

JÉSSICA DE TORRES BANDEIRA

**CICLICIDADE DO GÁS AMÔNIA E SUA INFLUÊNCIA EM TRAQUEIAS
DE FRANGOS DE CORTE**

RECIFE,

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JÉSSICA DE TORRES BANDEIRA

CICLICIDADE DO GÁS AMÔNIA E SUA INFLUÊNCIA EM
TRAQUEIAS DE FRANGOS DE CORTE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Pró-Reitoria de Pós-Graduação da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Ciência Veterinária.

Orientador:

Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto

Coorientadores:

Prof. Dr. Francisco de Assis Leite Souza

Dra. Priscilla Maria Cavalcante Rocha

RECIFE

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B214c Bandeira, Jéssica de Torres
 CICLICIDADE DO GÁS AMÔNIA E SUA INFLUÊNCIA EM TRAQUEIAS DE FRANGOS DE CORTE / Jéssica
de Torres Bandeira. - 2021.
 95 f. : il.

Orientador: Joaquim Evencio Neto.
Coorientador: Francisco de Assis Leite Souza.
Inclui referências e anexo(s).

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Recife, 2021.

1. Avicultura. 2. Bem-estar animal. 3. Cronobiologia. 4. Gás tóxico. 5. Histomorfometria.. I. Neto, Joaquim Evencio, orient. II. Souza, Francisco de Assis Leite, coorient. III. Título

CDD 636.089

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CICLICIDADE DO GÁS AMÔNIA E SUA INFLUÊNCIA EM
TRAQUEIAS DE FRANGOS DE CORTE

Tese de Doutorado elaborada por
JÉSSICA DE TORRES BANDEIRA

Aprovada em/...../.....

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto
Orientador – Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

Prof. Dr. Francisco De Assis Leite Souza
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

Dra. Priscilla Maria Cavalcante Rocha
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

Prof. Dr. Manuel de Jesus Simões
Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP

Lígia Reis de Moura Estevão
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

Dedicatória

Dedico esta tese aos que me ensinaram sobre o amor em suas diversas formas, Mariza, Elzir, Chuck e Renato.

DEDICO

Agradecimentos

Primeiramente agradeço à Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), por me proporcionar a oportunidade de continuar a estudar e me qualificar dentro da profissão que tanto amo. Agradeço também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa, sem a qual não teria conseguido financiar essa pesquisa.

Gostaria de agradecer ao professor Joaquim Evêncio, pelo voto de confiança e ter aceitado ser meu orientador “sem aviso prévio” e também ao professor Francisco Leite, por ter embarcado nesse doutorado junto conosco e ter aceito ser meu coorientador.

Agradeço à Priscilla Rocha por ter conseguido me fazer gostar do universo avícola, me dando todo o suporte que preciso como minha coorientadora e me contagiando com seu entusiasmo, e também à Maria Edna pelos ensinamentos no laboratório de histologia e pela parceria no experimento.

Aos colegas, Bruno Brito, Donald Manigat e Guilherme Felix muito obrigada por todo o apoio e colaboração durante as coletas. As minhas primas, Tatiane Silva e Alyne Silva, por sempre que precisei e até sem precisar, me ajudarem na execução dessa pesquisa, serei sempre grata.

Agradeço à toda a família Rocha, principalmente Dona Valdete e Sr. Márcio. Vocês são pessoas com o coração mais generoso que eu já conheci, me acolheram não apenas como uma colega de trabalho de Priscilla, mas como membro da família. Sem vocês essa pesquisa não poderia ter ocorrido, muito obrigada por tudo.

Muito obrigada a Jaime Santos por ter topado participar dessa pesquisa, sua ajuda foi vital.

Agradeço à minha família, Mariza Bandeira, Elzir Bandeira, Augusto Bandeira e Vera Lúcia por serem minha base, sem a qual eu não teria conquistado nada.

Agradeço aos meus amigos mais antigos, Flávia Braga, Israel Lira, André Farias, Célio Campos e Camila Meneguini pelo encorajamento de sempre.

Agradeço aos meus sogros, Miriam Souto Maior e Hélio Moraes, por todo apoio e encorajamento.

Estendo minha gratidão à Fernando Leandro, meu eterno “pai patológico”, por todos os conselhos e ensinamentos dentro e fora da profissão.

Sou muito grata ao destino, que fez com que eu e Renato Souto Maior fossemos colegas de turma na veterinária. Nos tornamos amigos, namorados, noivos e agora somos marido e mulher. Renato se tornou a pessoa que melhor me conhece, as vezes melhor que eu mesma. É a pessoa que me apoia e constrói sonhos e planos comigo, sempre do meu lado a cada passo, construindo um amor que jamais pensei que teria.

Me considero uma pessoa de muita sorte, entrei no doutorado buscando qualificação e ganhei muito mais que isso, ganhei amigos queridos, uma nova família. Todos vocês foram muito além do campo acadêmico, ganharam um espacinho especial no meu coração.

Muito obrigada de todo o meu coração a todos aqui citados e a tantos outros que indiretamente contribuíram para que esse sonho se tornasse real.

“Mirmã tenha fé, no fim tudo dá certo!”

Fernando Leandro dos Santos

RESUMO

Objetivou-se avaliar os níveis de amônia, avaliar as lesões histopatológicas e a histomorfometria em frangos de corte. Para o experimento, que foi realizado na cidade de Garanhuns, PE, foram utilizados 182 pintos da linhagem Ross, sendo 91 aves por cada semestre do ano e estas divididas em três grupos com 28 animais cada e mais um grupo controle (D0) com sete animais em cada. As aves foram alojadas em três galpões de frangos de corte não climatizados, medindo 2m x 2m em dois ciclos, um entre os meses de fevereiro e março, e o segundo entre junho e agosto, de 2019. Foi utilizada a cama mais utilizada na região, a de palha de arroz, no galpão 1 foi utilizada cama nova; no galpão 2 foi usada cama já fermentada proveniente de galpões da própria granja após um ciclo de produção; e no galpão 3 foi utilizada a mesma cama do galpão 2, a qual era pulverizada diariamente com sete litros de água. O ciclo de produção teve um total de 42 dias, as aves foram eutanasiadas em D0, D7, D21, D35 e D42, nos quais foram realizadas as coletas. Aferiu-se diariamente a concentração de gás amônia em cada galpão, em três turnos (manhã, meio-dia e fim da tarde), na altura das aves e do aviariista. Dois fragmentos de traqueia (porção superior e porção inferior) foram coletados, acondicionadas em potes plásticos em solução de formalina tamponada a 10% e posteriormente com álcool a 70% até o processamento histológico. As amostras foram processadas por técnica histológica de rotina, sendo emblocadas em parafina, cortadas a 3µm, coradas em hematoxilina e eosina e analisadas em microscópio óptico. Verificou-se que não houve diferença entre as mensurações em diferentes alturas dentro do galpão, porém há aumento de emissão de NH₃ (gás amônia) no inverno e também nos galpões que utilizaram cama reutilizada e reutilizada e molhada. Na histomorfometria, não houve diferença entre as aves, dos diferentes galpões de um mesmo ciclo, somente sazonal, nos D35 e D42, as aves criadas na época de altas temperaturas apresentaram maior espessura de mucosa traqueal. Já na histopatologia, as lesões mais encontradas foram traqueíte, hiperplasia de glândula mucosa, desciliação e metaplasia de epitélio traqueal, porém não houve diferença estatística entre os grupos, nem entre os ciclos.

Palavras-chave: Avicultura, bem-estar animal, cronobiologia, gás tóxico, histomorfometria.

ABSTRACT

The objective was to evaluate the ammonia levels, evaluate histopathological lesions and histomorphometry in broiler chickens. To the experimente, wich was carried out in the city of Garanhuns, PE, 182 chicks of the Ross lineage were used, with 91 birds for each semestre of the year divided into three groups with 28 animals each plus a control group (D0) with 7 animals each. The birds were housed in three unheated broiler houses, measuring 2m x 2m in two cycles, one between the months of february and march, and the second between june and august, of 2019. The bedding used was the most utilized in the region, the rice straw, in shed 1, new bedding was used, in shed 2 litter already fermented from the sheds on the farm itself was used after a production cycle, which was sprayed daily with seven liters of water; and in shed 3, the same bed as in shed 2 was used, but without spraying. The production cycle had a total of 42 days, the birds were euthanized in D0, D7, D21, D35, D42, in wich collections were carried out. The concentration of ammonia gas was checked daily in each shed, in three turns (morning, noon and late afternoon), at the height of the birds and of the employee. Two fragments of trachea (superior portion and inferior portion) were collected, stored in plastic containers with 10% buffered formalina solution and then 70% alcohol until the histological processing. The samples were processed by routine histological techniqe, being embedded in paraffin, cut at 3µm, stained in hematoxylin and eosin and analyzed under na optical microscope. It was found that there was no difference between the measurments at diferente heights in the shed, but there is na increase in NH₃(ammonia gas) in winter and also in sheds that used reused and reused wet litter. In histomophometry there was no difference between the birds, from diferente sheds in the same cycle, only seasonal, in D35 and D42, the birds raised in the high temperature season had greater tracheal mucosa thickness. In histopathology, the most common lesions were Tracheitis, mucous gland hyperplasia, deciliation and metaplasia of the tracheal epithelium, but there was no statistical difference between groups or between cycles.

Keywords: Animal welfare, chronobiology, histomorphometry, poultry, toxic gas.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| RESUMO | 7 |
| ABSTRACT | 8 |
| 1. INTRODUÇÃO | 10 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 11 |
| 2.1. Amônia na criação de frangos de corte..... | 11 |
| 2.1.1. Definição | 11 |
| 2.1.2. Origem..... | 12 |
| 2.1.3. Malefícios da alta concentração de gás amônia..... | 13 |
| 2.2. Sistema respiratório das aves | 15 |
| 2.3. Cronobiologia | 17 |
| 2.3.1. Ciclos biológicos | 18 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 20 |
| 3.1. Aspectos éticos..... | 20 |
| 3.2. Local..... | 20 |
| 3.3. Amostragem | 21 |
| 3.4. Avaliação histológica e histomorfométrica..... | 22 |
| 3.5. Aferição de gás amônia, temperatura e umidade ambiental..... | 23 |
| 3.6. Análise estatística para histomorfometria e histopatologia traqueal..... | 24 |
| 3.7. Tratamento matemático para estudo rítmico..... | 24 |
| 4. REFERÊNCIAS | 25 |
| 5. ARTIGOS CIENTÍFICOS | 31 |
| 5.1. Artigo científico número 1..... | 31 |
| 5.2. Artigo científico número 2..... | 44 |
| Avaliação histológica e histomorfométrica | 48 |
| Anexo 1 – Artigo 1 na formatação da revista Biological Rhythm Research..... | 59 |
| Anexo 2 – Normas da revista Biological Rhythm Research | 75 |
| Anexo 3 – Artigo 2 nas normas da Revista Brasileira de Ciência Avícola..... | 76 |
| Anexo 4 – Normas da Revista Brasileira de Ciência Avícola..... | 94 |

1. INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira é a terceira no ranking de produção mundial, atingindo 13.845 milhões de toneladas de carne de frango em 2020 (ABPA, 2021). Essa é a maior produção nos últimos 10 anos (ABPA, 2021), sendo reflexo da alta tecnificação aplicada na avicultura (EMBRAPA, 2018). Neste cenário o estado de Pernambuco se destaca como o maior produtor da Região Nordeste do Brasil (ABPA, 2021). Para isso, essa atividade requer um investimento razoável, com possibilidade de retorno proporcional à qualidade administrativa da empresa, uma vez que a margem de lucro é estreita (ROSA *et al.*, 2019).

Uma parte importante da avicultura é a escolha correta da cama, bem como seu manejo adequado, uma vez que a cama afeta diretamente a saúde, os parâmetros produtivos, a qualidade de carcaça e o bem-estar dos frangos (STOJCIC *et al.*, 2016). E a reutilização dela permite diminuir os custos da produção de frangos, bem como aumenta seu valor agrônômico e diminuir o impacto ambiental dessa atividade (CARVALHO *et al.*, 2011).

A utilização de cama em aviários, visa evitar o contato das aves diretamente com o solo, absorver a umidade, incorporar dejetos e ainda ajudar na manutenção da temperatura (GIROTTO e AVILA, 2003). A sua qualidade é de extrema importância, uma vez que é um fator significativo na criação de frangos de corte, desde o dia um até o abate, pois influencia na saúde, nos parâmetros produtivos, na qualidade de carcaça e no bem-estar desses animais (STOJCIC *et al.*, 2016).

Os dejetos dos animais que se acumulam na cama são responsáveis pela produção de poluentes, especialmente o gás amônia (NH_3) em decorrência da mobilização do nitrogênio excretado pelas aves (SOUSA *et al.*, 2016). Esse gás é incolor, corrosivo, volátil e tem odor repugnante (HAO e YAN, 2013) e sua produção está diretamente relacionada ao pH, temperatura e umidade presente na cama (ELLIOT e COLLINS, 1982). Sendo o NH_3 o maior poluente atmosférico da avicultura (YI *et al.*, 2016a), sabe-se que a emissão desse gás é lesiva aos frangos (MILES *et al.*, 2006) e seres humanos (DOUGLAS *et al.*, 2018).

O efeito do NH_3 é amplamente citado na avicultura (SOLIMAN *et al.*, 2017; WU, *et al.*, 2017; XIONG *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2015a,b), inclusive sua ação sobre o DNA das aves,

que induz mutações (YI *et al.*, 2016). Porém há pouca descrição morfológica e histopatológica das lesões causadas por esse gás e ausência de análises histomorfométricas.

Além disso, o gás amônia também é capaz de afetar a regulação dos relógios biológicos (WANG *et al.*, 2020). A interferência na cronobiologia das aves, no manejo do ciclo claro-escuro, é algo rotineiro e bem estudado (HIEKE, HUBERT e ATHREY, 2019; RIAZ *et al.*, 2021; WANG *et al.*, 2020), porém, pouco se sabe sobre a interferência de outros sincronizadores, tais como o NH₃, sobre a saúde desses animais.

Diante da importância da amônia na avicultura mundial, particularmente no Brasil e em Pernambuco, torna-se essencial avaliar os níveis desse gás na avicultura de corte tradicional, avaliar se sua produção ocorre de forma cíclica, bem como estudar a histomorfometria e a histopatologia de traqueias em frangos de corte submetidos a diferentes manejos de cama aviária.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Amônia na criação de frangos de corte

2.1.1. Definição

Amônia é um gás alcalino, incolor e que também pode se apresentar na forma líquida (DAVIS *et al.*, 2015). Tem um odor repugnante e sufocante, é bastante solúvel em água e ocorre naturalmente na natureza, decorrente principalmente da decomposição de material orgânico e queimadas de florestas ou erupções vulcânicas (TOXNET, 2018). É o poluente atmosférico mais preocupante na avicultura (DAVIS *et al.*, 2015).

2.1.2. Origem

A liberação de gás amônia é advinda da fermentação de compostos orgânicos presentes na cama do aviário, juntamente com os dejetos das aves, ricos em componentes nitrogenados como ácido úrico (80%), amônia (10%) e ureia (5%). (DAVIS e MORISHITA, 2005; DAVIS *et al.*, 2015). Assim que excretados, a ureia e o ácido úrico são rapidamente convertidas em amônia por ação enzimática da própria excreta e degradação pela microbiota presente (principalmente o *Bacillus pasteurii*) (DAVIS *et al.*, 2015).

A formação e liberação desse gás, depende de diversos fatores como Temperatura, pH e umidade da cama (ABREU *et al.*, 2011; ELIOTTS e COLLINS, 1982). Embora já se tenha comprovado que tanto níveis baixos como muito altos de umidade da cama, parecem não interferir na emissão de amônia (ELIOTTS e COLLINS, 1982; WEI *et al.*, 2015).

A cama de frango é um material absorvente que irá recobrir o piso dos alojamentos das aves, recebendo as excretas desses animais (CAMPOS *et al.*, 2018). A função esperada dessa cama é que ela absorva a umidade das fezes das aves, bem como demais materiais orgânicos que se misturem a ela, forneça uma superfície macia para evitar lesões de ordem mecânica nas aves e crie um isolamento térmico (CAMPOS *et al.*, 2018; CARVALHO *et al.*, 2011). Os materiais preferencialmente utilizados como cama na avicultura de corte são cascas de arroz, maravalha, serragem, papel e capim triturado (CAMPOS *et al.*, 2018; CARVALHO *et al.*, 2011).

O tipo de cama a ser utilizada também influenciará a emissão desse gás, Freitas *et al.* (2011) testaram seis tipos de cama quanto a emissão de amônia, sendo eles: bagaço de cana; maravalha; casca de arroz; capim Napier; bagaço de cana + casca de arroz; bagaço de cana + maravalha, e concluíram que só ocorre mudança da emissão de gás a partir do 28º dia, quando a cama com bagaço de cana + maravalha apresentou os menores e a cama com capim Napier os maiores índices de emissão de gás.

2.1.3. Malefícios da alta concentração de gás amônia

A presença de amônia é um problema não somente para a saúde dos animais, mas também para a saúde dos colaboradores e um dos principais problemas ambientais atrelados a criação de animais (DOUGLAS *et al.*, 2018; MEDEIROS *et al.*, 2008; NASEEM e KING, 2018). Dentre as criações de gado, suínos e aves, há uma ordem crescente na produção de poluentes atmosféricos, especialmente o gás amônia, que afeta a saúde de seres humanos expostos a ele, podendo causar irritação nos olhos e na pele, lesões em trato respiratório, dores de cabeça, vômitos e essas alterações podem se agravar e ocasionar até a morte do indivíduo (IVERSEN *et al.*, 2000; SCHIFFMAN, 1998).

Os humanos podem detectar a presença do gás amônia em concentrações baixas de até 10 ppm, isso se deve principalmente ao odor repugnante e a ação irritante do gás em olhos e mucosas respiratórias. Se a exposição for crônica, pode causar sinusite crônica, que por consequência irá dessensibilizar a pessoa quanto a presença de amônia, possibilitando a permanência em locais com altos níveis de amônia (DAVIS *et al.*, 2015).

Nas aves os sinais são semelhantes aos vistos em humanos, Oyetunde *et al.* (1978) descreveram que instantes após a emissão de amônia as aves apresentavam dificuldade respiratória, com movimentos de cabeça, vermelhidão dos olhos e em pele abaixo das penas das asas. Posteriormente observaram as aves ficavam ofegantes, trôpegas e deitavam-se ao lado da porta. Esse comportamento parava após um tempo e retornava toda vez que o gás era injetado na câmara.

Têm-se amplamente descrito na literatura que já em concentrações baixas como 25 ppm, a presença do gás amônia é capaz de causar lesões em trato respiratório de aves (ANDERSON, BEARD e HANSON, 1964; AL-MASHHADANI e BECK, 1985; ANSARI *et al.*, 2016). Dentre as lesões macroscópicas, destacam-se o excesso de muco em traqueia (ANDERSON, BEARD e HANSON, 1964; AL-MASHHADANI e BECK, 1985) e pulmões edematosos, inflamados e com pontos hemorrágicos (ANDERSON, BEARD e HANSON, 1964).

Nas lesões microscópicas no trato respiratório são citadas áreas com perda de cílios, principalmente na parte superior da traqueia (OYETUNDE *et al.*, 1978), que parecem possuir um número maior de células caliciformes, o que faz sentido em decorrência da maior presença de muco (AL-MASHHADANI e BECK, 1985). Além disso, em níveis de apenas 15ppm de gás

amônia já é possível verificar deterioração da estrutura tecidual traqueal, podendo chegar à deformação severa da camada mucosa, inflamação na lâmina própria e edema em submucosa (ZHOU *et al.*, 2021).

Os mecanismos de ação do gás sobre a traqueia é objeto de diversos estudos recentes, tem-se atrelado que níveis de 15ppm de gás amônia já são suficientes para ocasionar lesões graves na porção superior da traqueia (ZHOU *et al.*, 2021). Acredita-se que grande parte do aparecimento dessas lesões se deva a alcalinização da mucosa traqueal, que leva a um desbalanço na microbiota ali presente, deixando o epitélio mais vulnerável a ação de diversos patógenos, inclusive àqueles de ação sistêmica (XIONG *et al.*, 2016).

Nos pulmões evidencia-se aumento da espessura da parede alveolar, diminuindo a luz do alvéolo e por vezes com áreas de atelectasia (AL-MASHHADANI e BECK, 1985). Esses achados contradizem ao proposto por Curtis *et al.* (1975), que sugeriram que o trato respiratório inferior não seria afetado pela ação da amônia, porque esse gás é altamente solúvel em água, logo se ligaria ao muco no trato respiratório superior, sem chegar aos pulmões.

Além de causar essas lesões, que a princípio podem parecer pequenas, elas acabam por deixar as aves susceptíveis a agentes patógenos capazes de causar grandes perdas econômicas (ANDERSON, BEARD e HANSON, 1964; OYETUNDE *et al.*, 1978), pois deprimem a resposta imune das aves (WEI *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2017) e elevam os níveis de diversos mediadores inflamatórios (AN *et al.*, 2019; XIONG *et al.*, 2016; ZHOU *et al.*, 2021).

Além do trato respiratório é relatado uma irritação no aparelho fotorreceptor, causando lesões em córneas, fotofobia marcante, vermelhidão ocular e lacrimejamento (ANDERSON, BEARD e HANSON, 1964). Porém, se em concentrações constantes de até 25 ppm, essas lesões aparentam ser transitórias a partir do 28º dia de exposição ao NH₃ (MILES *et al.*, 2006).

Descreve-se ainda lesões em coxins das aves, embora não se possa relacionar diretamente a emissão de amônia ao aparecimento de doença podal. Sabe-se que a amônia produzida pelas bactérias presentes na cama, em sua maior parte se mistura a umidade da cama, fazendo com que esse microambiente se torne alcalino e conseqüentemente atue como agente irritante nos coxins (STOJCIC *et al.*, 2016).

Também se tem registros de alterações hepáticas (ZHANG *et al.*, 2015a), podendo ser observados infiltrados inflamatórios, hiperemia, fratura dos cordões esplênicos e atrofia da polpa vermelha, linfócitos aumentados e amiloidose circundando a camada muscular da parede arterial (AN *et al.*, 2019). Macroscopicamente se tem relatado uma palidez hepática (ZARNAB

et al., 2019), provavelmente decorrente do aumento de colesterol depositado no órgão (SA *et al.*, 2017).

Há redução em musculatura de peito (YI *et al.*, 2016b), como também alterações em deposição de gordura, qualidade e palatabilidade desse corte, principalmente devido a expressão de diversos genes responsáveis pelo controle do metabolismo lipídico nas aves (YI *et al.*, 2016a).

Zhang *et al.* (2015b), identificaram diminuição da taxa de crescimento, diminuição das vilosidades e criptas intestinais, desenvolvimento retardado dos órgãos linfóides como a bolsa cloacal e indicadores séricos de estresse oxidativo, como aumento de CK (creatina quinase) e baixa de T-SOD (superóxido dismutase total).

