



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS “PROF.^a CINOBELINA ELVAS”
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**EFICIÊNCIA DE FIXADORES NA ANÁLISE
HISTOLÓGICA INTESTINAL E DETERMINAÇÃO
HISTOMORFOMÉTRICA DO ÍLEO EM FRANGOS DE
CORTE**

REGINA LUCIA DOS SANTOS SILVA

Bom Jesus – PI

2018

REGINA LUCIA DOS SANTOS SILVA

**EFICIÊNCIA DE FIXADORES NA ANÁLISE
HISTOLÓGICA INTESTINAL E DETERMINAÇÃO
HISTOMORFOMÉTRICA DO ÍLEO EM FRANGOS DE
CORTE**

Orientador: Prof. Dr. Guilherme José Bolzani de Campos Ferreira

Dissertação apresentada ao *Campus* Prof.^a Cinobelina Elvas da Universidade Federal do Piauí, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação, na área de Nutrição Animal (Nutrição e Produção de Alimentos), para a obtenção do título de Mestre.

Bom Jesus - PI

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS “PROF.^a CINOBELINA ELVAS”
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

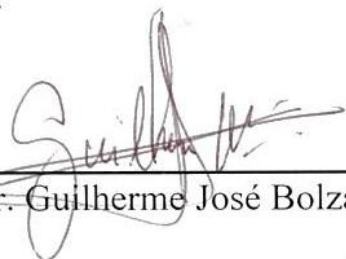
Título: Eficiência de fixadores na análise histológica intestinal e determinação histomorfométrica do íleo de frangos em corte

Autor: Regina Lucia dos Santos Silva

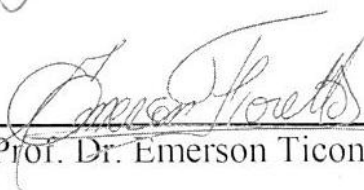
Orientador: Prof.^o Dr. Guilherme José Bolzani de Campos Ferreira

Aprovada em: 30 de Janeiro de 2018.

Banca Examinadora:



Prof.^o Dr. Guilherme José Bolzani de Campos Ferreira



Prof. Dr. Emerson Ticona Fioretto



Prof.^a Dr.^a Leilane Rocha Barros Dourado

Bom Jesus – PI

2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha **Família** (Irismar dos Santos da Silva, Raimundo Pereira da Silva, Regiane dos Santos da Silva, Daniela dos Santos da Silva e Mauricio Ribeiro Sena) de onde sempre obtive o estímulo necessário para continuar em minha trajetória acadêmica, à equipe do Laboratório de Anatomia Animal, em especial à **Hudson Piaulino de Figueiredo Cunha** e **Ranusce Santis** com quem pude crescer não apenas como profissional, mas como amiga, a Professora Dr.^a **Leilane Rocha Dourado** sempre solícita e de quem pude absorver grande aprendizado, e em especial ao Professor Dr. **Guilherme José Bolzani de Campos Ferreira** quem, mais que um orientador, mostrou-se um amigo e educador, a quem devo em grande parte todo o aprendizado obtido durante a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----|
| LISTA DE TABELAS | vi |
| RESUMO GERAL | vii |
| ABSTRACT | ix |
| INTRODUÇÃO GERAL | 10 |
| CAPÍTULO 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 12 |
| 1.1 A FIXAÇÃO NO PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO | 13 |
| 1.1.1 Formaldeído tamponado a 10% | 14 |
| 1.1.2 Bouin | 15 |
| 1.1.3 Álcool etílico 70° e Álcool etílico 50° | 16 |
| 1.1.4 Carnoy | 17 |
| 1.2 HISTOMORFOMETRIA NA NUTRIÇÃO DE AVES..... | 18 |
| 1.3 DIGESTIBILIDADE ILEAL E A COLETA ILEAL EM AVES | 19 |
| 1.4 INTESTINO DELGADO DAS AVES | 21 |
| 1.4.1 Jejuno e Íleo: Mclelland (1986) <i>versus</i> Baumel et al. (1993)..... | 22 |
| 1.5 HISTOLOGIA DO INTESTINO DELGADO DAS AVES..... | 23 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 25 |
| Capítulo 2 “EFICIÊNCIA DE FIXADORES NA ANÁLISE HISTOLÓGICA INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE” | 34 |
| Resumo | 35 |
| Introdução | 36 |
| Material e Métodos | 37 |
| Resultados e Discussão | 40 |
| Conclusão | 45 |
| Referências | 45 |

| | |
|--|-----------|
| Capítulo 3 “DETERMINAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DO ÍLEO EM FRANGOS DE CORTE” | 51 |
| Resumo | 52 |
| Introdução | 53 |
| Material e Métodos..... | 55 |
| Resultados e Discussão | 59 |
| Conclusão | 63 |
| Referências | 64 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 71 |

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1-** Tempo total, em horas, de fixação e processamento da porção descendente do duodeno de frangos de corte submetida à fixação por cinco fixadores (Álcool 70°GL, Álcool 50°GL, Bouin, Carnoy e Formol tamponado a 10%) 38
- Tabela 2-** Características observadas durante o processamento e avaliação dos tecidos duodenais submetidos a cinco fixadores histológicos e seus respectivos escores (numeração entre parênteses) 40
- Tabela 1-** Componentes das rações experimentais fornecidas na alimentação de frangos de corte da Linhagem Cobb 500® de 1 aos 24 dias de idade, Bom Jesus – Piauí, 2017 55
- Tabela 2-** Apresentação de médias e desvios-padrão dos diferentes parâmetros histomorfométricos das porções de jejuno e íleo de frangos de corte 59

RESUMO GERAL

SILVA, R.L.S. 2018. Eficiência de fixadores na análise histológica intestinal e determinação histomorfométrica do íleo em frangos de corte. 71 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal do Piauí, Bom Jesus, 2018.

Diante da inconsistência na utilização de fixadores na avaliação histológica de intestinos em frangos de corte e da importância da histomorfometria no estudo nutricional e produtivo nestes animais, objetivou-se o desenvolvimento de dois estudos complementares. A investigação do efeito de cinco fixadores (Álcool 70°GL, Álcool 50° GL, Bouin, Carnoy e Formol Tamponado a 10%) sobre a preservação tecidual e melhor processamento histológico, e a determinação da localização do íleo em frangos de corte por meio da morfometria microscópica. No primeiro estudo foram coletados de 11 (onze) frangos da linhagem Cobb 500®, aos 24 dias de idade, sob as mesmas condições de manejo e alimentação (formulada à base de milho e farelo de soja). Padronizou-se posição e amostragem de 05 (cinco) fragmentos da alça descendente do duodeno. Em análise de teste cego e único avaliador, cada fragmento no sentido crânio-caudal foi submetido a um tipo de fixador já mencionado acima. Realizou-se procedimento histológico padrão e avaliação quanto à dificuldade de microtomia, qualidade de coloração, preservação das estruturas e presença de artefatos na mucosa e na parede muscular. Os dados obtidos foram submetidos à análise de Kruskal-wallis e ao teste de Mann-whitney. Neste caso a análise de Kruskal-wallis não verificou diferenças significativas quanto a utilização dos diferentes fixadores para as características de microtomia, preservação e presença de artefatos na parede muscular, entretanto diferenças foram verificadas para as características coloração, preservação e presença de artefatos na mucosa intestinal, as quais foram submetidas ao teste de Mann-whitney o qual demonstrou a superioridade do Bouin e Formol tamponado a 10%. No que se refere ao segundo estudo, foram utilizados dez animais da linhagem Cobb 500® nas mesmas condições já descritas, dos quais foram coletados um total de 05 (cinco) fragmentos no sentido jejuno-íleo, sendo 02 (dois) fragmentos da região jejunal anterior ao divertículo de Meckel – 01 (um) JEP – jejuno proximal (imediatamente após a flexura duodenojejunal e 1 (um) JED – jejuno distal (na porção média a flexura e o divertículo de Meckel), e 03 (três) fragmentos subsequentes ao divertículo de Meckel – 01 (um) ILP – íleo proximal (imediatamente após o divertículo), 01 (um) ILM – íleo médio na (posição média entre o divertículo e o ápice dos cecos), e 01 (um) ILD – íleo distal (entre os cecos). Todos foram fixados em Formol tamponado a 10%, submetidos ao procedimento histológico padrão e corados com Hematoxilina e Eosina. Foram avaliadas as características para o vilão – perímetro, altura e largura; para a cripta – altura e largura; para a parede muscular – espessura. Os resultados obtidos foram submetidos à análise descritiva quantitativa e teste de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). Pela análise descritiva quantitativa verificou-se um comportamento decrescente e contínuo das médias obtidas para vilão- altura e perímetro; para cripta- altura, desde JEP até ILD. Quanto aos resultados obtidos pelo teste de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$), estes caracterizaram 03 (três) regiões distintas significativamente, desde o início do jejuno até a porção final do íleo, inserido entre os cecos. A histomorfometria determinou o jejuno se estende ao longo das porções JED, JEM e ILP e o íleo é representado pela região ILD (disposto entre os cecos). Ambos os estudos visaram fornecer um padrão metodológico para pesquisas que envolvam estes procedimentos em frangos de corte. Deste modo, concluiu-se que os fixadores Bouin e Formol tamponado a 10% se apresentaram superiores quanto à preservação, reduzida formação de artefatos e coloração de tecidos intestinais de frango de corte e que a amostragem das áreas de Jejuno e Íleo devem obedecer os pontos denominados jejuno distal (JED) e íleo distal (ILD) para análise histológica destas regiões em estudos de nutrição em frangos de corte.

Palavras – chave: anatomia, aves, íleo, topografia intestinal

ABSTRACT

SILVA, R.L.S. Fixer efficiency in intestinal histological analysis and histomorphometric determination of ileum from broiler chickens. 71p. MsC Dissertation (Mestrado em Zootecnia) – Federal University of Piauí, Bom Jesus, 2018.

In view of the inconsistency in the use of fixatives in the histological evaluation of intestines in broilers and the importance of histomorphometry in the nutritional and productive study in these animals, the objective was to develop two complementary studies. The investigation of the effect of five fixatives (Alcohol 70°GL, Alcohol 50° GL, Bouin, Carnoy and 10% Buffered Formol) on tissue preservation and better histological processing, and the determination of the location of the ileum in broilers by means of microscopic morphometry. In the first study, 11 (eleven) chickens of the Cobb 500® strain were collected at 24 days of age under the same management and feed conditions (formulated with corn and soybean meal). Position and sampling of 5 (five) fragments of the duodenal descending loop were standardized. In blind and single-valued analysis, each fragment in the craniocaudal direction was subjected to a type of fixative already mentioned above. Standard histological procedure and evaluation of the difficulty of microtomy, color quality, preservation of structures and presence of artifacts in the mucosa and in the muscular wall were performed. The data were submitted to Kruskal-wallis analysis and the Mann-Whitney test. In this case, the analysis of Kruskal-wallis did not verify significant differences in the use of different fixatives for the characteristics of microtomy, preservation and presence of artefacts in the muscular wall, however differences were verified for the characteristics of coloration, preservation and presence of intestinal mucosa artifacts, which were submitted to the Mann-whitney test which demonstrated the superiority of Bouin and Formol buffered to 10%. Regarding the second study, ten animals of the Cobb 500® strain were used in the same conditions described above, from which a total of 05 (five) fragments were collected in the jejunal-ileus direction, with 02 (two) fragments of the jejunal region anterior to the Meckel - 01 (one) JEP - proximal jejunum (immediately after the duodenojejunal flexure and 1 (one) JED - distal jejunum (in the medial portion of the flexure and the Meckel's diverticulum), and 03 (three) fragments subsequent to the Meckel's diverticulum - 01 (one) ILP - proximal ileus (immediately after the diverticulum), 01 (one) ILM - medium ileus at the midpoint between the diverticulum and the apex of the cecum, and 01 (one) (cecum), all of them were fixed in Formol buffered to 10%, submitted to the standard histological procedure and stained with Hematoxylin and Eosin. The results were submitted to quantitative descriptive analysis and Student-Newman-Keuls test ($p < 0.05$). The quantitative descriptive analysis showed a decreasing and continuous behavior of the averages obtained for villi-height and perimeter; for crypt-height, from JEP to ILD. As to the results obtained by the Student-Newman-Keuls test ($p < 0.05$), they characterized 03 (three) distinct regions significantly, from the beginning of the jejunum to the final portion of the ileum, inserted between the cecum. Histomorphometry determined the jejunum extending along the JED, JEM and ILP portions and the ileum is represented by the ILD region (disposed between the cecum). Both studies aimed to provide a methodological standard for research involving these procedures in broilers. Thus, Bouin and Formol buffered 10% fixatives were found to be superior in preservation, reduced artifact formation and staining of broiler chicken intestinal tissues, and that sampling of the Jejuno and Ileum areas should comply with points called distal jejunum (JED) and distal ileum (ILD) for histological analysis of these regions in nutrition studies in broilers.

Keywords: anatomy, birds, ileum, intestinal topography

INTRODUÇÃO GERAL

O processamento histológico tornou-se cada vez mais decisivo na avaliação nutricional de aves, objetivando verificar a capacidade absorptiva intestinal de alimentação padrão e da inserção de novas fontes de alimentos nestes animais (LATORRE et al., 2017; MAIORKA et al., 2004; RAMOS et al., 2011; SALAZAR et al., 2008; ZHANG et al., 2005).

Junqueira e Carneiro (2008) afirmam que um resultado positivo ao fim do processamento histológico de boa qualidade fundamenta-se na fixação dos tecidos de forma completa e adequada, e é por meio da inclusão do tecido em soluções fixadoras que se obtêm a inibição da autólise tecidual, coagulação ou endurecimento do tecido, preservação dos vários componentes celulares e tissulares, melhora na diferenciação óptica dos tecidos e, finalmente, facilitação da subsequente coloração. Bennett et al. (1976), Ferreira e Chiarini Garcia (1992) corroboram a importância do fixador quando afirmam que com o fixador a preservação celular ocorre com a preservação de variados detalhes morfológicos nos diversos órgão e células.

Atualmente não se tem disponíveis trabalhos que especifiquem quais são os fixadores padrões para estudos que visem elucidar a histologia de tecidos intestinais em aves, portanto, a utilização de fixadores se baseia na experiência profissional com técnicas histológicas, o que pode, por vezes, faltar ao pesquisador iniciante.

Outro possível questionamento refere-se à dubiedade sobre a exata localização do limite entre jejuno e íleo em frangos de corte. As obras de Mcllelland (1986) e Baumel et al.(1993) tem sido a referência para a coleta das regiões anatômicas supracitadas, no entanto, estes autores divergem consideravelmente quanto as localizações anatômicas dessas regiões. É possível verificar, ainda, que considerável parte dos trabalhos científicos, produzidos com base na avaliação histomorfométrica intestinal de aves, simplesmente não descreve com base em qual autor a coleta de cada porção intestinal foi realizada, prejudicando assim a reprodução de suas pesquisas.

A delimitação ileal, ainda, pode favorecer a padronização metodológica desta porção para trabalhos de digestibilidade ileal, os quais, por vezes, divergem quanto a dimensão e localização dos fragmentos coletados (Barbosa et al. 2008; Luegas et al. 2015; Garcia et al. 2000).

Diante do sobredito, este trabalho objetiva avaliar a atuação de diferentes fixadores histológicos (Álcool etílico 70°GL, Álcool etílico a 50°GL, Bouin, Carnoy e Formol tamponado a 10%) no processamento do intestino de frangos de corte e, ainda, fornecer por meio da histomorfometria a real localização das regiões de jejuno e íleo em frangos de corte, sugerindo as melhores regiões de coleta de cada porção intestinal para a realização de estudos morfológicos e histológicos destas regiões.

A dissertação foi desenvolvida sob protocolo nº 075/15 do Comitê de Ética em experimentação animal da UFPI e estruturada conforme as normas para elaboração de dissertações do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da UFPI da seguinte forma: INTRODUÇÃO; CAPÍTULO 1. Revisão Bibliográfica elaborada de acordo com as normas da ABNT; CAPÍTULO 2 – artigo científico intitulado: “**Eficiência de fixadores para análise histológica de intestino de frangos de corte**”; CAPÍTULO 3 – “**Determinação histomorfométrica do íleo em frangos de corte**” elaborados de acordo com as normas da Revista *Comunicata Scientiae* (<https://comunicatascientiae.com.br/public/journals/1/normas/Normas2017PORTUGUES.pdf>); e CONSIDERAÇÕES FINAIS.

