664	1,000	
	B	-0,388	0,244	-0,015	-0,070	0,285	0,327	1,000
20 semanas	RBC	1,000						
	WBC	-0,498	1,000					
	H	0,834	-0,301	1,000				
	L	-0,882	0,435	-0,988	1,000			
	M	0,612	-0,896	0,414	-0,516	1,000		
	E	-0,549	0,542	-0,192	0,310	-0,290	1,000	
	B	0,372	-0,131	0,587	-0,535	0,491	0,535	1,000
30 semanas	RBC	1,000						
	WBC	0,822	1,000					
	H	-0,298	-0,784	1,000				
	L	-0,461	0,083	-0,633	1,000			
	M	0,738	0,933	-0,786	0,020	1,000		
	E	0,372	-0,200	0,717	-0,982	-0,138	1,000	
	B	0,088	-0,073	0,335	-0,214	-0,306	0,134	1,000
36 semanas	RBC	1,000						
	WBC	0,703	1,000					
	H	-0,200	0,137	1,000				
	L	-0,142	-0,300	-0,928	1,000			
	M	0,809	0,312	0,002	-0,369	1,000		
	E	0,040	0,049	-0,869	0,928	-0,381	1,000	
	B	0,447	0,762	-0,414	0,354	-0,070	0,645	1,000
53 semanas	RBC	1,000						
	WBC	0,933	1,000					
	H	-0,348	-0,399	1,000				
	L	-0,336	-0,316	-0,734	1,000			
	M	0,921	0,915	-0,114	-0,587	1,000		
	E	0,029	0,141	0,756	-0,821	0,247	1,000	
	B	0,560	0,760	0,103	-0,655	0,781	0,612	1,000

(P-value para as correlações apresentadas <0,03).

Tabela 7 - Média, desvio padrão, coeficiente de variação, valor mínimo e máximo e número de amostras de parâmetros hematológicos de fêmeas com 14, 16, 18, 20, 30, 36 e 53 semanas de vida.

		RBC (µl)	WBC (µl)	H (%)	L (%)	M (%)	E (%)	B (%)
14 semanas	Média	3.813.533,33	9.866,66	33,67	59,00	5,07	1,87	0,33
	σ	1.779.814,23	5.984,57	13,31	15,23	3,97	1,36	0,49
	CV (%)	47,00	61,00	40,00	26,00	78,00	73,00	146,00
	Mínimo	1230000,00	2444,40	14,00	27,00	0,00	0,00	0,00
	Máximo	6840000,00	20444,40	57,00	81,00	16,00	5,00	1,00
	n	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00
16 semanas	Média	3.516.000,00	12.755,55	31,87	60,47	5,27	2,00	0,27
	σ	1.029.825,23	5.575,72	14,42	14,30	1,71	1,31	0,46
	CV (%)	29,00	44,00	45,00	24,00	32,00	65,00	172,00
	Mínimo	2080000,00	3111,10	10,00	36,00	3,00	0,00	0,00
	Máximo	5300000,00	19777,80	58,00	83,00	8,00	4,00	1,00
	n	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00
18 semanas	Média	3.480.000,00	14.444,45	28,53	62,07	7,13	3,87	0,27
	σ	742.534,27	5.651,86	13,32	15,30	3,25	7,29	0,46
	CV (%)	21,00	39,00	47,00	25,00	46,00	188,00	172,00
	Mínimo	2310000,00	4888,90	11,00	39,00	2,00	1,00	0,00
	Máximo	5340000,00	23333,30	45,00	82,00	13,00	30,00	1,00
	n	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00
20 semanas	Média	2.962.666,67	12.192,58	41,73	52,13	4,00	1,67	0,53
	σ	901.225,09	8.411,34	18,15	19,92	2,65	1,23	0,74
	CV (%)	30,00	69,00	43,00	38,00	66,00	74,00	139,00
	Mínimo	1590000,00	3777,70	17,00	16,00	0,00	0,00	0,00
	Máximo	5050000,00	31777,80	76,00	81,00	10,00	5,00	2,00
	n	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00
30 semanas	Média	3.388.933,33	18.162,96	42,87	46,53	7,20	3,27	0,20
	σ	1.247.151,01	8.727,29	10,25	11,93	2,91	2,02	0,41
	CV (%)	37,00	48,00	24,00	26,00	40,00	62,00	207,00
	Mínimo	1620000,00	3555,56	14,00	30,00	2,00	1,00	0,00
	Máximo	6410000,00	28444,44	55,00	75,00	14,00	6,00	1,00
	n	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00
36 semanas	Média	4.178.000,00	15.659,26	40,07	51,00	6,07	1,67	0,27
	σ	1.940.453,56	5.298,08	12,92	15,47	2,71	1,45	0,59
	CV (%)	46,00	34,00	32,00	30,00	45,00	87,00	223,00
	Mínimo	2610000,00	7333,34	12,00	26,00	1,00	0,00	0,00
	Máximo	10370000,00	25777,78	60,00	81,00	10,00	6,00	2,00
	n	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00
53 semanas	Média	4.104.000,00	16.740,74	45,80	47,80	5,47	0,93	0,20
	σ	1.260.168,92	8.634,73	12,21	11,45	2,45	0,80	0,56
	CV (%)	31,00	52,00	27,00	24,00	45,00	86,00	280,00
	Mínimo	2370000,00	5333,34	26,00	30,00	2,00	0,00	0,00
	Máximo	6740000,00	29111,12	64,00	65,00	11,00	3,00	2,00
	n	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00

Tabela 8 - Coeficiente de correlação de *Pearson* entre os parâmetros hematológicos de fêmeas com 14, 16, 18, 20, 30, 36 e 53 semanas de vida.

		RBC	WBC	H	L	M	E	B
14 semanas	RBC	1,000						
	WBC	0,184	1,000					
	H	0,097	-0,284	1,000				
	L	-0,187	0,249	-0,966	1,000			
	M	0,370	0,164	0,283	-0,508	1,000		
	E	0,124	-0,405	0,405	-0,471	0,148	1,000	
	B	-0,136	-0,043	-0,367	0,433	-0,418	-0,360	1,000
16 semanas	RBC	1,000						
	WBC	0,063	1,000					
	H	-0,014	-0,155	1,000				
	L	0,025	0,145	-0,981	1,000			
	M	-0,217	0,124	-0,027	-0,128	1,000		
	E	0,422	0,113	-0,042	-0,023	-0,032	1,000	
	B	0,316	-0,234	-0,081	0,078	-0,097	0,238	1,000
18 semanas	RBC	1,000						
	WBC	-0,040	1,000					
	H	0,419	-0,247	1,000				
	L	-0,393	0,333	-0,985	1,000			
	M	0,357	-0,535	0,459	-0,589	1,000		
	E	0,658	-0,027	0,154	-0,102	-0,084	1,000	
	B	-0,439	-0,135	0,303	-0,247	-0,362	-0,138	1,000
20 semanas	RBC	1,000						
	WBC	0,245	1,000					
	H	-0,219	0,330	1,000				
	L	0,243	-0,338	-0,991	1,000			
	M	-0,111	0,260	0,497	-0,583	1,000		
	E	-0,374	-0,051	0,295	-0,350	0,044	1,000	
	B	-0,157	0,122	-0,158	0,111	-0,182	0,285	1,000
30 semanas	RBC	1,000						
	WBC	-0,123	1,000					
	H	-0,397	0,172	1,000				
	L	0,372	-0,241	-0,930	1,000			
	M	0,109	0,082	0,358	-0,644	1,000		
	E	-0,263	0,447	-0,102	-0,205	0,465	1,000	
	B	-0,221	0,004	-0,128	0,165	-0,332	-0,068	1,000
36 semanas	RBC	1,000						
	WBC	0,277	1,000					
	H	-0,283	0,022	1,000				
	L	0,276	-0,110	-0,927	1,000			
	M	0,221	0,387	0,359	-0,521	1,000		
	E	-0,082	-0,308	0,143	-0,140	-0,249	1,000	
	B	0,144	-0,050	-0,189	0,109	0,166	0,111	1,000
53 semanas	RBC	1,000						
	WBC	0,598	1,000					
	H	-0,212	0,237	1,000				
	L	0,262	-0,257	-0,974	1,000			
	M	-0,118	0,097	-0,339	0,126	1,000		
	E	-0,455	-0,400	-0,075	0,100	-0,202	1,000	
	B	-0,033	-0,174	-0,286	0,174	0,344	0,032	1,000

(P-value para as correlações apresentadas <0,02).

5. Discussão

Analisando as tabelas 5 e 7, que dizem respeito ao hemograma das aves, observa-se um aumento do RBC com o avançar da idade, nos machos até às 30 semanas, e, a partir daí, ocorre um decréscimo das contagens até às 53 semanas. Contudo, apesar deste decréscimo, as aves com 36 e 53 semanas apresentaram contagens mais elevadas que as mais jovens, com 14, 16, 18 e 20 semanas.

Nas fêmeas não se observa um aumento do RBC tão evidente com o avançar da idade, como nos machos. Verificou-se um ligeiro decréscimo das contagens entre as 14 e as 20 semanas, e, depois, um aumento até às 53 semanas.

Comparando as contagens entre machos e fêmeas, observa-se que às 30, 36 e 53 semanas os machos apresentam um RBC superior, e inferior às 14, 16 e 18 semanas.

Relativamente às WBC, parece também haver, no geral, um aumento das contagens com o avançar da idade.

As contagens de linfócitos são superiores às dos heterófilos, exceto nos machos, às 20, 30 e 53 semanas.

Os machos apresentam também, no geral, contagens de monócitos superiores às fêmeas, e, no caso dos machos tendem a aumentar com a idade. Nas fêmeas observa-se um aumento das contagens até às 18 semanas, depois um decréscimo às 20, seguido de um aumento às 30. Depois voltam a decrescer até às 53 semanas.

Analisando a tabela 5, respeitante aos machos, observa-se que os resultados são muito heterogêneos, como se pode verificar pelo coeficiente de variação¹⁵⁶ e pelos valores mínimos e máximos. Os únicos parâmetros que apresentam um coeficiente de variação intermédio ($20\% < CV \leq 30\%$) são:

- i) leucócitos (CV = 29%) às 16 semanas;
- ii) eritrócitos (CV = 22%) às 18 semanas;
- iii) eritrócitos (CV = 26%) às 20 semanas;
- iv) heterófilos (CV = 19%) às 30 semanas;
- v) linfócitos (CV = 25%) às 36 semanas;
- vi) eritrócitos (CV = 25%) e linfócitos (CV = 18%) às 53 semanas.

Os únicos CV ($CV \leq 20\%$) baixos foram observados na contagem de linfócitos ($CV = 15\%$) às 30 semanas e na contagem de heterófilos ($CV = 9\%$) às 53 semanas.

Estes resultados devem-se provavelmente ao baixo número de amostras ($n = 5$).

Na tabela 6 são apresentadas as correlações entre os vários parâmetros analisados. Foi determinado o coeficiente de correlação de *Pearson*, que determina correlações lineares. Assim, essas correlações são positivas quando um dos parâmetros está associado ao aumento do outro ou, pelo contrário, são negativas, quando os parâmetros são inversamente proporcionais^{157,158}.

Foram registadas correlações positivas fortes (indicadas pela cor verde) entre os parâmetros:

- i) eritrócitos e basófilos às 16 às 53 semanas; eritrócitos e heterófilos às 20 semanas; eritrócitos e monócitos às 30, 36 e 53 semanas, e eritrócitos e leucócitos às 30, 36 e 53 semanas;
- ii) leucócitos e linfócitos às 14, 18 e 20 semanas; leucócitos e eosinófilos às 14 e 20 semanas; leucócitos e monócitos às 30 e 53 semanas, e leucócitos e basófilos às 14, 36 e 53 semanas;
- iii) heterófilos e monócitos às 14 e 16 semanas; heterófilos e monócitos às 14 semanas e heterófilos e eosinófilos às 18, 30 e 53 semanas;
- iv) linfócitos e basófilos às 14 semanas, e linfócitos e eosinófilos às 36 semanas;
- v) monócitos e eosinófilos às 16, 18 e 53 semanas;
- vi) eosinófilos e basófilos às 20, 36 e 53 semanas.