Além disso tudo, há diminuição do apetite das aves e consequente baixa da produtividade, tanto voltado para frango de corte como para poedeiras (CHARLES e PAYNE, 1966; LU *et al.*, 2016). Sendo registrado até 14,4% de redução de peso da carcaça do frango, quando em condições de até 25ppm de gás amônia (ZARNAB *et al.*, 2019).

2.2. Sistema respiratório das aves

Em comparação com os mamíferos, pode-se notar algumas diferenças na constituição dos órgãos do trato respiratório das aves (PLOPPER e ADAMS, 2012). Nas aves os pulmões são esponjosos, compactos e rígidos, também não possuem alvéolos pulmonares, apenas brônquios primários, secundários e terciários (ou parabrônquios), átrios e capilares aéreos, local onde ocorre a troca gasosa (MORAES, 2021; PLOPPER e ADAMS, 2012).

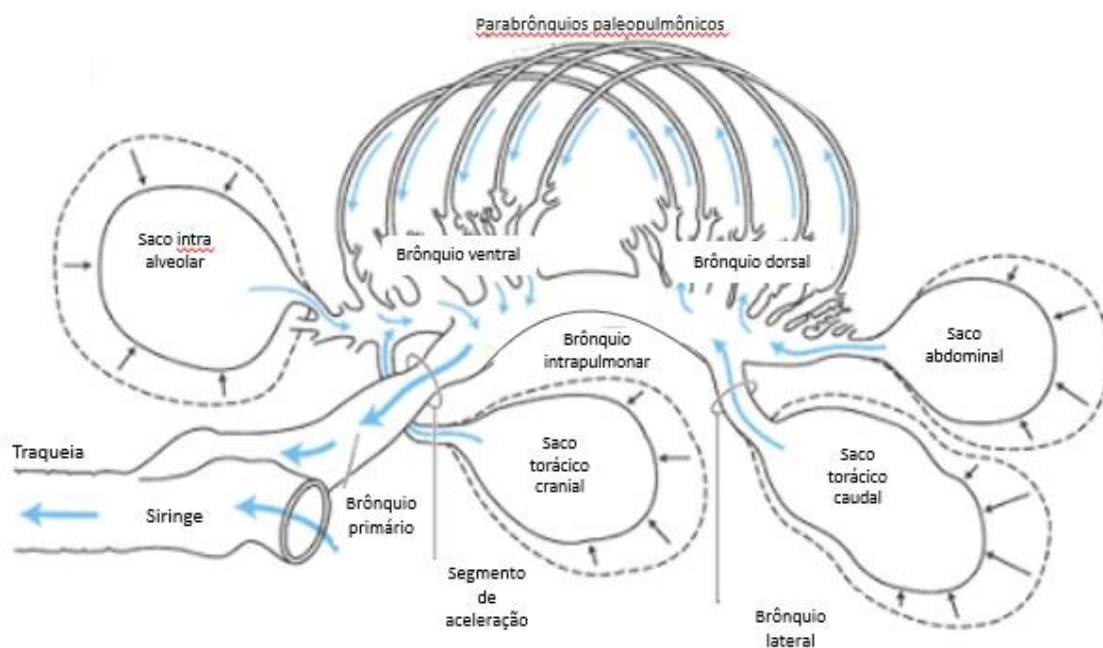
O trato respiratório superior é responsável por filtrar, aquecer e umedecer o ar inalado (FEDDE, 1986). Na porção final da traqueia as aves possuem a siringe, uma estrutura sacular responsável pela emissão de sons das aves (MORAES, 2021). A traqueia das aves possui anéis cartilagosos mais complexos e não tem musculatura, o que não permite mudanças em seu diâmetro durante a respiração, porém o epitélio respiratório é similar ao dos mamíferos, exceto pela grande quantidade glândulas mucosas (PLOPPER e ADAMS, 2012).

Além disso, as aves possuem nove sacos aéreos, cuja principal função é aumentar o fluxo de ar oxigenado nos pulmões (ADAMS *et al.*, 2021) (Figura 1), que são revestidos por epitélio escamoso (por vezes até cuboide) simples (PLOPPER e ADAMS, 2012). Alguns sacos aéreos penetram ossos, formando os ossos pneumáticos, diminuindo a sua densidade e facilitando o voo (FEDDE, 1986).

Quando a ave inspira, os músculos respiratórios contraem, aumentando o espaço intracavitário e também dentro dos sacos aéreos, criando uma pressão subatmosférica dentro dos sacos. Por causa dessa pressão, o ar passa pelo tecido pulmonar e chega até os sacos aéreos, quando a ave expira, por contração dos músculos expiratórios, o ar segue o caminho inverso (FEDDE, 1986), como ilustrado na figura 2. Esse fluxo ocorre porque os pulmões das aves não expandem, mas é neles que ocorre a troca gasosa (FEDDE, 1986).

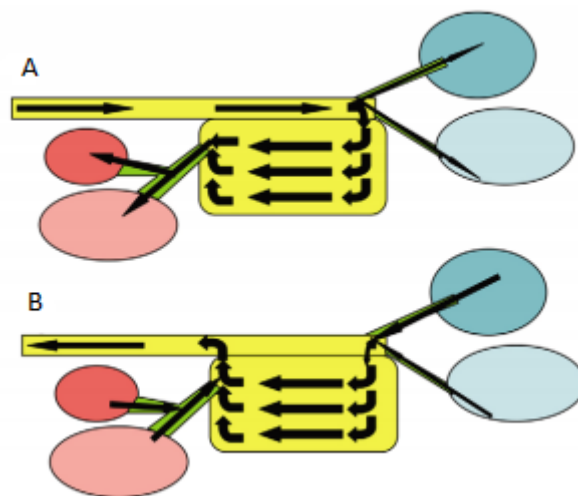
O trato respiratório inferior das aves é formado pelo monte laríngeo, traqueia, pulmões e sacos aéreos. Essas estruturas são mais sensíveis a agente ambientais irritantes e também mais susceptíveis a infecções, provavelmente por possuir uma vasta área de superfície, com alta umidade e oxigenação, fatores essenciais para o desenvolvimento da maioria dos microrganismos (TULLY Jr., 1995).

Figura 1 – Desenho esquemático do sistema respiratório das aves, indicando o fluxo do ar dentro das vias aéreas durante a respiração.



Fonte: Adaptado de Adams *et al.*, [s.d.].

Figura 2 – Esquema ilustrando o fluxo de ar, nas principais estruturas do sistema respiratório das aves, durante os processos de inspiração, ilustrado em A e expiração, ilustrado em B.



Fonte: Adaptado de Plummer e Goller, 2008.

2.3. Cronobiologia

Araujo e Marques (2002) definem a cronobiologia como “uma disciplina científica que se caracteriza como um ramo da ciência que estuda a organização temporal dos seres vivos.” Dentre os ramos da cronobiologia, o estudo da interferência dos fatores abióticos sobre os animais, tais como a influência do ciclo de luz e escuro, temperatura ambiente, humidade e tantos outros fatores, é o mais reportado (KRONFELD-SCHOR *et al.*, 2017).

Como uma forma adaptativa a essas mudanças ambientais, os seres vivos são capazes de modificar seu comportamento e atividades fisiológicas, procurando, principalmente, minimizar prejuízos (ARAUJO e MARQUES, 2002; KRONFELD-SCHOR *et al.*, 2017). Essas mudanças ambientais, e por consequência as adaptações dos seres vivos, ocorrem de forma rítmica, daí surgiu o estudo dos ritmos biológicos (ARAUJO e MARQUES, 2002).

2.3.1. Ciclos biológicos

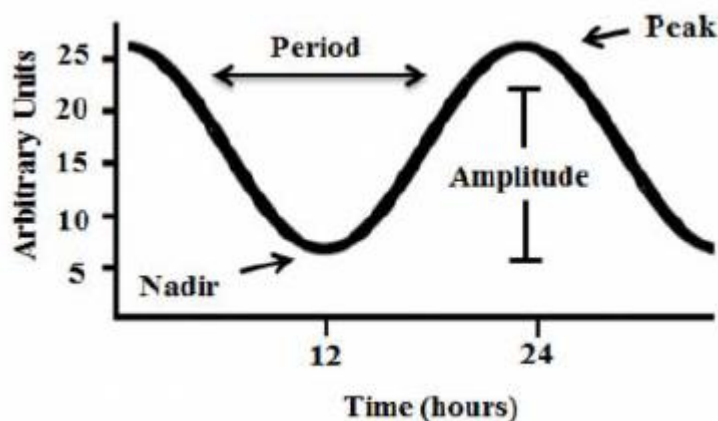
Em animais vertebrados, os ciclos podem ser classificados de acordo com a periodicidade (VERAS *et al.*, 2013), podendo ser organizados em: circaseptano, períodos de dias a semanas; infradianos, períodos superiores a 28 horas; circadiano, período de 24 horas; e ultradianos, períodos menores que 24 horas (PINTO, MURICY e TRETO, 2020). Essa ritmicidade intrínseca, que guia as adaptações do indivíduo as modificações ambientais, visa antecipar essas mudanças, e otimizar as respostas dos indivíduos (DIALLO *et al.*, 2020).

Dentre os ritmos biológicos, o mais estudado é o ciclo circadiano (ou ritmo circadiano), que é a regulação dos processos biológicos dos seres vivos, de forma rítmica, em um período de 24 horas (SANTOS e MOURA, 2019). Esse ritmo é ditado pela rotação do planeta Terra em torno do seu próprio eixo, que gera um ciclo de claro-escuro em aproximadamente 24 horas (PINTO, MURICY e TRETO, 2020).

O ciclo dos ritmos pode ser expresso em gráficos, onde a distância entre um pico e outro, da variação estudada, compreende o período desse ciclo (Figura 3) (PINTO, MURICY e TRETO, 2020). Esses picos respondem a mudanças ambientais com ação sincronizadora, chamadas de *Zeitgeber*, esses sincronizadores se suprimidos afetaram diretamente a ritmicidade do fenômeno estudado, ocorrendo um ritmo biológico *free-run*, ou seja, deixa de responder a ciclicidade imposta pelo *Zeitgeber*. Podem haver sincronizadores relacionados a outros ciclos que não somente ao geofísico, como por exemplo o ciclo da disponibilidade de alimento (VERAS *et al.*, 2013).

A compreensão desses ritmos biológicos é de suma importância para compreensão dos processos fisiológicos dos animais e seres humanos, bem como para entendimento das alterações biológicas ativadas por alterações nos sincronizadores (ÁNGELES-CASTELLANOS *et al.*, 2007). Os parâmetros clínicos e laboratoriais, tais como dosagens hormonais, metabolização celular, pressão arterial, entre outros, modificam junto com o ritmo biológico do indivíduo, sendo menos determinantes na espécie humana, devido a sua grande capacidade de adaptação, principalmente a mudanças ambientais (MARTÍNEZ-CARPIO e COROMINAS, 2004).

Figura 3 – Representação gráfica de dados com características de ciclo circadiano, no eixo y estão ilustradas medidas aleatórias e no eixo x o tempo decorrido. Em destaque estão indicados o ponto mais baixo do evento, denominado Nadir, e o ponto mais elevado indicado como Peak, a distância entre o pico da curva e o Nadir, indicado como Amplitude e o tempo de duração de um ciclo, ilustrado como Period.



Fonte: Pinto, Muricy e Treto, 2020.

Os ritmos biológicos interferem diretamente na susceptibilidade, resposta clínica e prognóstico dos animais frente a doenças infecciosas (DIALLO *et al.*, 2020; RIAZ *et al.*, 2021). Como por exemplo o ritmo circadiano pulmonar em mamíferos, que é gerado a nível celular, mediado por diversos genes, capazes de alterar o calibre e a resistência das vias aéreas, desencadear sintomas respiratórios e mediar reações inflamatórias (WANG *et al.*, 2020).

Os ritmos podem sofrer alterações que vão além do ciclo de luz-escuridão e dos reguladores endógenos dos relógios biológicos, outros fatores externos como o gás amônia (poluente aéreo), também influenciam as respostas as injúrias nos animais (WANG *et al.*, 2020). Essas interferências podem levar a alterações de microbiota (HIEKE, HUBERT e ATHREY, 2019), de desempenho zootécnico (RIAZ *et al.*, 2021) e até alterações histopatológicas (WANG *et al.*, 2020).

Para que isso possa ocorrer, algumas estruturas são responsáveis pela interpretação dos *Zeitgeber*, em mamíferos o núcleo supraquiasmático é o coordenador dessa sincronização (DIALLO *et al.*, 2020; SANTOS e MOURA, 2019). Em aves essa interpretação é um pouco mais complexa, é um sistema composto por três marcadores: o núcleo supraquiasmático; glândula pineal; e retina (AYO *et al.*, 2017; HIEKE, HUBERT e ATHREY, 2019).

A manipulação do fotoperíodo tornou-se algo rotineiro e essencial na avicultura moderna, tanto para aumento de performance como promoção de bem-estar animal (HIEKE,

HUBERT e ATHREY, 2019). O controle do período de luz é utilizado principalmente no incubatório, visando melhorar a taxa de eclosão, qualidade de pintainhos, performance pós-eclosão, e tantos outros fatores que interferem diretamente no ganho econômico da atividade (RIAZ *et al.*, 2021).

Além disso, o manejo sobre o estímulo luminoso vem sendo utilizado para controlar o comportamento reprodutivo, reduzir canibalismo e aumentar o consumo de alimento (HIEKE, HUBERT e ATHREY, 2019). Mas a influência do ciclo circadiano nas aves, também ocorre a nível de metabolismo celular, mediando o estresse oxidativo e portanto, a capacidade de resposta celular a injúrias diversas (AYO *et al.*, 2017).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Aspectos éticos

Todo o experimento foi conduzido sob os termos e condições dos Princípios Éticos da Experimentação Animal, do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA) aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), com número de licença 136/2018.

As aves foram eutanasiadas por deslocamento cervical, de acordo com a Resolução Normativa Nº 37/2018 – Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

3.2. Local

O experimento foi realizado em uma granja particular localizada na cidade de Garanhuns-PE, por ser uma das regiões de maior produção de frango de corte no Estado e onde

existem pequenos produtores que relatam problemas com o gás amônia proveniente da cama provocando lesões em seu plantel. O clima dessa região é classificado como Aw (clima tropical com chuvas de verão) na classificação de Köppen- Geiger.

Foram utilizados três galpões de frangos de corte em dois ciclos, um entre os meses de fevereiro e março de 2019, em época quente, cuja temperatura variou entre 33,6°C e 18,2°C (umidade mínima absoluta 30 a 31%) e o segundo entre junho e agosto do mesmo ano, em época fria, cuja temperatura variou entre 25,1°C e 14,5°C (umidade mínima absoluta 44 a 56%) (APAC, 2019abcde).

Os galpões mediam 2m x 2m, todos com orientação leste-oeste, não climatizados. A cama de escolha foi a palha de arroz, por ser um dos tipos mais amplamente utilizado no Nordeste brasileiro. No galpão 1, foi utilizada cama nova de palha de arroz sem aditivos; no galpão 2 foi reutilizada cama de palha de arroz já fermentada proveniente de galpões da própria granja após um ciclo de produção; já no galpão 3 foi utilizada a mesma cama do galpão 2, a qual era umedecida diariamente com pulverização de sete litros de água. A densidade de aves no galpão de alojamento foi de no máximo 11 aves/m², para todos os galpões, que é considerada ideal de acordo com o Manual de Manejo de Frangos Ross (2014).

3.3. Amostragem

Foram utilizados no total 182 pintos da linhagem Ross, sendo 91 aves por cada estação do ano, divididas em três grupos com 28 animais cada e um grupo controle (D0) com mais sete animais. O ciclo de produção levou em consideração a média de tempo de criação de frangos de corte comercialmente, sendo estes 42 dias. As coletas foram realizadas em D0 (sete aves), D7 (21 aves), D21 (21 aves), D35 (21 aves) e D42 (21 aves), sendo eutanasiadas sete aves por grupo nos referidos tempos.

O D0 corresponde ao momento da chegada dos pintos ao galpão, pois esse momento é decisivo para o bom desenvolvimento do lote, além de ser considerado crítico para o arranque inicial das aves. Para este experimento, esse grupo foi considerado o controle negativo de amônia, uma vez que as aves ainda não haviam sido expostas ao efeito desse gás, por ainda não terem sido alojadas.

Todas as aves foram pesadas em balança digital SF 400 – Global Home®), para o acompanhamento do seu desenvolvimento.

3.4. Avaliação histológica e histomorfométrica

Em todos os tempos pré-determinados foram coletadas amostras de traqueia (porção superior e porção inferior). Todas as amostras foram fixadas em solução de formalina a 10% tamponada (pH 7), durante 24h e posteriormente acondicionadas em potes plásticos com álcool a 70% e então seguiu-se o processamento histológico no Laboratório de Histologia Animal do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA).

Todas as amostras foram processadas por técnica histológica de rotina, a qual consiste em desidratação em concentrações de crescentes álcool, diafanização em xilol, impregnadas em parafina e emblocadas em parafina. Os blocos foram cortados a 3 μ m, e em seguida, as lâminas foram coradas em hematoxilina e eosina para posterior análise em microscópio óptico.

Para análise histomorfométrica da mucosa traqueal foi utilizado o protocolo de Nunes *et al.* (2002), sendo as lâminas observadas e fotografadas em objetiva de 4x em um microscópio óptico trinocular LEICA DM500 acoplado a uma câmera digital LEICA ICC50 HD®, sendo a imagem captura e analisada por meio do software Leica LAS EZ® (Leica Microsystems, Buffalo Grove, USA). As mensurações da espessura da mucosa traqueal, foram realizadas em imagens digitais, por meio de dez diferentes pontos equidistantes 100 μ m entre si, utilizando o software Image J®. O programa foi calibrado utilizando uma fotomicrografia no mesmo aumento (4x) de uma régua micrométrica de 0,01 mm LEICA (50 mm – Referência 10310345), na qual 69 pixels equivalem a 100 micrômetros.

Para avaliação histopatológica da traqueia e demais órgãos, foi adotado o protocolo de Sesti *et al.* (2013) com adaptações (Quadro 1). Lesões como hiperemia, congestão, hemorragia, metaplasia escamosa, achatamento epitelial, desprendimento de epitélio, necrose de epitélio, hiperplasia e hipertrofia de glândulas mucosas, depleção de glândulas mucosas, desciliação, traqueíte e fibroplasia, foram analisadas quanto ao grau de intensidade e distribuição.

Quadro 1 – Esquema detalhando a avaliação das lesões histopatológicas quanto a distribuição e intensidade por meio de escore.

| Categoria | Escore | Significado |
|--------------|--------|--------------------------|
| Distribuição | 0 | Ausente |
| | 1 | Focal |
| | 2 | Focalmente extensa |
| | 3 | Multifocal |
| | 4 | Multifocal a coalescente |
| | 5 | Difusa |
| Intensidade | 0 | Ausente |
| | 1 | Discreta |
| | 2 | Moderada |
| | 3 | Acentuada |

Fonte: Adaptado de Sesti *et al.* (2003).

3.5. Aferição de gás amônia, temperatura e umidade ambiental

O monitoramento do ambiente aéreo foi realizado diariamente, em três momentos – início da manhã, meio-dia e fim da tarde. Aferiu-se a concentração de amônia na altura das aves e na altura do rosto do tratador responsável pela manutenção dos galpões, por um detector de gás amônia (Ammonia Gas Detector - Smart sensor, modelo: SSEYL AR8500), que fornece leituras simultâneas dos níveis de amônia em ppm e temperatura em Célsius. Os níveis de umidade ambiental eram aferidos nos dias de coleta utilizando um termo-higrômetro (Thero-anemometer UA – 965, UYIGAO®).

3.6. Análise estatística para histomorfometria e histopatologia traqueal

Para todas as análises estatísticas foi utilizado o software comercial GraphPad Prism (versão 7.0). Para a variável espessura da mucosa traqueal foi aplicado o teste paramétrico ANOVA. Já as lesões histopatológicas foram analisadas utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, adotando-se nível de significância de 5%. Para avaliação dos pesos das aves, foi empregado o teste de normalidade ANOVA e posteriormente o teste t-student com significância de 5%.

3.7. Tratamento matemático para estudo rítmico

Após a tabulação dos resultados, em tabelas no programa Excel® foi realizada a normalização dos dados referentes ao nível de amônia, expressando-o em termos de ppm/C/Ave; ou seja, em termos da temperatura em Célsius (C) no momento da aferição, e considerando-se a variação no número de animais em cada grupo, uma vez que a cada período eram retirados sete animais para que fossem efetuadas as avaliações estruturais e histopatológicas, nos períodos de 7, 14, 21, 35 e 42 dias.

O teste estatístico de Fisher foi aplicado para a verificação das diferenças entre as aferições efetuadas nos níveis A e B, assim como para avaliação das condições de temperatura e umidade ao longo dos diferentes períodos de experimentação.

Para a verificação da ocorrência de ritmos de variação temporal dos níveis de amônia em cada grupo, foi determinado o coeficiente Hurst (H), considerando-se as metodologias sugeridas em Miranda e Andrade (2001), assim como os trabalhos de Breslin e Belward (1999) e Peters e Chistensen (2006).

Para a determinação dos padrões de variação rítmica dos níveis de amônia em todos os grupos, nos dois diferentes contextos, foi empregado o método COSINOR desenvolvido em

planilha do Programa Excel versão 2010 da Microsoft, tomando-se como referência os trabalhos de Refinetti, *et al* (2007), e Cornelissen (2014).

Para uma avaliação da capacidade descritora das equações obtidas, foi empregado o método de Fisher, como sugerido em Cornelissen (2014), utilizando-se das tabelas estatísticas e os respectivos valores dos coeficientes de determinação R^2 considerando-se um valor de $p < 0,01$ para uma avaliação das diferenças estatísticas, quando presentes.

Para uma comparação estatística entre os diferentes grupos foi empregado o teste Fisher mediante planilha estatística do programa Excel da Microsoft versão 2010, considerando-se para estabelecer os níveis de discrepância um valor crítico de $p < 0,05$.

4. REFERÊNCIAS

- ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório anual 2021**. p.1-75. 2021.
- ABREU, V. M .N. ; ABREU, P. G.; COLDBELLA, A.; CONCEIÇÃO, V. e CHINI, A. Metodologia de determinação do ph e da temperatura da cama de aviário em tempo real. IN: **Anais do XL Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola - CONBEA 2011**. Cuiabá – MT, Brasil, 2011.
- ADAMS, K.; BERMINGHAM, C.; LORENZ, M.; FRANK, J. e OSOSKI, E. The Avian Respiratory Sistem. [s.d.]
- AGÊNCIA PERNAMBUCANA DE ÁGUAS E CLIMA (APAC). **Boletim climático**: síntese climática. v.7, n.2, 33p. Recife, 2019a
- AGÊNCIA PERNAMBUCANA DE ÁGUAS E CLIMA (APAC). **Boletim climático**: síntese climática. v.7, n.3, 33p. Recife, 2019b
- AGÊNCIA PERNAMBUCANA DE ÁGUAS E CLIMA (APAC). **Boletim climático**: síntese climática. v.7, n.6, 33p. Recife, 2019c
- AGÊNCIA PERNAMBUCANA DE ÁGUAS E CLIMA (APAC). **Boletim climático**: síntese climática. v.7, n.7, 33p. Recife, 2019d
- AGÊNCIA PERNAMBUCANA DE ÁGUAS E CLIMA (APAC). **Boletim climático**: síntese climática. v.7, n.8, 33p. Recife, 2019e

AL-MASHHADANI, E. H.; BECK, M. M. Effects of atmospheric ammonia on the surface ultrastructure of the lung and trachea of broiler chicks. **Poultry Science**, n.64, p.2056 – 2061. 1985.