CAPÍTULO 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Elaborada de acordo com as normas da ABNT
(<http://abnt.org.br/normalizacao/lista-de-publicacoes/abnt>)

1.1 A FIXAÇÃO NO PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Uma preparação histológica de qualidade fundamenta-se no processo de fixação dos tecidos de forma completa e adequada. Por meio desta almeja-se, principalmente, a inibição da autólise tecidual, coagulação ou endurecimento do tecido, preservação dos vários componentes celulares e tissulares, melhora na diferenciação óptica dos tecidos e, finalmente, facilitação da subsequente coloração (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008).

Existe uma variedade de fixadores químicos os quais apresentam vantagens e desvantagens, sendo sua escolha adaptada em função do estudo proposto. Os fixadores devem preservar a morfologia e os constituintes dos tecidos num estado semelhante ao *in vivo* para observação microscópica. Assim, os fixadores não devem retrair, distorcer ou endurecer excessivamente os tecidos, assim como diminuir as características tintoriais dos diferentes componentes teciduais ou destruir os epítomos antigênicos dos tecidos (GRIZZLE, FREDENBURGH e MYERS, 2008).

O tempo de fixação varia de acordo com o tamanho e constituição do tecido, poder de fixação e temperatura do fixador (CULLING, ALLISSON e BARR, 1985). Caso esta fase do processamento histológico não ocorra corretamente às células e seus constituintes se apresentam distorcidas e retraídas, dificultando a avaliação histológica (FOX et al., 1985).

O tipo de fixador utilizado pode preservar diferentemente detalhes morfológicos dos mais variados tipos de órgãos e células (BENNETT et al., 1976; CHIARINI-GARCIA, 1992; SOARES et al., 2006).

Os principais fixadores utilizados são a acetona, o ácido acético, o ácido ósmico, o ácido pícrico, álcool etílico, álcool metílico, aldeído fórmico, aldeído glutárico, bicloreto de mercúrio, cromatos e permanganato de potássio. No entanto, frequentemente, os fixadores são constituídos de um fixador principal associado a outros que atuam corrigindo possíveis falhas do principal (BEHMER et al., 2003).

Trabalhos como de Amaral et al. (2004), Santos et al. (2012) e Campos et al. (2016) buscam avaliar as características de diferentes fixadores em diferentes tecidos animais. No entanto, quanto ao processamento de tecido intestinal de aves não é possível verificar a padronização da utilização de fixadores (AMOROSO et al., 2015; BOHORQUEZ, et al., 2011; CHEN et al., 2015; FAVERI et al., 2015; RAMOS et al., 2011; SILVA et al., 2011).

1.1.1 Formaldeído tamponado a 10%

Os aldeídos classificam-se como fixadores não coagulantes, conferindo as proteínas celulares o aspecto de gel transparente resultante das ligações cruzadas formadas entre as moléculas do fixador e as macromoléculas dos tecidos. Desta forma, após a fixação, muitas moléculas de água permanecem ligadas aos tecidos e às macromoléculas tissulares onde normalmente a água está associada, resultam em maior estabilização estrutural e, conseqüentemente, em melhor preservação histológica (FOX et al., 1985; SESSO, 1998).

Através das pontes metilénicas, promovidas pela fixação em aldeídos, às proteínas intracelulares solúveis são ligadas às proteínas estruturais e tornam-se insolúveis, conseqüentemente, não difundem durante o processamento e outros tratamentos subsequentes à fixação, levando à retenção dos constituintes celulares, bem como à preservação das relações entre os diferentes componentes celulares (FOX et al., 1985; SESSO, 1998). No entanto, podem levar à alteração de algumas características químicas dos componentes dos tecidos, comprometendo algumas colorações histoquímicas, bem como à alteração da conformação dos antígenos e à sua acessibilidade, comprometendo os estudos imunocitoquímicos (HOROBIN, 2008).

Behmer et al. (2003) afirma que o formol, embora não seja o melhor na preservação das estruturas celulares, ainda, é tido como o fixador mais utilizado e permite que o tecido permaneça até 10 anos sem grandes modificações. Alterações decorrentes do processamento com formol são a separação celular nos tecidos, contração citoplasmática em relação ao núcleo e a não preservação das mitocôndrias

Já a formalina a 10% para microscopia óptica e o aldeído glutárico em solução de 2 a 6% para microscopia eletrônica são os fixadores simples mais comumente utilizados (FOX et al., 1985). Sendo a formalina tida como responsável por melhor preservação dos detalhes das células de forma que os tecidos apresentem menos artefatos e melhor resolução ao microscópio de luz (COLE, SYKES, 1974; JUNQUEIRA e JUNQUEIRA, 1983). Entretanto, artefatos de retração observados com a utilização de formalina são reduzidos com uso de formaldeído tamponado neutro (KAP et al., 2011).

Devido ao supracitado recomenda-se a dissolução de formol em tampão fosfatado, Formalina Tamponada a 10%, segundo Behmer et al. (2003):

Formol (solução a 37% de formaldeído)_____ 100,0ml

| | |
|---|---------|
| Água destilada_____ | 900,0ml |
| Fosfato de sódio monobásico _____ | 4,0g |
| Fosfato de sódio dibásico (anidro)_____ | 4,5g |

O tempo de fixação dependerá do tamanho do fragmento do tecido, podendo variar entre 06 e 24h (JUNQUEIRA e JUNQUEIRA, 1983). Behmer et al. (2003) preconiza o tempo de fixação de 12 horas. É recomendado que, sempre que possível, não ultrapasse a 3mm de espessura e se utilize, no mínimo, um volume 20 vezes maior de fixador, em relação ao tecido a ser fixado, para que o material reaja satisfatoriamente. Uma vez fixado, a peça deve ser transferida para álcool 70%, onde poderá permanecer indefinidamente (JUNQUEIRA e JUNQUEIRA, 1983).

Amaral (2002) obteve resultados acurados no estudo do endométrio da égua processado com formalina. O grau de retração tecidual obtido no estudo de Amaral et al. (2004) foi, pelo mesmo, relacionado ao tipo de fixador utilizado. A altura média do epitélio de revestimento obtida nas biópsias fixadas em Bouin foi 28% menor ($P < 0,05$) do que nas biópsias fixadas em formalina, independente da fase do ciclo estral, o que caracteriza a melhor estabilização estrutural de tecidos fixados em formalina através de uma amarração que as moléculas fixadoras fazem sobre as macromoléculas tissulares (SESSO, 1998).

Apesar de o formol ser amplamente utilizado como fixador, alguns estudos têm demonstrado a associação entre a exposição ao formol e o desenvolvimento de neoplasias do trato respiratório dos manipuladores (HAUPTMANN, LUBIN e STEWART, 2003). Em 2004, o formol foi classificado como reagente carcinogênico pela International Agency for Research on Cancer (IARC, 2004).

1.1.2 Bouin

Os fixadores coagulantes, como a solução de Bouin, causam despolimerização das proteínas tissulares, fazendo com que as células e tecidos se apresentem com aspecto não homogêneo, o que dificulta a observação de detalhes citológicos (COLE, SYKES, 1974; LOCQUIN e LANGERON, 1983). Segundo Sesso (1998) a solução de Bouin precipita e altera a configuração das proteínas, levando à retração do tecido. No entanto, Reis (2012) afirma que em condições de necessidade de uma fixação mais rápida o líquido de Bouin tem sido a escolha, por permitir o estudo adequado de estruturas mais sensíveis à degradação e que necessitam de uma fixação mais eficiente para o estudo de detalhes celulares, nucleares ou citoplasmáticos, além de uma melhor visualização dos fenômenos

apoptóticos. De acordo com Behmer et al. (2003) este fixador apresenta boa penetração e apresenta tempo de fixação de 4 a 6 horas.

O fixador de Bouin tem a seguinte fórmula (BEHMER et al., 2003):

Aldeído fórmico (37 – 40%) _____ 250,0mL

Ácido pícrico solução aquosa saturada _____ 750,0mL

Ácido acético _____ 5,0mL

Após a fixação é fundamental a remoção do ácido pícrico dos tecidos para a posterior etapa de coloração. Além disso, resíduos deste ácido podem favorecer a deterioração da peça com o passar do tempo (JUNQUEIRA e JUNQUEIRA, 1983).

O método de preparação com o fixador Bouin e a inclusão em parafina, apesar de menos eficiente na resolução citológica, por apresentar mais artefatos, mantém sua popularidade nos laboratórios de patologia. Atribui-se esta preferência, principalmente, devido à premissa que este método tenha menor custo de execução (MCLAHALN, DE MEYTS e KRETZER, 2007). Diferentemente do supracitado em casos de necessidade de se realizar alguma técnica imunoistoquímica, a qualidade dos resultados pode ser comprometida quando o tecido for fixado em solução de Bouin ou Stieve (KAP et al., 2011).

Chiarini-Garcia et al. (2011) e Reis (2012) concluíram que o fixador Bouin interfere definitivamente na qualidade histológica de biopsias testiculares. Reis (2012), por sua vez, observou que em fragmentos fixados com Bouin e incluídos em parafina houve uma desorganização geral do tecido com retração entre os túbulos seminíferos e má definição entre os componentes intersticiais. Em tecidos ovarianos fixados em Bouin Andrade et al. (2005) obteve bons resultados. Amoroso et al. (2015), por meio da utilização de tecidos fixados em Bouin, pode obter resultados eficientes quanto a morfometria intestinal de frangos de corte sob efeito da interferência das condições da água sobre a da integridade intestinal.

1.1.3 Álcool etílico 70° e Álcool etílico 50°

De acordo com Buesa (2008) fixadores de natureza alcoólica necessitam de menor tempo para fixação, o que acelera o período requerido para o processamento histológico, embora possam promover encolhimento, colapso e endurecimento dos tecidos pela coagulação das proteínas e ácidos nucléicos, justificando possíveis alterações teciduais.

Behmer et al. (2003), contudo, descreve como principais alterações provocadas pela fixação com álcool a formação de agregados de células que tendem a se contrair formando grupos celulares, forte contração citoplasmática, núcleos morfológicamente distorcidos, e retração citoplasmática acumulada na membrana do lado oposto ao qual o fixador penetrou na célula.

Entretanto, Gillespie et al. (2002) citam o etanol 70% como pouco oneroso e de fácil preparo, podendo ser utilizado com sucesso para fixação de tecido glandular, além de órgãos como rim e próstata, permitindo a satisfatória inclusão em parafina. Gomez et al. (2010) recomendam a substituição de formol tamponado a 10% por alcóol 70% para fixação de tecidos utilizados em análises imuno-histoquímicas, devido a maior densidade celular evidenciada com a utilização do último fixador.

Contudo, existe a necessidade de verificar a espessura dos fragmentos que deve ter a máxima de 2 a 3mm, para que álcool atue como fixador de rápida ação. Sendo, naqueles casos em que se necessita da fixação de fragmentos maiores, essencial iniciar-se o procedimento de fixação com álcoois mais fracos, 30 a 40%, por 24 horas, em seguida a concentração do álcool deve aumentar progressivamente (BEHMER et al., 2003).

1.1.4 Carnoy

Em 1851, Clark propôs uma solução para fixar tecidos que consistia de álcool (vinho originalmente) e ácido acético na proporção de 3:1 (BAKER, 1985). Uma derivação desta formula foi introduzida em 1884 pelo belga Jean Baptiste Carnoy, consistindo em álcool absoluto (etanol), clorofórmio e ácido acético glacial (puro) na proporção de 6:3:1 (TSAI, 2006).

Dos componentes de Carnoy, o etanol é um fixador coagulativo que desnatura proteínas insolúveis em água em temperatura ambiente, extrai fosfolípidios das células e não afeta carboidratos. Já o ácido acético penetra rapidamente nos tecidos e tem como papel preservar os cromossomos através da coagulação de ácidos nucleicos (BAKER, 1985), além de quebra os elos entre as proteínas e libera radicais hidrofílicos edemaciando o tecido, prevenindo encolhimentos excessivos ocasionados pela ação do etanol (PRESNELL e SCHEREIBAN, 1997). O clorofórmio tem como função agilizar a lenta penetração do etanol no tecido. Isto se deve á sua natureza hidrofóbica que gera uma rápida desidratação tecidual (CARNOY, 1884).

De acordo com Behmer et al. (2003) a fixação tecidual em solução de Carnoy é efetiva entre 12 e 24 horas, sendo sua composição a seguinte:

| | |
|-----------------|--------|
| Álcool absoluto | 60,0mL |
| Clorofórmio | 30,0mL |
| Ácido Acético | 10,0mL |

Há uma escassez de trabalhos que identifiquem a qualidade do fixador Carnoy na preservação de tecidos intestinais em aves. Observaram-se, apenas, trabalhos datados de 1968 demonstrando a fixação adequada produzida por Carnoy em tecidos humanos, permitindo menor encolhimento tecidual em relação à formalina (PUNCHTLER et al., 1968). Em estudo sobre a ação dos fixadores Carnoy e formalina em tecido intestinal humano não se obteve diferenças significativas na ação desses, no entanto em tecido ovariano de bovinos a morfologia deste órgão foi mais bem preservada com Carnoy em relação à preservação obtida por formalina (SANTOS et al., 2012; STROBEL, MILLER e FERGUSON, 1981).

Chen et al. (2015) utilizaram Carnoy por um período de 8 horas, para avaliação intestinal (duodeno, jejuno e íleo) dos efeitos na morfologia intestinal relacionados a adição de ácido γ -aminobutírico e estresse calórico forçado em galinhas, e puderam observar as estruturas da mucosa intestinal e, ainda, as modificações relacionadas as variáveis avaliadas.

1.2 HISTOMORFOMETRIA NA NUTRIÇÃO DE AVES

As relações entre o regime alimentar e as características do aparelho digestório têm sido estudadas em vários grupos zoológicos e, em muitos destes, a exemplo em peixes, a tecnologia já possibilita o controle na formulação e manipulação de rações balanceadas, indispensável para obtenção de resultados produtivos satisfatórios (LOGATO, 1995; SEIXAS FILHO, BRÁS e GOMIDE, 2000). Contudo, Gallego e Rus (1987) consideram imprescindíveis, antes do aprofundamento no estudo dos distintos mecanismos de absorção intestinal, o conhecimento das características macro e microscópicas do aparelho digestório.

O epitélio intestinal serve como uma barreira dinâmica, a qual, no decurso do seu funcionamento normal, mantém regulada a absorção de nutrientes e água, excluindo os potenciais agentes patogênicos, sendo o intestino a mais importante via de entrada para os antígenos (OSWALD e BOUHET, 2005). Sendo que este epitélio é sensível a

perturbações, regularmente apresenta sinais clássicos referentes a uma resposta imunológica como o aumento da infiltração de leucócitos na lâmina própria e mudanças na estrutura do intestino, como a atrofia das vilosidades e hiperplasia dos enterócitos nas criptas (BEAL et al., 2006; SMITH e BEAL, 2008).

Segundo Macari e Maiorka (2000), o desenvolvimento da mucosa intestinal consiste no aumento da altura e densidade dos vilos, correspondendo para tanto a aumento das células epiteliais, e conseqüentemente uma melhor digestão e absorção intestinal. Diante do supracitado o aspecto histológico assume um caráter imprescindível na avaliação funcional do sistema digestório.

A histomorfometria apresenta-se difundida e aplicada em todo o contexto de nutrição animal, principalmente no que se refere à introdução de novos alimentos na produção de aves, buscando avaliar as condições morfológicas intestinais ligadas diretamente a capacidade de absorção dos componentes nutritivos e a possíveis efeitos nocivos desses novos componentes alimentares (IJI, SAKI e TIKEY, 2001; SILVA et al., 2011; ZHANG et al., 2005).

Além da avaliação da relação características histomorfométricas/capacidade absorptiva é possível descrever e relacionar observações morfométricas intestinais entre espécies distintas, como feito por Saviani et al. (2013) o qual descreve nos segmentos intestinais de avestruzes vilosidades grandes no duodeno e ausência das mesmas no ceco, onde é perceptível a maior quantidade de células caliciformes em relação ao duodeno, sugerindo que o plano histológico dos intestinos de avestruz segue o mesmo padrão observado em mamíferos e aves. Diante dos resultados supracitados verifica-se a importância do processamento e conhecimento histológico no estudo nutricional de aves.

1.3 DIGESTIBILIDADE ILEAL E A COLETA ILEAL EM AVES

A digestibilidade ileal verifica, por meio da coleta ileal, a diferença da quantidade de componentes nutricionais ingeridos em relação à quantidade de excretas nas fezes, sendo o método preconizado para aves em crescimento (SAKAMURA e ROSTAGNO, 2016). Estes autores descrevem melhores resultados com a técnica de coleta ileal em comparação a coleta total de aves intactas e cecectomizadas, devido à presença de ácido úrico nas fezes e a digestão proteica por bactérias cecais.