Verificaram-se correlações negativas fortes (indicadas pela cor azul) entre os parâmetros:

- i) eritrócitos e eosinófilos às 14 e 20 semanas, e eritrócitos e linfócitos às 20 semanas;
- ii) leucócitos e heterófilos às 14, 18 e 30 semanas, e leucócitos e monócitos às 14, 18 e 20 semanas;
- iii) heterófilos e linfócitos às 14, 16, 18, 20, 30, 36 e 53 semanas; heterófilos e basófilos às 14 e 36 semanas; heterófilos e monócitos às 30 semanas, e heterófilos e eosinófilos às 36 semanas;

- iv) linfócitos e monócitos às 14, 16, 20 e 53 semanas, e linfócitos e eosinófilos 16 e 30 e 53 semanas;
- v) monócitos e basófilos às 14 semanas;
- vi) eosinófilos e basófilos às 16 semanas.

Analisando a tabela 7, que diz respeito às fêmeas, observa-se que os resultados são muito heterogêneos, como se pode verificar pelo coeficiente de variação e pelos valores mínimos e máximos. Os únicos parâmetros que apresentam um coeficiente de variação intermédio ($20\% < CV \leq 30\%$) são:

- i) eritrócitos às 16, 18 e 20 semanas;
- ii) heterófilos e linfócitos às 30 e 53 semanas;
- iii) linfócitos às 36 semanas.

Não existe nenhum parâmetro com CV baixo.

Os intervalos para o CV foram estimados de acordo com a percepção da autora, relativamente à variação fisiológica observada.

Na tabela 8 observam-se as correlações entre os vários parâmetros analisados, tendo sido realizado o coeficiente de correlação de *Pearson*.

Foram registadas correlações positivas fortes (indicadas pela cor verde) entre os parâmetros:

- i) eritrócitos e eosinófilos às 18 semanas, e eritrócitos e leucócitos às 53 semanas.

Verificaram-se correlações negativas fortes (indicadas pela cor azul) entre os parâmetros:

- i) leucócitos e monócitos às 18 semanas;
- ii) heterófilos e linfócitos às 14, 16, 18, 20, 30, 36 e 53 semanas;
- iii) linfócitos e monócitos às 14, 18, 20, 30 e 36 semanas.

Avaliando as correlações, deve-se notar que, quer nos machos, quer nas fêmeas existe uma correlação negativa forte entre as contagens de heterófilos e de linfócitos, situação esta que se verificou para todas as idades.

Outra correlação negativa forte que se destaca em ambos os sexos ocorre entre os linfócitos e os monócitos. Esta correlação observa-se em todas as idades, exceto às 18, 30 e 36 semanas nos machos, e às 16 e 53 semanas nas fêmeas.

Observando os valores padrão para a espécie *Gallus gallus* (tabela 9), fornecidos por Johnson-Delaney e Harrison (1996) e igualmente referidos por Hawkins *et al.* (2013), podemos observar que os valores obtidos no estudo em questão se encontram praticamente todos dentro dos valores padrão¹⁵⁹, exceto para a contagem de monócitos nos machos, às 18, 20, 30, 36 e 53 semanas, que é superior, e para a contagem de heterófilos e linfócitos, às 53 semanas, que é, respectivamente superior e inferior. Para além disso, um WBC baixo foi também observado nos machos, às 14 semanas.

Tabela 9 - Valores padrão de hematologia para a espécie *Gallus gallus*. (Fonte: Johnson-Delaney CA e Harrison LR, 1996; referido por Hawkins *et al.*, 2013)^{159,176}.

RCB (10 ³ /μl)	WBC (10 ³ /μl)	H (%)	L (%)	M (%)	E (%)	B (%)
1,3-4,5	9-32	15-50	29-84	0,1-7	0-16	0-8

VIII. Avaliação de parâmetros bioquímicos usando *VetScan® i-STAT® 1 - ABAXIS*

1. Objetivo

Na clínica de animais de companhia os métodos auxiliares de diagnóstico, nomeadamente as análises hematológicas e bioquímicas são de uso corrente e essenciais para diagnóstico e tratamento de algumas doenças.

Na pecuária, no que toca à avicultura, o uso destes métodos não é, de todo, usado na prática clínica, sendo o diagnóstico baseado na anamnese, no exame clínico e na realização de necrópsias. Ao contrário das outras espécies animais, em que estão bem definidos valores de referência para os parâmetros hematológicos e bioquímicos, o mesmo não se aplica à generalidade das aves, devido à grande variabilidade de raças e estirpes comerciais.

As aves comerciais, devido à sua intensa seleção ao longo dos anos, tornaram-se muito suscetíveis a qualquer fator de *stress*, levando a uma diminuição brusca na produtividade. Na situação em estudo, essa diminuição reflete-se na produção de ovos incubáveis.

Outros problemas associados a elevada mortalidade são a tetania do cálcio das reprodutoras, as alterações no pH sanguíneo, os prolapsos vaginais, a rotura hepática e as lesões renais, entre outros. Estes problemas ocorrem com maior prevalência na fase inicial do período de postura, altura em que os incrementos de ração, a aferição dos sistemas de distribuição de ração e da pressão de água nas linhas de água, estão a ser aperfeiçoados de acordo com as necessidades do bando¹⁶⁰. Assim, o presente estudo apresenta especial ênfase nessa fase, período antes de se atingir o pico de postura (sensivelmente entre 20 e as 30 semanas de vida), tendo sido avaliadas aves de 23 e 27 semanas, de forma a detetar possíveis alterações nos parâmetros bioquímicos.

Para as determinações bioquímicas foi usado o equipamento *VetScan® i-STAT® 1* (ABAXIS, Califórnia, EUA). É um aparelho portátil, que permite a leitura de vários “cartuchos” de uso único que leem vários parâmetros sanguíneos. O “cartucho” usado, neste caso foi o CG8⁺, que lê os seguintes parâmetros: pH, excesso de base (BE), glucose (Glu), bicarbonato (HCO_3^-), ião cálcio, ião sódio (Na^+), ião potássio (K^+), pressão parcial de dióxido de carbono (PCO_2), pressão parcial de oxigénio (PO_2), saturação de oxigénio (sO_2), dióxido de carbono total (TCO_2), hemoglobina (Hb), hematócrito¹⁶¹. Os últimos dois parâmetros não foram avaliados, uma vez que foi utilizado soro e não sangue total.

A utilidade do *i-STAT®* já tinha sido comprovada em humanos¹⁶²⁻¹⁶⁴, quer para sangue inteiro, quer para sangue heparinizado, revelando a sua fácil utilização, tratando-se de um meio prático para obter valores de gasimetria e bioquímicas sanguíneas; posteriormente foi confirmada a sua eficiência em medicina veterinária^{165,166}.

Um estudo realizado para avaliação da eficácia do *i-STAT®* utilizando o “cartucho” EG7⁺, que mede: pH, PCO_2 , PO_2 , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Hct, HCO_3^- , TCO_2 , BE, sO_2 e Hb, validou a utilização desta metodologia para a espécie *Gallus gallus*, comparando os resultados com os métodos tradicionais de análises dos gases sanguíneos e de componentes bioquímicos. A validade do *i-STAT®* não foi, no entanto, comprovada para

os parâmetros potássio e excesso de base, cujos resultados mostraram grande discrepância em relação aos métodos tradicionais¹⁶⁷.

2. Material e métodos

Para este estudo foram usadas galinhas reprodutoras de núcleos da Sociedade Agrícola da Quinta da Freiria S.A., que provinham de quatro núcleos diferentes, sendo que foram colhidas 20 amostras de cada um. Os pavilhões escolhidos, dentro de cada núcleo, foram selecionados tendo em conta o estado de saúde das aves, que foi determinado com base na mortalidade e na uniformidade das mesmas. Para avaliar a uniformidade foram escolhidos os pavilhões com a média do peso das aves mais próxima do *standard*³³ para a idade. Contudo, devido a problemas técnicos, não se conseguiram avaliar 28 amostras, correspondentes às 27 semanas, pelo que, mais adiante, se observará que o número de amostras para as 23 semanas de vida foi de 80, enquanto para as 27 foi de 52.

A colheita foi realizada às 23 e, posteriormente, às 27 semanas de vida, ao mesmo grupo de aves, de forma a avaliar a evolução dos parâmetros em questão.

A hora escolhida para a colheita foi as 14 horas, de forma a evitar o aparecimento de soro lipémico.

A colheita foi realizada por venopunção, com recurso a uma lâmina de bisturi, na veia ulnar superficial, para um tubo de ensaio seco. Os tubos em questão chegaram ao laboratório cerca das 18 horas, foram centrifugados durante cinco minutos, o soro foi colhido, armazenado em tubos de *ependorf* e congelado a uma temperatura de até -18°C (temperatura mínima atingida pelo congelador usado). Aquando do seu processamento, as amostras foram descongeladas à temperatura ambiente.

Os “cartuchos” da referência CG8⁺, usados para leitura no aparelho *i-STAT*®, foram guardados no frigorífico, que idealmente deve estar a uma temperatura entre dois a oito graus célcus, como indicado no manual de utilização¹⁶¹ e foram colocados à temperatura ambiente, pelo menos, cinco minutos antes da sua utilização. O aparelho *i-STAT*® é ligado e só depois de se fazer a leitura do código de barras do “cartucho”, é que

são abertas as respectivas embalagens, sempre com especial cuidado, de forma a não tocar nos locais de contacto com a amostra¹⁶¹.

Para a análise, uma porção de 100 µL foi retirada, com recurso a uma micropipeta de 100 µL, a partir de uma amostra de soro previamente descongelada, sendo aplicada no depósito do “cartucho”. O mesmo foi fechado e colocado no aparelho *i-STAT*®, para reação, e os resultados ficaram prontos em dois a três minutos¹⁶¹.

Quando os resultados estão fora do intervalo de leitura aparecem os seguintes sinais: < ou >, que indicam que o valor é menor ou maior, respetivamente, do que o valor mínimo e máximo admissíveis para determinação, pelo equipamento. Como as determinações realizadas por este equipamento são de elevada precisão, assim que o sistema deteta que o resultado não vai ser fiável, não mostra qualquer resultado, aparecendo o símbolo ***¹⁶⁸.

Na figura 11 encontram-se os materiais usados nesta atividade, excetuando a centrífugadora.



Figura 11 - Material utilizado para a avaliação dos parâmetros bioquímicos do sangue periférico das aves. Podem ser observados o aparelho *i-STAT*®, um “cartucho” CG8⁺, a micropipeta de 100µl, as pontas para a micropipeta e um tubo de *ependorf*.

3. Revisão da bibliografia acerca dos parâmetros avaliados pelo *i-STAT*®

3.1. Gasimetria

A gasimetria venosa dá-nos informação sobre o estado ácido-base (pH, BE, HCO_3^-), sobre a ventilação (PCO_2) e oxigenação dos tecidos (PO_2)¹⁶⁹.

Pode ser realizada uma avaliação da gasimetria arterial ou venosa, de acordo como a função que se pretende avaliar. Uma avaliação do sangue arterial deve ser realizada quando se pretende avaliar a função respiratória, sendo que a pressão parcial dióxido de carbono arterial indica a capacidade de ventilação a nível dos parabrônquios, enquanto a pressão parcial de oxigénio arterial avalia a capacidade de oxigenação, exprimindo a eficácia das trocas de O_2 entre os parabrônquios e os capilares pulmonares, e depende diretamente da pressão parcial de O_2 no parabrônquio e da capacidade de difusão pulmonar desse gás. Pelo contrário, a avaliação do sangue venoso, caso se efetue, dá uma ideia da função metabólica de todo o sangue venoso. Se a amostra for de sangue periférico fornece informação sobre a função metabólica local¹⁷⁰.