AN Y., XING H., ZHANG Y., JIA P., GU X. e TENG X. The evaluation of potential immunotoxicity induced by environmental pollutant ammonia in broilers. **Poultry Science**, p. 1-11. 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pez135>

ANDERSON, D. P.; BEARD, C. W.; HANSON, R. P. The Adverse Effects of Ammonia on Chickens Including Resistance to Infection with Newcastle Disease Virus **Avian Diseases**, v. 1, n.8, p. 369 – 379. 1964.

ÀNGELES-CASTELLANOS M., RODRÍGUEZ K., SALGADO R. e ESCOBAR C. Cronobiología médica. Fisiología y fisiopatología de los ritmos biológicos. **Revista de la Facultad de Medicina UNAM**, v.50, n.6, p.238-241. 2007.

ANSARI, A. R.; GE, X.; HUANG, H.; HUANG, X.; ZHAO, X.; PENG, K.; ZHANG, J.; LIU, H. Effects of lipopolysaccharide on the histomorphology and expression of toll like receptor 4 in the chicken trachea and lung. **Avian Pathology**, n.45, v.5, p. 530 – 537. 2016.

ARAÚJO J.F. e MARQUES N. Cronobiologia: uma multidisciplinaridade necessária. **Margem**, São Paulo, n.15, p. 95-112, jun. 2002.

AYO J.O., MAKERI H.K., MINKA N.S. e ALUWONG T. Circadian rhythms of biomarkers of oxidative stress and their characteristics in broiler chickens reared under natural light/dark cycle. **Biological Rhythm Research**. 2017. <https://doi.org/10.1080/09291016.2017.1336880>.

BRESLIN M.C. e BELWARD J.A. Fractal Dimensions for Rainfall Time Series. **Mathematics and Computers in Simulation**, n.48, p.437-446. 1999.

CAMPOS M.F.F.S., TEÓFILO T.S., CHAVES D.P., SANTOS A.C.G., LOPES B.C.A., BEZERRA N.P.C. e TORRES M.A.O. Identificação parasitológica da cama de frango reutilizada em uma granja avícola. **Revista Brasileira Ciência Veterinária**, v. 25, n. 1, p. 27-30, jan./mar. 2018.

CARVALHO, T. M. R.; MOURA, D. J.; SOUZA, Z. M.; SOUZA, G. S.; BUENO, L. G. F. Qualidade da cama e do ar em diferentes condições de alojamento de frangos de corte. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, n.4, v.46, p. 351 – 361. 2011.

CHARLES, D. R.; PAYNE, C. G. The influence of graded levels of atmospheric ammonia on chickens. **British Poultry Science**, n.7, v.3, p. 189 – 198. 1966.

CHEN, H.; YAN, F. F.; HU, J. Y.; WU, Y.; TUCKER, C. M.; GREEN, A. R.; CHENG, H. W. Immune Response of Laying Hens Exposed to 30 ppm Ammonia for 25 Weeks. **International Journal of Poultry Science**, n.16, p. 139 - 146. 2017.

CORNELISSEN G. Cosinor-based rhythmometry. **Theoretical Biology and Medical Modelling**, n.11, p.1-24. 2014.

CURTIS, S. E.; ANDERSON, C. R.; SIMON, J.; JENSEN, A. H.; DAY, D. L.; KELLEY, K. W. Effects of aerial ammonia, hydrogen sulfide and swine-house dust on rate of gain and respiratory-tract structure in swine. **Journal of Animal Science**, v. 41, n. 3, p. 735 – 739. 1975.

DAVID, B.; MEJDELL, C.; MICHEL, V.; LUND, V.; MOE, R. O. Air quality in alternative housing systems may have an impact on laying hen welfare. Part II—ammonia. **Animals**, n.5, p. 886 – 896. 2015.

DAVIS, M.; MORISHITA, T. Y. Relative ammonia concentrations, dust concentrations, and presence of salmonella species and escherichia coli inside and outside commercial layer facilities. **Avian Diseases**, n.49, p. 30 – 35, 2005.

DIALLO A.B., COIFFARD B., LEONE M., MEZOUAR S. e MEGE J. For Whom the Clock Ticks: Clinical Chronobiology for Infectious Diseases. **Frontiers in Immunology**, v.11, n.1457, p. 1-11, jul. 2020.

DOUGLAS, P.; ROBERTSON, S.; GAY, R.; HANSELL, A. L.; GANT, T. W. A systematic review of the public health risks of bioaerosols from intensive farming. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, n. 221, p. 134 – 173. 2018.

ELLIOTT, H. A.; COLLINS, N. E. Factors affecting ammonia release in broiler houses. **Transactions of the ASAE**, n.25, v.2, p. 0413 – 0418. 1982.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Estatísticas – Portal EMBRAPA**. Acesso em Janeiro 2018. Disponível em: <https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas>.

FEDDE M.R. Respiration. *In*: STURKIE P.D.. **Avian Physiology**. 4. ed. New York: Springer-Verlag, 1986. cap. 9, p. 191-220.

FREITAS, L. W.; GARCIA, R. G.; NAAS, I. A.; CALDARA, F. R.; LIMA, N. D. S. Volatilização de amônia em diferentes tipos de cama para frangos de corte. **Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas – Tupã**, n.3, v.5, p. 142 – 151. 2011.

GIROTTI, A. F.; AVILA, V. S. Aspectos da produção, exportação, consumo e custos de produção e implantação de aviários. **Sistemas de produção de frangos de corte – EMBRAPA Suínos e Aves**, n.1. 2003.

HAO, J.; YAN, B. Simultaneous determination of indoor ammonia pollution and its biological metabolite in human body by use of a recyclable nanocrystalline lanthanide functionalized MOF. **Nanoscale**, n.8, v.5, p. 2881 – 2886. 2016.

HIEKE A.C., HUBERT S.M. e ATHREY G. Circadian disruption and divergent microbiota acquisition under extended photoperiod regimens in chicken. **PeerJ**, n.7, p. 1-28. 2019. DOI 10.7717/peerj.6592

IVERSEN, M.; KIRYCHUK, S.; DROST, H.; JACOBSON, L. Human health effects of dust exposure in animal confinement buildings. **Journal of agricultural safety and health**, n.6, v.4, p. 283 – 288. 2000.

KRONFELD-SCHOR N., N, VISSER M.E., SALIS L. e van GILS J.A. Chronobiology of interspecific interactions in a changing world. **Philosophical Transactions B**, n. 372, p. 1-13. 2017.

LU M., BAI J., WEI F., XU B., SUN Q., LI J., WANG G., TANG X., ZHANG H., YIN Q. e LI S. Effects of alpha-lipoic acid supplementation on growth performance, antioxidant capacity and biochemical parameters for ammonia-exposed broilers. **Animal Science Journal**, 2016. DOI:10.1111/asj.12759

MARTÍNEZ-CARPIO P.A. e COROMINAS A. Introducción general a la cronobiología clínica y a la manipulación terapéutica de los ritmos biológicos. **Medicina Clínica (Barcelona)**, v. 123, n. 6, p. 230-235. 2004.

MEDEIROS, R.; SANTOS, B. J. M.; FREITAS, M.; SILVA, O. A.; ALVES, F. F.; FERREIRA, E. A adição de diferentes produtos químicos e o efeito da umidade na volatilização de amônia em cama de frango. **Ciência Rural**, n.8, v. 38, p. 2321 – 2326. 2008.

MILES, D. M.; MILLER, W. W.; BRANTON, S. L.; MASLIN, W. R.; LOTT, B. D. Ocular Responses to Ammonia in Broiler Chickens. **Avian Diseases**, n.50, v.1, p. 45 - 49. 2006.

MIRANDA J.G.V. e ANDRADE R.F.S. R/S Analysis of Pluviometric Record: Comparison with Numerical Experiments. **Physica A**, n.295, p.38-41. 2001.

MORAES P.L. Sistema respiratório das aves. **Mundo Educação**. 2021. Disponível em: <https://mundoeducacao.uol.com.br/biologia/sistema-respiratorio-das-aves.htm>. Acesso em: 2 abr. 2021.

NASEEM, S.; KING, A. J. Ammonia production in poultry houses can affect health of humans, birds, and the environment—techniques for its reduction during poultry production. **Environmental Science and Pollution Research**, n.16, v.25, p.15269 – 15293. 2018.

NUNES J.E.S., VASCONCELOS A.C., JORGE M.A., GUIMARÃES E.B., PAIXÃO T.A., MARTINS N.R.S. e RESENDE J.S. Estudo comparativo da virulência de amostras de vacina do vírus da doença de Newcastle em galinhas SPF por meio da análise morfométrica da espessura traqueal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.54 p.335-339. 2002.

OYETUNDE, O. O. F.; THOMSON, R. G.; CARLSON, H. C. Aerosol exposure of ammonia, dust and *Escherichia coli* in broiler chickens. **Canadian veterinary journal**, n.19, p. 187 -193. 1978.

PETERS O. e CHRISTENSEN K. Rain Viewed as Relaxational Events. **Journal of Hidrology**, n.328, p.46-55. 2006.

PINTO W.J., MURICY V.C. e TRETO R.R.R. Ritmos biológicos no sistema endócrino. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 6, n. 7, p.53677-53696, jul. 2020.

PLOPPER C.G. e ADAMS D.R. Sistema respiratório. In: EURELL J.A. e FRAPPIER B.L. **Histologia Veterinária de Dellmann**, 6 ed., São Paulo: Manole, 2012. cap. 9, p.153-169.

RIAZ M.F., MAHMUD A., HUSSAIN J., REHMAN A., USMAN M., MEHMOOD S. e AHMAD S. Impact of light stimulation during incubation on hatching traits and post-hatch performance of commercial broilers. **Tropical Animal Health and Production** n.53, p.1-8. 2021.

ROSA C.O., GIMENES R.M.T., GARCIA R.G., RUVIARO C.F. e SORDI V.F. sistema de iluminação em LED na avicultura de corte: aspectos econômicos. *In*: III ENCONTRO INTERNACIONAL DE GESTÃO, DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO, Naviraí, MS. **Anais [...]**. 2019. P. 1-5.

SA R.N., XING H., LUAN S.J., SUN Y.B., SUN C.Y. e ZHANG H.F. Atmospheric ammonia alters lipid metabolism-related genes in the livers of broilers (*Gallus gallus*). **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**. p.1-7, 2017. DOI: 10.1111/jpn.12859

SANTOS A.A. e MOURA M.D.G. Relógio biológico: revisão de literatura. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v.17, n. 1, p.1-6. 2019.

SCHIFFMAN, S. S. Livestock odors: implications for human health and well-being. **Journal of animal Science**, n.76, p. 1343 – 1355. 1998.

SESTI L., KNEIPP C., PARANHOS R., PAULET P., CABAZAN C. Field safety and efficacy of vector Marek's/Newcastle Disease Vaccine (r-HVT-NDV) as assessed by clinical and productive performance in a large population of commercial broilers. *In*: WESTERN POULTRY DISEASE CONFERENCE (WPDC), Sacramento, California. **Anais [...]**. 2013. p.19-22.

SOLIMAN, E. S.; MOAWED, S. A.; HASSAN, R. A. Influence of microclimatic ammonia levels on productive performance of different broilers' breeds estimated with univariate and multivariate approaches. **Veterinary World**, n.10, v.8, p. 880 – 887. 2017.

SOUSA, F. C.; TINÔCO, I. F. F.; PAULA, M. O.; SILVA, A. L.; SOUZA, C. F.; BATISTA, F. J. F.; BARBARI, M. Medidas para minimizar a emissão de amônia na produção de frangos de corte: revisão. **Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas**, n.1, v.10, p. 51 – 61. 2016.

STOJCIC, M. D.; BJEDOV, S.; ZIKIC, D.; PERIC, L.; MILOSEVIC, N. Effect of straw size and microbial amendment of litter on certain litter quality parameters, ammonia emission, and footpad dermatitis in broilers. **Archives animal breeding**, n. 59, p. 131 – 137. 2016.

TOXNET – TOXICOLOGY DATA NETWORK. CASRN: 7664-41-7, Ammonia. Acesso em 10.12.2018. <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgiin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+162>.

TULLY, T. N. Avian respiratory diseases: Clinical overview. **Journal of avian medicine and surgery**, v. 9, n. 3, p.162-174. 1995

VERAS G.C., MURGAS L.D.S., ZANGERONIMO M.G., OLIVEIRA M.M., ROSA P.V. e FELIZARDO V.O. ritmos biológicos e fotoperíodo em peixes. **Archivos de Zootecnia**, v. 62, p. 25-43. 2013.

WANG L., SHI X., ZHENG S. e XU S. Selenium deficiency exacerbates LPS-induced necroptosis by regulating miR-16-5p targeting PI3K in chicken tracheal tissue. **Metallomics**, n. 12, p. 562-571. 2020.

WEI, F. X.; HU, X. F.; XU, B.; ZHANG, M. H.; LI, S. Y.; SUN, Q. Y.; LIN, P. Ammonia concentration and relative humidity in poultry houses affect the immune response of broilers. **Genetics and molecular research**, n.14, v.2, p. 3160 – 3169. 2015.

WU, Y. N.; YAN, F. F.; HU, J. Y.; CHEN, H.; TUCKER, C. M.; GREEN, A. R.; CHENG, H. W. The effect of chronic ammonia exposure on acute-phase proteins, immunoglobulin, and cytokines in laying hens. **Poultry Science**, n.96, p. 1524 – 1530. 2017.

XIONG, Y.; TANG, X.; MENG, Q.; ZHANG, H. Differential expression analysis of the broiler tracheal proteins responsible for the immune response and muscle contraction induced by high concentration of ammonia using iTRAQ-coupled 2D LC-MS/MS. **Science China Life Sciences**, n. 11, v. 59, p. 1166 – 1176. 2016.

YI B., CHEN L., AS R., ZHONG R., XING H. e ZHANG H. High concentrations of atmospheric ammonia induce alterations of gene expression in the breast muscle of broilers (*Gallus gallus*) based on RNA-Seq. **BMC Genomics**, v.17, n.598, p.1-11. 2016a.

YI B., CHEN L., AS R., ZHONG R., XING H. e ZHANG H. Transcriptome Profile Analysis of Breast Muscle Tissues from High or Low Levels of Atmospheric Ammonia Exposed Broilers (*Gallus gallus*). **PLoS ONE**, v.11, n.9, p.1-15. 2016b.

ZARNAB S., CHAUDHARY M.S., JAVED M.T., KHATOON A., SALEEMI M.K., AHMED T., TARIQ N., MANZOOR F., JAVED I., ZHANG H., ZHENHUA X. e PENG Y. Effects of Induced High Ammonia Concentration in Air on Gross and Histopathology of Different Body Organs in Experimental Broiler Birds and its Amelioration by Different Modifiers. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 39, n. 3, p. 371-376. 2019.

ZHANG, J.; LI, C.; TANG, X.; LU, Q.; SA, R.; ZHANG, H. High Concentrations of Atmospheric Ammonia Induce Alterations in the Hepatic Proteome of Broilers (*Gallus gallus*): an iTRAQ-Based Quantitative Proteomic Analysis. **PLoS ONE**, n.10, v.4, p. 1 – 18. 2015a.

ZHANG, J.; LI, C.; TANG, X.; LU, Q.; SA, R.; ZHANG, H. Proteome changes in the small intestinal mucosa of broilers (*Gallus gallus*) induced by high concentrations of atmospheric ammonia. **Proteome Science**, n.13, v.9, p. 1 – 14. 2015b.

ZHOU Y., ZHANG M., LIU Q. e FENG J. The alterations of tracheal microbiota and inflammation caused by different levels of ammonia exposure in broiler chickens. **Poultry Science**, n. 100, p. 685-696. 2021.

5. ARTIGOS CIENTÍFICOS

5.1. Artigo 1

Artigo intitulado “**Variação circadiana dos níveis de amônia em criação tradicional de frango de corte sob diferentes condições climáticas**”, que foi submetido à revista *Biological Rhythm Research*.

**VARIAÇÃO CIRCADIANA DOS NÍVEIS DE AMÔNIA EM CRIAÇÃO
TRADITIONAL DE FRANGO DE CORTE SOB DIFERENTES CONDIÇÕES
CLIMÁTICAS**

Jéssica de Torres Bandeira^{a*}, Tatiane Bandeira da Silva^b; Bruno César Azevedo de Brito^a;
Renato Souto Maior Muniz de Moraes^a; Maria Edna Gomes de Barros^c; Priscilla Maria
Cavalcane Rocha^a; George Chaves Jimenez^c; Francisco de Assis Leite Souza^c; Joaquim
Evêncio-Neto^c.

^a Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, Brasil; ^b Departamento de Medicina Veterinária, UNIBRA Centro Universitário (UNIBRA), Recife, Brasil; ^c Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, Brasil.

*Correspondence author: Jéssica de Torres Bandeira; Mailing address: Rua São José do Egito, nº 491, CEP: 53435-600, Pau Amarelo, Paulista, Pernambuco, Brasil; Phone: +5581996344339 E-mail: bandeira.j.t@gmail.com

VARIAÇÃO CIRCADIANA DOS NÍVEIS DE AMÔNIA EM CRIAÇÃO TRADICIONAL DE FRANGO DE CORTE SOB DIFERENTES CONDIÇÕES CLIMÁTICAS

O Brasil é o país que mais exporta carne de frango no mundo. Condições de alojamento constituem um dos maiores entraves na avicultura, dentre esses a exposição ao gás amônia (NH₃). O NH₃ pode lesionar diversos tecidos e gerar modificações genéticas prejudiciais. Portanto objetivou-se verificar e descrever se há uma variação rítmica nos níveis de NH₃ em galpões de frango de corte, criados em sistema tradicional. Foram utilizadas 182 aves, sendo 91 criadas em período quente e seco e 91 em período frio e úmido, com cama aviária de palha de arroz em três diferentes apresentações; nova, reutilizada após um ciclo de criação e reutilizada após um ciclo de criação com umedecimento diário. Foram realizadas três aferições diariamente, em duas alturas, durante o ciclo de 42 dias. Os dados foram tabulados e normalizados expressando-os em termos de ppm/C/Ave. O teste estatístico de Fisher foi aplicado para a verificação das diferenças entre os pontos de aferições e avaliar temperatura e umidade. Na verificação da ocorrência de ritmos de variação temporal dos níveis de amônia, foi determinado o coeficiente Hurst (H) e na determinação dos padrões de variação rítmica dos níveis de NH₃, foi empregado o método COSINOR. Para a capacidade descritora das equações obtidas, foi empregado o método de Fisher, considerando-se um valor de $p < 0,01$ para uma avaliação das diferenças estatísticas, quando presentes. Verificou-se que há uma variação rítmica nos níveis de NH₃ durante o ciclo de criação de 42 dias, bem como que em época fria os níveis de amônia aumentam ligeiramente, entretanto, os diferentes tipos de cama aviária testados não parecem influenciar significativamente nos níveis de amônia. Esses resultados permitem adaptações ao manejo em criações de frango de corte, proporcionando um ambiente seguro para as aves e trabalhadores, minimizando prejuízos.

Palavras-chave: Ciclo circadiano; Frango; *Gallus Gallus domesticus*; Poluente atmosférico; Ritmicidade.

Introdução

A produção de frango de corte brasileira tem destaque mundial, ocupando o terceiro lugar no ranking de produção. Com uma produção de 13.245 milhões de toneladas no ano de 2019, sendo considerada a maior produção dos últimos 10 anos (ABPA, 2020). Para isso, essa atividade requer um investimento razoável, principalmente em novas tecnologias promotoras de bem-estar aos animais, com possibilidade de retorno proporcional à qualidade administrativa da empresa (EMBRAPA, 2016; ROSA *et al.*, 2019).

Dawkins, Donnelly e Jones (2004) verificaram que na produção industrial de frangos de corte, as condições de alojamento são mais importantes do que a densidade em si. Dentre esses fatores está o gás amônia (NH₃), o qual é capaz de causar irritação em órgãos de diferentes sistemas (NA *et al.*, 2019). A volatilidade desse gás se deve principalmente à mobilização no nitrogênio excretado pelas próprias aves (SOUSA *et al.*, 2016).

Pesquisas mostram que o estresse pode gerar modificações a nível celular nas aves (AYO *et al.*, 2017), sendo capaz de modificar genes em musculatura peitoral (YI *et al.*, 2016b), modificar o metabolismo hepático (AS *et al.*, 2017) ou até mesmo a resposta imune da traqueia (XIONG *et al.*, 2016). O aumento dos níveis de amônia atmosférica gera estresse nas aves, inclusive diminuindo seu crescimento (MALISELO e NKONDE, 2015).

A regulação dos sistemas biológicos não é estática (ÁNGELES-CASTELLANOS *et al.*, 2007), sabe-se que a regulação do ciclo circadiano das aves pode influenciar em diversas áreas semelhantes, principalmente na resposta imune celular ao estresse oxidativo (AYO *et al.*, 2017). Alguns trabalhos assinalam a ocorrência de ritmos de várias naturezas, entre estes os ritmos de temperatura corpórea, captura de alimento e ovoposição em galinhas (KADONO *et al.*, 1981; HOUELIER *et al.*, 2002), como também uma interferência direta sobre a qualidade de incubação ao se modificar o ritmo circadiano de exposição a luz (RIAZ *et al.*, 2021).

Entretanto, pouco se sabe sobre a variação cíclica do gás amônia durante o período de criação de frangos de corte, assim, objetivou-se verificar a variação dos níveis de amônia, diariamente, em três momentos diferentes, em duas épocas distintas, uma no período de verão e outra no inverno, do município de Garanhuns, PE, em frangos de corte de zero a 42 dias de criação com ventilação natural e três diferentes apresentações de cama aviária.

Metodologia

Delineamento experimental

Os experimentos foram realizados em uma granja no município de Garanhuns, Pe, O clima dessa região é classificado como Aw (clima tropical com chuvas de verão) na classificação de Köppen- Geiger. Seguindo as determinações da Comissão de ética no uso de animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), com número de licença 136/2018.

Os bioensaios foram realizados em duas etapas; uma no período de fevereiro a março, correspondendo ao período de verão local, e outra etapa no interstício de junho a agosto de 2020, correspondendo ao frio local.

Na primeira etapa, 91 pintinhos, obtidos no incubatório local de frango de corte, sete foram eutanasiados por meio de deslocamento cervical e os demais distribuídos aleatoriamente, em três galpões, G1, G2 e G3, com mesma dimensão (2x2x2 m); com aeração natural e manejo por meio de cortinas. Em todos os galpões utilizou-se cama aviária de palha de arroz, com aproximadamente 15 cm de espessura, em G1 a palha de arroz era nova, em G2 palha de arroz usada uma vez e em G3 palha de arroz usada uma vez, umedecida todos os dias com 7 litros de água pulverizadas com pulverizador costal.