A digestibilidade da matéria seca, energia bruta e minerais como cálcio e fosforo, além da proteína bruta (TEJEDOR et al. 2001) podem ser avaliadas através do conteúdo

intestinal obtido por meio do protocolo descrito por Sakamura e Rostagno (2016). Estes autores descrevem que para a coleta ileal devem ser retirados das aves, imediatamente após o abate, o íleo, porção a partir a partir do divertículo de Meckel até 1 cm antes da junção ileocecal, sendo indicada a utilização do conteúdo de apenas dos dois terços finais do íleo (SAKAMURA e ROSTAGNO, 2016). Esta delimitação dá margem a uma variabilidade de fragmentos intestinais que podem ser coletados ainda que coloque em desuso trabalhos que se utilizavam das antigas recomendações da utilização de fragmentos de 15 a 40 cm desde a junção ceco-cólica em sentido cranial (SAKAMURA e ROSTAGNO, 2007).

A variação supracitada pode ser observada pela comparação dos estudos de Tejedor et al. (2001), que utilizou-se de um fragmento intestinal coletado a partir de 5 cm antes da junção íleocecocólica até 15 cm em direção ao jejuno, como Dias et al. (2015), que isolou uma secção do íleo desde o divertículo de Meckel até a junção íleo-cecal e Luegas et al. (2015), que utilizou-se da coleta de um segmento de 40 cm, terminando a 4 cm da junção íleo-cecal.

Klut, Mehlhorn e Rodehutschord (2005), por sua vez, consideram que as medições da digestibilidade de aminoácidos ileal podem ser afetadas pelo comprimento escolhido da seção amostrada. Silva, Costa e Lima (2014) evidenciam, a exemplo, que em aves o jejuno responde a absorção de 15-30% de aminoácidos livres, realizada através de transportadores localizados na membrana, e 75-80% acontece na forma de peptídeos, entretanto, no íleo apenas aminoácidos livres são absorvidos. O que retrata a importância da coleta de conteúdo da região específica do íleo para obtenção de resultados fidedignos quanto à avaliação da digestibilidade ileal neste caso.

Poureslami, Batal e Jung (2012) compararam a digestibilidade do conteúdo ileal em frangos de corte considerando dois diferentes fragmentos intestinais, o íleo inteiro, segmento desde o divertículo de Meckel até a junção ileo-cecal, e do íleo terminal, uma subseção de 15cm de comprimento do íleo distal. Estes autores não observaram diferenças significativas quanto à digestibilidade relacionadas às diferentes porções ileais analisadas. Klut, Mehlhorn e Rodehutschord (2005), por sua vez, compararam a digestibilidade de aminoácidos quanto a 3 fragmentos ileais, considerando o íleo como o segmento localizado entre o divertículo de Meckel e 2 cm anterior da junção ileo-ceco-colólica. O íleo foi subdividido em três subseções de igual comprimento: proximal, medial e terminal, por meio dos quais os autores puderam verificar que quando da necessidade de utilizar a digestibilidade ileal de aminoácidos como medida para o potencial de uma fonte protéica, a

amostragem da digesta não deve considerar o terço proximal da seção entre o divertículo de Meckel e o fim do íleo.

Contudo, podemos verificar que em sua maioria dos autores mencionados seguem no procedimento de coleta ileal a descrição de Baumel et al. (1993), tendo o divertículo de Meckel como ponto de divisão entre jejuno e íleo. O que, por sua vez, diverge da descrição apresentada por Mclelland (1986).

1.4 INTESTINO DELGADO DAS AVES

O comprimento do intestino varia com a espécie, e o das aves é relativamente mais curto comparando-se ao de mamíferos (DENBOW, 2000). Segundo Macari (1999) há uma considerável variação do comprimento intestinal das aves, de acordo com o tipo de alimentação. Boleli, Maiorka e Macari (2008), definem o intestino delgado como a porção mais longa do sistema digestório, onde são distinguíveis três segmentos: duodeno, jejuno e íleo.

O duodeno consiste na alça intestinal localizada ventralmente e do lado direito da moela, constituído de uma porção proximal, descendente, e uma distal, ascendente, semelhante à letra “U” (ARTONI, 2004; BOLELI; MAIORKA; MACARI, 2008). Ele é facilmente distinguido das demais regiões do intestino pela observação do pâncreas entre as duas porções da alça duodenal, e por seu maior diâmetro. Na porção ascendente do duodeno abrem-se os ductos biliares e pancreáticos, que conduzem a bile e o suco pancreático para o interior da região anterior do intestino delgado, respectivamente (BOLELI; MAIORKA; MACARI, 2008).

O jejuno, por sua vez, é o segmento intestinal mais comprido, marcado pela presença de pregas jejunais unidas ao mesentério (ARTONI, 2004). Essa porção intestinal durante o desenvolvimento do embrião “*in ovo*” está ligado ao saco vitelino, permanecendo assim durante a eclosão para que a absorção de nutrientes do seu conteúdo continue até o sexto ou sétimo dia de vida. Após a reabsorção completa do saco vitelino, um divertículo curto e cego permanece ligado ao jejuno, chamado de divertículo de Meckel (BOLELI, MAIORKA E MACARI, 2008).

O Divertículo de Meckel é o remanescente permanente do pedúnculo vitelínico e contribui, em aves, para mielopoiese extramedular após a eclosão do ovo (OLAH, GLICK e TAYLOR, 1984). É um tecido linfoide cujo aumento inicia-se a partir das 2 semanas de

idade e está completamente desenvolvido na décima semana. Está presente em 60% das aves, e é mais desenvolvido nas aves jovens (MCLELLAND, 1986).

Subsequente ao jejuno, temos o íleo caracterizado uma longa parte ascendente e uma curta parte descendente, que se continua até o intestino grosso (MARCHINI, 2005). Esse segmento intestinal tem como função a absorção dos nutrientes do quimo, por meio dos vasos linfáticos, chamados lactíferos (BOLELI, MAIORKA E MACARI, 2008).

Contudo é verificável a discordância ou dubiedade quanto à delimitação entre o início do íleo e o fim do jejuno em aves tendo em vista os trabalhos de Mclelland (1986) e Baumel et al. (1993), principais referências citadas nas mais variadas pesquisas que envolvem a utilização destas porções intestinais.

1.4.1 Jejuno e Íleo: Mclelland (1986) *versus* Baumel et al. (1993)

A localização do divertículo de Meckel tem sido de grande importância para a realização de pesquisas, pois é usado como referencial em estudos envolvendo análise das porções de jejuno e íleo em aves (SHIVAZAD et al., 2007; STRINGFELLOW, 2008). Mclelland (1986) descreve o divertículo de Meckel, presente em 60% das aves, como divisor entre a metade proximal e distal do jejuno, corroborando com Boleli, Maiorka e Macari (2008). Em gansos, Besoluk et al. (2002) cita o divertículo de Meckel um pouco distal à região média do intestino delgado.

Contudo, Baumel et al. (1993) afirmam que o divertículo de Meckel posiciona-se entre o jejuno e íleo. Do mesmo modo, Denbow (2000) cita que o divertículo de Meckel é, frequentemente, utilizado como a separação entre o jejuno e íleo. O que segundo Artoni et al. (2014) não é aconselhável por ser o divertículo uma proeminência vestigiosa, podendo variar quanto a localização ou até mesmo desaparecer na vida adulta. Entretanto, Branton et al. (1988), descreve que a posição deste vestígio embrionário é constante no gênero *Gallus*. Contrapondo-se aos 60,0% descritos por Mclelland (1986) e aos 15,8% dos casos citados por Ferreira et al. (2012) em que foi observado a presença de divertículos de Meckel nos animais avaliados.

Diferentemente do supracitado Mclelland (1986), corroborado por Rodrigues et al. (2012) e citado por Sousa et al. (2017), define o íleo como a porção intestinal continua ao jejuno, e na linha media ventral ao reto e a cloaca, estendendo-se em sentido cranial,

dorsalmente ao duodeno ascendente. Em cada lado do íleo e próximo a este, na maior parte do seu comprimento, situam-se os cecos direito e esquerdo.

Autores como Amoroso et al. (2015) citam a descrição anatômica segundo Baumel et al. (1993), dividindo jejuno e íleo pelo local de inserção do divertículo de Meckel, assim como Tancharoenrat et al. (2014), mesmo sem fazer referência a Baumel et al. (1993). No entanto grande parte dos autores não descrevem de acordo com que referências definiram as localizações de coleta dos fragmentos intestinais utilizados em suas pesquisas (FAVERI et al. 2015; NAKPHAICHIT et al., 2011; RAMOS et al. 2011; SHIRAISHI et al., 2009), o que dificulta a reprodução de seus estudos tendo em vista a dubiedade envolvida neste contexto.

1.5 HISTOLOGIA DO INTESTINO DELGADO DAS AVES

O epitélio intestinal serve como uma barreira dinâmica, a qual, no decurso do seu funcionamento normal, mantém regulada a absorção de nutrientes e água, excluindo os potenciais agentes patogênicos, sendo o intestino a mais importante via de entrada para os antígenos estranhos (OSWALD e BOUHET, 2005).

A túnica mucosa é composta por vilos (evaginações da mucosa) com borda estriada e células caliciformes (GARTNER e HIATT, 2007). Os vilos intestinais proporcionam um aumento na superfície interna do órgão, ou seja, na área de digestão e absorção intestinal. De acordo com Macari (1999), o tamanho das vilosidades, bem como o de microvilos, em cada segmento do intestino delgado, conferem a eles características próprias, sendo que na presença de nutrientes a capacidade absorptiva do segmento será diretamente proporcional ao tamanho dos vilos.

Sousa et al. (2017) afirmam que vilos intestinais tornam-se curtos e largos a medida que se aproxima o término do tubo digestório. No duodeno, os vilos são mais longos e digitiformes, no jejuno e no íleo podem ser lameliformes com aspecto foliáceo (BOLELI; MAIORKA; MACARI, 2008). De acordo com Mclelland (1986) a túnica mucosa do jejuno é quase idêntica ao duodeno, embora os vilos sejam mais curtos, já a mucosa do íleo é idêntica ao jejuno.

As células que compõem a túnica mucosa, segundo Gartner e Hiatt (2007) e Boleli, Maiorka e Macari (2008) são as células caliciformes, as intestinais prismáticas (enterócitos), as de Paneth, as células enteroendócrinas (produtoras de polipeptídeos) e as células M. O conjunto dessas células responde pela defesa, digestão e absorção, e pela

regulação desses processos, pela proliferação e diferenciação desses mesmos tipos celulares (BOLELI, MAIORKA e MACARI, 2008).

Banks (1992) relata que entre os pontos de inserção das vilosidades na mucosa observam-se orifícios onde desembocam glândulas tubulares simples (glândulas/criptas intestinais ou de Lieberkühn). A divisão de células indiferenciadas nas criptas intestinais promove o desenvolvimento do epitélio intestinal (QUINN et al. 2010). Esta renovação ocorre pela migração de células diferenciadas para o ápice da vilosidade. Na presença de exacerbada população de microrganismos mudanças na fisiologia intestinal são identificadas e a aceleração ou atenuação do *turnover* celular pode levar a prejuízos ligados a digestão, transporte e absorção de nutrientes (LESER e MOLBAK, 2009).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, D. **Estudo morfológico e histoquímico do endométrio de éguas PSI**. 2002. 65f. Tese (Doutorado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2002.

AMARAL, D.; CHIARINI-GARCIA H.; FILHO, V.V.R.; ALLEN, W.R. Efeito dos fixadores formalina e Bouin na preservação de biópsias do endométrio de éguas após inclusão em resina plástica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.1, p.7-12, 2004.

AMOROSO, L.; BARALDI-ARTONI S, M.; SOARES, N.M.; PINTO, F.R.; PACHECO, M.R.; SAGULA, A.L.; ALVA, J.C.R.; AMOROSO, P. Influência da qualidade microbiológica da água de dessedentação na morfologia intestinal de frangos de corte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.35, n. 1, p.80-88, 2015.

ANDRADE, E.R.; SENEDA, M.M.; ALFIERI, A.A.; OLIVEIRA, J.A.; FIGUEIREDO, J.R.; TONIOLLI, R. Efeito de diferentes concentrações de ácido 3-indolacético na ativação e crescimento in vitro de folículos pré-antrais ovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 3, p. 334-339, 2005.

ARTONI, S.M.B.; NAKAGHI, L.S.; BORGES, L.L. et al. Sistema digestório das aves. In: SAKOMURA, N.K.; SILVA, J.H.V.; COSTA, F.G.P. et al. **Nutrição de não ruminantes**. Jaboticabal-SP: FUNEP, p .678. 2014.

ARTONI, S.M.B. Anatomia do sistema digestório das aves. In: **Curso de Fisiologia da Digestão e Metabolismo de Nutrientes em Aves**, UNESP Jaboticabal, out. 2004. 1 CD-ROM.

BAKER, J.R. **Principles of biological microtechnique**. London: Methuen; 1985.

BANKS, W.J. **Histologia Veterinária Aplicada**. 2ed. São Paulo: Manole, 1992. 629p.

BAUMEL, J.J.; KING, A.S.; BREAZILE, J.E.; EVANS, H.E.; VANDEN BERGE, J.C. **Handbook of avian anatomy: nomina anatomica avium**. 2. ed. Cambridge: Nuttall Ornithological Club, 779 p. (Nuttall Ornithological Club, 23). 1993.

BEAL, R.K.; POWERS, C.; DAVISON, T.F.; SMITH, A.L. Immunological development of the avian gut in: PERRY, G.C. **Avian Gut Function in Health and Disease**, Cab International, v. 28, cap. 6, p. 85-103. 2006.

BEHMER, O.A.; TOLOSA, E.M.C.; NETO, A.G.F.; RODRIGUES, C.J.; **Manual de Técnicas para histologia normal e patológica**. United Kingdom. Editora Manole Ltda. 2ª ed. – Barueri, SP: Manole, p. 331. 2003.

BENNETT, H.S.; WIRINCK, A.D.; LEE, S.W. Science and art in preparing tissues embedded in plastic for light microscopy, with special reference to glycol methacrylate, glass knives and simple stains. **Stain Technology**, v. 51, n. 2, p. 71-97, 1976.

BESOLUK, K.; EKEN, E.; BOYDAK, M.; TIPIRDAMAZ, S. Morphological studies on Meckel's diverticulum in geese (*Anser Anser Domesticus*). **Anatomia Histologia Embryologia**, v. 31, n. 5, p. 290-292, 2002.

BOHÓRQUEZ, D.V.; BOHÓRQUEZ, N.E.; FERKET, P.R. Ultrastructural development of the small intestinal mucosa in the embryo and turkey poult: A light and electron microscopy study. **Poultry Science**. v.90, p. 842–855, 2011.

BOLELI, I. C.; MAIORKA, A.; MACARI, M. Estrutura Funcional do Trato Digestório. In: Marcos Macari.; Renato Luís Furlan.; Elisabeth Gonzales.. (Org.). **Fisiologia Aviária - Aplicada a Frangos de Corte**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, p. 75-98. 2008.

BRANTON, S.L.; LOTT, B.D.; MORGAN, G.W.; DEATON, J.W. Position of Meckel's diverticulum in broiler-type chickens. **Poultry Science**. v.67, p. 677-679, 1988.

BUESA, R.J. Histology without formalina? **Annals of Diagnostic Pathology**, n. 12, p. 387-396, 2008.

CAMPOS, L.S.; TAFURI, W.L.; PINTO, A.J.W. Avaliação de diferentes fixadores na preservação das características histológicas de pele de orelha de cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.68, n.5, p.1212-1218. 2016.

CARNOY, JB. **La biologie cellulaire**. Paris: Liere; 1884.

CHEN, Z.; XIE, J.; HU, M. Y.; TANG, J.; SHAO, Z.F.; LI, M.H. Protective effects of γ - aminobutyric acid (gaba) on the small intestinal mucosa in heat-stressed wenchang chicken. **The Journal of Animal & Plant Sciences**, v.25(1): p. 78-87, 2015.

CHIARINI-GARCIA, H.; PARREIRA, G.G.P.;ALMEIDA R.C.L. Glycol Methacrylate embedding for improved morphological, morphometrical, and immunohistochemical investigations under light microscopy: Testes as a model. **Methods in Molecular Biology**. p.689:3-18, 2011.

COLE, M.B.; SYKES, S.M. Glycol methacrylate in light microscopy: a routine method for embedding and sectioning animal tissue. **Stain Technology**, v. 49, n. 6, p. 387-400, 1974.