As substâncias tampão são responsáveis por minimizar alterações do pH decorrentes da adição ou subtração de iões hidrogénio (H^+), sendo que o sistema bicarbonato/ácido carbónico é o mais importante tampão do espaço extracelular¹⁶⁹.

A partir da seguinte reação $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3 \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$ é possível deduzir a equação de Henderson Hasselbach, fundamental para o entendimento do equilíbrio ácido-base^{169,171}:

$$\text{pH} = \text{Pk} + \log \frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{H}_2\text{CO}_3]}$$

$$\text{pH} = \text{Pk} + \log \frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\alpha \text{PCO}_2]}$$

O ácido carbónico (H_2CO_3) pode ser representado pelo produto da constante α (que neste caso é 0,03 e que corresponde à solubilidade para o PCO_2) pela pressão parcial de CO_2 no sangue arterial que expressa a ventilação. Assim, pode-se observar, segundo a equação, que o pH é o rácio da concentração de HCO_3^- em relação à concentração de CO_2 dissolvido no fluido extracelular. Observa-se então que o pH depende da função metabólica (numerador) e da função respiratória (denominador)¹⁶⁹.

$$pH = \frac{[HCO_3^-] (Metabólica)}{[\alpha PCO_2] (Respiratória)}$$

Um mecanismo de compensação dos desequilíbrios ácido-base consiste na excreção de H^+ , sendo que pode ser realizado através da função respiratória, que é mais eficiente, através da hiperventilação. Pelo contrário, a hipoventilação constitui um mecanismo de poupança de H^+ . No entanto, através da função renal, A poupança de H^+ , com excreção de HCO_3^- , é mais eficaz do que por via respiratória¹⁶⁹.

Outro mecanismo de compensações, que ocorre por via renal, é a reabsorção de iões HCO_3^- através da excreção de H^+ , que se dá também na forma de amónia (NH_4^+)¹⁶⁹. No entanto, para que esta influência seja significativa, é necessário um período de 24 a 48 horas. Este mecanismo é mais completo do que por via respiratória, porque retorna o pH do sangue a níveis normais¹⁶⁹.

A avaliação do pH serve para determinar se está presente uma acidose (se pH abaixo de 7,35) ou uma alcalose (se o pH está acima de 7,45). Um pH normal não indica necessariamente a ausência de um distúrbio ácido básico, dependendo do grau de compensação. O desequilíbrio ácido-base é atribuído a distúrbios ou do sistema respiratório (PCO_2), que se encontra dentro dos limites 40 a 50 mmHg¹⁷⁰, sendo que a sua diminuição associada à redução do pH indica alcalose respiratória e o inverso indica de alcalose respiratória; ou do sistema metabólico (HCO_3^-)¹⁷¹, cujo intervalo de referência é 20 a 24 mmol/L ¹⁷⁰, sendo valores inferiores associados a pH baixo, indicativos de acidose metabólica e o inverso indica alcalose metabólica¹⁷¹. Deve-se ter em consideração que este são valores padrão para os pequenos animais e para sangue venoso.

O parâmetro BE representa o excesso ou déficit de base dissolvidos no plasma sanguíneo, sendo que o ideal para um correto equilíbrio ácido-base é este valor estar próximo de zero. O excesso de base representa todo o distúrbio ácido-base, sendo que valores mais baixos que - 4 mmol/L indicam acidose metabólica e valores superiores a 4 mmol/L indicam alcalose metabólica. Deve prestar-se atenção, pois estes valores são os indicados para os pequenos animais, uma vez que nas aves em estudo não existem valores de referência para este parâmetro¹⁷¹.

Na tabela 10 apresenta-se um resumo das desordens ácido-base. Pode observar-se quais os parâmetros alterados em cada desordem, sendo que o aumento ou a diminuição

dos mesmos está indicado, respetivamente pelas setas (\uparrow), (\downarrow) e também o seu mecanismo de compensação.

Tabela 10 - Desordens ácido-base (Adaptado de Rose, 2001; referido por Irizarry e Reiss, 2009)^{171,184}.

Condição	Desordem	Compensação
\downarrow pH e HCO_3^- (\downarrow BE)	Acidose metabólica	Excreção de pCO_2
\uparrow pH e HCO_3^- (\uparrow BE)	Alcalose metabólica	Retenção de pCO_2
\downarrow pH e \uparrow PCO_2	Acidose respiratória	Retenção de HCO_3^- (\uparrow BE)
\uparrow pH e \downarrow PCO_2	Alcalose respiratória	Excreção de HCO_3^- (\downarrow BE)

As aves são homeotérmicas, ou seja, têm mecanismos capazes de manter a sua temperatura corporal mais ou menos constante. A zona de neutralidade térmica está compreendida entre os 18°C e os 24,8°C (dependendo da humidade relativa)³⁷. Esta trata-se no fundo de uma gama particular de temperatura ambiental sobre a qual as aves não alteram o seu comportamento ou apresentam sinais de desconforto e usam a quantidade mínima de energia metabólica para manter uma temperatura normotérmica. Dentro da zona de neutralidade térmica, a temperatura corporal é mantida pela equação térmica, isto é, a produção de calor é igual à perda de calor¹⁷².

Um dos principais problemas dos bandos no verão é o aumento da temperatura ambiental que leva a hipertermia.

As aves possuem mecanismos de dissipação de calor, primeiro a perda de calor dá-se por mecanismos não evaporativos (condução, convecção e radiação)^{172,173} que são chamadas de trocas sensíveis, uma vez que para ocorrerem dependem de um diferencial de temperatura entre a superfície corporal da ave e a temperatura ambiente, logo quanto maior essa diferença, maior serão as trocas de calor. De forma a tornarem mais eficientes essas trocas, as aves manifestam comportamentos como abrir as asas e agacharem-se, a fim de aumentar a área de superfície corporal em contacto com ar.

Um outro mecanismo para baixar a temperatura corporal é o aumento da ingestão de água¹⁷³. A proporção entre o consumo de água e o consumo de alimento sólido é,

aproximadamente, de 1,8 para 1, em situações normais³⁷, o que quer dizer que aves consomem quase o dobro de água em relação à ração. Outros fatores como umidade elevada, estados febris e aspecto físico do alimento sólido, composição química do mesmo, nomeadamente no tocante aos eletrólitos (sódio, potássio, entre outros) podem levar ao aumento da razão água/alimento sólido supramencionada.

Quando a temperatura ambiente iguala a temperatura corporal da ave, os mecanismos não evaporativos de perda de calor deixam de surtir efeito, sendo que começa a haver perdas de calor por evaporação da umidade do trato respiratório, através do aumento da frequência respiratória (polípnea)¹⁷². Com a hiperventilação há excessiva perda de CO₂ reduzindo a sua concentração no plasma sanguíneo.

Como forma de retornar o pH à neutralidade o HCO₃⁻, que atua como tampão, é então excretado através da urina e com poupança de H⁺ pelo rim. Este ião tem carga negativa e necessita de estar ligado a um ião monovalente de carga positiva como o ião Na⁺ ou o ião K⁺ para ser excretado¹⁷⁴.

Uma vez que as necessidades de manutenção dependem da temperatura ambiente, o aumento desta última vai levar a um maior gasto energético nestas necessidades, reduzindo assim a energia a ser utilizada para as necessidades de produção, levando a uma diminuição da performance das aves.

3.2. Balanço eletrolítico

3.2.1. Iões sódio e potássio

Os iões desempenham um importante papel em manter o equilíbrio ácido-base, assim como a pressão osmótica. O seu desequilíbrio é prevenido com um correto balanço entre aniões e catiões nas formulações de rações.

Esses eletrólitos, em diferentes quantidades e proporções, mostraram-se benéficos para aves em situações de *stress* por calor. Existe assim a necessidade de definir a fonte e a quantidade adequada de eletrólitos para haver um balanço eletrolítico na dieta (DEB) adequado para o melhor desempenho das aves em diferentes condições ambientais¹⁷².

A correção do pH é conseguida pela suplementação de eletrólitos na água e mesmo através do alimento sólido. A proporção de eletrólitos na dieta é determinada pelo DEB que é definido pela fórmula: $DEB = (Na^+ + K^+ + Cl^-)$ miliequivalentes por kg¹⁷².

Os iões monovalentes [sódio, potássio e cloro (Cl⁻)] têm mais poder eletrolítico que os iões divalentes (magnésio, enxofre, fósforo e cálcio), sendo que estes foram removidos por Mongin (1981)¹⁷⁵ da equação de DEB. Isto deve-se ao facto de *i*) os iões bivalentes não serem tão rapidamente absorvidos como os iões monovalentes; *ii*) o magnésio ser comumente fornecido nas rações; *iii*) o fosfato ser difícil de quantificar por ser fornecido por diversas fontes; *iv*) a taxa de absorção de cálcio ser controlada pelo sistema endócrino; *v*) o cálcio ser suplementado na forma de carbonato de cálcio; *vi*) o sulfato ser incluído em pequenas quantidades como anião para oligoelementos essenciais ou para evitar a degradação da metionina^{172,175}.

Um DEB muito elevado ou muito baixo pode causar alcalose metabólica ou acidose metabólica. O excesso ou a deficiência de algum mineral em particular deve ser evitado¹⁷².

O aumento do consumo de água pode dever-se a um DEB elevado, aumentando as excreções das aves e proporcionando uma perda de qualidade da cama.

Relativamente ao sódio e ao potássio, em particular, uma vez que estes iões vão ser avaliados pelo *i-STAT*®, os seus valores de referência para a espécie *Gallus gallus* são de 131 a 171 mmol/L e de 3 a 7,3 mmol/L, respectivamente^{159,176}.

A importância do sódio prede-se com o facto de: *i*) ser encontrado principalmente em fluidos extracelulares e encontrar-se intimamente ligado com o equilíbrio ácido-base; *ii*) estar associado a processos de transporte celular; *iii*) estar envolvido na carga eléctrica ao longo das fibras nervosas que regula a função neuromuscular; entre outras.

Uma deficiência em sódio resulta numa diminuição da pressão oncótica e consequente desequilíbrio ácido-base. Uma situação de maior carência pode levar a falha cardíaca^{177,178}.

Elevadas quantidades de sal na ração são tóxicas e a dose letal é de aproximadamente quatro gramas por quilograma de peso corporal e as aves são muito menos tolerantes ao sal fornecido através da água do que através da dieta. Sinais de

intoxicação incluem sede intensa, fraqueza muscular pronunciada e movimentos convulsivos que precedem a morte. Hemorragias e congestão severa podem ocorrer no trato gastrointestinal, músculos, fígado e pulmões. Elevados níveis de sal também causam excreções muito diluídas^{177,178}.

Em relação ao íão potássio este é encontrado principalmente no compartimento intracelular do organismo. Os tecidos moles das aves contêm três vezes mais potássio do que sódio. A importância do potássio prende-se com: *i*) a sua função na manutenção do potencial da membrana e do equilíbrio dos fluidos celulares; *ii*) participar em numerosas reações bioquímicas; *iii*) ser necessário para a atividade normal do coração, reduzindo a contratilidade do músculo cardíaco e favorecendo o relaxamento; *iv*) ser responsável pela transmissão do impulso elétrico, entre outros^{177,178}.

As deficiências em potássio são raras, uma vez que a maior parte dos alimentos contêm potássio. O principal sinal clínico de deficiência é a fraqueza muscular generalizada, observando-se fraqueza dos membros e em casos mais graves levar a insuficiência cardíaca e respiratória. Aves gravemente afetadas podem exibir ataques tetânicos seguidos de morte^{177,178}.