No período frio, repetiu-se o mesmo experimento com 91 pintinhos, sete foram eutanasiados por deslocamento cervical e os demais distribuídos em três galpões G4, G5 e G6, com variação similar quanto ao tipo de cama, como também as condições de aeração.

O nível de gás amônia e temperatura ambiente foram aferidos três vezes ao dia (6, 12 e 18h), em cada galpão, em dois pontos verticais, A (alto) e B (baixo), separados por pelo menos 1,20 m. A aferição era efetuada com a ajuda de um detector manual Gás Detector Smart Sensor modelo AR8500, que fornece leituras simultâneas dos níveis de amônia em ppm e temperatura em Célsius.

Foram realizadas coletas nos dias D0 (sete aves), D7, D21, D35 e D 42, sendo sete aves por galpão, totalizando 21 aves por dias de coleta. Os níveis de umidade ambiental eram aferidos nos dias de coleta utilizando um termo-higrômetro (Thero-anemometer UA – 965, UYIGAO®).

Tratamento matemático dos dados obtidos

Os dados foram tabulados em tabelas no programa Excel[®]. Após a tabulação dos resultados, foi providenciada a normalização dos dados referentes ao nível de amônia, expressando-o em termos de ppm/C/Ave; ou seja, em termos da temperatura em Célsius (C) no momento da aferição, e considerando-se a variação no número de animais em cada grupo, uma vez que a cada período eram retirados sete animais para que fossem efetuadas as avaliações estruturais e histopatológicas, nos períodos de 7, 14, 21, 35 e 42 dias.

O teste estatístico de Fisher foi aplicado para a verificação das diferenças entre as aferições efetuadas nos níveis A e B, assim como para avaliação das condições de temperatura e umidade ao longo dos diferentes períodos de experimentação.

Para a verificação da ocorrência de ritmos de variação temporal dos níveis de amônia em cada grupo, foi determinado o coeficiente Hurst (H), considerando-se as metodologias sugeridas em Miranda e Andrade (2001), assim como os trabalhos de Breslin e Belward (1999) e Peters e Chistensen (2006).

Finalmente, para a determinação dos padrões de variação rítmica dos níveis de amônia em todos os grupos, nos dois diferentes contextos, foi empregado o método COSINOR desenvolvido em planilha do Programa Excel versão 2010 da Microsoft, tomando-se como referência os trabalhos de Refinetti, *et al.* (2007), e Cornelissen (2014).

Para uma avaliação da capacidade descritora das equações obtidas, foi empregado o método de Fisher, como sugerido em Cornelissen (2014), utilizando-se das tabelas estatísticas e os respectivos valores dos coeficientes de determinação R² considerando-se um valor de $p < 0,01$ para uma avaliação das diferenças estatísticas, quando presentes.

Para uma comparação estatística entre os diferentes grupos foi empregado o teste Fisher mediante planilha estatística do programa Excel da Microsoft versão 2010, considerando-se para estabelecer os níveis de discrepância um valor crítico de $p < 0,05$.

Resultados

Considerando as aferições de gás amônia obtidos para os pontos A e B, verticalmente separados por uma distância não superior a 1,50 m em cada grupo, obteve-se os valores de probabilidade de 0,167 para o Grupo G1; 0,999 para G2 e 0,823 para G3, não havendo diferença estatística significativa para um valor de $p < 0,05$, para o período quente.

Para o período de frio os valores de probabilidade foram de 0,408 para G4; 0,852 para G5 e 0,937 para G6, também não havendo diferença estatística significativa para um valor de $p < 0,05$.

A temperatura média para o período quente foi de $27,17 \pm 3,73$ C (CV=3,73) e para o período frio foi de $22,46 \pm 0,52$ C (CV=2,33%). Com os valores de coeficiente de variação (CV) reduzidos, pode-se dizer que em cada período de experimentação a temperatura média entre os seus respectivos grupos foi praticamente constante.

Para comparar os níveis de gás amônia entre os diferentes grupos, foram considerados os valores obtidos no ponto A. Com o intuito de verificar se haveria uma variação de forma rítmica nos valores trabalhados. Para isso, os valores obtidos para os níveis de amônia foram normalizados em relação aos valores de temperatura em C° e em relação ao número de animais em cada grupo, conforme o período temporal em que seriam efetuadas as leituras.

Para a verificação da ocorrência de ritmicidade entre os valores aferidos quanto ao nível de amônia empregou-se o coeficiente de Hurst, empregando a técnica de Rescaled Range (R/S) de Hurst para avaliar as condições de persistência de memória na série temporal que procura descrever os níveis de amônia ao longo do tempo, nos diferentes grupos.

Na tabela 1 pode-se verificar os valores obtidos para o expoente H de Hurst em cada grupo, verificando-se ser cada um destes, estatisticamente diferente de zero para um valor de $p < 0,05$. Apesar disto, considerando-se as condições de realização das dosagens, verificou-se que estes valores estão situados no intervalo $0 < H < 0,5$, sugerindo que os níveis de amônia, em todos os grupos, variam de forma rítmica, embora de forma característica conforme o grupo.

Para verificar qual seria o padrão de ritmicidade associado, aplicou-se o método do COSINOR. Observou-se que o padrão rítmico era uma função periódica do tipo $Y = M + A \cdot \cos(W \cdot t + \phi_0)$, onde “Y” representa o nível atmosférico de amônia expresso em termos de ppm/C/Ave, “M” é o mesor, que caracteriza o valor médio do nível de amônia em torno do qual os demais valores oscilam, “A” é a amplitude de variação dos níveis de amônia; “W” é o parâmetro que estima o tamanho do ciclo ($W = 360/T$) onde “T” é o período de ocorrência de um ciclo completo, que no caso da amônia foi de 24 horas, atuando como período padrão em

que ocorrerá a variação. “t” é o tempo em que se deseja conhecer o valor dos níveis de amônia, neste caso normalizado em relação à temperatura e o número de aves por grupo no momento da dosagem. O parâmetro “φ” caracteriza o horário mais provável em que o nível de amônia é máximo.

Tabela 1. Valores médios e os respectivos desvios para o coeficiente de Hurst “H” e parâmetros de regressão para caracterização rítmica da variação dos níveis de amônia (ppm/C/Ave) nos diferentes grupos, sob diferentes condições de tratamento.

| Grupos | H | M (10 ⁻³) | A (10 ⁻³) | φ | R ² |
|--------|-----------|-----------------------|-----------------------|----------|----------------|
| G1 | 0,09±0,10 | 0,55±0,05 | 0,98±0,20 | 26,2±6,6 | 0,87 |
| G2 | 0,01±0,01 | 5,51±1,90 | 0,97±0,31 | 13,1±0,5 | 0,92 |
| G3 | 0,18±0,07 | 0,59±0,65 | 0,96±0,70 | 23,5±8,4 | 0,91 |
| G4 | 0,09±0,11 | 1,55±0,79 | 1,15±0,67 | 15,9±4,7 | 0,74 |
| G5 | 0,02±0,01 | 6,30±2,40 | 1,09±0,47 | 13,1±0,9 | 0,92 |
| G6 | 0,03±0,03 | 1,32±0,77 | 0,59±0,21 | 15,1±2,3 | 0,75 |

OBS: H – Coeficiente de Hurst; M – Mesor (ppm/C/Ave); - A – Amplitude (ppm/C/Ave); φ – Acrofase (horas).
R² - Coeficiente de determinação.

Os parâmetros de regressão para as funções que descrevem os ritmos de variação dos níveis de amônia, normalizados, em cada grupo podem ser visualizados na tabela 1, assim como na tabela 2 podem ser visualizadas as frações relativas quanto ao mesor tomando-se como referência o seu valor em G1.

Tabela 2. Razão entre os valores de Mesor (ppm/C/Ave) comparando-se com diferentes grupos de referência.

| | Grupos de referência | | | | | |
|----|----------------------|------|-------|------|------|----|
| | G1 | G2 | G3 | G4 | G5 | G6 |
| G1 | 1 | - | - | - | - | - |
| G2 | 10,02 | 1 | - | - | - | - |
| G3 | 1,07 | 0,11 | 1 | - | - | - |
| G4 | 2,82 | 0,28 | 2,63 | 1 | - | - |
| G5 | 11,45 | 1,14 | 10,67 | 4,06 | 1 | - |
| G6 | 2,4 | 0,24 | 2,24 | 0,85 | 0,21 | 1 |

OBS.: G1 – Grupo de aves criadas no período de temperaturas elevadas e com cama aviária nova; G2 - Grupo de aves criadas no período de temperaturas elevadas e com cama aviária reutilizada; G3 - Grupo de aves criadas no período de temperaturas elevadas e com cama aviária reutilizada e umedecida; G4 - Grupo de aves criadas no período de temperaturas amenas e com cama aviária nova; G5 - Grupo de aves criadas no período de temperaturas amenas e com cama aviária reutilizada; G6 - Grupo de aves criadas no período de temperaturas amenas e com cama aviária reutilizada e umedecida.

Entre os Grupos pertencentes à fase quente das aferições, pode-se verificar na tabela 1 que G1 e G3 apresentaram valores de Mesor e de amplitude muito próximos ($p > 0,05$), embora G2 tenha apresentado um valor cerca de 10 vezes maior ($p < 0,05$), sendo a amplitude de mesma ordem de grandeza como nos outros grupos.

No período quente, em G1 a produção e liberação máxima ocorreu por volta de $26,2 \pm 6,6$ h, como assinala a tabela 1, que equivaleria ao horário de cerca de duas horas e doze minutos. No grupo G2, que recebeu a cama aviária reutilizada sem ser umedecida, este período de atividade máxima é deslocado para aproximadamente às treze horas, que corresponde ao período de maior incidência solar. No grupo G3, com o umedecimento da palha de arroz, este tempo de atividade máxima de produção de amônia volta para um período similar ao do grupo G1, considerando-se o desvio padrão, onde obtém-se um horário que estaria em torno de cerca de 23 horas e trinta minutos, mas podendo variar cerca de seis horas.

Por fim, os coeficientes de determinação R^2 assinalam uma boa correspondência entre as funções matemáticas obtidas, na tentativa de descrição da variação dos níveis de amônia em relação à variação do intervalo temporal, uma vez que seus valores se aproximam da unidade, que corresponde à uma relação máxima de 100%.

Nas figuras 1 e 2 podem ser visualizados os padrões rítmicos de variação circadiana dos níveis de amônia por grau Celsius e por Ave nos diferentes grupos de tratamento, conforme o período quente ou frio quando da realização dos ensaios.

Figura 1. Variação circadiana dos níveis de amônia (ppm/C/Ave) nos grupos G1, G2 e G3 no período quente.

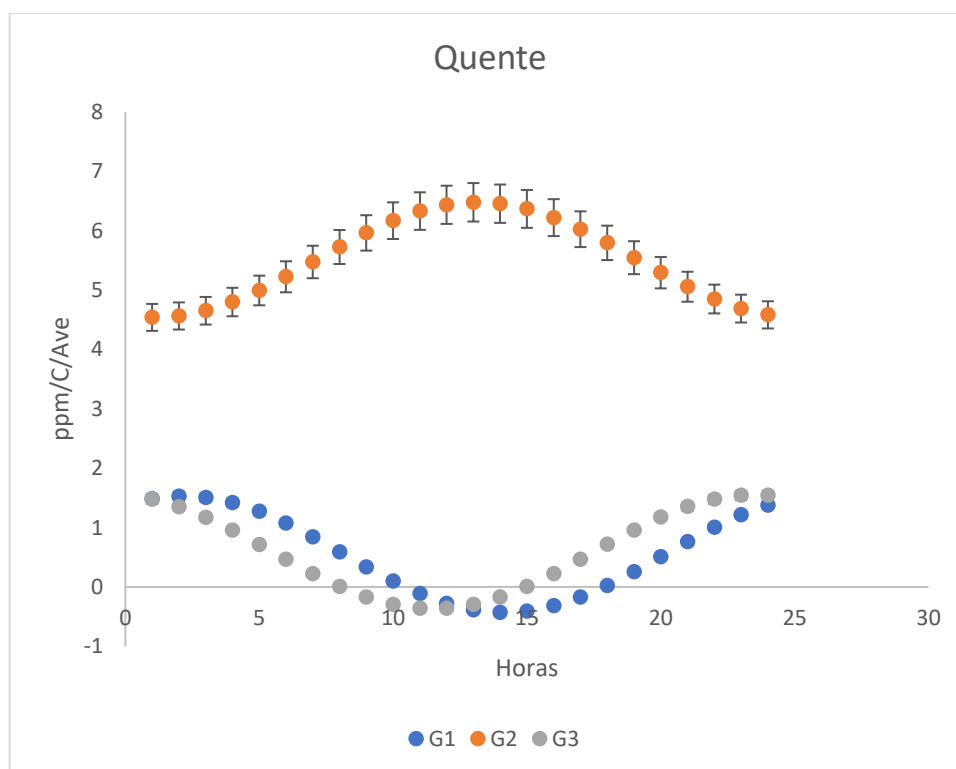
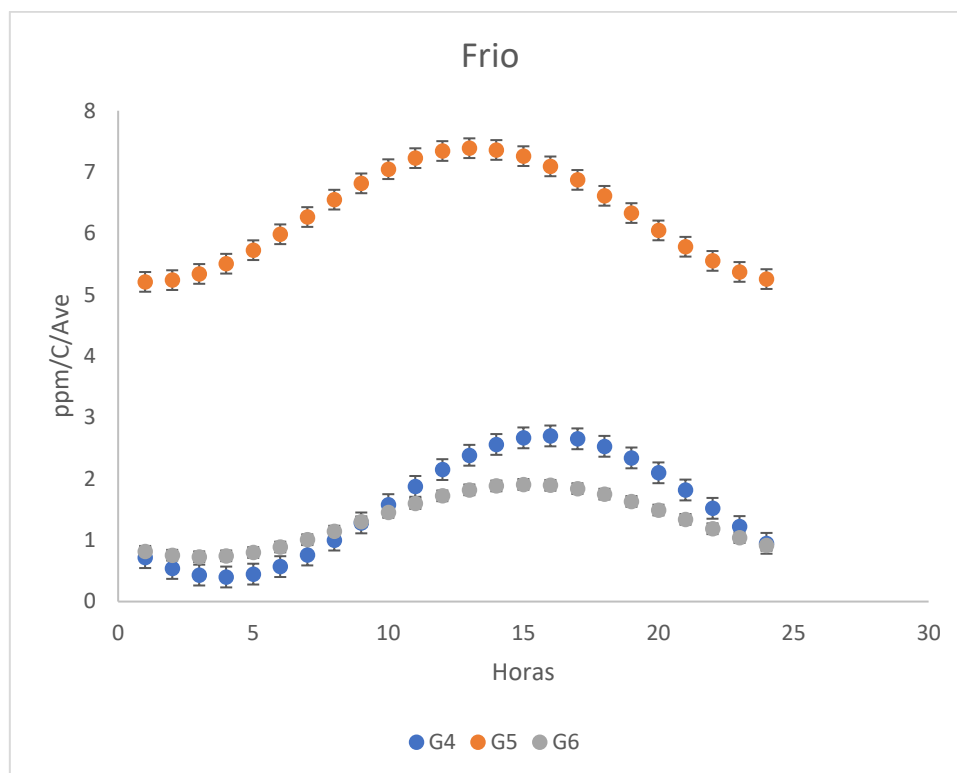


Figura 2. Variação circadiana dos níveis de amônia (ppm/C/Ave) nos grupos G4, G5 e G6 no período de frio.



Discussão

Estatisticamente não houve diferença nos valores de NH_3 entre os grupos no mesmo momento experimental. A metodologia utilizada para calcular a ritmicidade dos níveis de amônia foi semelhante as empregas nos estudos de Miranda e Andrade (2001), Pal *et al.* 2020) e Peter e Chistensen (2006).

O fato de G2 ter apresentado um valor de Mesor tão superior a G1 e G3 pode estar relacionado com a reutilização de cama aviária e/ou o umedecimento diário da cama, que ao contrário do que esperaria, houve uma redução na produção de amônia (NASEEM e KING, 2018). No período frio, este efeito também pode ser observado, sendo os valores do Mesor ligeiramente aumentados em todos os grupos nesta fase, embora a amplitude tenha sido, praticamente, de mesma magnitude.

Em tempo frio, a produção de amônia aumentou de forma significativa, para um valor de $p < 0,05$, cerca de 200% em relação a G1, 10% em relação a G2 e 240% em relação a G3,

como assinalam os dados da tabela 2. Resultados semelhantes aos encontrados Wathes *et al.* (1997), que verificaram uma maior produção de amônia gasosa na época fria. Entretanto, considerando apenas o fator temperatura ambiental, esse resultado contradiz o estabelecido na literatura que em temperatura ambiental mais alta, haveria um aumento na emissão de NH_3 (JIANG *et al.*, 2021).

Deve-se ressaltar que existe uma relação importante entre a variação de temperatura e a atividade enzimática nos sistemas biológicos (GONZALEZ-RUIZ *et al.*, 2020; HOAR, 1983), podendo esta aumentar ou diminuir, quando se afasta da temperatura ideal, acoplada às principais etapas do metabolismo do nitrogênio, tanto endogenamente, como no ambiente, envolvendo a participação de microrganismos (HU *et al.*, 2020). No período de temperatura mais baixa, parece que as condições de produção de amônia ficam mais favoráveis, aumentando-se a taxa de produção para cerca de um grau Celsius, por animal.

O impacto da reutilização e umidificação de cama aviária parece ter sido maior no período quente do que no frio, comparando-se a produção de NH_3 entre os grupos G2 e G5, como se melhor visualiza nas figuras 1 e 2. Nota-se que o umedecimento da cama do grupo G6, na fase fria, reduz a produção de amônia, mas não reduz a linha basal abaixo do nível de produção em G4, sugerindo que este nível está relacionado com um incremento basal decorrente da contribuição da variação de temperatura no ambiente.

O umedecimento pode deslocar o período de produção e liberação máxima de amônia, para um período em que a contribuição térmica do ambiente seria menor. Isto pode ser visto ao se verificar que o período de produção e liberação máxima da amônia nos grupos com cama aviária nova (G1 e G4), próximo a 15 horas, foi semelhante ao dos grupos com cama reutilizada e umedecida (G3 e G6), em torno de 15,1 horas. Já nos grupos com cama aviária reutilizada (G2 e G5), esse valor caiu para 13 horas. Disto se verifica que o fator umidade parece deslocar o ponto de atividade máxima produção e liberação da amônia, cerca de duas horas no período frio, aproximadamente dez horas no período quente, conforme assinalam os dados da tabela 1.

O domínio deste tipo de informação pode contribuir para o desenvolvimento de ferramentas importantes para se controlar os níveis de NH_3 , de forma a manter-se, na maior parte do tempo, com níveis satisfatórios de amônia tanto para as aves em crescimento, como para o profissional que circula nos espaços onde esta atividade é desenvolvida, aumentando-se a produção, com qualidade de vida e bem-estar animal (DAVID *et al.*, 2015).

Já com relação à amplitude, pode-se verificar que na fase quente esta permanece relativamente similar em todos os grupos, inclusive naquele em que ocorreu o umedecimento da cama em G3. Mas, em G6, após o umedecimento, na fase fria, temos uma queda em cerca da metade da amplitude de variação da taxa de produção de amônia. Também é importante destacar que na fase fria, o grupo G5 teve uma taxa de produção apenas quatro vezes maior em relação a G4 e G6, enquanto na fase quente esta relação (entre G1 e G3) tenha sido bem maior, conforme assinalam os dados da tabela 2.

Isso pode estar atrelado ao fato que na época quente a umidade relativa é mais estável, enquanto na época fria essa umidade varia muito, dessa forma, gera um aumento direto na produção de amônia (YONGBO *et al.*, 2017).

Com a visualização dos gráficos 1 e 2, verifica-se que as flutuações de fatores ambientais, como a temperatura e umidade, podem provocar um grande impacto sobre os locais onde se desenvolve os sistemas de criação de animais, por isso são objeto de estudos em todo o mundo (AYO *et al.*, 2017; JIANG *et al.*, 2021; MILES *et al.*, 2013; NASEEM e KING, 2018; SOUSA *et al.*, 2017; STOJCIC *et al.*, 2016).

A otimização dos processos de coleta de dados, assim como o aperfeiçoamento dos modelos matemáticos, pode constituir um importante recursos para se compreender a dinâmica dos diferentes fatores biológicos, numa perspectiva dinâmica. Assim, a constatação de que o gás amônia tem uma variação rítmica, bem como sofre influência direta de fatores ambientais e até alguns de alojamento (tipo de cama aviária e umidade da mesma), pode-se implementar medidas de adequação de manejo na criação de frango de corte, a fim de garantir uma produção mais saudável e mais rentável.

Conclusão

Verificou-se que a variação dos níveis de amônia, em criação tradicional de frango de corte, ocorre de forma rítmica, com ligeiro aumento na época fria. E que criações que reutilizem cama aviária estão sujeitas a níveis mais altos de NH₃.

Declaração de conflito de interesse

Nenhum conflito potencial foi reportado pelos autores.

Referências

- ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal. 2020. **Relatório anual 2020**. 1-160.
- An Y, Xing H, Zhang Y, Jia P, Gu X and Teng X. 2019. The evaluation of potential immunotoxicity induced by environmental pollutant ammonia in broilers. **Poult. Sci.** 0:1-11.
- Àngeles-Castellanos M, Rodríguez K, Salgado R and Escobar C. 2007. Cronobiología médica. Fisiología y fisiopatología de los ritmos biológicos. **Rev Fac Med UNAM** 50, 6:238-241.
- Ayo JO, Makeri HK, Minka NS and Aluwong T. 2017. Circadian rhythms of biomarkers of oxidative stress and their characteristics in broiler chickens reared under natural light/dark cycle. **Biol. Rhythm. Res.** <https://doi.org/10.1080/09291016.2017.1336880>.
- Breslin MC and Belward JA. 1999. Fractal Dimensions for Rainfall Time Series. **Math Comput Simulat** 48:437-446.
- Cornelissen G. 2014. Cosinor-based rhythmometry. **Theor Biol Medical Model** 11:1-24.
- Dunlap JC, Loros JJ, DeCoursey PJ. 2004. **Chronobiology Biological timekeeping**. p. 405, Sinauer Associates, USA.
- Dunlap JC. **Molecular bases for circadian clocks**. 1999. *Cell* 96: 271-90.
- Gonzalez-Ruiz R, Granillo-Luna ON, Peregrino-Uriarte AB, Gómez-Jiménez S and Yepiz-Plascencia G. 2020. Mitochondrial manganese superoxide dismutase from the shrimp *Litopenaeus vannamei*: Molecular characterization and effect of high temperature, hypoxia and reoxygenation on expression and enzyme activity. **J Therm Biol** 99.
- Hoar W. 1983. Temperature and the rates of biological activities. In **General and comparative Physiology**, Third Edition, pp 659-664, Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
- Houdelier C, Guyomarc'h C, Lumineau S and Rochard JP. 2002. Circadian rhythms of oviposition and feeding activity in Japanese quail: effects of cyclic administration of melatonin. **Chronobiol Int** 19:1107–1119.
- Hu R, Wang X., Xu J, Zhang Y, Pan Y and Su X. 2020. The mechanism of soil nitrogen transformation under different biocrusts to warming and reduced precipitation: From microbial functional genes to enzyme activity. **Sci Total Environ** 722.
- Jiang J, Stevenson DS, Uwizeye A, Tempio G and Sutton MA. 2021. A climate-dependent global model of ammonia emissions from chicken farming. **Biogeosciences** 18:135-158.
- Kadono H, Besch EL and Usami E. 1981. Body temperature, oviposition, and food intake in the hen during continuous light. **J Appl Physiol** 51:1145–1149.
- Malislelo PS and Nkonde GK. 2015. Ammonia Production In Poultry Houses And Its Effect On The Growth Of *Gallus Gallus Domestica* (Broiler Chickens): A Case Study Of A Small Scale Poultry House In Riverside, Kitwe, Zambia. **Int J Sci Technol Res.** 4:141-145.
- Marques N and Menna-Barreto L. 1997. **Cronobiologia: princípios e aplicação**. P.328, Edusp-Editora Fiocruz, São Paulo.