CULLING, C.F.A.; ALLISSON, R.T.; BARR, W.T. **Cellular pathology technique**. 4. ed. London: Butterworth-Heinemann, 1985.

DENBOW, D.M. Gastrointestinal anatomy and physiology, In:WHITTOW, G.C. **Sturkie's Avian Physiology**. Academic Press, fifth edition, San Diego. p. 298-341. 2000.

DIAS, G.E. A.; CARVALHO, B. O.; GOMES, A.V. C.; MEDEIROS, P. T.C.; SOUSA, F. D. R.; SOUZA, M. M. S.; LIMA, C. A. R. Óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare L.*) na dieta de frangos de corte como equilibrador da microbiota intestinal. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.37, ed.1, p.108-114, 2015.

FAVERI, J.C.; MURAKAMI, A.E.; POTENÇA, A.; EYNG, C.; MARQUES, A.F.Q.; SANTOS, T.C. Desempenho e morfologia intestinal de frangos de corte na fase de crescimento, com e sem adição de nucleotídeos na dieta, em diferentes níveis proteicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, ed.3, p.291-296, 2015.

FERREIRA, M.S.; JÚNIOR, P. F.; GUIMARÃES, G.C.; OLIVEIRA, F.S. Tamanho e localização do pedúnculo e divertículo vitelínicos em aves de corte. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 5, p.1919-1922, 2012.

FERREIRA, R.M.A.; CHIARINI-GARCIA, H. Efeito da fixação e do meio de inclusão na preservação histológica do intestino da traíra *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794). **Revista Brasileira de Ciências Morfológicas**, v. 9, p. 32-37, 1992.

FOX, C.H.; JOHNSON, F.B.; WHITING, J.; ROLLER, P.P. Formaldehyde fixation. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 33, n. 8, p. 845, 1985.

GALLEGO, M.G.; RUS, A.S. Absorción intestinal en peces. In: ESPINOSA DE LOS MONTEROS, J.; LABARTA, U. (Eds.). **Nutricion en acuicultura I**. Madrid: Plan de Formación de Técnicos Superiores en Acuicultura, p.123-171, 1987.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. **Atlas Colorido de Histologia**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 432. 2007.

GILLESPIE, J.W.; BEST, C.J.; BICHSEL, V.E.; COLE, K.A.; GREENHUT, S.F.; HWITT, S.M.; AHRAM, M.; GATHRIGHT, Y. B.; MERINO, M.J.; STRAUSBERG, R.L.; EPSTEIN, J.I.; HAMILTON, S.R.; GANNOT, G.; BAIBAKOVA, G.V.; CALVERT, V.S; FLAIG, M.J.; CHUARQUI, R.F.; HERRING, J.C.; PFEIFER, D.; PETRICOIN, E.F.; LINEHAN, W.M.; DURAY, P.H.; BOVA, G.S.; EMMERT-BURCK, M.R. Evaluation of non-formoldeído in tissue fixation for molecular profiling studies. **American Journal of Pathology**, v. 160, n. 2, p. 449-457, 2002.

GOMEZ, D.S.; JANEIRO, R.; BRASIL, R.A.; JULIANO, Y.; NOVO, N.F.; GEMPERLI, R.; PINTO, W.S. Comparação da evidenciación dos miofibroblastos marcados por imunohistoquímica em tecido de granulação quando fixado por formol ou por álcool a 70%. **Revista Brasileira de Queimaduras**. v.9, ed.1, p.11-3, 2010.

GRIZZLE, W.; FREDENBURGH, J.; MYERS, R. Fixation of Tissues. In: BANCROFT, J.D.; GAMBLE, M. **Theory and Practice of Histological Techniques**.6 ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2008.

HAUPTMANN, M.; LUBIN, J.H.; STEWART, P.A.; Mortality from lymphohematopoietic malignancies among workers in formaldehyde industries. **Journal national cancer institute**, v.95, p.1615-23, 2003.

HOROBIN, R.E. How do Histological Stains Work In: Bancroft, J.D.; Gamble, M. **Theory and Practice of Histological Techniques**. United Kingdom. 6 ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2008.

IARC. International Agency for Research on Cancer. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Tobacco Smoke and Involuntary Smoking - IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, v. 83. Lyon: IARC Press; 2004.

IJI, P.A.; SAKI, A.A.; TIKEY, D.R. Intestinal structure and function of broiler chickens on diets supplemented with a mannanoligosaccharide. **Animal Feed Science and Technology**, v. 81, p.1186-1192, 2001.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

JUNQUEIRA, L.C.U.; JUNQUEIRA, L.M.M.S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Santos, 1983.

KAP, M.; SMEDTS, F.; OOSTERHUIS, W.; WINTHER, R.; CHRISTENSEN, N.; REISCHAUER, B.; VIERTLER, C.; GROELZ, D.; BECKER, K.F.; ZATLOUKAL, K.; LANGER, R.; SLOTTA-HUSPENINA, J.; BODO, K.; DE JONG, B.; OELMULLER, U.; RIEGMAN, P. Histological assessment of PAX gene tissue fixation and stabilization reagents. **PLoS One**.v. 6. e27704, p.1-10, 2011.

KLUTH, H.; MEHLHORN, K.; RODEHUTSCORD, M. Studies on the intestine section to be sampled in broiler studies on precaecal amino acid digestibility. **Archives of Animal Nutrition**. v.59, ed.4, p.271–279. 2005.

LATORRE, J.D.; HERNANDEZ-VELASCO, X.; VICENTE, J.L.; WOLFENDEN, R.; HARGIS, B. M.; TELLEZ, G.;. Effects of the inclusion of a Bacillus direct-fed microbial on performance parameters, bone quality, recovered gut microflora, and intestinal morphology in broilers consuming a grower diet containing corn distillers dried grains with solubles. **Poultry Science**, v.96, ed.8, p. 2728–2735, 2017.

LESER, T.D.; MOLBAK, L. Better living through microbial action: the benefits of the mammalian gastrointestinal microbiota on the host. United Kingdom. **Environmental Microbiology**. v.11, ed. 9, p.2194-2206. 2009.

LOCQUIN, M.; LANGERON, M. **Handbook of microscopy**. London: Butterworths, 322 p. 1983.

LOGATO, P.V.R. **Anátomo-histologia funcional do aparelho digestório do pacu, Piaractus mesopotamicus Holmberg, (Characiformes, Characidae, Myelinae)**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1995. 118p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, 1995.

LUEGAS, J.A.P., ALBINO, L.F.T., TAVERNARI, F.C., BARROS, V.R.S.M., PESSOA, G.B.S., ROSTAGNO, H.S. Efeito da adição de probióticos na dieta sobre digestibilidade ileal da matéria seca e da proteína de frangos de corte. **Archivos de zootecnia**.v.64, ed.247, p. 00-00. 2015.

MACARI, M. **A fisiologia do sistema digestório das aves (I)**. Aves e ovos, v. 15, n. 8/9, p. 12-20, jun. 1999.

MACARI, M.; MAIORKA, A. Estudo sobre uso de parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* sobre desenvolvimento das vilosidades intestinais. In: Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícola, Campinas, SP. **Anais**. Campinas, p. 170. 2000.

MAIORKA, A.; SANTIN, A.M.E.; BORGES, S.A.; OPALINSKI, M.; SILVA, A.V.F. Emprego de uma mistura de ácidos fumárico, láctico, cítrico e ascórbico em dietas iniciais de frangos de corte. **Archives of Veterinary Science**. v. 9, n. 1, p. 31-37, 2004.

MARCHINI, C. F. P. **Efeito da temperatura ambiente cíclica elevada sobre os parâmetros produtivos, fisiológicos, morfométricos e proliferação celular da mucosa intestinal de frango de corte**. 2005. 81f. Tese (Mestrado em Produção Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005.

MCLACHLAN, R.I.; DE MEYTS, E.R.; KRETZER, D.M. Histological evaluation of the human testis approaches to optimizing the clinical value of the assessment: Mini Review. **Human Reproduction**. v.22, p.2-16, 2007.

MCLELLAND, J. Sistema digestório das aves. In: GETTY, R. (Ed.). **Anatomia dos animais domésticos**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986. v. 2, p. 1986.

NAKPHAICHIT, M.; THANOMWONGWATTANA, S.; PHRAEPHAISARN, C.; SAKAMOTO, N.; KEAWSOMPONG, S.; NAKAYAMA, J. ; NITISINPRASERT, S. The effect of including *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 during post-hatch feeding on the growth and ileum microbiota of broiler chickens. **Poultry Science**, v. 90, ed. 12, p. 2753–2765, 2011.

OLAH, I.; GLICK, B.; TAYLOR, R. E. Meckels diverticulum. II. A novel lymphoepithelial organ in the chicken. **The Anatomical Record**, v. 208, n. 2, p. 253-263, 1984.

OSWALD, I.P.; BOUHET. The effects of mycotoxins, fungal food contaminants, on the intestinal epithelial cell-derived innate immune response. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 108, n. 1-2, p. 199-209, 2005.

POURESLAMI, R.; BATAL, A.B.; JUNG, B. Effect of ileal sub-section and the method of collection of digesta on the determination of apparent ileal digestibility of amino acids in broilers. *Animal Feed Science and Technology*. v.177. p.130–133. 2012.

PRESNELL, J.K.; SCHEREIBAN, M.P. **Humason's animal tissue techniques**, 5 th ed. United Kingdom. Baltimore: Johns Hopkins University Press; 1997.

PUNCHTLER, H.; WALDROP, F.S.; CONNER, H.M.; TERRY, M.S. Carnoy fixation: practical and theoretical considerations. *Histochemie*. v.16 (4), p.361-71, 1968.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD F.C. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. United Kingdom. 10th ed. Blackwell Publishing, Oxford, p.457-460. 2010.

RAMOS, L.S.N.; LOPES, J.B.; SILVA, S.M.M.S; SILVA, F.E.S.; RIBEIRO, M.N. Desempenho e histomorfometria intestinal de frangos de corte de 1 a 21 dias de idade recebendo melhoradores de crescimento. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.40, n.8, p.1738-1744, 2011.

REIS, A.B. **Estudo comparativo entre diferentes processamentos histológicos na interpretação de biopsias testiculares**. Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. Belo Horizonte. p. 77. 2012.

RODRIGUES, M. N.; OLIVEIRA, G. B.; SILVA, R. S. B.; TIVANE, C.; ALBUQUERQUE, J.F.G.; MIGLINO, M.A.; OLIVEIRA, M.F. Macroscopia e topografia do aparelho digestório de emas (*Rhea americana americana*). *Pesquisa Veterinária Brasileira*. v.32, ed.7, p.681-686, 2012.

SALAZAR, P.C.R.; ALBUQUERQUE, R.; TAKEARA, P.; TRINDADE NETO, M. A.; ARAÚJO, L.F. Efeito dos ácidos láctico e butírico, isolados e associados, sobre o desempenho e morfometria intestinal em frangos de corte. *Brazilian Journal Veterinary Research. Animal Science*. v. 45, n. 6, p. 463-471, 2008.

SAKAMURA, N.K.; ROSTAGNO, H.S. **Métodos de pesquisa em nutrição de monogástricos**. Jaboticabal: FUNEP, ed.1, p.283. 2007.

SAKAMURA, N.K.; ROSTAGNO, H.S. **Métodos de pesquisa em nutrição de monogástricos**. Jaboticabal: FUNEP, ed.2, p.283. 2016.

SANTOS, J.T.; SILVA – SANTOS, K.C.; ANDRADE, E.R.; LISBOA, L.A.; SCHNEIDER, C.L.; CIQUINI, A. Effect of fixative type and fixation time on the morphology of bovine preantral ovarian follicles. **Semina: Ciências Agrárias**. v.33, ed.1, p.297-304. 2012.

SAVIANI, G.; PONSO, R.; COGLIATI, B.; ARAÚJO, C.M.M.; SANTOS, J.M.; MARIANO, A.N. B.; ALBUQUERQUE, R.; Histologia do intestino do avestruz (*Struthio camelus*, Linnaeus 1758). **Brazilian Journal Veterinary Research. Animal Science**. v. 50, n. 4, p. 265-269, 2013.

SEIXAS FILHO, J.T.; BRÁS, J.M.; GOMIDE, A.T.M. Anatomia funcional e morfometria dos intestinos e dos cecos pilóricos do teleostei (Pisces) de água doce *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.2, p.313-324, 2000.

SESSO, A. Fixação de sistemas biológicos. In: SOUZA, W. **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicada às ciências biológicas**. Rio de Janeiro: Universidade Estadual Norte Fluminense, 1998. p.1-17, cap. I.

SHIRAISHI, C.S.; AZEVEDO, J.F.; SILVA A. V.; SANT'ANAI, D.M.G.; EDUARDO ARAÚJO, J.A. Análise morfométrica da parede intestinal e dinâmica de mucinas secretadas no íleo de frangos infectados por *Toxoplasma gondi*. **Ciência Rural**.v.39, n.7, p.2146-2153, 2009.

SHIVAZAD, M.; BEJAEI, M.; TAHERKHANI, R.; ZAGHARI, M.; KIAEI, M. M. Effects of glucose injection and feeding oasis on broiler chick`s subsequent performance. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.10, n.11, p.1860-1864, 2007.

SILVA, J.H.V.; COSTA, F.G.P; LIMA, R.B. Digestão e Absorção de Proteínas. In: SAKOMURA, N.K.; SILVA, J.H.V.; COSTA, F.G.P. et al. **Nutrição de não ruminantes**. Jaboticabal-SP: FUNEP, p.678. 2014.

SILVA, J.C.R.; RABELO, C.B.V.; LOPES, C.C.; JÚNIOR, V.A.S.; SILVA, D.A.T.; ARRUDA, E.M.F. Sugar cane yeast in the diet of laying hens and effects on intestinal morphology. **Poultry Science**. v.90. Supp. 1, p. 146-147,. 2011.

SMITH, A.L.; BEAL, R. The avian enteric immune system in health and disease. In: DAVISON, F.; KASPERS, B.; SCHAT, K.A. **Avian Immunology**. Academic Press. v.13, p. 243–271. 2008.

SOARES, J.M.; BELETTI, M.E.; MACHADO, E.R.; SILVA, M. Histomorfometria de testículos de gatos (*Felis domestica*) utilizando-se três diferentes fixadores. **Bioscience Journal**. v. 22, n. 1, p. 175-181, 2006.

SOUSA, D. C.; OLIVEIRA, N. L.A.; SANTOS, E.T.; GUZZI, A.; DOURADO, L.R.B.; FERREIRA, G. J.B.C. Caracterização morfológica do trato gastrointestinal de frangos de corte da linhagem Cobb 500®. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [S.l.], v. 35, n. 1, p. 61-68, 2017.

STRINGFELLOW, K.D. Evaluation of agricultural disinfectants and necrotic enteritis preventatives in broiler chickens. **Master of Science Thesis**. p.86. 2008.

STROBEL, S.; MILLER, HR.; FERGUSON, A. Human Intestinal mucosal mast cells: evaluation of fixation and staining techniques. **Journal of Clinical Pathology**. v.34, ed.8, p. 851-8. 1981.

TANCHAROENRAT, P.; RAVINDRAN, V.; ZAEFARIAN, F.; RAVINDRAN, G. Digestion of fat and fatty acids along the gastrointestinal tract of broiler chickens. **Poultry Science**, v. 93, ed.2, p.371-9. 2014.

TEJEDOR, A. A.; ALBINO, L. F. T.; ROSTAGNO, H. S.; Vieites, F. M. Efeito da Adição da Enzima Fitase sobre o Desempenho e a Digestibilidade Ileal de Nutrientes. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.30, n.3. 2001.

TSAI, C. **Comparing DNA Damage Caused by Formaldehyde, Glutaraldehyde, Carnoy's and ethacam e Cancer Tissue Fixations**. Electronic Thesis or Dissertation. Bowling Green State University, 2006. Disponível em: <<https://etd.ohiolink.edu/>>. Visualizado em 21 de setembro de 2017.

ZHANG, W.; LEE, B.D.; LEE, S.K.; Lee, K.W.; An, G.H.; Song, K.B.; Lee, C.H. Effects of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cell components on growth performance, meat quality, and ileal mucosa development of broiler chicks. **Poultry Science**, v.84, n.7, p.1015-1021, 2005.