3.2.2. Íão cálcio

O cálcio ionizado é cálcio livre e é biologicamente ativo no plasma e a sua determinação direta é muito mais rigorosa. Esta questão deve-se ao facto de o cálcio total poder sofrer variações de leitura devido a alterações na albumina (hipoalbuminémia) ou no pH (situação de alcalose ou acidose)¹⁷⁹.

O cálcio do sangue circula em duas formas, como cálcio ligado a proteínas e como cálcio ionizado³⁰.

O valor de referência do cálcio ionizado para a espécie *Gallus gallus* é de 3,3 a 5,925 mmol/L^{159,176}.

O cálcio é um dos elementos do plasma sanguíneo que é regulado com mais eficiência. As hormonas responsáveis pela regulação do cálcio reconhecidas nas aves são a hormona paratiroide (PTH), calcitocina (CT) e 1,25-dihydroxy vitamina D₃ (vitamina D₃)³⁰.

Dietas com baixo teor de cálcio causam uma redução significativa no cálcio ionizado no plasma sanguíneo, com uma diminuição ou uma queda completa na postura e regressão do ovário em seis a nove dias²¹.

A reabsorção de cálcio a partir do osso medular é regulada pela hormona PTH e 1,25-dihidroxitamina D₃, enquanto a absorção intestinal é mediada apenas pela 1,25-dihidroxitamina D₃. A importância dos dois órgãos como fontes de cálcio depende da concentração de cálcio na dieta³⁰.

Uma queda nos níveis plasmáticos de Ca²⁺ estimula a libertação da PTH e o seu aumento inibe a secreção desta hormona^{30,180}. Os principais alvos da PTH em aves são os ossos e os rins³⁰. A PTH aumenta a libertação de cálcio a partir do osso medular, estimulando a atividade dos osteoclastos, quando o ovo se encontra na glândula da casca³⁰ e induz o aumento da reabsorção de cálcio no rim.

A CT produz o efeito oposto da PTH, uma vez que bloqueia a osteoclase do osso medular quando o ovo está no magnum³⁰.

Relativamente à vitamina D₃, a sua conversão da forma inativa para a forma ativada ocorre pela 1-hidroxilação de 25-hidroxitamina D₃ no rim sob controlo hormonal de estrogénio e da PTH²¹.

O conteúdo mineral da casca do ovo é constituído por 97 a 98% de carbonato de cálcio, enquanto a restante percentagem consiste em carbonato de magnésio e fosfato tricálcico²¹.

O pH sanguíneo é assegurado pelo equilíbrio entre os iões HCO₃⁻ e o CO₂ dissolvidos, como já falado anteriormente.

No sangue dá-se a seguinte reação química: $CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3 \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$, neste caso específico, com o objetivo de se obter iões HCO₃⁻.

Na glândula da casca, o ião HCO₃⁻, através precipitação de carbonato (CO₃⁻) e libertação de H⁺, leva à formação do CaCO₃¹⁷³. A anidrase carbónica é a enzima responsável pelo desencadeamento desta reação³⁰.

O H⁺ libertado na corrente sanguínea é parcialmente neutralizado pelos iões HCO₃⁻, levando a uma diminuição do pH sanguíneo e, conseqüente, a acidose metabólica.

A compensação desta acidose dá-se através do mecanismo de compensação respiratório, através do aumento da ventilação pulmonar, com libertação de CO_2 e também por um mecanismo metabólico, através da excreção de H^+ e reabsorção de iões HCO_3^- através do rim.

Em caso de *stress* por calor, devido à alcalose respiratória instalada, aumenta a excreção de HCO_3^- pela urina, estando assim indisponível para a formação da casca, resultando numa casca menos espessa e logo mais fraca¹⁷³.

A hipocalcémia, também chamada de tetania do cálcio, é uma condição que pode surgir nas galinhas reprodutoras, resultando de níveis baixos de cálcio na corrente sanguínea, o que conduz a fraqueza muscular ou paralisia.

O cálcio está, nas reprodutoras pesadas, muito associado à formação da casca do ovo, pese embora desempenhar várias outras funções, como na transmissão do impulso nervoso e na contração muscular. Múltiplas causas podem levar a situações de má absorção do cálcio, como desequilíbrios ácido-base e eletrolíticos, perda de integridade intestinal e formulação do cálcio.

Em relação às alterações no equilíbrio ácido-base, sabe-se que, no gado, uma situação de alcalose parece afetar a capacidade de resposta do rim à PTH, o que afeta a capacidade de se mobilizar cálcio durante a produção de leite. Não se sabe se este mesmo efeito ocorre nas aves, embora estas tenham mecanismos para corrigir essas alterações de pH. Uma situação de alcalose, por exemplo, se não for corretamente tamponado, afeta a disponibilidade de cálcio alterando o cálcio da forma livre e ionizada para a sua forma inativa, biologicamente ligada a proteínas, e reduz a atividade da PTH, levando também a uma casca do ovo mais fina^{73,85}.

Uma situação de carência de vitamina D_3 também vai reduzir a absorção de cálcio, daí esta dever ser devidamente suplementada. Pelo contrário um excesso de fósforo na alimentação, leva a que a reabsorção de cálcio do osso medular seja menos eficiente, levando a uma diminuição da sua disponibilidade para a formação da casca^{73,85}.

Qualquer situação que afete o trato gastrointestinal, aumentando a taxa de passagem da alimentação (alimentação de baixa viscosidade, aumento ingestão de água, perda de integridade intestinal) limitará a absorção de cálcio⁸⁵.

A formulação da fonte de cálcio, como o tamanho das partículas, pode afetar o período de tempo que o cálcio se encontra no trato digestivo e disponível para absorção. Quanto maior as partículas, maior o tempo que permanece no intestino, como já falado anteriormente⁸⁵.

3.3. Glucose

A maior circulação de hidratos de carbono nas aves é a de glucose¹⁸¹. A concentração de glucose no sangue (valor de referência para a espécie *Gallus gallus* 277-300mg/dL^{159,176}) é mais do dobro dos mamíferos (60-130 mg/dL, nos pequenos animais¹⁸²) e o principal órgão responsável pela lipogénese nas aves é o fígado e de seguida o rim¹⁸¹.

A concentração de glucose é menor durante a noite (quando as galinhas não se alimentam) e aumenta após a ingestão de alimento¹⁸¹.

Segundo Scanes (2015) podemos considerar que nas aves existem quatro fases metabólicas no que toca ao metabolismo da glucose: *i*) fase de absorção intestinal dos hidratos de carbono e de glucose, que abrange tanto a passagem de ingesta e qualquer armazenamento de ingesta na moela e proventrículo, antes da digestão e absorção; *ii*) corresponde à fase de jejum em que há desfragmentação de triglicéridos, levando à libertação de ácidos gordos e quebra de proteínas, que são utilizados na gluconeogénese; *iii*) depois do esgotamento dos triglicéridos dá-se o catabolismo muscular e os aminoácidos são usados na gluconeogénese¹⁸¹.

O glicogénio presente no fígado e no músculo constituem uma fonte alternativa de glucose durante as duas últimas fases anteriores¹⁸¹.

4. Resultados

Os resultados obtidos através do *i-STAT*®, para as 23 e 27 semanas de vida, encontram-se sumarizados nas tabelas 11 e 12. Nas tabelas 13 e 14 encontram-se as correlações entre os vários parâmetros avaliados.

Tabela 11 - Média, desvio padrão, coeficiente de variação, valor mínimo e máximo e número de amostras dos parâmetros bioquímicos avaliados com o *i-STAT*®, às 23 e 27 semanas de vida de reprodutoras pesadas.

23 semanas		pH	PCO ₂ (mmHg)	PO ₂ (mmHg)	BE (mmol/L)	HCO ₃ ⁻ (mmol/L)	TCO ₂ (mmol/L)
	Média	8,01	18,03	162,96	22,13	47,16	39,69
σ	0,17	18,46	20,48	8,41	21,38	8,23	
CV (%)	2,00	102,00	13,00	38,00	45,00	21,00	
Mínimo	7,62	6,20	103,00	0,00	20,80	21,00	
Máximo	8,20	130,00	194,00	30,00	85,00	50,00	
n	80,00	80,00	80,00	80,00	80,00	80,00	80,00
27 semanas	Média	7,92	21,29	172,88	18,08	38,94	35,63
	σ	0,17	22,22	22,56	8,41	16,59	7,44
	CV (%)	2,00	104,00	13,00	47,00	43,00	21,00
	Mínimo	7,46	10,60	105,00	0,00	21,60	22,00
	Máximo	8,20	130,00	276,00	30,00	85,00	50,00
	n	52,00	52,00	52,00	52,00	52,00	52,00

Tabela 12 - Média, desvio padrão, coeficiente de variação, valor mínimo e máximo e número de amostras dos parâmetros bioquímicos avaliados com o *i-STAT*®, às 23 e 27 semanas de vida de reprodutoras pesadas.

23 semanas		sO ₂ (%)	Na ⁺ (mmol/L)	K ⁺ (mmol/L)	Ca ²⁺ (mmol/L)	Glu (mg/dL)
	Média	99,96	152,25	5,36	0,91	185,53
σ	0,19	2,87	1,05	0,17	12,91	
CV (%)	0,00	2,00	20,00	19,00	7,00	
Mínimo	99,00	141,00	3,60	0,53	161,00	
Máximo	100,00	160,00	8,90	1,28	227,00	
n	80,00	80,00	80,00	80,00	80,00	80,00
27 semanas	Média	100,00	151,73	5,25	0,91	185,88
	σ	0,00	2,35	0,78	0,18	11,38
	CV (%)	0,00	2,00	15,00	19,00	6,00
	Mínimo	100,00	145,00	3,90	0,50	158,00
	Máximo	100,00	160,00	7,30	1,68	219,00
	n	52,00	52,00	52,00	52,00	52,00

Tabela 13 - Coeficiente de correlação de *Pearson* entre os parâmetros bioquímicos avaliados pelo *i-STAT*®, às 23 e 27 semanas de vida de reprodutoras pesadas.

		pH	PCO ₂	PO ₂	BE	HCO ₃ ⁻	TCO ₂
		23 semanas	pH	1,000			
PCO ₂	-0,003		1,000				
PO ₂	0,195		-0,024	1,000			
BE	0,918		0,013	0,407	1,000		
HCO ₃ ⁻	0,778		0,143	0,151	0,725	1,000	
TCO ₂	0,893		0,068	0,380	0,962	0,858	1,000
sO ₂	0,388		-0,025	0,546	0,436	0,217	0,370
Na ⁺	-0,224		-0,210	-0,020	-0,138	-0,206	-0,140
K ⁺	0,004		0,097	-0,551	-0,264	-0,081	-0,281
Ca ²⁺	-0,686		0,051	0,083	-0,525	-0,535	-0,526
Glu	-0,533		-0,053	0,053	-0,370	-0,429	-0,378
27 semanas	pH	1,000					
	PCO ₂	0,221	1,000				
	PO ₂	-0,108	0,098	1,000			
	BE	0,935	0,195	-0,018	1,000		
	HCO ₃ ⁻	0,772	0,495	-0,066	0,751	1,000	
	TCO ₂	0,902	0,315	-0,019	0,969	0,866	1,000
	sO ₂	-	-	-	-	-	-
	Na ⁺	0,349	0,101	-0,191	0,175	0,199	0,117
	K ⁺	-0,189	0,018	-0,029	-0,305	-0,198	-0,344
	Ca ²⁺	-0,507	-0,118	0,391	-0,389	-0,445	-0,377
	Glu	0,078	-0,016	0,101	-0,035	-0,013	-0,070

(P-value para as correlações apresentadas <0,02)

Tabela 14 - Coeficiente de correlação de *Pearson* entre os parâmetros bioquímicos avaliados pelo *i-STAT*®, às 23 e 27 semanas de vida de reprodutoras pesadas.

		sO ₂	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Glu
		23 semanas	sO ₂	1		
Na ⁺	-0,006		1			
K ⁺	-0,266		-0,074	1		
Ca ²⁺	-0,054		0,207	-0,24	1	
Glu	-0,212		0,17	-0,112	0,471	1
27 semanas	sO ₂	1				
	Na ⁺	-	1			
	K ⁺	-	0,409	1		
	Ca ²⁺	-	-0,564	-0,23	1	
	Glu	-	0,345	0,241	0,039	1

(P-value para a correlação apresentada = 0,01)

5. Discussão

Analisando as tabelas 11 e 12, observa-se que os resultados para os parâmetros PCO_2 , BE e HCO_3^- apresentam um coeficiente de variação ($\text{CV} > 30\%$) quer para as 23, quer para as 27 semanas. Os resultados foram muito variáveis para estes parâmetros, como se pode observar também pelo valor mínimo e máximo, sendo necessário mais amostras para ser possível obter um resultado fiável.