- Miles DM, Brooks JP, McLaughlin MR and Rowe DE. 2013. Broiler litter ammonia emissions near sidewalls, feeders, and waterers. **Poult Sci** 92:1693-1698.
- Miranda JGV and Andrade RFS. 2001. R/S Analysis of Pluviometric Record: Comparison with Numerical Experiments. **Physica A** 295:38-41.
- Naseem S and King AJ. 2018. Ammonia production in poultry houses can affect health of humans, birds, and the environment—techniques for its reduction during poultry production. **Environ. Sci Pollut Res** volume 25:15269–15293.
- Pall S, Dutta S, Nasrin T and Chattopadhyay S. 2020. Hurst exponent approach through rescaled range analysis to study the time series of summer monsoon rainfall over northeast India. **Theor Appl Climatol** 142:581-587.
- Peters E. 1989. Fractal Structure in the Capital Markets. **Financial Anal J** 45: 32-32.
- Peters O and Christensen K. 2006. Rain Viewed as Relaxational Events. **J Hidrol** 328:46-55.
- Refinetti R, Lissen GC and Halberg F. 2007. Procedures for numerical analysis of circadian rhythms. **Biol Rhythm Res** 38:275–325.
- Riaz MF, Mahmud A, Hussain J, Rehman A, Usman M, Mehmood S and Ahmad S. 2021. Impact of light stimulation during incubation on hatching traits and post-hatch performance of commercial broilers. **Trop Anim Health Prod** 53:1-8.
- Rosa CO, Gimenes RMT, Garcia RG, Ruviaro CF, Sordi VF. 2019. Sistema de iluminação em led na avicultura de corte: aspectos econômicos. In: **III Encontro Internacional de Gestão, Desenvolvimento e Inovação**.
- Sa RN, Xing H, Luan SJ, Sun YB, Sun CY and Zhang HF. 2017. Atmospheric ammonia alters lipid metabolism-related genes in the livers of broilers (*Gallus gallus*). **J Anim Physiol Anim Nutr.** 1-7.
- Sousa FC and Tinôco IFF. 2017. Gas emission in the poultry production. **J Anim Behav Biometeorol** 5:49-55.
- Stojcic MD, Bjedov S, Zikic D, Peric L and Milosevic N. 2016. Effect of straw size and microbial amendment of litter on certain litter quality parameters, ammonia emission, and footpad dermatitis in broilers. **Arch Anim Breed** 59:131-137.
- Whates CM, Holden MR, Sneath RW, White RP and Philips VR. 1997. Concentrations and emission rates of aerial ammonia, nitrous oxide, methane, carbon dioxide, dust and endotoxin in UK broiler and layer houses. **Br Poult Sci** 38:14-28.
- Xiong Y, Tang X, Meng Q and Zhang H. 2016. Differential expression analysis of the broiler tracheal proteins responsible for the immune response and muscle contraction induced by high concentration of ammonia using iTRAQ-coupled 2D LC-MS/MS. **Sci China Life Sci** 59:1166-1176.
- Yi B, Chen L, Sa R, Zhong R, Xing H and Zhang H. Transcriptome Profile Analysis of Breast Muscle Tissues from High or Low Levels of Atmospheric Ammonia Exposed Broilers (*Gallus gallus*). **PLoS ONE** 11(9): e0162631. doi:10.1371/journal.pone.0162631.
- Yong-bo S, Su-jun L, Ya W, Ren-na S and Hong-fu Z. 2017. Effect of relative humidity in poultry house on thermoregulation and blood parameters of broilers. **Acta Vet Zootech Sin**, 48:669-677.

5.2. Artigo científico número 2

Artigo científico intitulado Influência do gás amônia quanto a histomorfometria e histopatologia de traqueias de frangos de corte, será submetido à Revista Brasileira de Ciência Avícola.

Influência do gás amônia quanto a histomorfometria e histopatologia de traqueias de frangos de corte

Jéssica de Torres Bandeira^{1*}, Tatiane Bandeira da Silva²; Bruno César Azevedo Brito¹;
Renato Souto Maior Muniz de Moraes¹; Maria Edna Gomes Barros³; Priscilla Maria
Cavalcante Rocha³; Francisco de Assis Leite Souza³; Joaquim Evêncio-Neto³.

¹ Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, Brasil; ² Departamento de Medicina Veterinária, UNIBRA Centro Universitário (UNIBRA), Recife, Brasil; ³ Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, Brasil.

*Correspondence author: Jéssica de Torres Bandeira; Mailing address: Rua São José do Egito, nº 491, CEP: 53435-600, Pau Amarelo, Paulista, Pernambuco, Brasil; Phone: +5581996344339
E-mail: bandeira.j.t@gmail.com

Histomorfometria e histopatologia de traqueias de frangos de corte submetidos à diferentes níveis de gás amônia

Objetivou-se avaliar a histomorfometria e a histopatologia da traqueia de frangos de corte submetidos a diferentes níveis de gás amônia. O experimento foi realizado na cidade de Garanhuns-PE em 2019, entre os meses de fevereiro e março, com temperatura mais elevada e uma repetição entre junho e agosto, com temperatura mais amena. Para isto, utilizou-se três galpões com cama de palha de arroz, sendo no galpão 1, cama nova; no galpão 2, cama reutilizada; e no galpão 3, cama reutilizada com aumento de sua umidade. Foram alojadas 28 aves por galpão, para um ciclo de produção e 42 dias. Nos dias D0, D7, D21, D35 e D42, foram eutanasiadas sete aves por galpão, sendo as aves do D0 consideradas como grupo controle, em seguida coletados fragmentos de traqueia (porção superior e porção inferior), acondicionados em potes plásticos com solução de formalina a 10% tamponada (pH 7). Após 24h o fixador foi trocado por álcool a 70%, dando início ao processamento histológico de rotina. As mensurações da espessura da mucosa traqueal foram realizadas em imagens digitais, por meio de dez diferentes pontos equidistantes 100µm entre si. As lesões histopatológicas foram avaliadas considerando sua distribuição e intensidade. Observou-se que as aves criadas com cama reutilizada, apresentaram maior quantidade e gravidade de lesões histopatológicas, entretanto esses resultados não tiveram diferença estatística. Quanto a histomorfometria, as aves criadas no período de temperatura elevada, ao final do ciclo de produção (D35 e D42), apresentaram mucosa traqueal mais espessa que as aves criadas no período de temperatura amena. Assim, podemos concluir que a diferença entre as camas não alterou de forma significativa a mucosa traqueal das aves, no entanto, a temperatura ambiente influenciou na espessura da traqueia das aves na fase final do ciclo de produção.

Palavras-chave: Avicultura; *Gallus Gallus domesticus*; gás tóxico; NH₃; Traqueíte.

Introdução

O Brasil é o terceiro maior produtor de carne de frango no mundo, com o total de 13.845 milhões de toneladas de carne de frango no ano de 2020 (ABPA, 2021). A região Nordeste ocupa a quarta colocação em percentual produtivo, destacando-se o Estado de Pernambuco responsável por aproximadamente 45% da produção total da região (ABPA, 2021).

Rosa *et al.* (2019) afirmam que a margem de lucro na atividade avícola é estreita, necessitando constantes investimentos. Uma parte importante desse investimento é na cama aviária, pois a sua qualidade afeta diretamente os índices produtivos (STOJCIC *et al.*, 2016), podendo ser utilizadas em vários ciclos de produção seguindo-se um manejo adequado (WANG *et al.*, 2016). Espera-se que a cama absorva a umidade dos materiais orgânicos que se misturem a ela, crie um isolamento térmico e sirva como proteção física a fim de evitar lesões podais (CAMPOS *et al.*, 2018; CARVALHO *et al.*, 2011).

Todo material orgânico da cama, especialmente as excretas das aves, são responsáveis pelas mudanças físico-químicas da cama, resultando na produção de gás amônia (NH₃) (DAVIS e MORISHITA, 2005). O NH₃ é considerado o maior poluente atmosférico da avicultura (YI *et al.*, 2016), capaz de causar lesões em seres humanos (DAVIS *et al.*, 2015; IVERSEN *et al.*, 2000; SCHIFFMAN, 1998) e nas aves, principalmente no sistema respiratório (AL-MASHHADANI e BECK, 1985; ANDERSON *et al.*, 1964; ANSARI *et al.*, 2016).

As principais lesões descritas são excesso de muco em traqueia, pulmões edematosos, inflamados e com pontos hemorrágicos (AL-MASHHADANI e BECK, 1985; ANDERSON *et al.*, 1964; ANSARI *et al.*, 2016). Entretanto as alterações histológicas são poucas vezes descritas, sendo relatado perda de cílios, aumento do número de células caliciformes, inflamação em lâmina própria e edema em submucosa (AL-MASHHADANI e BECK, 1985; OYETUNDE *et al.*, 1978; ZHOU *et al.*, 2021). Entretanto, ainda não há uma análise histomorfológica dessas traqueias.

Há ainda outros fatores que influenciam diretamente o bem-estar dessas aves, como o estresse térmico. O estresse térmico ocorre quando o animal não consegue dissipar calor suficiente para o meio ambiente, isso pode ocorrer por diversos fatores, dentre os quais, a elevação de temperatura ambiente (RATH *et al.*, 2015). Associa-se ao estresse térmico alterações gastrointestinais e imunológicas (RATH, *et al.*, 2015), porém, não há relatos associando a temperatura ambiente elevada a lesões em sistema respiratório.

Desta forma, objetivou-se avaliar as lesões histopatológicas e a histomorfometria em traqueias de frangos, submetidos a diferentes níveis de NH_3 e temperaturas ambientes diversas.

Material e métodos

Local e amostragem

O experimento foi realizado na cidade de Garanhuns-PE, onde existem relatos de problemas com o gás amônia proveniente da cama, provocando lesões nos frangos de corte. Foi conduzido sob os termos e condições dos Princípios Éticos da Experimentação Animal, do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA) aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), com número de licença 136/2018. O clima dessa região é classificado como Aw (clima tropical com chuvas de verão) na classificação de Köppen- Geiger.

O experimento foi realizado entre os meses de fevereiro e março, época do ano com temperatura ambiental elevada (entre 33,6°C e 18,2°C com umidade mínima absoluta 30 a 31%) com repetição entre junho e agosto de 2019, em época de temperaturas mais amenas (entre 25,1°C e 14,5°C com umidade mínima absoluta 44 a 56%) (APAC, 2019abcde).

Foram utilizados três galpões, que mediam 2m x 2m, todos com orientação Leste-Oeste, não climatizados. A cama de escolha foi a palha de arroz, por ser um dos tipos mais amplamente utilizado no Nordeste brasileiro. No galpão 1, foi utilizada cama nova de palha de arroz sem aditivos; no galpão 2 foi reutilizada cama de palha de arroz já fermentada proveniente de galpões da própria granja após um ciclo de produção; já no galpão 3 foi utilizada a mesma cama do galpão 2, a qual era umedecida diariamente com pulverização de sete litros de água.

Foram utilizados um total de 182 pintos da linhagem Ross, sendo 91 aves por cada estação do ano, divididas em três galpões com 28 animais cada. Cada galpão foi considerado um grupo experimental, sendo eles G1, G2 e G3 as aves criadas nos três galpões na época quente e G4, G5 e G6 as aves criadas na época de temperaturas amenas. Para cada momento experimental o grupo controle era composto por sete aves de zero dia, formando os grupos Gx (ciclo de produção entre fevereiro e março) e Gy (ciclo de produção entre junho e agosto). A densidade de aves no galpão de alojamento foi de no máximo 11 aves/m², para todos os galpões,

que é considerada ideal para a linhagem utilizada, de acordo com o Manual de Manejo de Frangos Ross (2014). Essas aves foram criadas em um ciclo de produção de 42 dias.

Todas as aves foram pesadas em balança digital SF 400 – Global Home®), para o acompanhamento do seu desenvolvimento. Aves foram eutanasiadas de acordo com a Resolução Normativa Nº 37/2018 – Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), nos dias 0, 7, 21, 35 e 42 (D0, D7, D21, D35 e D42). No D0 foram eutanasiadas sete aves, para compor o grupo controle e nos demais dias, D7, D21, D35 e D42, eram eutanasiadas sete aves por grupo.

Avaliação histológica e histomorfométrica

Em todos os tempos pré-determinados foram coletadas amostras de duas regiões da traqueia (porção superior e porção inferior) e então, acondicionadas em potes plásticos com solução de formalina a 10% tamponada (pH 7). Após 24h, as amostras foram transferidas para o álcool a 70%, dando início ao processamento histológico no Laboratório de Histologia Animal do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA).

Todas as amostras foram processadas por técnica histológica de rotina (ROCHA *et al.*, 2016), onde foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool, diafanizadas em xilol, impregnadas e emblocadas em parafina. Os blocos foram cortados a 3µm, e em seguida, as lâminas foram coradas em hematoxilina e eosina para posterior análise em microscópio óptico trinocular LEICA DM500.

Para análise histomorfométrica da mucosa traqueal foi utilizado o protocolo de Nunes *et al.* (2002), sendo as lâminas observadas e fotografadas em objetiva de 4x em um microscópio óptico trinocular LEICA DM500 acoplado a uma câmera digital LEICA ICC50 HD®, sendo a imagem capturada por meio do software Leica LAS EZ® (Leica Microsystems, Buffalo Grove, USA). As mensurações da espessura da mucosa traqueal, foram realizadas em imagens digitais, por meio de dez diferentes pontos equidistantes 100µm entre si, utilizando o software Image J®. O programa foi calibrado utilizando uma fotomicrografia no mesmo aumento (4x) e uma régua micrométrica de 0,01 mm LEICA (50 mm – Referência 10310345), na qual 69 pixels equivalem a 100 micrômetros.

Para avaliação histopatológica da traqueia, foram observadas lesões como hiperemia, congestão, hemorragia, metaplasia escamosa, achatamento epitelial, desprendimento de

epitélio, necrose de epitélio, hiperplasia e hipertrofia de glândulas mucosas, depleção de glândulas mucosas, desciliação, traqueíte e fibroplasia. Para classificação das lesões quanto a sua distribuição e grau de intensidade, foi adotado o protocolo de Sesti *et al.* (2013) com adaptações (Quadro 1).

Quadro 1 - Avaliação das lesões histopatológicas quanto a distribuição e intensidade por meio de escore.

| Categoria | Escore | Significado |
|--------------|--------|--------------------------|
| Distribuição | 0 | Ausente |
| | 1 | Focal |
| | 2 | Focalmente extensa |
| | 3 | Multifocal |
| | 4 | Multifocal a coalescente |
| | 5 | Difusa |
| Intensidade | 0 | Ausente |
| | 1 | Discreta |
| | 2 | Moderada |
| | 3 | Acentuada |

Fonte: Adaptado de Sesti *et al.* (2003).

Para fins de monitoramento do gás amônia, eram feitas três aferições diárias, em três turnos, início da manhã, início da tarde e início da noite. Para isso utilizou-se um detector de gás amônia (Ammonia Gas Detector - Smart sensor, modelo: SSEYL AR8500), que fornece leituras simultâneas dos níveis de amônia em ppm e da temperatura ambiente em °C.

Análise estatística

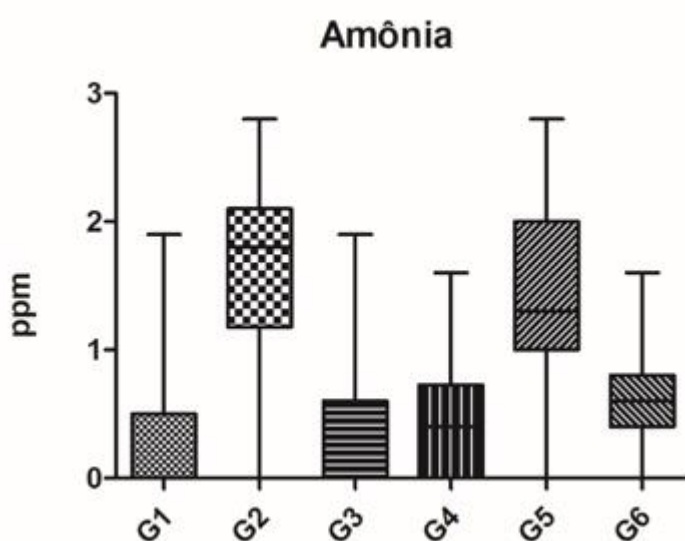
Para todas as análises estatísticas foi utilizado o software comercial GraphPad Prism (versão 7.0). Para a variável espessura da mucosa traqueal foi aplicado o teste paramétrico

ANOVA. Já as lesões histopatológicas foram analisadas utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, adotando-se nível de significância de 5%. Para avaliação dos pesos das aves, foi empregado o teste de normalidade ANOVA e posteriormente o teste t-student com significância de 5%.

Resultados e discussão

A influência da umidade da cama, neste trabalho, não elevou os níveis de amônia como esperado (Figura 1), pois os valores encontrados nos grupos criados com camas novas, foram bem próximos aos valores dos grupos criados com cama reutilizada e umedecida. Isso não era esperado, uma vez que a liberação do gás amônia depende de vários fatores, dentre eles a umidade da cama e a temperatura ambiental, onde nos locais mais úmidos e frios haveria uma maior liberação desse gás (ASTON et al., 2019).

Figura 1: Níveis de amônia (ppm) mensurados nos diferentes manejos de cama aviária, em duas épocas do ano, de temperatura mais elevada e de temperatura amena. Cada padrão representa um grupo experimental, sendo eles: G1 e G4 – aves criadas em galpão com cama aviária nova; G2 e G5 – aves criadas em galpão com cama aviária reutilizada; G3 e G6 – aves criadas em galpão com cama reutilizada e umedecida. Os grupos G1, G2 e G3 foram criados em período do ano com temperaturas elevadas e os grupos G4, G5 e G6 foram criados em período do ano com temperaturas amenas.



Fidan *et al.* (2020) também associam o aumento da umidade com o aumento de NH_3 , porém, eles adicionam outro fator na liberação desse gás, a espessura da cama. Em cama com espessura de 1cm, houve piora na sua qualidade e aumento de umidade e NH_3 . Nesse estudo, todas as camas tinham espessuras semelhantes, aproximadamente 15cm, tamanho que Fidan *et al.* (2020) afirmam gerar uma redução da amônia atmosférica, o que também pode ter colaborado para os valores reduzidos encontrados.

Eliotts e Collins (1982) em seu experimento evidenciaram que na primeira semana de criação dos frangos, o aumento de umidade da cama gerou uma redução nos níveis de NH_3 , já nas semanas seguintes ocorreu efeito inverso. O desfecho desse experimento vai de encontro ao que foi evidenciado nesse trabalho, em que os níveis de gás amônia permaneceram baixos. Os mesmos autores atribuem a redução de gás amônia à uma maior diluição de NH_3 e apontam que como a produção desse gás depende da atividade de bactérias aeróbicas, que em um ambiente de muita umidade não conseguiriam desempenhar seu metabolismo, fazendo com que bactérias anaeróbicas prevalecessem. Esse ambiente favorável as bactérias anaeróbicas, pode ter perdurado por todo o ciclo produtivo neste estudo.

Miles *et al.* (2011) geraram uma equação capaz de estimar a quantidade de gás amônia a ser volatilizado em uma produção de frangos de corte. Para chegar nessa equação eles provaram que os fatores que mais influenciam são a temperatura ambiente e a umidade da cama, quando esses dois elementos aumentam, o NH_3 também aumenta. Porém, há um determinado limite de umidade e temperatura em que essa produção atinge seu limite máximo e após esse limite tende a diminuir. Isso pode explicar o fenômeno visto nesse estudo, pois os grupos G2 e G5, nos quais as aves eram criadas com cama aviária reutilizada, registraram maiores níveis de NH_3 , enquanto os grupos G3 e G6, nos quais a cama era umedecida, registram níveis semelhante aos grupos G1 e G3, nos quais a cama era nova, estando de acordo com Liu *et al.* (2007) que concluíram que em um determinado momento ponto o aumento de umidade diminuiu a emissão de NH_3 .

Alguns autores já relataram lesões relacionadas à exposição ao NH_3 , tais como metaplasia do epitélio da mucosa, hipertrofia da mucosa (OYETUNDE *et al.*, 1978), desciliação (OYETUNDE *et al.*, 1978; SHI *et al.*, 2019; TERZICH *et al.*, 1998), hipertrofia de glândulas mucosas (SHI *et al.*, 2019; TERZICH *et al.*, 1998; ZHOU *et al.*, 2020), necrose, hemorragia e traqueite (TERZICH *et al.*, 1998; WANG *et al.*, 2020; ZHOU *et al.*, 2020).

Neste trabalho, além das lesões já citadas, foram observadas também o achatamento e desprendimento do epitélio da mucosa, fibroplasia, hemorragia e hiperemia (associadas a processos inflamatórios), traqueíte (com predominância de linfócitos, histiócitos e plasmócitos, respectivamente), congestão (não associada a infiltrados inflamatórios), perda de cílios, além de depleção e hipertrofia de glândulas mucosas.

Essas lesões ocorreram por diversos mecanismos atrelados a ação do gás amônia, esse gás é capaz de provocar instabilidade na microbiota da traqueia, resultando em reações inflamatórias e até necrose de mucosa (ZHOU *et al.*, 2021). Segundo Han *et al.* (2020) a amônia gera um estresse oxidativo nas células do epitélio traqueal, com esse estresse ocorre uma disfunção mitocondrial que desencadeia a morte celular por necroptose, uma morte celular mediada que irá provocar uma grande reação inflamatória. Isso condiz com o achado de maior ocorrência que foi a traqueíte, porém não foram encontradas muitas áreas de morte celular. As demais lesões com maior frequência foram hiperplasia de glândulas mucosas, metaplasia escamosa do epitélio da mucosa e desciliação (Figura 2), porém sem diferença estatística entre as porções superior e inferior da traqueia, nem entre os grupos ou entre os períodos do ano.