Capítulo 2 “EFICIÊNCIA DE FIXADORES NA ANÁLISE HISTOLÓGICA INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE”

Elaborado de acordo com as normas da Revista *Comunicata Scientiae*
(<https://comunicatascientiae.com.br/public/journals/1/normas/Normas2017PORTUGUES.pdf>)

Chapter 2 “EFFICIENCY OF FIXERS IN THE INTESTINAL HISTOLOGICAL ANALYSIS OF BROILER CHICKENS”

Elaborado de acordo com as normas da Revista *Comunicata Scientiae*
(<https://comunicatascientiae.com.br/public/journals/1/normas/Normas2017PORTUGUES.pdf>)

Eficiência de fixadores na análise histológica intestinal de frangos de corte

Resumo

O processamento histológico requer a observação de protocolos que possam ser ajustados a cada amostra tecidual. Devido à escassez de informações sobre a atividade dos diferentes fixadores em tecidos intestinais de frangos de corte, tendo em vista a abrangente utilização da histomorfometria em estudos nutricionais, objetiva-se demonstrar o melhor fixador para utilização em tecidos intestinais de frangos de corte. Para tanto, foram coletadas, de 11 (onze) frangos da linhagem Cobb 500®, aos 24 dias de idade, 5 (cinco) fragmentos da alça descendente do duodeno. Cada fragmento foi fixado respectivamente em Bouin, Carnoy, Formaldeído tamponado a 10%, álcool etílico 70°GL, álcool etílico 50°GL, os quais foram submetidos a processamento histológico padrão e avaliados de acordo com a dificuldade de microtomia, qualidade da coloração, preservação das estruturas da mucosa e parede muscular, presença de artefatos na mucosa e na parede muscular. Para todas as características, um único avaliador, por meio de teste cego, conferiu escores de 1 (um) a 5 (cinco), desde a pior até a melhor apresentação das características. Os resultados obtidos através da análise de Kruskal-wallis não mostraram significativa diferença quanto à microtomia, preservação e presença de artefatos na parede muscular, relacionadas à utilização dos diferentes fixadores. Pelo teste Mann-Whitney, entretanto, que a coloração de tecidos fixados em Bouin e Formol Tamponado a 10% mostrou-se, estatisticamente, superior àquela observada em tecidos fixados em Álcool 70°GL e Álcool 50°GL e Carnoy. Quanto à preservação e presença de artefatos na mucosa, os resultados sugerem uma ordem decrescente de melhor

atuação, sendo o Bouin e o Formol tamponado a 10% superiores ao álcool 70°GL e 50°GL, os quais, de acordo com a característica avaliada, superam a atuação do Carnoy. Tem-se, portanto, que o Bouin assim como o Formol tamponado a 10% apresentam-se superiores aos demais fixadores no referente à fixação de tecidos intestinais de frangos de corte.

Palavras-chave: fixação química, processamento histológico, aves, intestino delgado

Introdução

O processamento histológico depende de duas etapas iniciais, a coleta e a fixação dos tecidos. Caputo et al. (2010) destaca a fixação tecidual como a parada da autólise, tendo o fixador poder de auxiliar na perfusão e impregnação dos demais reagentes utilizados no processamento, e impedir a colonização por microrganismos. Distorções e retrações podem ser observadas pela incorreta aplicação de fixadores, dificultando a interpretação tecidual (Fox et al. 1985).

Segundo Suvarna et al. (2013) as vantagens da utilização de um determinado fixador podem ser contrabalanceadas pela perda da conformação celular ou retração dos tecidos, variação nas colorações histoquímicas e imunohistoquímicas e interferência na análise bioquímica. Estes contrapontos sugerem a importância do conhecimento de fixadores eficientes para cada amostra.

O processamento histológico requer a observação dos protocolos passíveis de adaptação diante de cada amostra, que é única (Nunes e Cinsas, 2016). Estudos recentes objetivam evidenciar fixadores mais efetivos na preservação de diferentes tecidos, seja para estudos histopatológicos (Campos et

al., 2016; Amaral et al., 2004), para a avaliação reprodutiva (Búfalo et al. 2016), ou para avaliação molecular ou proteica de determinados tecidos com a utilização de fixadores alternativos ao formol tamponado (Klopfleisch et al., 2012).

A histologia no estudo das características nutricionais em monogástricos a muito é utilizada. Tendo na morfometria microscópica intestinal sua maior empregabilidade. Entretanto, o processo de fixação que vise a melhor preservação das estruturas intestinais nesses animais é indefinido como verificado nos trabalhos de Fernandes et al. (2017a), Fernandes et al. (2017b), Azevedo et al. (2016), Gonçalves et al. (2014) e Lemos et al. (2013).

Á escassez de informações sobre a atividade de fixadores em tecidos intestinais de frangos de corte induz o pesquisador a fazer uso de informações referentes à fixação obtidas através da análise de tecidos diversos. Fox et al. (1985) apresenta a formalina a 10% como um fixador simples e de ampla utilização para microscopia óptica. Gillespie et al. (2002), por sua vez, cita o etanol 70% como de baixo custo e simples preparação. Santos et al. (2012) demonstraram a melhor eficiência dos fixadores Carnoy e Bouin quanto à manutenção da morfologia da estrutura ovariana quando comparado a outros fixadores, que incluíam formol tamponado a 10% e álcool 70%.

Diante do supracitado objetiva-se demonstrar o melhor fixador para utilização em estudos de tecidos intestinais de frangos corte.

Material e Métodos

O presente estudo se realizou na Universidade Federal do Piauí – UFPI, Campus Prof.^a Cinobelina Elvas, no Laboratório de Anatomia Animal, segundo o qual buscou-se testar a eficiência de cinco fixadores histológicos. Dentre estes os

fixadores Álcool etílico 70°GL e Álcool etílico 50°GL foram confeccionados, no próprio laboratório de anatomia animal, com auxílio de Alcoômetro Gay-Lussac (GL). De acordo com a composição proposta por Behmer et al. (2003) as soluções de Carnoy e Formol tamponado a 10% foram produzidas, sendo utilizado no ultimo a solução de formaldeído P.A. a 36,5-38%, Dinâmica® - lote:82713. Quanto à solução de Bouin, esta foi adquirida comercialmente.

Foram utilizados onze frangos de corte da Linhagem Cobb 500®, sob mesmas condições de manejo e alimentação (a base de milho e farelo de soja, com 22,20% e 20,31% de proteína e 2.950 e 3.000 Kcal/Kg nas fases de 1 a 7 dias e 8 a 24 dias) Rostagno et al. (2011).

Aos 24 dias de idade todos os animais foram abatidos por meio de deslocamento cervical seguido de exsanguinação, de acordo com o aceite da Comissão de Ética, protocolo nº 075/15. Subsequentemente foram coletados cinco fragmentos da alça descendente do duodeno, no sentido de cranial para caudal. Cada fragmento da porção duodenal, com aproximadamente 2,0 cm, na mesma sequência de coleta, foi imerso em seu respectivo fixador (fixação por imersão), Álcool etílico 70°GL, Álcool etílico a 50°GL, Bouin, Carnoy e Formaldeído tamponado 10%, onde permaneceram de acordo com os tempos ilustrados na tabela 1. E processados manualmente pelo protocolo padrão de processamento histológico (Prophet et al., 1992).

Tabela 2. Tempo total, em horas, de fixação e processamento da porção descendente do duodeno de frangos de corte submetida à fixação por cinco fixadores (Álcool 70°GL, Álcool 50°GL, Bouin, Carnoy e Formol tamponado a 10%)

| Fixadores | Fixação | Lavagem em água corrente* | Álcool 50°GL* | Álcool 70°GL* | Processamento Histológico** | Total |
|-----------|---------|---------------------------|---------------|---------------|-----------------------------|-------|
|-----------|---------|---------------------------|---------------|---------------|-----------------------------|-------|

| | | | | | | |
|-------------------------------|----|---|----|----|----|----|
| Álcool 70°GL | 48 | - | - | 24 | 11 | 83 |
| Álcool 50°GL | 48 | - | - | 24 | 11 | 83 |
| Bouin | 18 | 6 | 24 | 24 | 11 | 83 |
| Carnoy | 24 | - | - | 48 | 11 | 83 |
| Formol tamponado a 10% | 48 | - | - | 24 | 11 | 83 |

*Procedimentos para remoção do ácido pícrico

** Corresponde aos procedimentos de desidratação em serie crescente de álcoois (80°, 90°, 95°, 100°I, 100°II, 100°III), diafanização (duas horas em solução de xilol), impregnação (duas horas em parafina histológica a 57°C) e inclusão do material em blocos de parafina histológica.

O material incluído em blocos de parafina foi submetido à microtomia como o auxílio de um micrótomo rotativo semi-automático (Leica®, Wetzlar-Alemanha). Neste procedimento foram utilizadas navalhas descartáveis (Leica® biosystems). Inicialmente navalhas seminovas eram utilizadas para o desbaste da camada de parafina que recobria o tecido incluído, na sequência, após a evidenciação do tecido, com uma navalha nova eram realizados cortes semiseriados de 4µm, durante este procedimento foi verificada a dificuldade com que eram obtidos os cortes (Tabela 2.). A cada corte selecionado dez subsequentes cortes eram desprezados, contudo, foram obtidos três cortes histológicas por bloco.

A coloração de todos os tecidos foi realizada pela técnica de Hematoxilina-eosina e as lâminas montadas com verniz vitral incolor 500 (Paiva, 2006). Os tecidos corados foram analisados com o auxílio de microscópio óptico Trinocular (Nova Optical Systems®), objetiva de 4x, 10x e 20x, segundo a preservação das estruturas da mucosa e da parede muscular, assim como a presença de artefatos na mucosa e parede muscular. Quanto aos artefatos considerados, foram avaliados dobramentos, retração e eversão do tecido

(parcial ou completa) e deposição de pigmentos. Todas as características foram avaliadas por um único avaliador, por meio de teste cego, sendo conferidos escores de 1 a 5, respectivamente, desde a pior até a melhor apresentação (Tabela 2.).

Tabela 2. Características observadas durante o processamento e avaliação dos tecidos duodenais submetidos a cinco fixadores histológicos e seus respectivos escores (numeração entre parênteses)

| Característica avaliada | Escala de parâmetros | | | | |
|---------------------------------------|-----------------------------|-------------|-------------|-----------|---------------|
| Microtomia | Muito difícil (1) | Difícil (2) | Normal (3) | Pouca (4) | Nenhuma (5) |
| Coloração | Péssima (1) | Ruim (2) | Regular (3) | Boa (4) | Excelente (5) |
| Preservação da mucosa | Péssima (1) | Ruim (2) | Regular (3) | Boa (4) | Excelente (5) |
| Preservação da parede muscular | Péssima (1) | Ruim (2) | Regular (3) | Boa (4) | Excelente (5) |
| Artefatos da mucosa | Excessivos (1) | Muitos (2) | Normal (3) | Raros (4) | Ausentes (5) |
| Artefatos na parede muscular | Excessivos (1) | Muitos (2) | Normal (3) | Raros (4) | Ausentes (5) |

Os valores obtidos pela avaliação das características supracitadas foram submetidos à análise de Kruskal-wallis e subsequentemente ao teste de Mann Whitney, como o auxílio do software BioEstat 5.0 (Alves et al. 2007).

Resultados e Discussão

Verificou-se pela análise de Kruskal-wallis que não existem diferenças significativas quanto às características dificuldade de microtomia, preservação da parede muscular e presença de artefatos na parede muscular relacionadas à utilização dos fixadores Álcool etílico 70°GL, Álcool etílico a 50°GL, Bouin, Carnoy e Formaldeído tamponado 10%. Em contrapartida pode-se verificar que as

características coloração, preservação da mucosa e presença de artefatos na mucosa diferiram significativamente, diferença esta definida pela aplicação teste de Mann-whitney.

Contudo, mesmo diante de resultados não significativos quanto à microtomia, torna-se válido destacar a descrição de fixadores de natureza alcoólica como capazes de coagular proteínas e ácidos nucleicos, conduzindo ao encolhimento e colapso do tecido, culminando em desidratação exacerbada e subsequente inviabilização da microtomia (Santos et al. 2012; Paiva et al. 2014). Efeitos semelhantes, destacados por Campos et al. (2016), estão relacionados a um longo período de fixação em solução de Carnoy e Bouin, conferindo enrijecimento demasiado do tecido.

No que se refere à preservação e a presença de artefatos na parede muscular, a apresentação de diferenças não significativas pela análise de Kruskal-wallis sugere que fixadores menos utilizados no processamento de material de origem animal, como o álcool 50°GL e 70°GL, podem, somando-se esses resultados aos baixos custos, acessível preparo (Gillespie et al., 2002) e exigência de um menor tempo de fixação (Santos et al. 2012), ser utilizados eficientemente na fixação de tecidos musculares.

Quanto à qualidade de coloração, a preservação e a presença de artefatos na mucosa intestinal de frangos de corte diferenças significativas, referentes à utilização dos diferentes fixadores foram verificadas pela análise de Kruskal-wallis e identificadas pela aplicação do teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$), (Figura 1.).

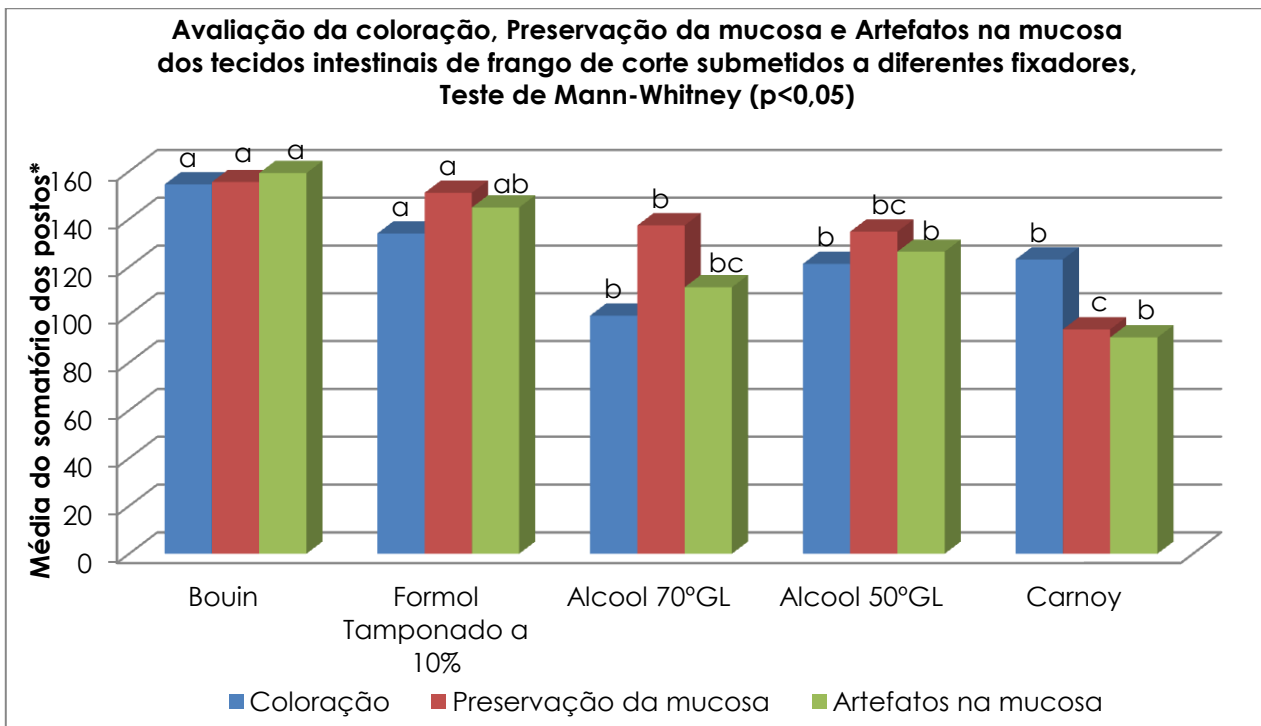


Figura 1. Avaliação da qualidade da qualidade da coloração, preservação e presença de artefatos na mucosa intestinal de frangos de corte, teste de Mann-whitey ($p < 0,05$). * Refere-se ao valor médio do somatório dos postos elencados a cada amostra, pelo software Bioestat, para a realização do Teste de Mann - Whitney (*Wilcoxon rank-sum test*) (Alves et al. 2007).

Na avaliação da qualidade da coloração, preservação e presença de artefatos na mucosa intestinal de frangos de corte (Figura 1.) é possível verificarmos a melhor apresentação e a diferença significativa dos fixadores Bouin e Formol tamponado a 10%, os quais são equivalentes estatisticamente, em relação aos demais fixadores.

No que diz respeito à coloração tecidual com hematoxilina e eosina, esta apresenta relação direta com a constituição histológica do órgão avaliado, tendo em vista que esses corantes atuam por meio de ligações ânion/catiônicas com macromoléculas e componentes citoplasmáticos, conferindo assim coloração aos tecidos (Ross e Pawlina, 2016).