Para os restantes parâmetros avaliados os resultados mostraram-se bastante homogêneos, como se pode observar pelo valor mínimo e máximo e pelo coeficiente de variação ($\text{CV} \leq 20\%$), exceto para o TCO_2 que é de 21%, sendo este um valor razoável. Isto observa-se quer para as 23 semanas, quer para as 27 semanas.

Os intervalos para o CV foram estimados de acordo com a percepção da autora, relativamente à variação fisiológica observada.

Em relação à evolução das 23 semanas para as 27, não se registaram grandes alterações na média, exceto para os parâmetros PCO_2 que é superior às 27 semanas (diferença: 3,26); e TCO_2 (diferença: 4,06) e BE (diferença: 4,05) cuja média é superior às 23 semanas.

Fazendo a comparação dos valores de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e glucose obtidos, com os valores de referência para a espécie já apresentados anteriormente, observa-se que, quer relativamente às 23 semanas, quer às 27, os resultados ora determinados encontram-se dentro dos valores padrão anteriormente propostos: Na^+ (131-171 mmol/L), K^+ (3-7,3 mmol/L), Ca^{2+} (3,3-5,925 mmol/L) excepto para a glucose, que se encontra abaixo (227-300mg/dL)^{159,176}.

Nas tabelas 13 e 14 observam-se as correlações entre os vários parâmetros analisados, obtidas com recurso ao coeficiente de correlação de *Pearson*.

Foram registadas correlações positivas fortes (indicadas pela cor verde) entre os parâmetros:

- i) pH e BE, HCO_3^- e TCO_2 , quer às 23, quer às 27 semanas;
- ii) PO_2 e sO_2 às 23 semanas;
- iii) BE e HCO_3^- , TCO_2 , quer às 23, quer às 27 semanas;
- iv) HCO_3^- e TCO_2 , quer às 23, quer às 27 semanas.

Verificaram-se correlações negativas fortes (indicadas pela cor azul) entre os parâmetros:

- i) pH e Ca^{2+} , quer às 23, quer às 27 semanas, e entre o pH e a glucose às 23 semanas;
- ii) PCO_2 e K^+ às 23 semanas;
- iii) BE e Ca^{2+} às 23 semanas;
- iv) HCO_3^- e Ca^{2+} às 23 semanas;
- v) TCO_2 e Ca^{2+} às 23 semanas;
- vi) Na^+ e Ca^{2+} às 27 semanas.

As correlações positivas entre os parâmetros pH, HCO_3^- , BE e TCO_2 fazem todo o sentido, uma vez que, como exposto anteriormente, estes parâmetros encontram-se intimamente relacionados.

Alguma imprecisão na determinação dos parâmetros pH, PCO_2 , e PO_2 e TCO_2 deve, ainda assim, ser sempre de considerada dado o contacto com o ar e algum diferimento temporal entre a colheita e a medição, tal como indicado no manual de utilização do *i-STAT*®. Deve-se, por isso, evitar o contacto com o ar, quando se pretende medir estes parâmetros, bem como realizar a medição o quanto antes¹⁶⁸.

O pH, neste caso, apresenta às 23 semanas uma média de 8,01 e às 27 uma média de 7,92, o que, comparando com os valores considerados fisiológicos, já apresentados anteriormente, pode-se considerar que existe uma alcalose ($\text{pH} > 7,45$)¹⁷¹.

Os valores médios ideais para o excesso de base deveriam variar entre -4/4 mmol/L¹⁷¹, como já falado anteriormente, no entanto são observados valores de 22,13 às 23 e de 18,08 às 27 semanas. Valores superiores a quatro indicam alcalose metabólica.

Os valores padrão para o bicarbonato, como indicado anteriormente, são de 20 a 24 mmol/L¹⁷⁰, mas são observados valores de 47,16 mmol/L às 23 e de 38,94 mmol/L às 27 semanas de vida, indicando uma possível alcalose metabólica.

Os valores referentes ao PCO_2 encontram-se abaixo dos valores de referência (40 a 50 mmHg)¹⁷⁰, quer para as 23 (18,03 mmHg), quer para as 27 semanas de vida (21,29 mmHg) e associado ao facto do pH se encontrar elevado, sugere-se uma situação de alcalose respiratória, possivelmente devido à hiperventilação das aves na altura da

colheita das amostras. Pelo contrário, os valores referentes ao PO₂ encontram-se muito acima do valor padrão (30 a 42 mmHg)¹⁷⁰, quer para as 23 (162,96 mmHg), quer para as 27 semanas de vida (172,88mmHg)¹⁷⁰. Os valores para o TCO₂ não foram comparados, uma vez que a maior parte do carbono total está incorporado na forma de bicarbonato e os referentes ao sO₂ também não, isto porque os valores de referência são para sangue arterial. Há que ter em conta que estes valores de referência são relativos a pequenos animais, nomeadamente para o cão e, para sangue venoso.

Quanto ao K⁺, nas aves o seu nível decresce de 30 a 60% em duas horas¹⁶⁷, uma vez que as amostras utilizadas chegaram 4h depois da colheita, os valores determinados poderão apresentar algum desvio.

As tabelas 15 e 16 referem-se aos resultados encontrados num estudo semelhante, realizado por Martin *et al.* (2010)¹⁸³, onde se efetuou um levantamento destes dados em galinhas reprodutoras pesadas das estirpes *Ross 708*, *Ross 1108* e *Cobb 500*, com idades compreendidas entre as 25 e as 36 semanas de vida. Apesar de as estirpes e idades utilizadas não serem as mesmas, os resultados deste estudo constituem o melhor termo de comparação, tendo também sido utilizado sangue venoso.

Tabela 15 - Média, valor mínimo e máximo e número de amostras dos parâmetros bioquímicos avaliados com o *i-STAT*®, em galinhas reprodutoras pesadas das estirpes *Ross 708*, *Ross 1108* e *Cobb 500*, com idades compreendidas entre as 25 e as 36 semanas de vida (Fonte: Martin *et al.*, 2010)¹⁸³.

	pH	PCO ₂ (mmHg)	PO ₂ (mmHg)	BE (mmol/L)	HCO ₃ ⁻ (mmol/L)	TCO ₂ (mmol/L)
Média	7,42	37,7	46,2	0,2	24,6	25,7
Mínimo	7,2	25,4	32	-9	17,7	19
Máximo	7,58	55,9	81	15	37,1	38
n	165	165	165	165	165	165

Tabela 16 - Média, valor mínimo e máximo e número de amostras dos parâmetros bioquímicos avaliados com o *i-STAT*®, em galinhas reprodutoras pesadas das estirpes *Ross 708*, *Ross 1108* e *Cobb 500*, com idades compreendidas entre as 25 e as 36 semanas de vida (Fonte: Martin *et al.*, 2010)¹⁸³.

	sO ₂ (%)	Na ⁺ (mmol/L)	K ⁺ (mmol/L)	Ca ²⁺ (mmol/L)	Glu (mg/dL)
Média	82	147,1	4,9	1,47	234
Mínimo	64	141	4	1,1	207
Máximo	96	157	6	1,89	301
n	165	165	165	165	165

O que podemos observar a partir das tabelas 15 e 16 é que os valores que se apresentam mais próximos respeitam aos iões Na⁺, K⁺ e Ca²⁺. De resto, observa-se uma grande variação, devendo-se, porém, ter em conta que os valores em comparação, não são valores padrão e que os métodos de colheita e processamento das amostras não foram os mesmos. No caso do estudo realizado por por Martin *et al.* (2010)¹⁸³, as amostras foram colhidas para seringas 3 mL, acopladas a agulhas de 20G e de imediato transferidas para um tubo com heparina líquida e processadas após 10 minutos da colheita. Em todo o caso, o mais importante, em termos práticos, será a constância da metodologia utilizada para cada estirpe e exploração, levando igualmente em consideração a adequação ao conjunto das tarefas de maneo envolvidas, num contexto de minimização da intervenção humana.

IX. Conclusão

A dissertação e o estágio permitiram à autora uma aquisição de conhecimentos sobre a avicultura e a medicina de produção de aves, quer pela parte prática em contexto de exploração avícola, quer pelo trabalho de investigação posterior.

A partir do estudo em questão, pode-se afirmar que os resultados da hematologia se encontravam, regra geral, dentro do expectável como normal para a espécie, contudo são muito heterogéneos. Observou-se a existência de correlações fortes entre vários parâmetros, destacando-se, quer em machos, quer em fêmeas, as correlações negativas fortes entre heterófilos e linfócitos, e também entre os linfócitos e monócitos.

Os resultados das bioquímicas mostraram-se, pelo contrário, muito homogéneos, exceto para os parâmetros PCO_2 , BE e HCO_3^- . Em relação à evolução das 23 semanas para as 27, não se registaram grandes alterações na média dos valores, exceto para os parâmetros PCO_2 , TCO_2 e BE. Destacam-se correlações positivas fortes para os parâmetros pH, HCO_3^- , BE e TCO_2 .

Os valores para o pH e PCO_2 são sugestivos de uma alcalose respiratória. Os valores do pH, HCO_3^- e BE podem ser devidos a uma alcalose metabólica. Os resultados referentes ao PO_2 encontravam-se acima dos valores de referência para os eletrólitos (Na^+ , K^+ e Ca^{2+}) encontram-se dentro do normal para a espécie, mas os referentes à glucose, pelo contrário, encontravam-se abaixo.

Em termos de amostragem, para evitar tanta heterogeneidade de valores na hematologia, serão pois necessárias mais amostras por idade, para se conseguir estabelecer valores de referência corretos para a estirpe utilizada, a *Ross 308*. Quanto às bioquímicas, para a maioria dos parâmetros o número de amostras verificou-se suficiente, exceto para os parâmetros PCO_2 , BE e HCO_3^- , que necessitam de um maior número de amostras.

No futuro, de forma a minimizar erros laboratoriais, no que toca aos parâmetros hematológicos, sugere-se que as amostras sejam processadas o mais rapidamente possível após a colheita e utilizar um agitador de tubos de sangue, para ir mantendo as amostras sob agitação suave, enquanto se vão fazendo as leituras, uma vez que este procedimento ainda demora algum tempo, evitando-se, assim, que o sangue possa coagular. Quanto aos esfregaços, estes deverão ser feitos logo no momento da colheita e com sangue sem anticoagulante.

Relativamente às bioquímicas, o mais correto, para reduzir erros de leitura, especialmente para os parâmetros pH, PCO_2 , e PO_2 e TCO_2 é evitar o contacto das amostras com o ar. De forma a minimizar erros na leitura do K^+ , deve fazer-se a análise em menos de duas horas decorridas após a colheita.

O aparelho *i-STAT*® verificou-se ser uma ferramenta útil, prática e de fácil utilização, capaz de, em apenas dois minutos, fazer uma leitura de um grande número de parâmetros. Em contexto de exploração, o facto de ser portátil permite o seu transporte

para os pavilhões e realizar as determinações no local, obtendo-se resultados fiáveis, num curto espaço de tempo.