Ainda assim, foi possível notar que a maior ocorrência de lesões neste órgão foi no período de temperaturas amenas, corroborando com Aston *et al.* (2019). A maior parte dessas lesões encontravam-se na porção superior da traqueia, o que já era esperado, uma vez que o gás amônia tem boa solubilidade em água (AL-MASHHADANI e BECK, 1985; XING *et al.*, 2016), portanto sua concentração vai diminuindo a medida em que passa pelo trato respiratório, pois vai se misturando ao muco presente no trato respiratório superior (AL-MASHHADANI e BECK, 1985) (Quadros 2 e 3).

Quanto a distribuição e escore de intensidade, não houve diferença estatística ($p > 0.05$) entre as porções superiores e inferiores das traqueias, tampouco entre os grupos e os diferentes períodos do ano. Em sua maioria as lesões tinham uma distribuição multifocal, variando quanto a intensidade, nesse caso as áreas de desciliação eram sempre acentuadas, as demais lesões variaram entre leve e moderada.

Quadro 2: Frequência absoluta das principais lesões em porção superior de traqueias de frangos de corte, submetidos a diferentes manejos de cama aviária em dois períodos do ano, um de temperaturas elevadas e um de temperaturas amenas.

| Lesão | G1 | G2 | G3 | Total TE | G4 | G5 | G6 | Total TA | Total geral |
|-------------|----|----|----|----------|----|----|----|----------|-------------|
| Desciliação | 1 | 1 | 0 | 2 | 5 | 1 | 0 | 6 | 8 |
| Hiperplasia | 4 | 8 | 7 | 19 | 14 | 9 | 10 | 33 | 52 |
| Metaplasia | 3 | 2 | 3 | 8 | 5 | 5 | 3 | 13 | 21 |
| Traqueíte | 16 | 12 | 12 | 40 | 22 | 9 | 14 | 45 | 85 |
| | 24 | 23 | 22 | 89 | 46 | 26 | 27 | 99 | 188 |

G1 – aves criadas com cama aviária nova em período de temperatura elevada; G2 – aves criadas com cama aviária reutilizada em período de temperatura elevada; G3 – aves criadas com cama aviária reutilizada e umedecida em período de temperatura elevada; G4 – aves criadas com cama aviária nova em período de temperatura amena; G5 – aves criadas com cama aviária reutilizada em período de temperatura amena; G6 – aves criadas com cama aviária reutilizada e umedecida em período de temperatura amena; TE – período de temperatura elevada; TA – período de temperatura amena.

Quanto a histomorfometria, no dia sete a espessura das traqueias de todos os grupos foi semelhante (Figura 3-A), no dia 21 os grupos do período de temperaturas amenas apresentam um pequeno aumento em relação ao período de temperaturas elevadas, porém, sem diferença estatística ($p > 0.05$) (Figura 3-B). Já nos dias 35 e 42 essa diferença se inverteu e a espessura das traqueias dos animais do período de temperaturas elevadas passaram a ter medidas maiores que as dos animais do período de temperaturas amenas (Figura 3-C e D), apresentando diferença estatística ($p < 0.05$).

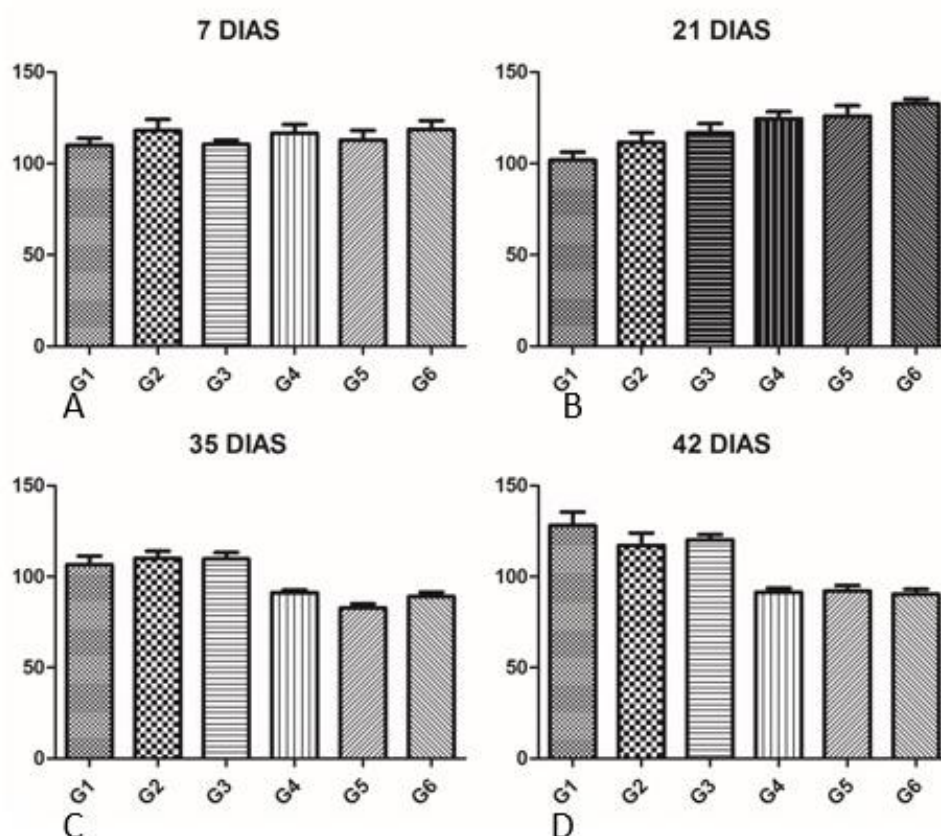
Quadro 3: Frequência absoluta das principais lesões em porção inferior de traqueias de frangos de corte, submetidos a diferentes manejos de cama aviária em dois períodos do ano, um de temperaturas elevadas e um de temperaturas amenas.

| Lesão | G1 | G2 | G3 | Total ciclo 1 | G4 | G5 | G6 | Total ciclo 2 | Total geral |
|-------------|----|----|----|---------------|----|----|----|---------------|-------------|
| Desciliação | 1 | 1 | 1 | 3 | 2 | 0 | 0 | 2 | 5 |
| Hiperplasia | 6 | 8 | 11 | 25 | 19 | 12 | 15 | 46 | 71 |
| Metaplasia | 0 | 1 | 1 | 2 | 5 | 2 | 3 | 10 | 12 |
| Traqueíte | 10 | 11 | 10 | 31 | 12 | 10 | 9 | 31 | 62 |
| | 17 | 21 | 23 | 61 | 38 | 24 | 27 | 89 | 150 |

G1 – aves criadas com cama aviária nova em período de temperatura elevada; G2 – aves criadas com cama aviária reutilizada em período de temperatura elevada; G3 – aves criadas com cama aviária reutilizada e umedecida em período de temperatura elevada; G4 – aves criadas com cama aviária nova em período de temperatura amena; G5 – aves criadas com cama aviária reutilizada em período de temperatura amena; G6 – aves criadas com cama aviária reutilizada e umedecida em período de temperatura amena; TE – período de temperatura elevada; TA – período de temperatura amena.

O fato de a espessura de mucosa traqueal ter aumentado no fim do ciclo de produção no período de temperaturas elevadas, não condiz com o esperado, pois foi no período de temperaturas amenas que foram observadas maiores frequências de metaplasia epitelial e traqueíte. Ambas as alterações promovem o aumento da mucosa traqueal (ELDEMERY *et al.*, 2017; TORO *et al.*, 2012), pois na metaplasia há proliferação de células epiteliais e na traqueíte há infiltrado de células inflamatórias.

Figura 3: Análise histomorfométrica da mucosa traqueal de frangos de corte aos 7, 21, 35 e 42 dias de vida, criados em diferentes manejos de cama aviária. Cada padrão representa um grupo experimental, sendo eles: G1 e G4 – aves criadas em galpão com cama aviária nova; G2 e G5 – aves criadas em galpão com cama aviária reutilizada; G3 e G6 – aves criadas em galpão com cama reutilizada e umedecida. Os grupos G1, G2 e G3 foram criados em período do ano com temperaturas elevadas e os grupos G4, G5 e G6 foram criados em período do ano com temperaturas amenas. Apenas nos dias 35 e 42 foram encontradas diferenças na espessura de mucosa traqueal das aves, entre os períodos do ano ($p>0.05$).



Em conclusão, mesmo em diferentes níveis de NH_3 e diferentes condições ambientais, não foi possível notar diferença significativa quanto às alterações histopatológicas entre as aves dos diferentes grupos. Na histomorfometria verificamos que no período de temperaturas elevadas, as mucosas traqueais apresentaram maiores mensurações, já os diferentes níveis de amônia em um mesmo período do ano, não demonstraram diferenças nas mensurações de mucosa traqueal.

Referências bibliográficas

- ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório anual 2021**. p.1-75. 2021.
- AL-MASHHADANI, E. H.; BECK, M. M. Effects of atmospheric ammonia on the surface ultrastructure of the lung and trachea of broiler chicks. **Poultry Science**, n.64, p.2056 – 2061. 1985.
- ANDERSON, D. P.; BEARD, C. W.; HANSON, R. P. The Adverse Effects of Ammonia on Chickens Including Resistance to Infection with Newcastle Disease Virus **Avian Diseases**, n.8, v. 1, p. 369 – 379. 1964.
- ANSARI, A. R.; GE, X.; HUANG, H.; HUANG, X.; ZHAO, X.; PENG, K.; ZHANG, J.; LIU, H. Effects of lipopolysaccharide on the histomorphology and expression of toll like receptor 4 in the chicken trachea and lung. **Avian Pathology**, n.45, v.5, p. 530 – 537. 2016.
- ASTON, E.J., JACKWOOD, M.W., GOGAL, R.M., HURLEY, D.J., FAIRCHILD, B.D., HILT, D.A., CHENG, S., TENSA, L.R., GARCIA, M. e JORDAN, B.J. Ambient ammonia does not appear to inhibit the immune response to infectious bronchitis virus vaccination and protection from homologous challenge in broiler chickens. **Veterinary immunology and immunopathology**, n. 109932, v. 217. 2019.
- CAMPOS M.F.F.S., TEÓFILO T.S., CHAVES D.P., SANTOS A.C.G., LOPES B.C.A., BEZERRA N.P.C. e TORRES M.A.O. Identificação parasitológica da cama de frango reutilizada em uma granja avícola. **Revista Brasileira Ciência Veterinária**, v. 25, n. 1, p. 27-30, jan./mar. 2018.
- CARVALHO, T. M. R.; MOURA, D. J.; SOUZA, Z. M.; SOUZA, G. S.; BUENO, L. G. F. Qualidade da cama e do ar em diferentes condições de alojamento de frangos de corte. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, n.4, v.46, p. 351 – 361. 2011.
- DAVID, B.; MEJDELL, C.; MICHEL, V.; LUND, V.; MOE, R. O. Air quality in alternative housing systems may have an impact on laying hen welfare. Part II—ammonia. **Animals**, n.5, p. 886 – 896. 2015.
- DAVIS, M.; MORISHITA, T. Y. Relative ammonia concentrations, dust concentrations, and presence of salmonella species and escherichia coli inside and outside commercial layer facilities. **Avian Diseases**, n.49, p. 30 – 35, 2005.
- ELDEMERY, F., JOINER, K.S., TORO, H. e van SANTEN, V.L. Protection against infectious bronchitis virus by spike ectodomain subunit vaccine. **Vaccine**, n. 35, p. 5864-5871. 2017.
- ELLIOTT, H. A.; COLLINS, N. E. Factors affecting ammonia release in broiler houses. **Transactions of the ASAE**, n.25, v.2, p. 0413 – 0418. 1982.
- FIDAN, E.D., KAYA, M., NAZLIGUL, A. e TURKYILMAZ, M.K. The effects of perch cooling on behavior, welfare criteria, performance, and litter quality of broilers reared at high temperatures with different litter thicknesses. **Brazilian journal of poultry science**, v.22, n. 3, p. 001-012. 2020.
- HAN, Q., ZHANG, J., SUN, Q., XU Y. e TENG, X. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction involved in ammonia-induced nephrocyte necroptosis in chickens. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 203, n. 110974, p. 1-9. 2020.

- IVERSEN, M.; KIRYCHUK, S.; DROST, H.; JACOBSON, L. Human health effects of dust exposure in animal confinement buildings. **Journal of agricultural safety and health**, n.6, v.4, p. 283 – 288. 2000.
- LIU, Z., WANG, L., BEASLEY, D. e OVIEDO, E. Effect of moisture content on ammonia emissions from broiler litter: A laboratory study. **Journal of atmospheric chemistry**, v. 58, p. 41-53. 2007.
- MILES, D.M., ROWE, D.E. e CATHCART, T.C. High litter moisture content suppresses litter ammonia volatilization. **Poultry science**, v. 90, p. 1397-1405. 2011.
- NUNES J.E.S., VASCONCELOS A.C., JORGE M.A., GUIMARÃES E.B., PAIXÃO T.A., MARTINS N.R.S. e RESENDE J.S. Estudo comparativo da virulência de amostras de vacina do vírus da doença de Newcastle em galinhas SPF por meio da análise morfométrica da espessura traqueal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.54 p.335-339. 2002.
- OYETUNDE, O. O. F.; THOMSON, R. G.; CARLSON, H. C. Aerosol exposure of ammonia, dust and *Escherichia coli* in broiler chickens. **Canadian veterinary journal**, n.19, p. 187 -193. 1978.
- RATH, P.K.; BEHURA, N.C.; SAHOO, S.P.; PANDA, P.; MANDAL, K.D. e PANIGRAHI, P.N. Amelioration of Heat Stress for Poultry Welfare: A Strategic Approach. **International journal of livestock research**, v.5, n.3, p.1-9. 2015.
- ROCHA. P.M.C.; BARROS, M.E.G. e EVÊNCIO-NETO, J. Análise morfométrica da parede intestinal e dinâmica de mucinas secretadas no jejuno de frangos suplementados com probiótico *Bacillus subtilis* cepa C31021. **Pesquisa veterinária brasileira**, v.36, n.4, p.312-316. 2016.
- SCHIFFMAN, S. S. Livestock odors: implications for human health and well-being. **Journal of animal Science**, n.76, p. 1343 – 1355. 1998.
- SESTI L., KNEIPP C., PARANHOS R., PAULET P., CABAZAN C. Field safety and efficacy of vector Marek's/Newcastle Disease Vaccine (r-HVT-NDV) as assessed by clinical and productive performance in a large population of commercial broilers. *In: WESTERN POULTRY DISEASE CONFERENCE (WPDC)*, Sacramento, California. **Anais [...]**. 2013. p.19-22.
- SHI, Q., WANG, W., CHEN M., ZHANG, H. e XU, S. Ammonia induces Treg/Th1 imbalance with triggered NF- κ B pathway leading to chicken respiratory inflammation response. **Science of the total environment**, v. 659, p. 354-362. 2019.
- STOJCIC, M. D.; BJEDOV, S.; ZIKIC, D.; PERIC, L.; MILOSEVIC, N. Effect of straw size and microbial amendment of litter on certain litter quality parameters, ammonia emission, and footpad dermatitis in broilers. **Archives animal breeding**, n. 59, p. 131 – 137. 2016.
- TERZICH, M., QUARLES, C., GOODWIN, M.A. e BROWN J. Effect of Poultry Litter Treatment[®] (PLT[®]) on the development of respiratory tract lesions in broilers. **Avian pathology**, v. 27, n. 6, p. 566-569. 1998.
- TORO, H., PENNINGTON, D., GALLARDO, R.A., van SANTEN, V.L., van GINKEL, F.W., ZHANG, J. e JOINER, K.S. Infectious Bronchitis Virus Subpopulations in Vaccinated Chickens After Challenge. **Avian diseases**, v. 56, p. 501-508. 2012.
- WANG, L., LIBURN, M. e YU, Z. Intestinal microbiota of broiler chickens as affected by litter management regimens. **Frontiers in microbiology**, v. 7, n. 593, p. 1-12. 2016.

WANG L., SHI X., ZHENG S. e XU S. Selenium deficiency exacerbates LPS-induced necroptosis by regulating miR-16-5p targeting PI3K in chicken tracheal tissue. **Metallomics**, n. 12, p. 562-571. 2020.

XING, H., LUAN, S., SUN, Y., AS, R. e ZHANG, H. Effects of ammonia exposure on carcass traits and fatty acid composition of broiler meat. **Animal nutrition**, v. 2, p. 282-287. 2016.

YI B., CHEN L., AS R., ZHONG R., XING H. e ZHANG H. Transcriptome Profile Analysis of Breast Muscle Tissues from High or Low Levels of Atmospheric Ammonia Exposed Broilers (*Gallus gallus*). **PLoS ONE**, v.11, n.9, p.1-15. 2016.

ZHOU, Y., LIU, Q.X., LI, X.M., MA, D.D., XING, S., FENG, J.H. e ZHANG, M.H. Effects of ammonia exposure on growth performance and cytokines in the serum, trachea, and ileum of broilers. **Poultry Science**, v. 99, p. 2485-2493. 2020.

ZHOU, Y., ZHANG, M., LIU, Q. e FENG, J. The alterations of tracheal microbiota and inflammation caused by different levels of ammonia exposure in broiler chickens. **Poultry Science**, n. 100, p. 685-696. 2021.

Anexo 1 – Artigo 1 na formatação da revista *Biological Rhythm Research*

Circadian variation in ammonia levels in traditional broiler chicken raising system under different climate conditions

Ammonia circadian variation in broiler chicken

Jéssica de Torres Bandeira^{a*}, T. B. Silva^b; B. C. A. Brito^a; R. S. M. M. Morais^a; M. E. G. Barros^c; P. M. C. Rocha^a; G. C. Jimenez^c; F. A. L. Souza^c; J. Evêncio-Neto^c.

^a Department of Veterinary Medicine, Rural Federal University of Pernambuco (UFRPE), Recife, Brazil; ^b Department of Veterinary Medicine, UNIBRA University Center (UNIBRA), Recife, Brazil; ^c Department of Animal Morphology and Physiology, Rural Federal University of Pernambuco (UFRPE), Recife, Brazil.

*Correspondence author: Jéssica de Torres Bandeira; Mailing address: Rua São José do Egito, nº 491, CEP: 53435-600, Pau Amarelo, Paulista, Pernambuco, Brasil; Phone: +5581996344339 E-mail: bandeira.j.t@gmail.com

**Circadian variation in ammonia levels in traditional broiler chicken raising system
under different climate conditions**

Brazil is the largest exporter of chicken meat in the world. Lodging conditions pose numerous problems for poultry farming, including exposure to ammonia gas (NH₃), which causes damage to different tissues and can generate harmful genetic modifications. The aim of the present study was to determine whether there is rhythmicity in NH₃ levels in broiler chicken houses in a traditional raising system. A total of 182 broiler chickens were used, 91 of which were raised in the warm period and 91 were raised in the cool period on rice straw litter under three different conditions: new, reused after one raising cycle, and reused after a raising cycle with daily wetting. Three daily readings of atmospheric ammonia were performed at two heights during a 42-day cycle. The data were tabulated, normalized, and expressed in terms of ppm/C/bird. Fisher's statistical test was used to determine differences related to reading point, temperature, and moisture. The Hurst coefficient was determined in the occurrence of rhythmicity in the temporal variation in NH₃ levels and the COSINOR method was employed for the determination of patterns of rhythmic variation in NH₃ levels. Fisher's method was employed to determine the descriptive capacity of the equations, considering a p-value of <0.01 as indicative of a statistically significant difference. Rhythmic variation in NH₃ levels was found during the 42-day raising cycle. Moreover, ammonia levels increased slightly in the cool season. However, the different types of litter seem to exert no significant influence on ammonia levels. These findings can assist in establishing adaptations to broiler chicken management, providing a safer environment for the birds and workers.

Keywords: Atmospheric pollutant; Circadian cycle; Rhythmicity; Chicken; *Gallus Gallus domesticus*;

Introduction

The Brazilian production of broiler chickens occupies third place in world ranking. Production was 13,245 million tons in 2019, which is considered the largest in the last ten years (ABPA 2020). This activity requires considerable investment, especially in new technologies that promote animal wellbeing, with the possibility of long-term returns (Rosa et al. 2019).

Dawkins, Donnelly, and Jones (2004) report that lodging conditions are more important than density in the industrial production of broilers. Among the lodging factors that constitute a problem in poultry farming activities, the production of ammonia gas (NH_3) causes irritation to different organ systems (An et al. 2019). The volatility of this gas is mainly due to the mobilization of nitrogen excreted by birds themselves (Sousa et al. 2016).

Studies have shown that stress can cause changes on the cellular level in birds (Ayo et al. 2017) and is capable of modifying genes in the pectoral musculature (Yi et al. 2016), altering hepatic metabolism (Sa et al. 2017), and even altering the immune response of the trachea (Xiong et al. 2016). The increase in levels of atmospheric ammonia generates stress in poultry, which can lead to diminished growth (Maliselo and Nkonde 2015).

The regulation of biological systems is not a static process (Ágeles-Castellanos et al. 2007). The regulation of the circadian cycle in poultry can exert an influence on diverse aspects, especially the immune response to oxidative stress (Ayo et al. 2017). Studies have described the occurrence of rhythms of different natures in chickens, such as rhythms in body temperature, feeding, and egg laying (Kadono et al. 1981; Houdelier et al. 2002), as well as an indirect interference on incubation quality by modifying the circadian rhythms of exposure to light (Riaz et al. 2021).

However, little is known regarding the cyclic variation in ammonia gas during a raising period of broiler chickens. Therefore, the aim of the present study was to determine whether there is a daily variation in ammonia levels in two different seasons (warm and cool periods) in the city of Garanhuns, Brazil, during a 42-day broiler chicken raising cycle with natural ventilation and three different litter conditions.

Methods

Experimental design

The experiments were conducted on a commercial ranch in the city of Garanhuns (northeastern Brazil). The climate of the region is classified as Aw (tropical with summer rains) in the Köppen-Geiger classification. This study was conducted following approval from the Ethic Committee on Animal Use of Rural Federal University of Pernambuco (UFRPE) (license number: 136/2018).

The bioassays were performed in 2020 in two phases: February to March, corresponding to the warm season, and June to August, corresponding to the cool season. In the first phase, 91 chicks were obtained from a local broiler hatchery. Seven were euthanized by cervical dislocation and the others were randomly distributed among three houses (H1, H2, and H3) with the same dimensions (2x2x2m), with natural aeration and the manual positioning of curtains. Rice straw litter was used in all houses, measuring approximately 15 cm in thickness. The rice straw was new in H1, reused after one raising cycle in H2, and reused after a raising cycle with daily wetting (seven liters of sprayed water) in H3. The same protocol was repeated in the cool period: 91 chicks; seven euthanized by cervical dislocation and the rest distributed among three houses (H4, H5, and H6) with natural aeration and three types of litter (new, used, and used with wetting).