Portanto, alterações promovidas nas microestruturas teciduais por fixadores podem contribuir com alterações no aspecto tintorial dos tecidos, a exemplo temos a atuação do ácido acético, presente na solução de Bouin, o qual precipita proteínas nucleares sem alterar aquelas citoplasmáticas (Abrahão et al. 2004), e o álcool etílico que promove a precipitação e desnaturação de proteínas (Behmer et al. 2003), o que pode justificar a melhor apresentação do primeiro fixador (Figura 1.).

Contudo, podemos citar os trabalhos de Campos et al. (2016), os quais verificaram que tecidos fixados em Formol tamponado a 10 % apresentaram melhor qualidade de coloração em relação àqueles fixados Bouin e Carnoy, Santos et al. (2012), observaram uma coloração homogênea e de fácil avaliação em tecidos ovarianos fixados com Carnoy e Bouin. Assim como nesses estudos os três fixadores supracitados apresentaram-se com maior efetividade neste estudo, quanto à coloração (Figura 1.), entretanto com variações quanto aquele de maior destaque, o que pode está relacionada à constituição histológica dos diferentes tecidos avaliados.

Ao verificarmos a preservação e presença de artefatos na mucosa, temos os fixadores Bouin e Formol tamponado a 10%, estatisticamente iguais quanto aos seus resultados, mostrando-se superiores aos demais fixadores, quanto a estes é notável a pior apresentação do Carnoy na fixação de tecidos intestinais de frangos de corte (Figura 1.).

No que diz respeito à utilização de fixadores alcoólicos, mesmo estes sendo relacionados à desnaturação e retração tecidual (Santos et al. 2012), é possível verificarmos casos em que o álcool 70°GL pode se sobressair ao formol (Gomez et al. 2010). Entretanto a utilização de álcool 50°GL, principalmente, e

álcool 70°GL como fixadores é pouco documentada em estudos voltados a fixação de tecidos animais que utilizam da histologia microscópica intestinal.

Os resultados positivos apresentados pela fixação em Formol tamponado a 10% (Figura 1.) podem estar relacionadas à ação não coagulante deste fixador, a qual resulta em maior estabilização estrutural e, conseqüentemente, melhor preservação histológica (Fox et al., 1985; Sesso, 1998), assim como ao controle de pH, em função do tamponamento da solução, tendo em vista que pequenas mudanças no pH do fixador podem trazer grandes alterações as estruturas celulares (Glauert, 1975).

Todavia, Buesa (2008) e Hauptmann et al. (2003) mesmo evidenciando a inexistência de substitutos com melhor relação custo-benefício para o formol acrescentam a toxicidade e predisposição cancerígena conferida a manipuladores desta solução, relacionadas a exposição à este fixador.

Já o Bouin é documentado como eficaz na preservação de tecidos finos e delicados (Musumeci, 2014), porém exige um período, crucial, de remoção do ácido pícrico (Santos et al., 2008), tendo em vista que a precipitação deste leva a desconfiguração das proteínas, contribuindo para a retração do tecido, e conseqüentemente produção de artefatos (Sesso 1998).

Não obstante, é imprescindível ressaltar os diferentes resultados, levando em consideração os diferentes pontos avaliados, quando comparamos este estudo com outros que objetivaram definir a utilização de fixadores em diferentes tecidos (Santos et al. 2012; Soares et al., 2006; Campos et al., 2016), o que sugere a eminente necessidade da avaliação individual de cada amostra, tendo em vista a importância do componente constituição tecidual no resultado final, corroborando desta forma a necessidade de estudos específicos

relacionados à utilização de fixadores para os diferentes tecidos corporais baseada na singularidade de cada amostra (Nunes e Cinsas, 2016).

Conclusão

Conclui-se que o Bouin e o Formol tamponado a 10% apresentam-se superiores aos demais fixadores na preservação de tecidos intestinais, reduzida formação de artefatos e coloração dos tecidos intestinais de frangos de corte.

Referências

Abrahão, D.S. Piza, A. R.T., Martins, M.A., Neto, J.C.S., Ferreira, E.C.J., Rapado, L.N., Hosoda, T.M., Silva, R.C., Azzuz, A.C., Taniwak, N.N., Pires, M. F. C. 2004. Estudo comparativo com diversos fixadores para aplicação em microscopia eletrônica de transmissão. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, v.63, ed.2, p. 248-54.

Alves, M., Ayres Junir, M., Ayres, D. L., Santos, A. A. S. 2007. BioEstat: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. Belém do Pará, p. 364.

Amaral, D., Chiarini-Garcia, H., Vale Filho, V.R., Allen, W.R. 2004. Efeito dos fixadores formalina e Bouin na preservação de biópsias do endométrio de éguas após inclusão em resina plástica. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.56, n.1, p. 7-12.

Azevedo, R.V, Ramos, A.P.S., Carvalho, J.S.O., Braga, L.G.T. 2016. Inclusão do farelo da folha da mandioca para juvenis de tilápia do Nilo. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v.38, n.3, p. 305-310.

Behmer, O.A., Tolosa, E.M.C., Neto, A.G.F., Rodrigues, C.J. 2003. Manual de Técnicas para histologia normal e patológica. Editora Manole Ltda. 2ª ed. – Barueri, SP: Manole, p. 331.

Buesa, R.J. Histology without formalina? 2008. *Annals of Diagnostic Pathology*. n. 12, p. 387-396.

Búfalo, I., González, S.M., Silva, C.B., Lindquist, A.G., Bergamo, L.Z., Costa, C.B., Marinho, L.S.R., Seneda, M.M. 2016. Efeito do tipo de fixador e tempo de fixação na morfologia de folículos pré-antrais equinos. *Semina: Ciências Agrárias*. v. 37, n. 1, p. 243-250.

Campos, L.S., Tafuri, W.L., Pinto, A.J.W. 2016. Avaliação de diferentes fixadores na preservação das características histológicas de pele de orelha de cães. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.68, n.5, p.1212-1218.

Caputo, L.F.G., Gitirana, L.B., Manso, P.P.A. 2010. Técnicas histológicas. In: Molinaro, E., Caputo, L., Amendoeira, R. (Org.). Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde. Rio de Janeiro: Escola Politécnica de Saúde Juvenil, Caputo; Gitirana; Manso, p. 89-188.

Fernandes, J.I.M., Rorig, A., Gottardo, E.T., Schmidt, J.M., Burin Júnior, A.M., Fülber, L.M. 2017a. Dietas pós-eclosão suplementadas com fontes de gordura e acrescidas de taurina e glicina sobre a morfometria intestinal e o desempenho de frangos de corte de um a 21 dias. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.69, n.1, p.198-204.

Fernandes, J.I.M., Contini, J.P., Prokoski, K., Gottardo, E.T., Cristo, A.B., Perini, R.2017b. Desempenho produtivo de frangos de corte e utilização de energia e nutrientes de dietas iniciais com milho classificado ou não e suplementadas com complexo enzimático. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. vol. 69 no.1, p.181-190.

Fox, C.H., Johnson, F.B., Whiting, J., Roller, P.P. 1985. Formaldehyde fixation. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, Baltimore, v.33, n.8, p.845.

Gillespie, J.W., Best, C.J., Bichsel, V.E., Cole, K.A., Greenhut, S.F., Hwitt, S.M., Ahram, M.; Gathright, Y. B., Merino, M.J., Strausberg, R.L., Epstein, J.I., Hamilton, S.R., Gannot, G., Baibakova, G.V., Calvert, V.S, Flaig, M.J., Chuarqui, R.F., Herring, J.C., Pfeifer, D., Petricoin, E.F., Linehan, W.M., Duray, P.H., Bova, G.S., Emmert-Burck, M.R. 2002. Evaluation of non-formoldeído in tissue fixation for molecular profiling studies. *American Journal of Pathology*, v.160, n.2, p.449-457.

Glauert, A.M. 1975. Practical methods in Electron microscopy - Fixation, dehydration and embedding of biological specimens. Strangeways Research Laboratory, Cambridge. North-Holland Publishing Companys, Oxford.

Gonçalves, F.G., Zaninil, S.F., Sousa, D.R., Silva, M.A., Colnago, L.G. 2014. Sinergia entre aditivo vegetal e níveis crescentes de promotores de crescimento sobre o desempenho produtivo e morfometria intestinal de frangos de corte. *Ciência Rural*, Online. <Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S010384782013005000158>>. Acesso: 20 de dezembro de 2017.

Gomez, D.S., Janebro, R., Brasil, R. A., Juliano, Y., Novo, N.F., Gemperli, R., Pinto, W.S. 2010. Comparação da evidenciação dos miofibroblastos marcados por imuno-histoquímica em tecido de granulação quando fixado por formol ou por álcool a 70%. *Revista Brasileira de Queimaduras*. v.9, n.1, p.11-13.

Hauptmann, M., Lubin, J.H., Stewart, P.A. 2003. Mortality from lymphohematopoietic malignancies among workers in formaldehyde industries. *Journal of National Cancer Institute*, v.95, p.1615-23.

Klopfleisch, R., Deetzen, M.V., Weiss, A.Th. Weigner, J., Weigner, F., Plendl J., Gruber, A.D.W. 2012. Weigners Fixative—An Alternative to Formalin Fixation for Histology With Improved Preservation of Nucleic Acids. *Veterinary Pathology*. v.50, n.1, p. 191-199.

Lemos, M.J., Calixto, L.F.L., Nascimento, A.A., Sales, A., Santos, M.A.J., Aroucha, R.J.N. 2013. Morfologia do epitélio intestinal de codornas japonesas alimentadas com parede celular da *Saccharomyces cerevisiae*. *Ciência Rural*. v.43, n.12, p. 2221-2227.

Musumeci, G. 2014. Past, present and future: overview on histology and histopathology. *Journal Histology Histopathology*. v. 1, n. 5.<Disponível em: <http://dx.doi.org/10.7243/2055-091X-1-5>>. Acesso em: 01 de agosto de 2017.

Nunes, C.S., Cinsa, L.A. 2016. Princípios do processamento histológico de rotina. *Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais*, v.8, n. único, p. 31-40.

Paiva, J.G.A., Carvalho, S.M.F., Magalhães, M. P., Ribeiro, D. G, 2006. Verniz vitral incolor 500: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. *Acta Botânica Brasileira*. v.20, n.2, p. 257-264.

Paiva, M.B., Gouveia, G.M., Fioravanti, H., Luvizotto, M.C.R. 2014. Citoinclusão de capa leucocitária e medula óssea de cães: padronização da técnica. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.66, n.2, p. 439-444.

Prophet, E.B., Mills, B., Arrington, J.B. e Sobin, L.H. 1992. Laboratory Methods in Histotechnology. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC. p.279.

Ross, M. H.; Pawlina, W. 2016. Histologia: texto e atlas em correlação com a biologia celular e molecular. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.983.

Rostagno, H.S., Albino, L.F.T., Donzele, J.L., Gomes, P.C., Oliveira, R. F., Lopes, D.C., Ferreira, A.S., Barreto, S.L.T., Euclides, R.F. 2011. Tabelas brasileiras para aves e

suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais. 3ed. Viçosa, MG: UFV. DZO, p.252.

Santos, S., Sá, D., Bastos, E., Guedes-Pinto, H., Gut, I., Gärtner, F., Chaves, R. 2008. An efficient protocol for genomic DNA extraction from formalin-fixed paraffinembedded tissues. *Research Veterinary Science*. doi: 10.1016/j.08.007. p. 421-426.

Santos, J.T., Silva – Santos, K.C., Andrade, E.R., Lisboa, L.A., Schneider, C.L., Ciquini, A. 2012. Effect of fixative type and fixation time on the morphology of bovine preantral ovarian follicles. *Semina: Ciências Agrárias*. v.33, n.1, p. 297-304.

Sesso, A. 1998. Fixação de sistemas biológicos. In: SOUZA, W. Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicada às ciências biológicas. Rio de Janeiro: Universidade Estadual Norte Fluminense, cap. I. p.1-17.

Soares, J.M., Beletti, M.E., Machado, E.R., Silva, M. 2006. Histomorfometria de testículos de gatos (*Felis domestica*) utilizando-se três diferentes fixadores. *Bioscience Journal*. v. 22, n. 1, p.175-181.

Suvarna, S.K., Layton, C., Bancroft, J.D. 2013. Bancroft's theory and practice of histological techniques. 7. ed. London: Churchill Livingstone Elsevier, p. 637.

Capítulo 3 “DETERMINAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DO ÍLEO EM FRANGOS DE CORTE”

Elaborado de acordo com as normas da Revista *Comunicata Scientiae*
(<https://comunicatascientiae.com.br/public/journals/1/normas/Normas2017PORTUGUES.pdf>)

Chapter 3 " HISTOMORPHOMETRIC ILEUM DETERMINATION OF BROILER "

Prepared according to the norms of Revista *Comunicata Scientiae*
(<https://comunicatascientiae.com.br/public/journals/1/normas/Normas2017PORTUGUES.pdf>)

Determinação histomorfométrica do íleo em frangos de corte

Resumo

Divergências relacionadas à coleta das porções intestinais de jejuno e íleo são frequentes em estudos que utilizam de morfometria intestinal e envolvam a avaliação da digestibilidade ileal. Por tanto, objetiva-se informar, de acordo com a avaliação histomorfométrica intestinal a localização de jejuno e íleo e direcionar pontos específicos para coleta destas regiões em frangos de corte. Neste estudo foram utilizados dez frangos de corte, com 24 dias, sob as mesmas condições de manejo e alimentação, dos quais foram obtidos 2 (dois) fragmentos da região jejunal anterior ao divertículo de Meckel, imediatamente após a flexura duodenojejunal (jejuno proximal) e na porção média entre esta e o divertículo de Meckel (jejuno distal), e três fragmentos subsequentes ao divertículo de Meckel, imediatamente após o divertículo (íleo proximal), na posição média (íleo médio), entre o divertículo e o ápice dos cecos, e entre os cecos (íleo distal). Esses foram fixados em formol tamponado a 10%, processados histologicamente, e corados com Hematoxilina e Eosina. Subsequentemente foram analisadas as medidas de perímetro do vilos, altura do vilos, largura do vilos, comprimento da cripta, largura da cripta e espessura da parede muscular. A análise descritiva quantitativa demonstrou que as médias para altura das criptas, altura dos vilos e perímetro dos vilos passam por uma diminuição gradativa desde o jejuno proximal até o íleo distal. Os resultados obtidos para as características altura de vilos e perímetro de vilos distinguem estatisticamente, por meio da análise de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$), as regiões de jejuno e íleo. Portanto, conclui-se que o jejuno compreende as porções de jejuno distal, íleo proximal e íleo médio, e o íleo

delimita-se a região de íleo distal, localizada entre os cecos. As regiões de jejuno distal e íleo distal são pontos aos mais seguros de coleta de jejuno e íleo, respectivamente.

Palavras-chave: morfometria, intestino delgado, anatomia topográfica

Introdução

A morfometria intestinal depende, dentre outros fatores, do conhecimento da localização e do desenvolvimento intestinal. Santos et al. (2012) descrevem a completa formação anatômica do sistema digestório de um pintainho logo após o nascimento, diferentemente da maturidade funcional, obtida no início da vida do mesmo. O desenvolvimento das características envolvidas na maturação funcional (aumento do intestino, altura e densidade dos vilos, número e volume de células epiteliais) segundo ocorrem, significativamente, entre o 17º dia de incubação e o sétimo dia pós-eclosão, sendo considerado até o 16º dia em frangos de corte (Uni et al. 1998), o que ocorre, consideravelmente, em menor proporção em aves senis (Marchini et al. 2009).

Fernandes et al. (2017), Latorre et al. (2017) e Tzora et al. (2017) comprovam a importância e frequência da utilização da histomorfometria, quanto a relação entre a inclusão de alimentos e mudanças significativas nos componentes morfológicos da mucosa intestinal.

Entretanto, pesquisas voltadas a nutrição animal que fazem uso da histomorfometria descrevem, quando descrevem, as porções de jejuno e íleo com diferentes localizações. Temos nos trabalhos de Amoroso et al. (2015), Duarte et al. (2017) e Khan et al. (2017), Tzora et al. (2017), Tancharoenrat et al. (2014) a

descrição, segundo Baumel et al. (1993), em que divertículo de Meckel é utilizado como ponto de divisão entre jejuno e íleo. Artoni et al. (2014), por sua vez, desaconselha a utilização da descrição supracitada, tendo em vista que o divertículo é uma proeminência vestigial que pode variar quanto a localização ou desaparecer na vida adulta.