O método de contagem em câmara de *Neubauer* requer um procedimento mais demorado, mas é igualmente fiável em termos de resultados. A realização do esfregaço sanguíneo é um procedimento relativamente rápido e, devido à coloração com o corante *Diff-Quick*, permite a obtenção de resultados também eles fiáveis.

No que toca à parte laboratorial, obtiveram-se resultados fiáveis e que podem servir de termo de comparação, como valores de referência para a estirpe *Ross 308*. Já os parâmetros que necessitam de investigação adicional podem servir como ponto de partida para um incremento da investigação nesta área, tudo isto com inegáveis aplicações em termos de medicina preventiva da produção.

Pode ser pertinente também a comparação dos valores padrão com valores obtidos na altura das vacinações e pesagens totais, por serem operações que provocam um elevado *stress* nas aves e observar que alterações podem estas situações causar.

A aplicação prática da avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos é a de contribuir para um diagnóstico precoce, nomeadamente nas fases iniciais dos processos patológicos mais frequentes neste tipo de exploração.

Na vertente preventiva da medicina da produção de aves, poderá ainda alargar-se a investigação a outros parâmetros, quer hematológicos, quer bioquímicos, de forma a melhor identificar possíveis variações associadas a estados fisiológicos específicos, os quais poderão constituir fatores predisponentes de doença.

X. Bibliografia

1. Grupo Valouro. www.pintovalouro.pt/epages/3130-160315.sf/pt_PT/?ObjectPath=/Shops/3130-160315/Categories/Grupo_Valouro. Retrieved July 3 2017.
2. Pinto Valouro. www.pintovalouro.pt/epages/3130-160315.sf/pt_PT/?ObjectPath=/Shops/3130-160315/Categories/Sobre_a_Pinto_Valouro. Retrieved March 5 2017.

3. Soares MC. Melhoramento genético das aves, desempenho zootécnico e ambiente. *Alimentação Animal* 2016;8–11.
4. Crawford RD. Origin and history of poultry species. In: Crawford, Roy D, editor. *Poultry Breeding and Genetics*. Elsevier, USA, 1990:1–19.
5. Elfick D. A Brief History of Broiler Selection: How Chicken Became a Global Food Phenomenon in 50 Years. *Aviagen International* 2012;1–7.
6. Havenstein G, Ferket P, Qureshi M. Growth, livability, and feed conversion of 1957 versus 2001 broilers when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. *Poultry Science* Oxford University Press Oxford, UK, 2003a;82:1500–1508.
7. Havenstein G, Ferket P, Qureshi M. Carcass composition and yield of 1957 versus 2001 broilers when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. *Poultry Science* Oxford University Press Oxford, UK, 2003b;82:1509–1518.
8. Havenstein GB. *Performance changes in poultry and livestock following 50 years of genetic selection*. 2006.
9. Sherwood D. Modern broiler feeds and strains: What two decades of improvement have done. *Feedstuffs* 1977;49–70.
10. Havenstein G, Ferket P, Scheideler S et al. Growth, livability, and feed conversion of 1957 vs 1991 broilers when fed “typical” 1957 and 1991 broiler diets. *Poultry Science* Oxford University Press Oxford, UK, 1994a;73:1785–1794.
11. Havenstein G, Ferket P, Scheideler S et al. Carcass composition and yield of 1991 vs 1957 broilers when fed “typical” 1957 and 1991 broiler diets. *Poultry Science* Oxford University Press Oxford, UK, 1994b;73:1795–1804.
12. Tallentire C, Leinonen I, Kyriazakis I. Breeding for efficiency in the broiler chicken: A review. *Agronomy for Sustainable Development* Springer Paris, 2016;36:66.
13. Schmidt C, Persia M, Feierstein E et al. Comparison of a modern broiler line and a heritage line unselected since the 1950s. *Poultry Science* Oxford University Press Oxford, UK, 2009;88:2610–2619.
14. Zuidhof M, Schneider B, Carney V et al. Growth, efficiency, and yield of commercial broilers from 1957, 1978, and 2005. *Poultry Science* Oxford University Press, 2014;93:2970–2982.
15. Leeson S, Summers JD. *Broiler breeder production*. Nottingham University Press, Canada, 2010:22–90, 99–134, 166–215, 271–278.

16. Wolc A. Genomic selection in layer and broiler breeding. *Lohmann Information* 2015;49:4–11.
17. Wong G, Lui B, Wang J et al. A genetic variation map for chicken with 2.8 million single nucleotide polymorphisms. *Nature Europe PMC Funders*, 2004;432:717.
18. Laughlin K. The evolution of genetics, breeding and production. *Temperton Fellowship Report* 2007;15.
19. Avendãno S, Watson K, Kranis A. Genomics in poultry breeding - into consolidation phases. *XXIV World's poultry congress*. 2012:1–8.
20. Rutz F, Ancuti M, Xavier E et al. Avanços na fisiologia e desempenho reprodutivo de aves domésticas. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 2007;31:307–317.
21. Johnson A. Reproduction in the female. In: Scanes, C, editor. *Sturkie's Avian Physiology*. 6th ed. Elsevier, UK, 2015:641–653, 653–657.
22. Baker J, Balch D. A study of the organic material of hen's-egg shell. *Biochemical Journal* Portland Press Ltd, 1962;82:352.
23. Wyburn G, Johnston H, Draper M et al. The ultrastructure of the shell forming region of the oviduct and the development of the shell of *Gallus domesticus*. *Experimental Physiology* Wiley Online Library, 1973;58:143–151.
24. Solomon S. The eggshell: strength, structure and function. *British poultry science* Taylor & Francis, 2010;51:52–59.
25. Wistedt A. Shell formation and bone strength in laying hens. 2013:9–23.
26. Robinson FE, Fasenko GM, Renema RA. *Optimizing Chick Production in Broiler Breeders*. Spotted Cow Press, Canada, 2003:3–10, 33–38, 85–95.
27. Etches RJ. *Reproduction in poultry*. CAB International, UK, 1996:738–739.
28. Taylor T, Moore J. The effect of high and low levels of dietary inorganic phosphate on the pre-laying storage of calcium and phosphorus and on the composition of the medullary and cortical bone in pullets. *British Journal Nutrition* 1958;12:35–42.
29. Senior B. Oestradiol concentration in the peripheral plasma of the domestic hen from 7 weeks of age until the time of sexual maturity. *Journal of Reproduction and Fertility Soc Reprod Fertility*, 1974;41:107–112.
30. Dacke C, Sugiyama T, Gray C. The role of hormones in the regulation of bone turnover and eggshell calcification. In: Scanes, C, editor. *Sturkie's Avian*

- Physiology*. 6th ed. Elsevier, UK, 2015:549, 552–554.
31. Kim W, Bloomfield S, Sugiyama T et al. Concepts and methods for understanding bone metabolism in laying hens. *World's Poultry Science Journal* Cambridge University Press on behalf of World's Poultry Science Association, 2012;68:71–82.
 32. Buss E, Guyer R. Bone parameters of thick and thin eggshell lines of chickens. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* Elsevier, 1984;78:449–452.
 33. Aviagen. *Ross 308 parent stock: performance objectives*. Newbridge, Scotland, 2016:3–5, 7–8.
 34. Kolanczyk M, Meijerhof R. Uniformity - the key to success with breeders. *Poultry International* 2004;10–14.
 35. Dibner J, Knight C, Kitchell M et al. Early feeding and development of the immune system in neonatal poultry. *Journal of Applied Poultry Research* Oxford University Press Oxford, UK, 1998;7:425–436.
 36. Cobb-Vantress. *Brooding guide for optimum breeder development*. Arkansas, USA, 2013c:1–11.
 37. Aviagen. *Parent stock management handbook*. Newbridge, Scotland, 2013:1–110, 121–131, 143–149, 152–156.
 38. Maiorka A, Dahlke F, Morgulis MSF de A. Broiler adaptation to post-hatching period. *Ciência Rural* SciELO, Brasil, 2006;36:701–708.
 39. Seto F. Early development of the avian immune system. *Poultry Science* Oxford University Press Oxford, UK, 1981;60:1981–1995.
 40. Schijns V, Zande S, Luoiani B et al. Practical aspects of poultry vaccination. In: Schat, K and Kaspers, B and Kaiser, P, editor. *Avian Immunology*. 2nd ed. Elsevier, USA, 2014:349–353.
 41. Dalloul RA, Lillehoj HS. Recent advances in immunomodulation and vaccination strategies against coccidiosis. *Avian Diseases* BioOne, 2005;49:1–8.
 42. Cardoso A, Tessari E, Castro A et al. Monitoria sorológica da micoplasmose em plantéis de aves reprodutoras no Brasil através do teste de soroaglutinação rápida. *Biológico, São Paulo* 2006;73:23–26.
 43. Chapman H. Practical use of vaccines for the control of coccidiosis in the chicken. *World's Poultry Science Journal* Cambridge University Press on behalf of World's Poultry Science Association, 2000;56:7–20.

44. Vermeulen A, Schaap D, Schettters TP. Control of coccidiosis in chickens by vaccination. *Veterinary Parasitology* Elsevier, 2001;100:13–20.
45. Williams R. Anticoccidial vaccines for broiler chickens: pathways to success. *Avian Pathology* Taylor & Francis, 2002;31:317–353.
46. Chapman H, Cherry T, Danforth H et al. Sustainable coccidiosis control in poultry production: the role of live vaccines. *International Journal for Parasitology* Elsevier, 2002;32:617–629.
47. Marchaim U, Kulka R. The non-parallel increase of amylase, chymotrypsinogen and procarboxypeptidase in the developing chick pancreas. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology* Elsevier, 1967;146:553–559.
48. Maiorka A, Santin E, Dahlke F et al. Posthatching water and feed deprivation affect the gastrointestinal tract and intestinal mucosa development of broiler chicks. *Journal of Applied Poultry Research* Oxford University Press Oxford, UK, 2003;12:483–492.
49. Cobb-Vantress. Flock uniformity. <http://www.cobb-vantress.com/academy/articles/article/academy/2015/04/04/flock-uniformity>. Retrieved June 30 2017.
50. Boerjan M. Chick vitality and uniformity. *International Hatchery Practice* 2006;20:7–8.
51. Willemsen H, Everaert N, Witters A et al. Critical assessment of chick quality measurements as an indicator of posthatch performance. *Poultry Science* Oxford University Press Oxford, UK, 2008;87:2358–2366.
52. Ipek A, Sözcü A. Broiler chick quality and scoring methods. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi*, 2013;131–138.
53. Hubbard. *Incubation guide*. Walpole, Massachusetts, USA, 2012;9, 12–56.
54. Hubbard. *Guide parent stock*. Walpole, Massachusetts, USA, 2015:2–8.
55. Lewis P. *Lighting for broiler breeders*. *Aviagen site* Newbridge, Scotland: Aviagen Ltd., 2009:1–12.
56. Richards M, Rosebrough R, Coon C et al. Feed intake regulation for the female broiler breeder: In theory and in practice 1 2. *Journal of Applied Poultry Research* Oxford University Press Oxford, UK, 2010;19:182–193.
57. Hitt G. The benefits of floor feeding (for optimal uniformity). *Tech notes* 2015;