The level of ammonia gas and environmental temperature were measured three times per day (6:00a.m., 12:00p.m. and 18:00p.m.) in each broiler house at two vertical points (A [high] and B [low]) separated by approximately 1.20m. The readings were performed with the Smart Sensor gas detector (model AR8500), which furnishes simultaneous readings of ammonia levels in ppm and temperature in Celsius.

Collections were made on Day 0 (seven birds), D7, D21, D35, and D42. Seven birds were used on each collection day per house, totaling 21 birds per collection day. These birds were collected to assess possible injuries in a partner study. Environmental humidity level was measured on each collection day using a moisture meter (thermo-anemometer UA – 965, UYIGAO®).

Mathematical treatment of data

The data were tabulated with the aid of the Excel® program. The data regarding the ammonia level were normalized and expressed as ppm/C/bird: temperature at the time of the reading considering the variation in the number of animals in each group, as seven birds were removed on each evaluation day (7, 14, 21, 35, and 42 days) for structural and histopathological evaluations.

Fisher's statistical test was used to determine differences between the readings performed at Points A and B as well as differences in temperature and humidity throughout the different experimentation periods. The Hurst (H) coefficient was calculated to determine the occurrence of rhythmicity in the temporal variation of ammonia levels in each group, considering the methods suggested by Breslin and Belward (1999), Miranda and Andrade (2001) and Peters and Christensen (2006). The COSINOR method (developed in Excel, version 2010, Microsoft) was employed for the determination of patterns of rhythmicity in ammonia levels in all groups in the two seasonal contexts, based on Refinetti et al. (2007) and Cornelissen (2014).

Fisher's method was employed to determine the descriptive capacity of the equations obtained, as suggested by Cornelissen (2014), using statistical tables and respective coefficients of determination (R^2), considering a p-value of < 0.01 as indicative of a statistically significant difference. Comparisons between groups were performed using Fisher's test with the aid of a spreadsheet created with the Excel program (version 2010), considering a p-value of < 0.05 as indicative of a statistically significant difference.

Results

Considering the ammonia gas readings at Points A and B (separated vertically by a distance of approximately 1.20m in each group), probability values in the warm period were 0.167 in H1, 0.999 in H2, and 0.823 in H3, demonstrating no statistically significant differences between points ($p > 0.05$). Probability values in the cool period were 0.408 in H4, 0.852 in H5, and 0.937 in H6, also demonstrating no statistically significant differences between points ($p > 0.05$).

Mean temperature was $27.17 \pm 3.73^{\circ}\text{C}$ in the warm period ($\text{CV}=3.73\%$) and $22.46 \pm 0.52^{\circ}\text{C}$ in the cool period ($\text{CV}=2.33\%$). The low coefficients of variation indicate that mean temperature was practically constant among the different groups in each period of the experiment (warm and cool).

The readings from Point A were considered in the comparison of ammonia gas levels among the different groups to determine the variations in the rhythmicity of the data. For such, ammonia levels were normalized in relation to temperature and the number of animals in each group for each period in which the readings were taken.

The Hurst coefficient was employed to determine the occurrence of rhythmicity among the ammonia level readings. For such, the rescaled range method (R/S) was used to evaluate memory persistence in the time series in the description of ammonia levels in the different groups over time. Table 1 displays the H values in the different groups, each of which was statistically different from zero considering a p-value < 0.05 . Despite this, the H values were situated within the 0 to 0.5 range, suggesting that the ammonia levels varied rhythmically in all groups, although in a characteristic manner within each group.

The COSINOR method was employed to determine the associated pattern of rhythmicity. The rhythmic pattern was found to be a periodic function of the following type: $Y = M + A \cdot \cos(W \cdot t + \phi_0)$, in which “Y” represents the atmospheric level of ammonia expressed as ppm/C/bird, “M” is the mesor, which characterizes the mean level of ammonia around which the other values fluctuate, “A” is the amplitude of variation in ammonia levels, “W” is the parameter that estimates the size of the cycle ($W = 360/T$, in which “T” is the period of occurrence of a complete cycle, which, in the case of ammonia, was 24 horas, serving as a standard period in which variation occurs), “t” is the time in which one wishes to know the ammonia level (normalized in relation to temperature and the number of birds per group at the time of the reading), and “ ϕ ” characterizes the most probable time of the maximum ammonia level.

The regression parameters for the functions that described the rhythms of variation in the normalized ammonia levels in each group are displayed in Table 1. The relative fractions regarding the mesor (taking the values in H1 as reference) are displayed in Table 2.

Among the groups analyzed in the warm period, H1 and H3 had very similar mesor values ($p>0.05$), whereas the mesor in H2 was about tenfold higher ($p<0.05$) (Table 1). The amplitude in the three groups was on the same order of magnitude. The maximum production and release of ammonia gas occurred at 26.2 ± 6.6 h in H1, which is equivalent to 02.12h. In H2, which received reused litter that was not wetted, the period of maximum activity was approximately 13.00h, which corresponds to the period of greatest incident solar radiation. In H3 (reused litter wetted daily), the time of maximum ammonia production was similar to that found in H1 (considering the standard deviation), occurring at around 23.30h, but with a six-hour variation.

[Table 1 near here]

[Table 2 near here]

The coefficients of determination (R^2) indicated good correspondence among the mathematical functions at describing the variation in ammonia levels in relation to the variation in the time interval, as the values approached the unit, which corresponds to a maximum of 100%.

Figures 1 and 2 show the rhythmic patterns of circadian variation in ammonia level per degree Celsius and per broiler chicken among the different treatment groups in the different periods (warm or cool) in which the assays were conducted.

[Figure 1 near here]

[Figure 2 near here]

Discussion

Statistically, no significant differences were found in NH_3 among the groups in the same experimental period. The method used to calculate the rhythmicity of the ammonia levels was similar to that employed in studies conducted by Miranda and Andrade (2001), Peters and Christensen (2006) and Pal et al. (2020).

The fact that the mesor was much higher in H2 compared to H1 and H3 may be related to the reuse of the litter and/or the absence of daily wetting. In contrast to what would be expected, a reduction in the production of ammonia was found in the group with reused and wetted litter (Naseem and King 2018). This

same effect was found in the cool period. Moreover, mesor values were slightly higher in all groups in this phase, although the amplitude was practically of the same magnitude.

In the cool period, the production of ammonia increased significantly ($p < 0.05$); around 200% in relation to H1, 10% in relation to H2, and 240% in relation to H3, as shown in Table 2. Similar results were found by Wathes et al. (1997), who reported a greater production of ammonia gas in the cold season. However, considering only the environmental temperature factor, this result contradicts data established in the literature, in which a higher environmental temperature is related to an increase in the emission of NH_3 (Jiang et al. 2021).

There is an important association between the variation in temperature and enzymatic activity in biological systems (Hoar 1983; Gonzalez-Ruiz et al. 2020), which either increases or diminishes when there is a movement away from the ideal temperature, coupled to the main steps of the metabolism of nitrogen both endogenously and in the environment involving the participation of microorganisms (Hu et al. 2020). It seems that conditions to produce ammonia are more favorable in the cooler period, with an increase in the production rate for every one-degree C increase in ambient temperature.

The impact of the reutilization and wetting of the litter seems to have been greater in the warm period than the cold period when comparing NH_3 production between H2 and H5 (as illustrated in Figures 1 and 2). The wetting of the litter in the cool period (H6) reduced the production of ammonia but did not reduce the basal level below the production level found in H4, suggesting that this level is related to a basal increase resulting from the contribution of the variation of temperature in the environment.

Wetting may displace the period of maximum ammonia production and release to a period in which the thermal contribution of the environment is lower. Indeed, the period of maximum ammonia production and release in the group with new litter was similar to that found in the group with reused and wetted litter in each period (H1 and H3; H4 and H6). Thus, the moisture factor seems to displace the point of maximum ammonia production and release approximately two hours in the cool period and approximately ten hours in the warm period, as demonstrated by the data displayed in Table 1.

This information could contribute to the development of important tools for controlling NH₃, maintaining satisfactory levels for both the growing birds and workers a large portion of the time, thereby increasing production, animal wellbeing, and quality of life (David et al. 2015).

The amplitude remained relatively similar in all groups in the warm period, even in the group in which the wetting of the litter occurred (H3). However, a reduction by approximately half occurred in the amplitude of the variation in the ammonia production rate after wetting in the cool period (H6), as shown in Table 2. This may be linked to the fact that the relative humidity is more stable in the warm period, but varies greatly in the cool period, generating a direct influence on ammonia production (Yongbo et al. 2017).

As illustrated in Figures 1 and 2, fluctuations in environmental factors, such as temperature and humidity, can have a considerable impact in locations where animal raising systems are developed and are therefore the object of study throughout the world (Miles et al. 2013; Stojcic et al. 2016; Ayo et al. 2017; Sousa et al. 2017; Naseem and King 2018; Jiang et al. 2021).

The optimization of data collection processes and the improvement of mathematical models could constitute an important resource for understanding the dynamics of different biological factors. Thus, the observation that ammonia gas has rhythmic variation and is also influenced directly by environmental factors and some lodging factors (type and moisture of litter) can assist in the adjustment of management measures for broiler chicken raising systems to ensure healthier and more profitable production.

The present findings revealed the occurrence of rhythmic variation in ammonia levels in a traditional broiler chicken raising system, with a slight increase in production in the cool season. Moreover, systems in which the litter is reused are subject to higher NH₃ levels.

Declaration of interest statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

References

ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal. 2020. Relatório anual 2020. 1-160.

An Y, Xing H, Zhang Y, Jia P, Gu X and Teng X. 2019. The evaluation of potential immunotoxicity induced by environmental pollutant ammonia in broilers. *Poult. Sci.* 0:1-11.

Àngeles-Castellanos M, Rodríguez K, Salgado R and Escobar C. 2007. Cronobiología médica. Fisiología y fisiopatología de los ritmos biológicos. *Rev Fac Med UNAM* 50, 6:238-241.

Ayo JO, Makeri HK, Minka NS and Aluwong T. 2017. Circadian rhythms of biomarkers of oxidative stress and their characteristics in broiler chickens reared under natural light/dark cycle. *Biol. Rhythm. Res.* <https://doi.org/10.1080/09291016.2017.1336880>.

Breslin MC and Belward JA. 1999. Fractal Dimensions for Rainfall Time Series. *Math Comput Simulat* 48:437-446.

Cornelissen G. 2014. Cosinor-based rhythmometry. *Theor Biol Medical Model* 11:1-24.

Dunlap JC, Loros JJ, DeCoursey PJ. 2004. *Chronobiology Biological timekeeping.* p. 405, Sinauer Associates, USA.

Dunlap JC. Molecular bases for circadian clocks. 1999. *Cell* 96: 271-90.

Gonzalez-Ruiz R, Granillo-Luna ON, Peregrino-Uriarte AB, Gómez-Jiménez S and Yepiz-Plascencia G. 2020. Mitochondrial manganese superoxide dismutase from the shrimp *Litopenaeus vannamei*: Molecular characterization and effect of high temperature, hypoxia and reoxygenation on expression and enzyme activity. *J Therm Biol* 99.

Hoar W. 1983. Temperature and the rates of biological activities. In *General and comparative Physiology*, Third Edition, pp 659-664, Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.

Houdelier C, Guyomarc'h C, Lumineau S and Rochard JP. 2002. Circadian rhythms of oviposition and feeding activity in Japanese quail: effects of cyclic administration of melatonin. *Chronobiol Int* 19:1107–1119.

Hu R, Wang X., Xu J, Zhang Y, Pan Y and Su X. 2020. The mechanism of soil nitrogen transformation under different biocrusts to warming and reduced precipitation: From microbial functional genes to enzyme activity. *Sci Total Environ* 722.

Jiang J, Stevenson DS, Uwizeye A, Tempio G and Sutton MA. 2021. A climate-dependent global model of ammonia emissions from chicken farming. *Biogeosciences* 18:135-158.

Kadono H, Besch EL and Usami E. 1981. Body temperature, oviposition, and food intake in the hen during continuous light. *J Appl Physiol* 51:1145–1149.

Malislelo PS and Nkonde GK. 2015. Ammonia Production In Poultry Houses And Its Effect On The Growth Of *Gallus Gallus Domestica* (Broiler Chickens): A Case Study Of A Small Scale Poultry House In Riverside, Kitwe, Zambia. *International Journal of Scientific & Technology Research* 4:141-145.

Marques N and Menna-Barreto L. 1997. *Cronobiologia: princípios e aplicação*. P.328, Edusp-Editora Fiocruz, São Paulo.

Miles DM, Brooks JP, McLaughlin MR and Rowe DE. 2013. Broiler litter ammonia emissions near sidewalls, feeders, and waterers. *Poult Sci* 92:1693-1698.

Miranda JGV and Andrade RFS. 2001. R/S Analysis of Pluviometric Record: Comparison with Numerical Experiments. *Physica A* 295:38-41.

Naseem S and King AJ. 2018. Ammonia production in poultry houses can affect health of humans, birds, and the environment—techniques for its reduction during poultry production. *Environ. Sci Pollut Res* volume 25:15269–15293.

Pal S, Dutta S, Nasrin T and Chattopadhyay S. 2020. Hurst exponent approach through rescaled range analysis to study the time series of summer monsoon rainfall over northeast India. *Theor Appl Climatol* 142:581-587.

Peters E. 1989. Fractal Structure in the Capital Markets. *Financial Anal J* 45: 32-32.

Peters O and Christensen K. 2006. Rain Viewed as Relaxational Events. *J Hidrol* 328:46-55.

Refinetti R, Lissen GC and Halberg F. 2007. Procedures for numerical analysis of circadian rhythms. *Biol Rhythm Res* 38:275–325.

Riaz MF, Mahmud A, Hussain J, Rehman A, Usman M, Mehmood S and Ahmad S. 2021. Impact of light stimulation during incubation on hatching traits and post-hatch performance of commercial broilers. *Trop Anim Health Prod* 53:1-8.

Rosa CO, Gimenes RMT, Garcia RG, Ruviaro CF, Sordi VF. 2019. Sistema de iluminação em led na avicultura de corte: aspectos econômicos. In: III Encontro Internacional de Gestão, Desenvolvimento e Inovação.

Sa RN, Xing H, Luan SJ, Sun YB, Sun CY and Zhang HF. 2017. Atmospheric ammonia alters lipid metabolism-related genes in the livers of broilers (*Gallus gallus*). *J Anim Physiol Anim Nutr.* 1-7.

Sousa FC and Tinôco IFF. 2017. Gas emission in the poultry production. *J Anim Behav Biometeorol* 5:49-55.

Stojcic MD, Bjedov S, Zikic D, Peric L and Milosevic N. 2016. Effect of straw size and microbial amendment of litter on certain litter quality parameters, ammonia emission, and footpad dermatitis in broilers. *Arch Anim Breed* 59:131-137.

Whates CM, Holden MR, Sneath RW, White RP and Philips VR. 1997. Concentrations and emission rates of aerial ammonia, nitrous oxide, methane, carbon dioxide, dust and endotoxin in UK broiler and layer houses. *Br Poult Sci* 38:14-28.

Xiong Y, Tang X, Meng Q and Zhang H. 2016. Differential expression analysis of the broiler tracheal proteins responsible for the immune response and muscle contraction induced by high concentration of ammonia using iTRAQ-coupled 2D LC-MS/MS. *Sci China Life Sci* 59:1166-1176.

Yi B, Chen L, Sa R, Zhong R, Xing H and Zhang H. Transcriptome Profile Analysis of Breast Muscle Tissues from High or Low Levels of Atmospheric Ammonia Exposed Broilers (*Gallus gallus*). *PLoS ONE* 11(9): e0162631. doi:10.1371/journal.pone.0162631.

Yong-bo S, Su-jun L, Ya W, Ren-na S and Hong-fu Z. 2017. Effect of relative humidity in poultry house on thermoregulation and blood parameters of broilers. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 48:669-677.

Tables

Table 1. Mean and standard deviation values for Hurst (H) coefficient and regression parameters for rhythmic characterization of variation in ammonia levels (ppm/C/bird) in different groups under different treatment conditions.

| Group | H | M (10^{-3}) | A (10^{-3}) | ϕ | R ² |
|-------|-------------|-----------------|-----------------|------------|----------------|
| H1 | 0.09 ± 0.10 | 0.55 ± 0.05 | 0.98 ± 0.20 | 26.2 ± 6.6 | 0.87 |
| H2 | 0.01 ± 0.01 | 5.51 ± 1.90 | 0.97 ± 0.31 | 13.1 ± 0.5 | 0.92 |
| H3 | 0.18 ± 0.07 | 0.59 ± 0.65 | 0.96 ± 0.70 | 23.5 ± 8.4 | 0.91 |
| H4 | 0.09 ± 0.11 | 1.55 ± 0.79 | 1.15 ± 0.67 | 15.9 ± 4.7 | 0.74 |
| H5 | 0.02 ± 0.01 | 6.30 ± 2.40 | 1.09 ± 0.47 | 13.1 ± 0.9 | 0.92 |
| H6 | 0.03 ± 0.03 | 1.32 ± 0.77 | 0.59 ± 0.21 | 15.1 ± 2.3 | 0.75 |

NOTE: H – Hurst coefficient; M – mesor (ppm/C/bird); A – amplitude (ppm/C/bird); ϕ – acrophase (hours);

R² – coefficient of determination.

Table 2. Ratio between mesor values (ppm/C/bird) comparing different reference groups.

| Reference groups | | | | | | |
|------------------|-------|------|-------|------|------|----|
| | H1 | H2 | H3 | H4 | H5 | H6 |
| H1 | 1 | - | - | - | - | - |
| H2 | 10.02 | 1 | - | - | - | - |
| H3 | 1.07 | 0.11 | 1 | - | - | - |
| H4 | 2.82 | 0.28 | 2.63 | 1 | - | - |
| H5 | 11.45 | 1.14 | 10.67 | 4.06 | 1 | - |
| H6 | 2.4 | 0.24 | 2.24 | 0.85 | 0.21 | 1 |

Figures

Figure 1

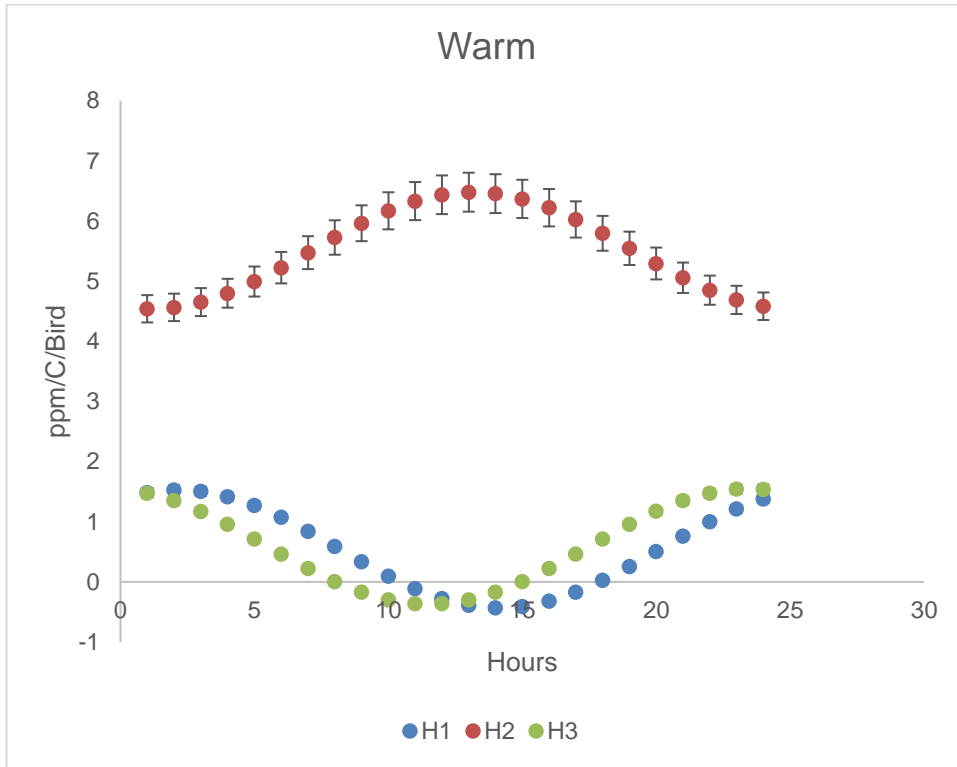


Figure 2

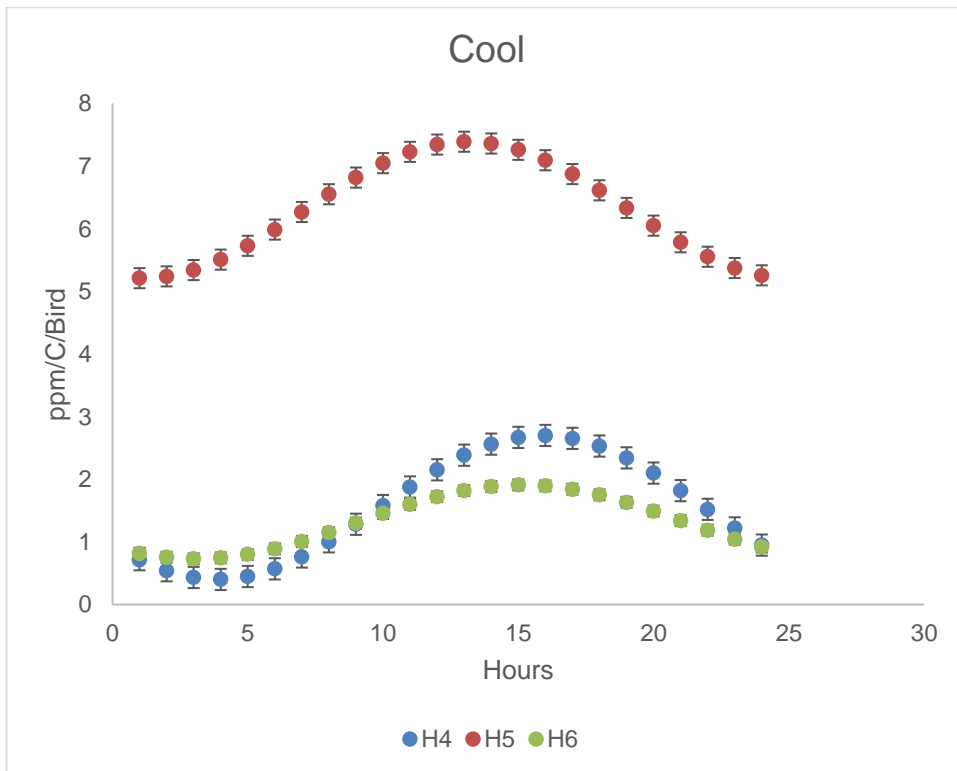


Figure Legends

Figure 1. Circadian variation in ammonia levels (ppm/C/bird) in H1, H2, and H3 (warm period).

Figure 2. Circadian variation in ammonia levels (ppm/C/bird) in H4, H5, and H6 (cool period).

Anexo 2 – Normas da revista *Biological Rhythm Research*

Preparing Your Paper

All authors submitting to medicine, biomedicine, health sciences, allied and public health journals should conform to the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals, prepared by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE).