McLelland, J. (1986), entretanto, descreve o íleo como tendo em cada face lateral, na maior parte do seu comprimento, os cecos direito e esquerdo, descrição esta utilizada por Sousa et al. (2017) para a descrição macroscópica e microscópica do intestino de frangos de corte. O primeiro autor, retrata o divertículo de Meckel, presente em 60% das aves, como divisor entre as porções proximal e distal do jejuno, corroborado por Boleli, Maiorka e Macari (2008) e Ferreira et al. (2012).

Ramos et al. (2011), Faveri et al. (2015), Fernandes et al. (2017), Leandro et al. (2017), não descrevem qual a localização anatômica dos fragmentos denominados de jejuno e íleo, o que, devido a dubiedade de informações referentes à delimitação destas regiões, dificulta a reprodução de suas pesquisas.

A localização do íleo fornece ainda redução na subjetividade da coleta desta região para ensaios de digestibilidade ileal, tendo em vista as diferentes porções intestinais coletados, à exemplo, Luegas et al. (2015), utilizaram da coleta de um segmento de 40 cm, terminando a 4 cm da junção íleo-cecal, Barbosa et al. (2008), utilizaram um segmento de 20 cm que terminava a 4 cm da junção íleo-cecal, e Rodrigues et al. (2003), o qual fez uso de 30 cm da porção do íleo terminal, anterior à junção íleo-cecal.

Para tanto, objetiva-se esclarecer com base na histomorfometria intestinal a localização das regiões de jejuno e íleo, padronizando melhores pontos para coleta dessas porções intestinais em frangos de corte.

Material e Métodos

Este estudo foi realizado no Laboratório de Anatomia Animal, na Universidade Federal do Piauí – UFPI, Campus Prof.^a Cinobelina Elvas. Para tanto foram utilizados dez frangos de corte da Linhagem Cobb 500®, os quais eram mantidos sob as mesmas condições de manejo e alimentação, esta formulada de acordo com Rostagno et al. (2011), a base de milho e farelo de soja (Tabela 1.).

Tabela 1. Componentes das rações experimentais fornecidas na alimentação de frangos de corte da Linhagem Cobb 500® de 1 aos 24 dias de idade, Bom Jesus – Piauí, 2017

| INGREDIENTES | 1-7 | 8-24 |
|--|----------------|-------------|
| Milho | 54,399 | 60,166 |
| Soja farelo | 38,033 | 33,129 |
| Óleo de soja | 2,580 | 2,258 |
| Fosfato Bicálcico | 1,912 | 1,524 |
| Suplemento vitamínico mineral ¹ | 1,000 | 1,000 |
| Calcário | 0,902 | 0,914 |
| Sal | 0,508 | 0,482 |
| L-lisina HCL | 0,274 | 0,250 |
| DL-Metionina | 0,166 | 0,106 |
| L-Treonina | 0,112 | 0,072 |
| L-valina | 0,064 | 0,048 |
| Inerte ² | 0,050 | 0,050 |
| Total | 100,000 | 100 |
| NUTRIENTES | | |
| Proteína (%) | 22,20 | 20,31 |
| Energia metabolizável (Kcal/kg) | 2,950 | 3,000 |
| Metionina (%) | 0,647 | 0,569 |
| Metionina + Cistina dig.b (%) | 0,944 | 0,846 |
| Lisina dig. (%) | 1,310 | 1,174 |
| Treonina dig. (%) | 0,865 | 0,763 |
| Triptofano dig (%) | 0,249 | 0,223 |
| Valina dig. (%) | 0,998 | 0,904 |

| | | |
|------------------------|-------|-------|
| Cálcio (%) | 0,920 | 0,819 |
| Fosforo disponível (%) | 0,470 | 0,391 |

1Suplemento vitamínico-mineral pré-inicial (1-7dias): Vitamina A: 750.000 UI/kg; Vitamina D3: 250.000 UI/kg; Vitamina E:1.500 UI/kg; Vitamina K3:100mg/kg; Vitamina B1:100mg/kg; Vitamina B2:350mg/kg; Vitamina B6: 180mg/kg; Vitamina B12: 1.400mg/kg; Niocina:4.000mg/kg; Pantotenato de Cálcio:1.000mg/kg; Ácido Fólico:55mg/kg; Biotina: 6mg/kg; Cloreto de Colina:32g/kg; Metionina:190g/kg; Ferro:3.500mg/kg; Cobre:8.000mg/kg; Manganês: Zinco :5.000mg/kg;Iodo:140mg/kg; Selênio:25mg/kg; Nicorbazina:12,5g/kg; Virginamicina:2.000mg/kg.

1Suplemento vitamínico-mineral inicial (8-24dias): Vitamina A: 700.000 UI/kg; Vitamina D3: 200.00 UI/kg; Vitamina E: 1.200 UI/kg; Vitamina K3: 380mg/kg; Vitamina B16:60mg/kg; Vitamina B2:450mg/kg; Vitamina B6:120mg/kg; Vitamina B12 :1.200mg/kg; Niacina :3500mg/kg; Pantotenato de Cálcio:800mg/kg; Ácido Fólico: 50mg/kg; Biotina:5mg/kg; Cloreto de Colina:30mg/kg; Metionina: 160g/kg; Ferro:3.000mg/kg; Cobre :6.600mg/kg; Manganês:6.000mg/kg; Zinco:4.500mg/kg; Iodo:120 mg/kg; Selênio:20mg/kg; Salinomicina:6.600mg/kg; Virginamicina:1.500mg/kg.

Ao final do período de 24 dias os animais foram abatidos, por meio de deslocamento cervical seguido de exsanguinação, de acordo com a aprovação do Conselho de Ética nº 075/15. Subsequentemente fez-se a coleta dos seguintes fragmentos intestinais: dois fragmentos da região jejunal anterior ao divertículo de Meckel, o primeiro após o fim da flexura duodenojejunal, denominado jejuno proximal (JEP), e o seguinte na posição média entre duodeno e divertículo de Meckel, denominado jejuno distal (JED) e três fragmentos subsequentes ao divertículo de Meckel, o primeiro imediatamente após o divertículo, íleo proximal (ILP), o segundo na posição media entre divertículo e o ápice dos cecos, íleo médio (ILM), e o terceiro fragmento localizado na porção média entre os cecos, íleo distal (ILD), (Figura 1.)

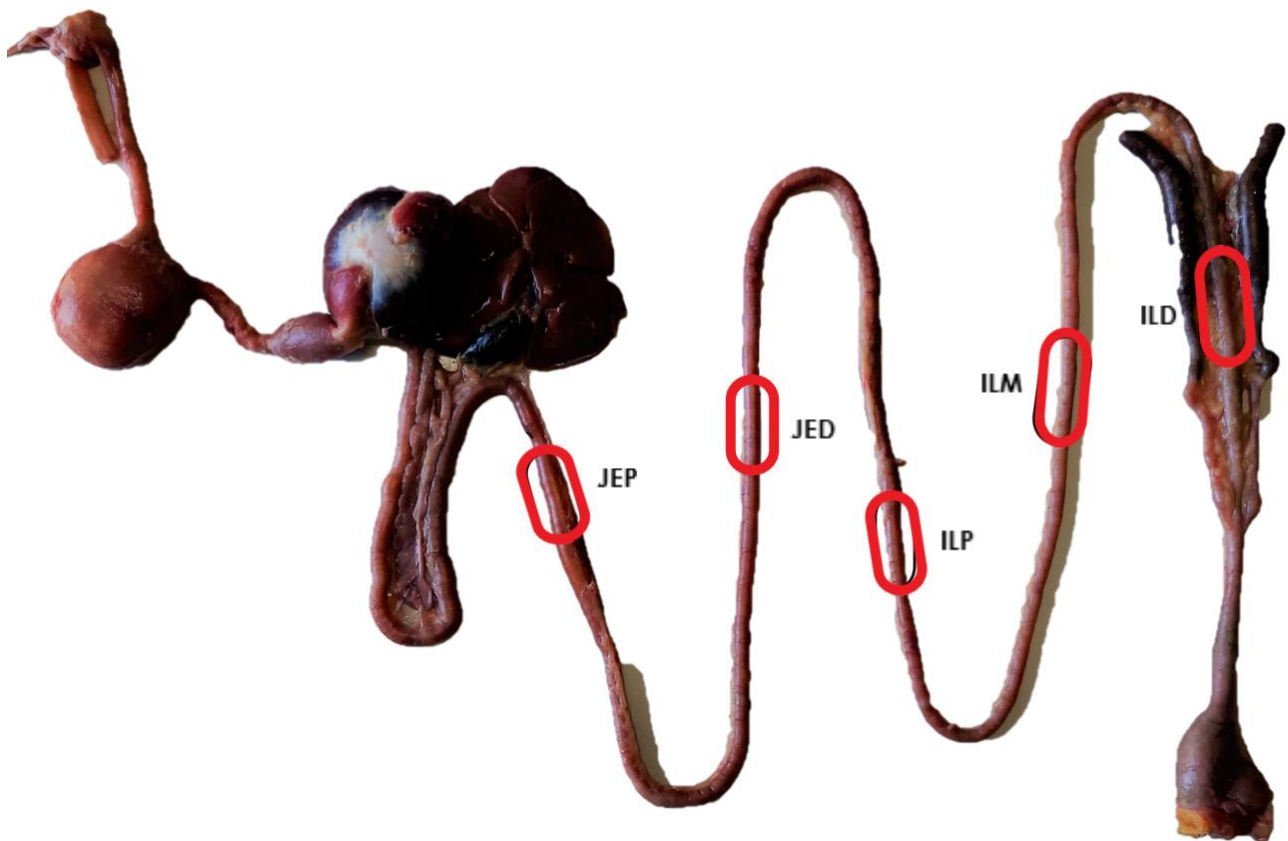


Figura 2. JEP - jejunum proximal (fragmento subsequente a flexura duodenojejunal); JED – jejunum distal (fragmento na porção média entre o fim do duodeno e o divertículo de Meckel); ILP – íleo proximal (fragmento imediatamente subsequente ao divertículo de Meckel); ILM – íleo médio (fragmento na porção média entre o divertículo de Meckel e os ápices dos cecos); ILD – jejunum distal (fragmento da porção média entre os cecos).

Todos os recortes foram fixados em formol tamponado a 10% tamponado por um período de 24 horas, em seguida processados manualmente de acordo com o protocolo padrão de processamento histológico: desidratação seriada em álcoois (80°, 90°, 95°, 100° I, 100° II e 100° III), seguida de dois banhos de xilol (diafanização), impregnação por duas horas em parafina histológica e inclusão dos tecidos em blocos de parafina (Prophet et al., 1992). Na sequência o material foi levado a microtomia, utilizando-se de um micrótomo rotativo (Leica®, Wetzlar-Alemanha) para a realização dos cortes histológicos, de espessura de 4 µm, e confecção de três lâminas por bloco. Todas as lâminas foram coradas com Hematoxilina-Eosina (HE) e montadas com verniz vitral incolor 500® (Paiva, 2006). A

avaliação morfométrica microscópica foi realizada com o auxílio de microscópio óptico Trinocular (Nova Optical Systems®) equipado com câmera digital TOUPCAM™ de 5 Megapixel para registro fotográfico das imagens e mensuração, realizada em software analisador de imagem Toupview 3.7, por meio de análise linear.

Para cada região intestinal coletada foram avaliadas, de acordo com a unidade adotada (micrometro), 10 vilosidades, 10 criptas (Fukayama et al. 2005), de forma aleatória, e 10 diferentes pontos da parede muscular, de forma que contemplassem todo o diâmetro do órgão. Nas vilosidades e criptas foram obtidas medidas de perímetro de vilosidade, altura de vilosidade, largura de vilosidade, comprimento de cripta e largura de cripta (Figura 2.).



Figura 2. PV -perímetro do vilosidade (mensuração de todo o contorno da estrutura vilosa); AV- Altura do vilosidade (mensurada da base até

o ápice do vilô, traçando-se um eixo central na estrutura); LV - Largura do vilô (distância entre as extremidades laterais do vilô, mensurada na porção média do vilô); AC - Altura da cripta (mensurada da extremidade contínua ao vilô); LC - Largura da cripta (distância entre as extremidades laterais da cripta).
Coloração HE, objetiva de 4x.

Os dados coletados foram submetidos à análise descritiva quantitativa e ao teste de Student-Newman-Keuls a 5% de significância, por meio do software SigmaPlot 12.0.

Resultados e Discussão

De acordo com a análise descritiva quantitativa é possível observar que as médias para altura dos vilos, perímetro dos vilos e altura da cripta mostraram-se gradativamente menores desde o jejuno proximal até a região denominada íleo distal (Tabela 2).

Tabela 2. Apresentação de médias e desvios-padrão dos diferentes parâmetros histomorfométricos das porções de jejuno e íleo de frangos de corte

| Característica avaliada | Porção intestinal | N | Média | Desvio Padrão |
|-------------------------|-------------------|----|---------|---------------|
| Altura de vilô (AV) | JEP | 10 | 825.301 | 181.081 |
| | JED | 10 | 751.91 | 146.285 |
| | ILP | 10 | 661.073 | 118.98 |
| | ILM | 10 | 602.515 | 117.847 |
| | ILD | 10 | 477.564 | 109.36 |
| Largura de vilô (LV) | JEP | 10 | 81.701 | 12.944 |
| | JED | 10 | 72.225 | 8.854 |
| | ILP | 10 | 69.115 | 15.598 |
| | ILM | 10 | 83.355 | 19.021 |
| | ILD | 10 | 76.953 | 13.283 |
| Altura de cripta (AC) | JEP | 10 | 84.84 | 15.525 |
| | JED | 10 | 85.176 | 18.954 |
| | ILP | 10 | 87.046 | 26.515 |
| | ILM | 10 | 78.59 | 10.142 |
| | ILD | 10 | 72.415 | 17.873 |

| | | | | |
|------------------------|-----|----|----------|---------|
| Largura de cripta (LC) | JEP | 10 | 37.796 | 5.072 |
| | JED | 10 | 35.223 | 3.396 |
| | ILP | 10 | 34.15 | 2.708 |
| | ILM | 10 | 37.111 | 4.663 |
| | ILD | 10 | 35.673 | 10.62 |
| Perímetro de vilo (PV) | JEP | 10 | 1670.536 | 394.104 |
| | JED | 10 | 1533.695 | 282.207 |
| | ILP | 10 | 1397.106 | 241.195 |
| | ILM | 10 | 1266.321 | 239.57 |
| | ILD | 10 | 990.154 | 221.91 |
| Parede muscular (PM) | JEP | 10 | 271.884 | 98.736 |
| | JED | 10 | 286.83 | 93.649 |
| | ILP | 10 | 329.686 | 71.679 |
| | ILM | 10 | 310.165 | 55.258 |
| | ILD | 10 | 370.352 | 149.365 |

JEP - jejuno proximal; JED – jejuno distal; ILP – íleo proximal; ILM – íleo médio; ILD – íleo distal

Sousa et al. (2017) sugerem uma gradativa e menor necessidade de renovação celular nas porções finais do intestino delgado, o que corrobora com a observação, neste caso, da redução da altura das criptas, considerando que o incremento ou não nas profundidades das criptas visa manter o *turnover* celular (Araújo et al., 2006) e pode sinalizar atividade proliferativa celular mais intensa (Pluske, Hampson e Williams, 1997).

Kisielinski et al. (2002) verificaram que a altura dos vilos é diretamente proporcional à área de absorção, o mesmo é assegurado por Cunha et al. (2016). Para tanto, podemos afirmar que à medida que ocorre a diminuição no tamanho das vilosidades intestinais (Tabela 2.) é possível verificarmos, através da morfometria microscópica, a redução da absorção nas porções finais em relação às iniciais do intestino delgado.

Entretanto, a largura média dos vilos não se comporta como as características supracitadas, permanecendo com valores próximos desde o jejuno proximal até o íleo distal, o que diverge da descrição de Sousa et al. (2017), os quais afirmam que vilos, presentes em toda extensão do intestino delgado e

grosso, tornam-se curtos e largos a medida que se aproxima o termino do tubo digestório.

Quanto à espessura da parede muscular, esta assume valores crescentes em direção ao íleo (tabela 2.), confirmando o que é citado por McLelland, J. (1986). A variabilidade, por sua vez, definida pelos desvios-padrão (Tabela 2.) não foi discrepante quando comparados àqueles descritos por Oliveira et al. (2008).

Através da análise pelo Teste de Student-Newman-Keuls, a 5% de significância, foi possível verificar que baseado nas características altura de vilo e perímetro de vilo três regiões podem ser distinguidas estatisticamente, dentro do limite formado desde a flexura duodenojejunal até a junção íleo-ceco-cólica.