58. Valls M. Spin feeders for rearing broiler breeders (floor feeding). *Technical Bulletin* Walpole, Massachusetts, USA, 2012;1–4.
59. Santoso U, Tanaka K, Ohtani S et al. 1458601. Effects of early skip day feeding on growth performance and body composition in broilers. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 1993;6:451–461.
60. Cobb-Vantress. *Breeder management guide*. Arkansas, USA, 2013b:1–52.
61. Bartov I, Bornstein S, Lev Y et al. Feed restriction in broiler breeder pullets: Skip-a-day versus skip-two-days. *Poultry Science* Oxford University Press Oxford, UK, 1988;67:809–813.
62. Wiggle S. Maintaining broiler breeder pullets on skip-a-day feeding after photostimulation until 5% egg production is reached alters ovarian development. 2008:10–24.
63. Cobb-Vantress. Fleshing important in optimal broiler breeding. www.cobb-vantress.com/academy/articles/article/academy/2016/12/28/fleshing-important-in-optimal-broiler-breeding. Retrieved June 23 2017.
64. Robinson F, Robinson N, Scott T. Reproductive performance, growth rate and body composition of full-fed versus feed-restricted broiler breeder hens. *Canadian Journal of Animal Science* NRC Research Press, 1991b;71:549–556.
65. Robinson FE. *Ovarian Form and Function in Broiler Breeders: Effects of Prepubertal Photoperiod and Feed Allocation*. Department of Agricultural, Food and Nutritional Science, University of Alberta, 1997.
66. Yu M, Robinson F, Charles R et al. Effect of feed allowance during rearing and breeding on female broiler breeders. 2. Ovarian morphology and production. *Poultry Science* Oxford University Press Oxford, UK, 1992;71:1750–1761.
67. Hocking P, Gilbert A, Walker M et al. Ovarian follicular structure of White Leghorns fed ad libitum and dwarf and normal broiler breeders fed ad libitum or restricted until point of lay. *British Poultry Science* Taylor & Francis, 1987;28:493–506.
68. Hocking P, Waddington D, Walker M et al. Control of the development of the ovarian follicular hierarchy in broiler breeder pullets by food restriction during rearing. *British Poultry Science* Taylor & Francis, 1989;30:161–173.
69. Boni I, Ponsati R, Griebeler J et al. Puntos críticos de la cría y recría de reproductoras pesadas . *XX Congreso Latinoamericano de Avicultura*. 2007:297–307.
70. Robinson F, Robinson N, Scott T. Reproductive performance, growth rate and body composition of full-fed versus feed-restricted broiler breeder hens.

- Canadian Journal of Animal Science* NRC Research Press, 1991;71:549–556.
71. Fattori T, Wilson H, Harms R et al. Response of broiler breeder females to feed restriction below recommended levels. 1. Growth and reproductive performance. *Poultry science* Oxford University Press Oxford, UK, 1991;70:26–36.
 72. Gregorio R. Prolapse of the oviduct in poultry. www.msdsvetmanual.com/poultry/disorders-of-the-reproductive-system/prolapse-of-the-oviduct-in-poultry. Retrieved June 19 2017.
 73. Crespo R, Shivaprasad H. Development, metabolic and other noninfectious disorders. In: Swayne, D, editor. *Diseases of Poultry*. 13th ed. Wiley-Blackwell, USA, 2013:1233–1234, 1252–1254, 1257–1258.
 74. Stake P, Fredrickson T, Bourdeau C. Induction of fatty liver-hemorrhagic syndrome in laying hens by exogenous beta-estradiol. *Avian diseases* JSTOR, 1981;410–422.
 75. Pearson A, Butler E. The oestrogenised chick as an experimental model for fatty liver-haemorrhagic syndrome in the fowl. *Research in Veterinary Science* 1978;24:82–86.
 76. Choi Y, Ahn H, Lee B et al. Nutritional and hormonal induction of fatty liver syndrome and effects of dietary lipotropic factors in egg-type male chicks. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* Asian-Australasian Association of Animal Production Societies (AAAP), 2012;25:1145–1152.
 77. Haghghi-Rad F, Polin D. Lipid Alleviates Fatty Liver Hemorrhagic Syndrome 1, 2. *Poultry Science* Oxford University Press Oxford, UK, 1982;61:2465–2472.
 78. Schumann B, Squires E, Leeson S et al. Effect of hens fed dietary flaxseed with and without a fatty liver supplement on hepatic, plasma and production characteristics relevant to fatty liver haemorrhagic syndrome in laying hens. *British Poultry Science* Taylor & Francis, 2003;44:234–244.
 79. Cobb-Vantress. *Cobb Mx male management supplement*. Arkansas, USA, 2016:3–7, 12–13.
 80. Cobb-Vantress. Floor egg management. <http://www.cobb-vantress.com/academy/articles/article/academy/2016/03/23/floor-egg-management>. Retrieved June 15 2017.
 81. Aviagen. *Best practice in the breeder house - preventing floor eggs*. Newbridge, Scotland, 2017:2.
 82. Board R, Halls N. The cuticle: a barrier to liquid and particle penetration of the shell of the hen's egg. *British Poultry Science* Taylor & Francis, 1973;14:69–97.

83. Dunlop M, Moss A, Groves P et al. The multidimensional causal factors of “wet litter” in chicken-meat production. *Science of The Total Environment* Elsevier, 2016;562:766–776.
84. Backhouse D, Gous R. Responses of adult broiler breeders to feeding time. *World’s Poultry Science Journal* Cambridge University Press on behalf of World’s Poultry Science Association, 2006;62:269–281.
85. Turner BJ. Calcium tetany in broiler breeder hens: Update. 2009;1–5.
86. Brillard J, McDaniel G. Influence of spermatozoa numbers and insemination frequency on fertility in dwarf broiler breeder hens. *Poultry Science* Oxford University Press Oxford, UK, 1986;65:2330–2334.
87. Bramwell R, McDaniel C, Wilson J et al. Age effect of male and female broiler breeders on sperm penetration of the perivitelline layer overlying the germinal disc. *Poultry science* Oxford University Press Oxford, UK, 1996;75:755–762.
88. McGovern RH. Reproduction in male broiler breeders. 2002:18–21, 43–47.
89. Costa I. Pododermatite ulcerativa em aves e mamíferos exóticos. 2014:47–50.
90. Pierson E, Krista L, McDaniel G. Effect of age and physiological status on sperm storage 24 hours after artificial insemination in broiler breeder hens. *British poultry Science* Taylor & Francis, 1988;29:193–197.
91. Ahammad M, Okamoto S, Kawamoto Y et al. The Effects of Regular Fluid Secretion from the Uterus of Laying Hens on the Longevity and Fertilization Ability of Fowl Sperm in the Oviduct. *Poultry Science Journal* 2013;1:13–22.
92. Reviere M, Brillard J. Variations in the sperm production, the sperm output and in the number of sperms to be inseminated in aging broiler breeders. *World’s Poultry Science Journal* 1986;42:98.
93. Jones K. Health management of the modern broiler breeder male. *Aviagen Brief* 2009;1–9.
94. Edwards CL. The physiological zero and the index of development for the egg of the domestic fowl, *Gallus domesticus*. *American Journal of Physiology-Legacy Content* Am Physiological Soc, 1902;6:351–397.
95. Frunk EM, Biellier HV. The minimum temperature for embryonic development in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Poultry Science* Oxford University Press Oxford, UK, 1944;23:538–540.
96. Fassenko G, Robinson F, Hardin R et al. Research note: Variability in preincubation embryonic development in domestic fowl. 2. Effects of duration of egg storage period. *Poultry Science* Oxford University Press Oxford, UK,

1992;71:2129–2132.

97. Jason C. Egg storage: good practices. *www.petersime.com/hatchery-development-department/egg-storage/*. Retrieved June 16 2017.
98. Samberg Y, Meroz M. Application of disinfectants in poultry hatcheries. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)* 1995;14:365–380.
99. Rahn H. Water in the avian egg overall budget of incubation. *American Zoologist* Oxford University Press UK, 1980;20:373–384.
100. Molenaar R, Reijrink I, Meijerhof R et al. Meeting embryonic requirements of broilers throughout incubation: a review. *Revista Brasileira de Ciência Avícola SciELO Brasil*, 2010;12:137–148.
101. Aviagen. *Como... Incubação*. Newbridge, Scotland, 2011:1–14, 17–19.
102. Silva F, Faria D, Torres K et al. Influence of egg pre-storage heating period and storage length on incubation results. *Revista Brasileira de Ciência Avícola SciELO Brasil*, 2008;10:17–22.
103. Cobb-Vantress. *Guia de manejo de incubação*. Arkansas, USA, 2008:1–15, 30–35.
104. Araújo W, Albino L. *Comercial Incubation*. Transworld Research Network, Brasil, 2011:1–64, 71–73, 89–136, 157–171.
105. Decuyper E, Michels H. Incubation temperature as a management tool: a review. *World's Poultry Science Journal* Cambridge University Press on behalf of World's Poultry Science Association, 1992;48:28–38.
106. French N. Modeling incubation temperature: The effects of incubator design, embryonic development, and egg size. *Poultry Science* Oxford University Press Oxford, UK, 1997;76:124–133.
107. Decuyper E, Tona K, Bruggeman V et al. The day-old chick: a crucial hinge between breeders and broilers. *World's Poultry Science Journal* Cambridge University Press on behalf of World's Poultry Science Association, 2001;57:127–138.
108. Romijn C, Lokhorst W. Foetal heat production in the fowl. *The Journal of physiology* Wiley Online Library, 1960;150:239–249.
109. Lourens A, Molenaar R, Van den Brand H et al. Effect of egg size on heat production and the transition of energy from egg to hatchling. *Poultry Science* Oxford University Press Oxford, UK, 2006;85:770–776.

110. Rahn H. Gas exchange of avian eggs with special reference to turkey eggs. *Poultry Science* Oxford University Press Oxford, UK, 1981;60:1971–1980.
111. Janke O, Tzschentke B, Boerjan M. Comparative investigations of heat production and body temperature in embryos of modern chicken breeds. *Avian and Poultry Biology Reviews* Science Reviews 2000 Ltd, 2004;15:191–196.
112. Meijerhof R, Van Beek G. Mathematical modelling of temperature and moisture loss of hatching eggs. *Journal of Theoretical Biology* Elsevier, 1993;165:27–41.
113. Lourens A, Van den Brand H, Meijerhof R et al. Effect of eggshell temperature during incubation on embryo development, hatchability, and posthatch development. *Poultry Science* Oxford University Press Oxford, UK, 2005;84:914–920.
114. Joseph N, Lourens A, Moran Jr E. The effects of suboptimal eggshell temperature during incubation on broiler chick quality, live performance, and further processing yield. *Poultry Science* Oxford University Press Oxford, UK, 2006;85:932–938.
115. Leksrisompong N, Romero-Sanchez H, Plumstead P et al. Broiler incubation. 1. Effect of elevated temperature during late incubation on body weight and organs of chicks. *Poultry Science* Oxford University Press Oxford, UK, 2007;86:2685–2691.
116. Boleli I, Morita V, Matos Jr J et al. Poultry Egg Incubation: Integrating and Optimizing Production Efficiency. *Revista Brasileira de Ciência Avícola* SciELO, Brasil, 2016;18:1–16.
117. Tona K, Onagbesan O, De Ketelaere B et al. Effects of turning duration during incubation on corticosterone and thyroid hormone levels, gas pressures in air cell, chick quality, and juvenile growth. *Poultry Science* Oxford University Press Oxford, UK, 2003;82:1974–1979.
118. Tong Q, McGonnell IM, Romanini CE et al. Effect of high levels of CO₂ during the final 3 days of incubation on the timing of hatching in chick embryos. *Information Technology, Automation and Precision Farming. International Conference of Agricultural Engineering*. Valencia, Spain, 8-12, 2012:2–7.
119. Kirk S, Emmans G, McDonald R et al. Factors affecting the hatchability of eggs from broiler breeders. *British Poultry Science* Taylor & Francis, 1980;21:37–53.
120. Ernst R, Bradley F, Delany M et al. *Common Incubation Problems: Causes and Remedies*. UCANR Publications, 2004:1–6.
121. Tullett S. *Como investigar as práticas de incubação*. Newbridge, Scotland, 2010:4–9, 12–32, 36–37.