Inicialmente podemos verificar uma região de transição entre o duodeno e jejuno, representada pelo jejuno proximal (JEP), seguido do jejuno, compreendendo, dentro do que foi denominada neste estudo, o jejuno distal (JED), o íleo proximal (ILP) e o íleo médio (ILM), e o íleo, representado pelo íleo distal (ILD), localizado entre os cecos (Figura 3.).

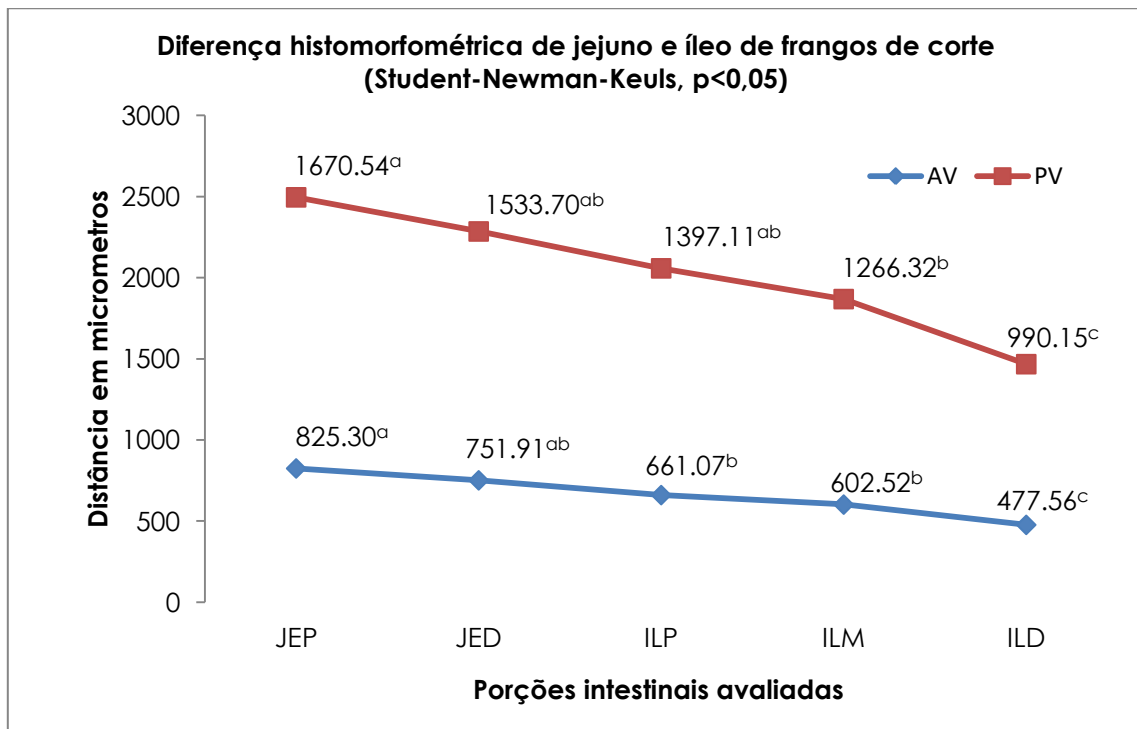


Figura 3. Representação estatística, por Teste de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$) de significância, demonstrando as regiões de transição duodenojejunal, representada pelo jejuno proximal (JEP), o jejuno, composto das regiões de jejuno distal (JED), íleo proximal (ILP) e íleo médio (ILM), e o íleo, região do íleo distal (ILD). Perímetro de vilo (PV) e Altura de vilo (AV).

Segundo os resultados apresentados é possível verificarmos que o divertículo de Meckel apresentou-se próximo a porção média do jejuno semelhante ao descrito por Ferreira et al. (2012). Estes resultados contradizem a delimitação de jejuno e íleo descrita por Baumel et al. (1993), e utilizada atualmente por diversos pesquisadores, seja na utilização para histomorfometria (Amoroso et al. 2015) ou em estudos voltados a digestibilidade ileal (Luegas et al. 2015), onde o divertículo de Meckel é imposto como o divisor das porções de jejuno e íleo.

O real posicionamento do íleo na região intercecal, íleo distal (ILD), é corroborado pelos achados de Klut, Mehlhorn e Rodehutschord (2005), os quais comparando a digestibilidade de aminoácidos quanto a três fragmentos ileais,

considerando o íleo como o segmento localizado entre o divertículo de Meckel e 2 cm anterior da junção ileo-ceco-cólica, verificaram que a porção posterior ao divertículo de Meckel se comporta funcionalmente diferente da porção final do íleo, nos fornecendo meios para determinar a porção intestinal localizada entre os cecos como o íleo, com base funcional e agora histomorfométrica.

Estes argumentos revelam a inconsistência do fator metodológico, que pode refletir diretamente na confiabilidade dos resultados, como verídica e frequente.

No que se refere às regiões de coleta para avaliação de jejuno e íleo, que melhor refletem as características destas regiões, são o jejuno distal e o íleo distal, respectivamente, as quais conferem uma menor oportunidade de erro envolvida na coleta.

Contudo, a proporcionalidade da relação altura de vilo/área de absorção (Kisielinski et al. 2002; Cunha et al. 2016) assim como a manutenção do tamanho dos vilos, que segundo Pelicano et al., (2003) se relaciona diretamente a manutenção da capacidade digestiva e de absorção intestinal, caracterizando a atividade de cada região intestinal, corroboram a utilização da altura de vilo como medida para determinação das diferenças entre jejuno e íleo neste experimento.

Conclusão

O jejuno é composto das porções denominadas, neste estudo, de jejuno distal (JED), íleo proximal (ILP) e íleo médio (ILM), e o íleo compreende a porção intestinal disposta entre os cecos, o íleo distal (ILD). Sendo as regiões de

jejuno distal e íleo distal os mais seguros pontos de coleta de jejuno e íleo, respectivamente.

Referências

Amoroso L., Baraldi-artoni S.M., Soares N.M., Pinto F.R., Pacheco M.R., Sagula A.L., Alva J.C.R., Amoroso P. 2015. Influência da qualidade microbiológica da água de dessedentação na morfologia intestinal de frangos de corte. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.35 (1), p.80-88.

Araújo, L.F.; Junqueira, O.M.; Lopes, E.L., Araújo, C.S.S., Ortolan, J.H., Laurentiz, A.C. 2006. Utilização da levedura desidratada (*Saccharomyces cerevisiae*) para leitões na fase inicial. Santa Maria, *Ciência Rural*, v.36, n.5, p. 1576-1581.

Artoni, S.M.B., Nakaghi, L.S., Borges, L.L., Macari, M.2014. Sistema digestório das aves. In: Sakomura, N.K., Silva, J.H.V., Costa, F.G.P., Fernandes, J.B.K.F., Hauschild, L. Nutrição de não ruminantes. Jaboticabal-SP: FUNEP, p .678.

Azevedo R.V., Ramos A.P.S., Carvalho J.S.O., Braga L.G.T., Tavares, L.G. 2016. Inclusão do farelo da folha da mandioca para juvenis de tilápia do Nilo. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v.38, ed.3, p. 305-310.

Barbosa, N.A.A., Sakomura, N.K., Fernandes, J.B.K., Dourado, L.R.B. 2008. Enzimas exógenas no desempenho e na digestibilidade ileal de nutrientes em frangos de corte. *Pesquisa agropecuária brasileira*, v.43, n.6, p.755-762.

Baumel, J., King, A.S., Breazile, J.E., Evans, H.E., Vanden Berge, J.C. 1993. Handbook of avian anatomy: nomina anatomica avium. Cambridge: Nuttall Ornithological Club. Nuttall Ornithological Club, 2. ed. v.23. p. 779.

Boleli, I.C., Maiorka, A., Macari, M. 2008, Estrutura Funcional do Trato Digestório. In: Marcos Macari.; Renato Luís Furlan.; Elisabeth Gonzales. (Org.). Fisiologia Aviária - Aplicada a Frangos de Corte. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP/UNESP. p. 75-98.

Cunha, H. P. F., Sousa, D. C., Santos, E. T., Guzzi, A, Dourado, L. R. B., Ferreira, G. J. B. C. 2016. Histomorfometria do intestino delgado de frangos de corte (Cobb 500®) suplementadas com glicerina bruta a 7%. *Acta Veterinaria Brasilica*, v.10, n.3, p.238-245.

Duarte, C.R.A., Eyng C., Murakami, A. E., Vargas, M.D., Nunes R.V. 2017. A inclusão do resíduo da própolis na dieta afeta a atividade de enzimas digestivas em frangos de corte. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 38, n. 1, p. 411-422.

Faveri, J.C., Murakami, A.E., Potença A., Eyng C., Marques, A. F. Q., Santos, T.C. 2015. Desempenho e morfologia intestinal de frangos de corte na fase de crescimento, com e sem adição de nucleotídeos na dieta, em diferentes níveis proteicos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.35. ed.3, p. 291-296.

Fernandes, J.I.M., Contini, J.P., Prokoski, K., Gottardo, E.T., Cristo, A.B., Perini, R. 2017. Desempenho produtivo de frangos de corte e utilização de energia e nutrientes de dietas iniciais com milho classificado ou não e suplementadas com complexo

enzimático. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v.69 n.1, p.181-190.

Ferreira, M.S., Júnior, P.F., Guimarães, G.C., Oliveira, F.S. 2012. Tamanho e localização do pedúnculo e divertículo vitelínicos em aves de corte. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 33, n. 5, p. 1919-1922.

Fukayama, E.H., Bertechini, A.G., Geraldo, A., Kato, R.K., Murgas, L.D.S. 2005. Extrato de orégano como aditivo em rações para frangos de corte. *Revista Brasileira de Zootecnia*. v.34, n.6, p. 2316-2326.

Khan I., Zaneb H., Masood S., Yousaf M.S., Rehman H.F., Rehman H. 2017. Effect of *Moringa oleifera* leaf powder supplementation on growth performance and intestinal morphology in broiler chickens. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 101 (Suppl. 1), p. 114–121.

Kluth, H., Mehlhorn, K., RODEHUTSCORD, M. 2005. Studies on the intestine section to be sampled in broiler studies on precaecal amino acid digestibility. *Archives of Animal Nutrition*. v.59, ed.4, p.271–279.

Kisielinski, K., Willis, S., Prescher, A., Klosterhalfen, B., Schumpelick, V. 2002. A simple new method to calculate small intestine absorptive surface in the rat. *Clinical and Experimental Medicine*. v.2, p.131-135.

Latorre, J.D., Hernandez-Velasco, X., Vicente, J.L., Wolfenden, R., Hargis, B. M., Tellez, G. 2017. Effects of the inclusion of a *Bacillus* direct-fed microbial on performance parameters, bone quality, recovered gut microflora, and intestinal morphology in broilers consuming a grower diet containing corn distillers dried grains with solubles. *Poultry Science*, v. 96, n.8, p. 2728–2735.

Leandro, N.S.M., Gomes, N.A., Café, M.B., Carvalho, F.B., Stringhini, J.H., Laboissière, M. 2017. Histomorfometria de órgãos linfóides e desenvolvimento intestinal de pintos de corte originados de matrizes com diferentes idades e submetidos ao estresse por calor na incubação. *Ciência Animal Brasileira* v.18. ISSN 1809-6891. Disponível em: <https://www.revistas.ufg.br/vet/article/view/e-34828/22546>. Acesso em: 14 dez. 2017.

Luegas, J.A.P., Albino, L.F.T., Tavernari, F.C., Barros, V.R.S.M., Pessoa, G.B.S., Rostagno, H.S. 2015. Efeito da adição de probióticos na dieta sobre digestibilidade ileal da matéria seca e da proteína de frangos de corte. *Arquivo de Zootecnia*. v.64, n.247, p. 00-00.

Marchini, C.F.P., Silva, P.L., Nascimento, M.R.B.M., Beletti, M.E., Guimarães, E.C., Soares, H.L. 2009. Morfometria da mucosa duodenal em frangos de corte submetidos à temperatura ambiente cíclica elevada. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.61, n.2, p.491-497.

McLelland, J. 1986. Sistema Digestivo das aves. In: Getty, R. (5 ed) *Anatomia dos animais domésticos*. Interamericana, Rio de Janeiro, v.2. p.1986.

Oliveira, M.C., Marques, R.H., Gravena, R.A., Moraes, V.M.B. 2008. Morfometria do intestino delgado de frangos tratados com dietas adicionadas de mananoligossacarídeo e complexo enzimático (Morphometry of the small intestine from broilers treated with diets added of mannan oligosaccharides and enzymatic complex). *Biotemas*. v.21. n 3. p. 135-142.

Paiva, J.G.A., Carvalho, S.M.F., Magalhães, M. P., Ribeiro, D. G, 2006. Verniz vitral incolor 500: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. *Acta Botânica Brasileira*. v.20, ed.2, p. 257-264.

Pelicano, E.R.L., Souza P.A., Souza H.B.A., Oba A., Norkus, E.A., Kodawara, L.M, Lima, T.M.A. 2003. Effect of different probiotics on broiler carcass and meat quality. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, v.5, n.3, p. 207-214.

Pluske, J. R., Hampson, D. J., Williams, I. H. 1997. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. *Livestock Production Science*, v. 51, p. 215–236.

PropheT, E.M., Millis, B., Arrington, J.B., Sobin, L.H. 1992. Laboratory methods in histotechnology. Washington: America Registry of Pathology, p. 275.

Ramos, L.S.N., Lopes, J.B., Silva, S.M.M.S, Silva, F.E.S., Ribeiro, M.N. 2011. Desempenho e histomorfometria intestinal de frangos de corte de 1 a 21 dias de

idade recebendo melhoradores de crescimento. *Revista Brasileira de Zootecnia*. v.40, n.8, p.1738-1744.

Rodrigues, P.B., Rostagno, H.S., Albino, L.F.T., Gomes, P.C., Barboza, W.A., Toledo, R. S. 2003. Desempenho de Frangos de Corte, Digestibilidade de Nutrientes e Valores Energéticos de Rações Formuladas com Vários Milhos, Suplementadas com Enzimas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.32, n.1, p.171-182.

Rostagno, H.S., Albino, L.F.T., Donzele, J.L., Gomes, P.C., Oliveira, R. F., Lopes, D.C., Ferreira, A.S., Barreto, S.L.T., Euclides, R.F. 2011. Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais. 3ed. Viçosa, MG: UFV. DZO, p. 252.

Santos, F.R., Oliveira, P. R., Minafra, C.S., Duarte E. F., Almeida R.R., Silva W.J. 2012. Desenvolvimento digestório e aproveitamento energético em frangos de corte. *PUBVET*, V. 6, N. 18, ed. 205, p. 1369-1374.

Sousa, D.C., Oliveira N.L.A., Santos E.T., Guzzi A., Dourado, L.R.B., Ferreira G.J.B.C. Caracterização morfológica do trato gastrointestinal de frangos de corte da linhagem Cobb 500®. 2017. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. v. 35, n. 1, p. 61-68.

Tanchoenrat, P., Ravindran, V., Zaefarian, F., Ravindran, G. 2014. Digestion of fat and fatty acids along the gastrointestinal tract of broiler chickens. *Poultry Science*, v.93, ed.2, p.371-9.

Tzora, A., Giannenas I., Karamoutsios, A., Papaioannou, N., Papanastasiou, D. , Bonos, E., Skoufos, S., Bartzanas, T., Skoufos, I. 2017. Effects of Oregano, Attapulgate, Benzoic Acid and their Blend on Chicken Performance, Intestinal Microbiology and Intestinal Morphology. *Japan Poultry Science*. 54, p. 218-227.

Uni, Z., Ganot, S., Skalan, D. 1998. Posthatch development of mucosa function in the broiler small intestine. *Poultry Science*, v.77, n.1, p. 75-82.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos que visem à padronização metodológica configuram meios de enriquecimento a pesquisa científica, além de conferir aos resultados obtidos, neste caso, por meio de preparações histológicas, e ainda, que se utilizem de morfometria intestinal, ou da localização ileal para estudos de digestibilidade ileal, fidedignidade a condição da estrutura ou órgão avaliado. A observação de fixadores que reúnam características mais positivas quanto à preservação e processamento do intestino de frangos de corte, como o Bouin e Formaldeído a 10% evidenciados neste estudo, fornecem ao pesquisador bases científicas para execução de pesquisa como segurança na obtenção de resultados eficientes. A correta determinação topográfica do íleo, fornecida pela caracterização histomorfométrica, que também é atualmente utilizada para observação parcial do desempenho nutricional em frangos, a redução da subjetividade da coleta de material intestinal nestes animais, promovendo desta maneira a padronização do local de coleta e finalizando assim o debate entre nutricionistas e anatomistas sobre sua localização, servem para o enriquecimento da ciência em busca de resultados mais sólidos.