122. Lapao C, Gama L, Soares MC. Effects of broiler breeder age and length of egg storage on albumen characteristics and hatchability. *Poultry Science* Oxford University Press Oxford, UK, 1999;78:640–645.
123. Bruzual J, Peak S, Brake J et al. Effects of relative humidity during incubation on hatchability and body weight of broiler chicks from young breeder flocks. *Poultry Science* Oxford University Press Oxford, UK, 2000;79:827–830.
124. Soares MC. Simpósio Nacional de Resíduos e Efluentes Orgânicos. Leiria, 2015.
125. Soares MC. Considerações políticas sobre a análise dos riscos alimentares. *Revista de Ciências Agrárias* 2002;25:319–324.
126. Soares MC. Desafios da segurança alimentar para o setor avícola. *Federação Portuguesa das Associações Avícolas* 2010;
127. DGAV. *Lista de biocidas de uso veterinário utilizado*. Lisboa, 2017:1–42.
128. Bayer. *Manual de biossegurança Bayer*. Portugal, :5–31.
129. Oliveira D, Cardoso R, Mamprim A et al. Laboratory and Field Evaluation of a Cypermethrin-Based Insecticide for the Control of *Alphitobius Diaperinus* Panzer (Coleoptera: Tenebrionidae) and Its In-Vitro Effects on *Beauveria Bassiana* Bals. Vuill. (Hypocreales: Cordycipitaceae). *Revista Brasileira de Ciência Avícola* SciELO, Brasil, 2016;18:371–380.
130. Vittori J, Schocken-Iturrino RP, Trovó KP et al. *Alphitobius diaperinus* spp como veiculador de *Clostridium perfringens* em granjas avícolas do interior paulista-Brasil. *Ciência Rural* SciELO, Brasil, 2007;894–896.
131. Roche A, Cox N, Richardson L et al. Transmission of *Salmonella* to broilers by contaminated larval and adult lesser mealworms, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Poultry Science* Oxford University Press Oxford, UK, 2009;88:44–48.
132. Leffer AM, Kuttel J, Martins LM et al. Vectorial competence of larvae and adults of *Alphitobius diaperinus* in the transmission of *Salmonella* Enteritidis in poultry. *Vector-borne and Zoonotic diseases* Mary Ann Liebert, Inc., 2010;10:481–487.
133. Bates C, Hiatt K, Stern N. Relationship of *Campylobacter* isolated from poultry and from darkling beetles in New Zealand. *Avian Diseases* BioOne, 2004;48:138–147.
134. Goodwin MA, Waltman WD. Transmission of *Eimeria*, viruses, and bacteria to chicks: darkling beetles (*Alphitobius diaperinus*) as vectors of pathogens. *Journal of Applied Poultry Research* Oxford University Press Oxford, UK, 1996;5:51–55.

135. Despins JL, Axtell RC. Feeding behavior and growth of broiler chicks fed larvae of the darkling beetle, *Alphitobius diaperinus*. *Poultry Science* Oxford University Press Oxford, UK, 1995;74:331–336.
136. Japp A, Bicho C, Silva A. Importância e medidas de controle para *Alphitobius diaperinus* em aviários. *Ciência Rural* SciELO, Brasil, 2010;40.
137. Dinev I. The darkling beetle (*Alphitobius diaperinus*) - a health hazard for broiler chicken production. *Trakia Journal of Sciences* 2013;11:1–4.
138. ACMF. *Formaldehyde - guidelines for safe working practices*. 1995:1–8.
139. Cobb-Vantress. *Vaccination procedure guide*. Arkansas, USA, 2013a:1–27.
140. Mitchell EB, Johns J. Avian hematology and related disorders. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice* Elsevier, 2008;11:501–522.
141. Campbell TW. Hematology. In: Ritchie B, Harrison G & Harrison L, editor. *Avian Medicine Principles and Applications*. Wingers Publishing, USA, 1994:176–198.
142. Walberg J. White blood cell counting techniques in birds. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*. 2001:72–76.
143. Samour J. Diagnostic value of hematology. In: Harrinson G & Lightfoot T, editor. *Clinical Avian Medicine*. Spix Publishing, USA, 2006:587–609.
144. Ahmed S, Shuring G. A resposta imune específica: imunidade adquirida. In: Cunnigham, J and Klein, B, editor. *Tratado de Fisiologia Veterinária*. 4th ed. Elsevier, Brasil, 2008:672.
145. Jones M. Avian Hematology. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice* 2015;18:649–658.
146. Campbell T. *Exotic Animal Hematology and Cytology*. 4th ed. Wiley-Blackwell, USA, 2015:37–62.
147. Lane R. Basic techniques in pet avian clinical pathology. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* Elsevier, 1991;21:1157–1179.
148. Clark P, Boardman W, Raidal S. *Atlas of Clinical Avian Hematology*. Willey-Blackwell, UK, 2009:33–53.
149. Campbell T. Hematology of birds. In: Thrall, M and Weiser, G and Allison, R and Campbell, TW, editor. *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. 2nd ed. Wiley-Blackwell, USA, 2012:238–276.

150. Maxwell M, Robertson G. The avian heterophil leucocyte: a review. *World's Poultry Science Journal* Cambridge University Press on behalf of World's Poultry Science Association, 1998;54:155–178.
151. Branton S, May J, Lott B et al. Various blood parameters in commercial hens acutely and chronically infected with *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*. *Avian Diseases* JSTOR, 1997;540–547.
152. Wight P, Dewar W, Mackenzie G. Monocytosis in experimental zinc deficiency of domestic birds. *Avian Pathology* Taylor & Francis, 1980;9:61–66.
153. Montali R. Comparative pathology of inflammation in the higher vertebrates (reptiles, birds and mammals). *Journal of comparative pathology* Elsevier, 1988;99:1–26.
154. Maxwell M, Robertson G. The avian basophilic leukocyte: a review. *World's Poultry Science Journal* Cambridge University Press on behalf of World's Poultry Science Association, 1995;51:307–325.
155. Lewis S, Bain B. Basic Hematological techniques. In: Lewis, SM and Bain, BJ and Bates, I, editor. *Dacie and Lewis Practical Hematology*. 9th ed. Churchill Livingstone, UK, 2001:19–46.
156. Dawson B, Trapp R. Resumo e apresentação de dados quadros e gráficos. *Bioestatística Básica e Clínica*. McGraw-Hill Interamericana, Ltda, Brasil, 2001:21–53.
157. Festing MF, Altman DG. Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals. *ILAR journal* Oxford University Press, 2002;43:244–258.
158. Afonso A, Nunes C. *Estatística e probabilidade, aplicações e soluções em SPSS*. Escolar Editora, Portugal, 2011:134, 135.
159. Hawkins M, Barron H, Speer B et al. *Birds*. 4th ed. Carpenter, J, editor. *Exotic Animal Formulary* Elsevier Health Sciences, USA, 2013:347.
160. Jones HG, Randall C, Mills C. A survey of mortality in three adult broiler breeder flocks. *Avian Pathology* Taylor & Francis, 1978;7:619–628.
161. Abaxis. *Quick reference guide*. 2014:2–11.
162. Jacobs E, Vadasdi E, Sarkozi L et al. Analytical evaluation of i-STAT Portable Clinical Analyzer and use by nonlaboratory health-care professionals. *Clinical Chemistry* Clinical Chemistry, 1993;39:1069–1074.
163. Erickson KA, Wilding P. Evaluation of a novel point-of-care system, the i-STAT portable clinical analyzer. *Clinical Chemistry* Clinical Chemistry, 1993;39:283–

287.

164. Mock T, Morrison D, Yatscoff R. Evaluation of the i-STAT™ system: A portable chemistry analyzer for the measurement of sodium, potassium, chloride, urea, glucose, and hematocrit. *Clinical biochemistry* Elsevier, 1995;28:187–192.
165. Verwaerde P, Malet C, Lagente M et al. The accuracy of the i-STAT portable analyser for measuring blood gases and pH in whole-blood samples from dogs. *Research in Veterinary Science* Elsevier, 2002;73:71–75.
166. Peiró JR, Borges AS, Gonçalves RC et al. Evaluation of a portable clinical analyzer for the determination of blood gas partial pressures, electrolyte concentrations, and hematocrit in venous blood samples collected from cattle, horses, and sheep. *American Journal of Veterinary Research* Am Vet Med Assoc, 2010;71:515–521.
167. Steinmetz H VRKSRB, J H. Evaluation of the i-STAT portable clinical analyzer in chickens (*Gallus gallus*). *Journal of veterinary diagnostic investigation* SAGE Publications Sage CA: Los Angeles, CA, 2007;19:382–388.
168. Abbott. *Porcedure manual for i-STAT system*. 2011:5–8, 14.
169. Évora PRB, Garcia LV. Equilíbrio ácido-base. *Medicina (Ribeirao Preto Online)* 2008;41:301–311.
170. Wanddell L. Blood gas analysis. *Clinician's Brief* 2016;20–22.
171. Irizarry R, Reiss A, others. Arterial and venous blood gases: indications, interpretations, and clinical applications. *Compendium: Continuing Education for Veterinarians* 31: 1 2009;7:1–7.
172. Ahmad T, Sarwar M. Dietary electrolyte balance: implications in heat stressed broilers. *World's Poultry Science Journal* Cambridge University Press on behalf of World's Poultry Science Association, 2006;62:638–653.
173. Hy-line. *Understanding heat stress in layers: management tips to improve hot weather flock performance*. 2016:1–8.
174. Arantes U, Stringhini J, Oliveira M et al. Effect of different electrolyte balances in broiler diets. *Revista Brasileira de Ciência Avícola* SciELO Brasil, 2013;15:233–237.
175. Mongin P. Recent advances in dietary anion-cation balance: applications in poultry. *Proceedings of the Nutrition Society* Cambridge University Press, 1981;40:285–294.

176. Johnson-Delaney C, Harrison L. *Exotic Companion Medicine Handbook for Veterinarians*. Zoological Education Network, USA, 2008:446–447.
177. Klasing K. Nutritional diseases. In: Swayne, D, editor. *Disease of Poultry* . 13th ed. Wiley-Blackwell, USA, 2013:1210–13, 1222–1224.
178. Balos MZ, Jaksic S, Knevzevic S et al. Electrolytes - sodium, potassium and chlorides in poultry nutrition. *Arhiv Veterinarske Medicine* 2016;9:31–42.
179. Jafri L, Khan A, Azeen S. Ionized calcium measurement in serum and plasma by ion selective electrodes: comparison of measured and calculated parameters. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* Springer, 2014;29:327–332.
180. Brown EM. Extracellular Ca²⁺ sensing, regulation of parathyroid cell function, and role of Ca²⁺ and other ions as extracellular (first) messengers. *Physiological Reviews* American Physiological Society, 1991;71:371–411.
181. Scanes C. Carbohydrate metabolism. In: Scanes, C, editor. *Sturkie's Avian Physiology*. 6th ed. Elsevier, UK, 2015:421–423, 430–437.
182. Nelson RW. Disorders of the endocrine pancreas. In: Nelson, Richard W and Couto, C Guillermo, editor. *Small Animal Internal Medicine*. 15th ed. Elsevier, Canada, 2014:777.
183. Martin MP, Wineland M, Barnes HJ. Selected blood chemistry and gas reference ranges for broiler breeders using the i-STAT handheld clinical analyzer. *Avian Diseases* BioOne, 2010;54:1016–1020.
184. Rose B, Post T. Introduction to simple and mixed acid-base disorders. In: Rose, BD and Post, TW, editor. *Introduction to simple and mixed acid-base disorders*. 5th ed. McGraw-Hill Book Company, USA, 2001:541.
185. Gill FB. *Ornithology*. Macmillan, USA, 2007.
186. Trato reprodutivo feminino da ave . 2016. <http://human-anatomy101.com/male-chicken-anatomy/male-chicken-anatomy-turkey-reproductive-anatomy-grut32bit/>. Retrieved December 6 2017.
187. Celeromics. Câmara de Neubauer. <http://www.celeromics.com/en/cell-count-products/counting-chambers.php>. Retrieved November 9 2017.