Structure

Your paper should be compiled in the following order: title page; abstract; keywords; main text introduction, materials and methods, results, discussion; acknowledgments; declaration of interest statement; references; appendices (as appropriate); table(s) with caption(s) (on individual pages); figures; figure captions (as a list).

Word Limits

Please include a word count for your paper. There are no word limits for papers in this journal.

Style Guidelines

Please refer to these quick style guidelines when preparing your paper, rather than any published articles or a sample copy.

Please use spelling style consistently throughout your manuscript.

Please note that long quotations should be indented without quotation marks.

Formatting and Templates

Papers may be submitted in Word format. Figures should be saved separately from the text. To assist you in preparing your paper, we provide formatting template(s).

Word templates are available for this journal. Please save the template to your hard drive, ready for use.

If you are not able to use the template via the links (or if you have any other template queries) please contact us here.

References

Please use this reference guide when preparing your paper.

15 **Resumo**

16 Objetivou-se avaliar a histomorfometria e a histopatologia da traqueia de frangos de
17 corte submetidos a diferentes níveis de gás amônia. O experimento foi realizado na
18 cidade de Garanhuns-PE em 2019, entre os meses de fevereiro e março, com
19 temperatura mais elevada e uma repetição entre junho e agosto, com temperatura
20 mais amena. Para isto, utilizou-se três galpões com cama de palha de arroz, sendo
21 no galpão 1, cama nova; no galpão 2, cama reutilizada; e no galpão 3, cama reutilizada
22 com aumento de sua umidade. Foram alojadas 28 aves por galpão, para um ciclo de
23 produção e 42 dias. Nos dias D0, D7, D21, D35 e D42, foram eutanasiadas sete aves
24 por galpão, sendo as aves do D0 consideradas como grupo controle, em seguida
25 coletados fragmentos de traqueia (porção superior e porção inferior), acondicionados
26 em potes plásticos com solução de formalina a 10% tamponada (pH 7). Após 24h o
27 fixador foi trocado por álcool a 70%, dando início ao processamento histológico de
28 rotina. As mensurações da espessura da mucosa traqueal foram realizadas em
29 imagens digitais, por meio de dez diferentes pontos equidistantes 100µm entre si. As
30 lesões histopatológicas foram avaliadas considerando sua distribuição e intensidade.
31 Observou-se que as aves criadas com cama reutilizada, apresentaram maior
32 quantidade e gravidade de lesões histopatológicas, entretanto esses resultados não
33 tiveram diferença estatística. Quanto a histomorfometria, as aves criadas no período
34 de temperatura elevada, ao final do ciclo de produção (D35 e D42), apresentaram
35 mucosa traqueal mais espessa que as aves criadas no período de temperatura
36 amena. Assim, podemos concluir que a diferença entre as camas não alterou de forma
37 significativa a mucosa traqueal das aves, no entanto, a temperatura ambiente
38 influenciou na espessura da traqueia das aves na fase final do ciclo de produção.

39 **Palavras-chave:** Avicultura; *Gallus Gallus domesticus*; gás tóxico; NH₃; Traqueíte.

40 **Introdução**

41 O Brasil é o terceiro maior produtor de carne de frango no mundo, com o total
42 de 13.845 milhões de toneladas de carne de frango no ano de 2020 (ABPA, 2021). A
43 região Nordeste ocupa a quarta colocação em percentual produtivo, destacando-se o
44 Estado de Pernambuco responsável por aproximadamente 45% da produção total da
45 região (ABPA, 2021).

46 Rosa *et al.* (2019) afirmam que a margem de lucro na atividade avícola é
47 estreita, necessitando constantes investimentos. Uma parte importante desse
48 investimento é na cama aviária, pois a sua qualidade afeta diretamente os índices
49 produtivos (STOJCIC *et al.*, 2016), podendo ser utilizadas em vários ciclos de
50 produção seguindo-se um manejo adequado (WANG *et al.*, 2016). Espera-se que a
51 cama absorva a umidade dos materiais orgânicos que se misturem a ela, crie um
52 isolamento térmico e sirva como proteção física a fim de evitar lesões podais
53 (CAMPOS *et al.*, 2018; CARVALHO *et al.*, 2011).

54 Todo material orgânico da cama, especialmente as excretas das aves, são
55 responsáveis pelas mudanças físico-químicas da cama, resultando na produção de
56 gás amônia (NH₃) (DAVIS e MORISHITA, 2005). O NH₃ é considerado o maior
57 poluente atmosférico da avicultura (YI *et al.*, 2016), capaz de causar lesões em seres
58 humanos (DAVIS *et al.*, 2015; IVERSEN *et al.*, 2000; SCHIFFMAN, 1998) e nas aves,
59 principalmente no sistema respiratório (AL-MASHHADANI e BECK, 1985;
60 ANDERSON *et al.*, 1964; ANSARI *et al.*, 2016).

61 As principais lesões descritas são excesso de muco em traqueia, pulmões
62 edematosos, inflamados e com pontos hemorrágicos (AL-MASHHADANI e BECK,
63 1985; ANDERSON *et al.*, 1964; ANSARI *et al.*, 2016). Entretanto as alterações
64 histológicas são poucas vezes descritas, sendo relatado perda de cílios, aumento do

65 número de células caliciformes, inflamação em lâmina própria e edema em
66 submucosa (AL-MASHHADANI e BECK, 1985; OYETUNDE et al., 1978; ZHOU *et al.*,
67 2021). Entretanto, ainda não há uma análise histomorfológica dessas traqueias.

68 Há ainda outros fatores que influenciam diretamente o bem-estar dessas aves,
69 como o estresse térmico. O estresse térmico ocorre quando o animal não consegue
70 dissipar calor suficiente para o meio ambiente, isso pode ocorrer por diversos fatores,
71 dentre os quais, a elevação de temperatura ambiente (RATH *et al.*, 2015). Associa-se
72 ao estresse térmico alterações gastrointestinais e imunológicas (RATH, *et al.*, 2015),
73 porém, não há relatos associando a temperatura ambiente elevada a lesões em
74 sistema respiratório.

75 Desta forma, objetivou-se avaliar as lesões histopatológicas e a
76 histomorfometria em traqueias de frangos, submetidos a diferentes níveis de NH₃ e
77 temperaturas ambientes diversas.

78 **Material e métodos**

79 **Local e amostragem**

80 O experimento foi realizado na cidade de Garanhuns-PE, onde existem relatos
81 de problemas com o gás amônia proveniente da cama, provocando lesões nos frangos
82 de corte, sendo conduzido sob os termos e condições dos Princípios Éticos da
83 Experimentação Animal, do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal
84 (CONCEA) aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade
85 Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), com número de licença 136/2018. O clima
86 dessa região é classificado como Aw (clima tropical com chuvas de verão) na
87 classificação de Köppen- Geiger.

88 O experimento foi realizado entre os meses de fevereiro e março, época do ano
89 com temperatura ambiental elevada (entre 33,6°C e 18,2°C com umidade mínima

90 absoluta 30 a 31%) com repetição entre junho e agosto de 2019, em época de
91 temperaturas mais amenas (entre 25,1°C e 14,5°C com umidade mínima absoluta 44
92 a 56%) (APAC, 2019abcde).

93 Foram utilizados três galpões, que mediam 2m x 2m, todos com orientação
94 Leste-Oeste, não climatizados. A cama de escolha foi a palha de arroz, por ser um
95 dos tipos mais amplamente utilizado no Nordeste brasileiro. No galpão 1, foi utilizada
96 cama nova de palha de arroz sem aditivos; no galpão 2 foi reutilizada cama de palha
97 de arroz já fermentada proveniente de galpões da própria granja após um ciclo de
98 produção; já no galpão 3 foi utilizada a mesma cama do galpão 2, a qual era
99 umedecida diariamente com pulverização de sete litros de água.

100 Foram utilizados um total de 182 pintos da linhagem Ross, sendo 91 aves por
101 cada estação do ano, divididas em três galpões com 28 animais cada. Cada galpão
102 foi considerado um grupo experimental, sendo eles G1, G2 e G3 as aves criadas nos
103 três galpões na época quente e G4, G5 e G6 as aves criadas na época de
104 temperaturas amenas. Para cada momento experimental o grupo controle era
105 composto por sete aves de zero dia, formando os grupos Gx (ciclo de produção entre
106 fevereiro e março) e Gy (ciclo de produção entre junho e agosto). A densidade de
107 aves no galpão de alojamento foi de no máximo 11 aves/m², para todos os galpões,
108 que é considerada ideal para a linhagem utilizada, de acordo com o Manual de Manejo
109 de Frangos Ross (2014). Essas aves foram criadas em um ciclo de produção de 42
110 dias.

111 Todas as aves foram pesadas em balança digital SF 400 – Global Home®),
112 para o acompanhamento do seu desenvolvimento. Aves foram eutanasiadas de
113 acordo com a Resolução Normativa Nº 37/2018 – Diretrizes da Prática de Eutanásia
114 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), nos dias 0,

115 7, 21, 35 e 42 (D0, D7, D21, D35 e D42). No D0 foram eutanasiadas sete aves, para
116 compor o grupo controle e nos demais dias, D7, D21, D35 e D42, eram eutanasiadas
117 sete aves por grupo.

118 **Avaliação histológica e histomorfométrica**

119 Em todos os tempos pré-determinados foram coletadas amostras de duas
120 regiões da traqueia (porção superior e porção inferior) e então, acondicionadas em
121 potes plásticos com solução de formalina a 10% tamponada (pH 7). Após 24h, as
122 amostras foram transferidas para o álcool a 70%, dando início ao processamento
123 histológico no Laboratório de Histologia Animal do Departamento de Morfologia e
124 Fisiologia Animal (DMFA).

125 Todas as amostras foram processadas por técnica histológica de rotina
126 (ROCHA et al., 2016), onde foram desidratadas em concentrações crescentes de
127 álcool, diafanizadas em xilol, impregnadas e emblocadas em parafina. Os blocos
128 foram cortados a 3 μ m, e em seguida, as lâminas foram coradas em hematoxilina e
129 eosina para posterior análise em microscópio óptico trinocular LEICA DM500.

130 Para análise histomorfométrica da mucosa traqueal foi utilizado o protocolo de
131 Nunes et al. (2002), sendo as lâminas observadas e fotografadas em objetiva de 4x
132 em um microscópio óptico trinocular LEICA DM500 acoplado a uma câmera digital
133 LEICA ICC50 HD®, sendo a imagem captura por meio do software Leica LAS EZ®
134 (Leica Microsystems, Buffalo Grove, USA). As mensurações da espessura da mucosa
135 traqueal, foram realizadas em imagens digitais, por meio de dez diferentes pontos
136 equidistantes 100 μ m entre si, utilizando o software Image J®. O programa foi calibrado
137 utilizando uma fotomicrografia no mesmo aumento (4x) e uma régua micrométrica de

138 0,01 mm LEICA (50 mm – Referência 10310345), na qual 69 pixels equivalem a 100
139 micrômetros.

140 Para avaliação histopatológica da traqueia, foram observadas lesões como
141 hiperemia, congestão, hemorragia, metaplasia escamosa, achatamento epitelial,
142 desprendimento de epitélio, necrose de epitélio, hiperplasia e hipertrofia de glândulas
143 mucosas, depleção de glândulas mucosas, desciliação, traqueíte e fibroplasia. Para
144 classificação das lesões quanto a sua distribuição e grau de intensidade, foi adotado
145 o protocolo de Sesti et al. (2013) com adaptações (Tabela 1).

146 Para fins de monitoramento do gás amônia, foram realizadas três aferições
147 diárias, em três turnos (início da manhã, por volta das 6h, início da tarde, por volta das
148 12h e início da noite, por volta das 18h). Para isso utilizou-se um detector de gás
149 amônia (Ammonia Gas Detector - Smart sensor, modelo: SSEYL AR8500), que
150 fornece leituras simultâneas dos níveis de amônia em ppm e da temperatura ambiente
151 em °C.

152 Tabela 1 - Avaliação das lesões histopatológicas quanto a distribuição e intensidade
153 por meio de escore.

| Categoria | Escore | Significado |
|--------------|--------|--------------------------|
| Distribuição | 0 | Ausente |
| | 1 | Focal |
| | 2 | Focalmente extensa |
| | 3 | Multifocal |
| | 4 | Multifocal a coalescente |
| | 5 | Difusa |
| Intensidade | 0 | Ausente |
| | 1 | Discreta |
| | 2 | Moderada |
| | 3 | Acentuada |

154 Fonte: Adaptado de Sesti *et al.* (2003).

155 **Análise estatística**

156 Para todas as análises estatísticas foi utilizado o software comercial GraphPad
157 Prism (versão 7.0). Para a variável espessura da mucosa traqueal foi aplicado o teste
158 paramétrico ANOVA. Já as lesões histopatológicas foram analisadas utilizando o teste
159 não paramétrico de Kruskal-Wallis, adotando-se nível de significância de 5%. Para
160 avaliação dos pesos das aves, foi empregado o teste de normalidade ANOVA e
161 posteriormente o teste t-student com significância de 5%.

162 **Resultados e discussão**

163 A influência da umidade da cama, neste trabalho, não elevou os níveis de
164 amônia como esperado (Figura 1), pois os valores encontrados nos grupos criados
165 com camas novas, foram bem próximos aos valores dos grupos criados com cama
166 reutilizada e umedecida. Isso não era esperado, uma vez que a liberação do gás
167 amônia depende de vários fatores, dentre eles a umidade da cama e a temperatura
168 ambiental, onde nos locais mais úmidos e frios haveria uma maior liberação desse
169 gás (ASTON *et al.*, 2019).

170 Figura 1

171 Fidan *et al.* (2020) também associam o aumento da umidade com o aumento
172 de NH₃, porém, eles adicionam outro fator na liberação desse gás, a espessura da
173 cama. Em cama com espessura de 1cm, houve piora na sua qualidade e aumento de
174 umidade e NH₃. Nesse estudo, todas as camas tinham espessuras semelhantes,
175 aproximadamente 15cm, tamanho que Fidan *et al.* (2020) afirmam gerar uma redução
176 da amônia atmosférica, o que também pode ter colaborado para os valores reduzidos
177 encontrados.

178 Elliotts e Collins (1982) em seu experimento evidenciaram que na primeira
179 semana de criação dos frangos, o aumento de umidade da cama gerou uma redução

180 nos níveis de NH_3 , já nas semanas seguintes ocorreu efeito inverso. O desfecho desse
181 experimento vai de encontro ao que foi evidenciado nesse trabalho, em que os níveis
182 de gás amônia permaneceram baixos. Os mesmos autores atribuem a redução de gás
183 amônia à uma maior diluição de NH_3 e apontam que como a produção desse gás
184 depende da atividade de bactérias aeróbicas, que em um ambiente de muita umidade
185 não conseguiriam desempenhar seu metabolismo, fazendo com que bactérias
186 anaeróbicas prevalecessem. Esse ambiente favorável as bactérias anaeróbicas, pode
187 ter perdurado por todo o ciclo produtivo neste estudo.

188 Miles *et al.* (2011) geraram uma equação capaz de estimar a quantidade de
189 gás amônia a ser volatilizado em uma produção de frangos de corte. Para chegar
190 nessa equação eles provaram que os fatores que mais influenciam são a temperatura
191 ambiente e a umidade da cama, quando esses dois elementos aumentam, o NH_3
192 também aumenta. Porém, há um determinado limite de umidade e temperatura em
193 que essa produção atinge seu limite máximo e após esse limite tende a diminuir. Isso
194 pode explicar o fenômeno visto nesse estudo, pois os grupos G2 e G5, nos quais as
195 aves eram criadas com cama aviária reutilizada, registraram maiores níveis de NH_3 ,
196 enquanto os grupos G3 e G6, nos quais a cama era umedecida, registram níveis
197 semelhante aos grupos G1 e G3, nos quais a cama era nova, estando de acordo com
198 Liu *et al.* (2007) que concluíram que em um determinado momento ponto o aumento
199 de umidade diminuiu a emissão de NH_3 .

200 Alguns autores já relataram lesões relacionadas à exposição ao NH_3 , tais como
201 metaplasia do epitélio da mucosa, hipertrofia da mucosa (OYETUNDE *et al.*, 1978),
202 desciliação (OYETUNDE *et al.*, 1978; SHI *et al.*, 2019; TERZICH *et al.*, 1998),
203 hipertrofia de glândulas mucosas (SHI *et al.*, 2019; TERZICH *et al.*, 1998; ZHOU *et*

204 *al.*, 2020), necrose, hemorragia e traqueite (TERZICH *et al.*, 1998; WANG *et al.*, 2020;
205 ZHOU *et al.*, 2020).

206 Neste trabalho, além das lesões já citadas, foram observadas também o
207 achatamento e desprendimento do epitélio da mucosa, fibroplasia, hemorragia e
208 hiperemia (associadas a processos inflamatórios), traqueite (com predominância de
209 linfócitos, histiócitos e plasmócitos, respectivamente), congestão (não associada a
210 infiltrados inflamatórios), perda de cílios, além de depleção e hipertrofia de glândulas
211 mucosas.

212 Essas lesões ocorreram por diversos mecanismos atrelados a ação do gás
213 amônia, esse gás é capaz de provocar instabilidade na microbiota da traqueia,
214 resultando em reações inflamatórias e até necrose de mucosa (ZHOU *et al.*, 2021).
215 Segundo Han *et al.* (2020) a amônia gera um estresse oxidativo nas células do epitélio
216 traqueal, com esse estresse ocorre uma disfunção mitocondrial que desencadeia a
217 morte celular por necroptose, uma morte celular mediada que irá provocar uma grande
218 reação inflamatória. Isso condiz com o achado de maior ocorrência que foi a traqueite,
219 porém não foram encontradas muitas áreas de morte celular. As demais lesões com
220 maior frequência foram hiperplasia de glândulas mucosas, metaplasia escamosa do
221 epitélio da mucosa e desciliação (Figura 2), porém sem diferença estatística entre as
222 porções superior e inferior da traqueia, nem entre os grupos ou entre os períodos do
223 ano.

224 Figura 2

225 Ainda assim, foi possível notar que a maior ocorrência de lesões neste órgão
226 foi no período de temperaturas amenas, corroborando com Aston *et al.* (2019). A maior
227 parte dessas lesões encontravam-se na porção superior da traqueia, o que já era

228 esperado, uma vez que o gás amônia tem boa solubilidade em água (AL-
 229 MASHHADANI e BECK, 1985; XING *et al.*, 2016), portanto sua concentração vai
 230 diminuindo a medida em que passa pelo trato respiratório, pois vai se misturando ao
 231 muco presente no trato respiratório superior (AL-MASHHADANI e BECK, 1985)
 232 (Tabela 2 e 3).

233 Tabela 2: Frequência absoluta das principais lesões em porção superior de traqueias
 234 de frangos de corte, submetidos a diferentes manejos de cama aviária em dois
 235 períodos do ano, um de temperaturas elevadas e um de temperaturas amenas.

| Lesão | G1 | G2 | G3 | Total TE | G4 | G5 | G6 | Total TA | Total geral |
|-------------|----|----|----|----------|----|----|----|----------|-------------|
| Desciliação | 1 | 1 | 0 | 2 | 5 | 1 | 0 | 6 | 8 |
| Hiperplasia | 4 | 8 | 7 | 19 | 14 | 9 | 10 | 33 | 52 |
| Metaplasia | 3 | 2 | 3 | 8 | 5 | 5 | 3 | 13 | 21 |
| Traqueíte | 16 | 12 | 12 | 40 | 22 | 9 | 14 | 45 | 85 |
| | 24 | 23 | 22 | 89 | 46 | 26 | 27 | 99 | 188 |

236 G1 – aves criadas com cama aviária nova em período de temperatura elevada; G2 – aves criadas com
 237 cama aviária reutilizada em período de temperatura elevada; G3 – aves criadas com cama aviária
 238 reutilizada e umedecida em período de temperatura elevada; G4 – aves criadas com cama aviária nova
 239 em período de temperatura amena; G5 – aves criadas com cama aviária reutilizada em período de
 240 temperatura amena; G6 – aves criadas com cama aviária reutilizada e umedecida em período de
 241 temperatura amena; TE – período de temperatura elevada; TA – período de temperatura amena.

242

243 Quanto a distribuição e escore de intensidade, não houve diferença estatística
 244 ($p > 0.05$) entre as porções superiores e inferiores das traqueias, tampouco entre os
 245 grupos e os diferentes períodos do ano. Em sua maioria as lesões tinham uma
 246 distribuição multifocal, variando quanto a intensidade, nesse caso as áreas de

247 desciliação eram sempre acentuadas, as demais lesões variaram entre leve e
248 moderada.

249 Tabela 3: Frequência absoluta das principais lesões em porção inferior de traqueias
250 de frangos de corte, submetidos a diferentes manejos de cama aviária em dois
251 períodos do ano, um de temperaturas elevadas e um de temperaturas amenas.

| Lesão | G1 | G2 | G3 | Total ciclo 1 | G4 | G5 | G6 | Total ciclo 2 | Total geral |
|-------------|----|----|----|---------------|----|----|----|---------------|-------------|
| Desciliação | 1 | 1 | 1 | 3 | 2 | 0 | 0 | 2 | 5 |
| Hiperplasia | 6 | 8 | 11 | 25 | 19 | 12 | 15 | 46 | 71 |
| Metaplasia | 0 | 1 | 1 | 2 | 5 | 2 | 3 | 10 | 12 |
| Traqueíte | 10 | 11 | 10 | 31 | 12 | 10 | 9 | 31 | 62 |
| | 17 | 21 | 23 | 61 | 38 | 24 | 27 | 89 | 150 |

252 G1 – aves criadas com cama aviária nova em período de temperatura elevada; G2 – aves criadas com
253 cama aviária reutilizada em período de temperatura elevada; G3 – aves criadas com cama aviária
254 reutilizada e umedecida em período de temperatura elevada; G4 – aves criadas com cama aviária nova
255 em período de temperatura amena; G5 – aves criadas com cama aviária reutilizada em período de
256 temperatura amena; G6 – aves criadas com cama aviária reutilizada e umedecida em período de
257 temperatura amena; TE – período de temperatura elevada; TA – período de temperatura amena.

258 Quanto a histomorfometria, no dia sete a espessura das traqueias de todos os
259 grupos foi semelhante (Figura 3-A), no dia 21 os grupos do período de temperaturas
260 amenas apresentam um pequeno aumento em relação ao período de temperaturas
261 elevadas, porém, sem diferença estatística ($p>0.05$) (Figura 3-B). Já nos dias 35 e 42
262 essa diferença se inverteu e a espessura das traqueias dos animais do período de
263 temperaturas elevadas passaram a ter medidas maiores que as dos animais do
264 período de temperaturas amenas (Figura 3-C e D), apresentando diferença estatística
265 ($p<0.05$).

266 Figura 3

267 O fato de a espessura de mucosa traqueal ter aumentado no fim do ciclo de
268 produção no período de temperaturas elevadas, não condiz com o esperado, pois foi
269 no período de temperaturas amenas que foram observadas maiores frequências de
270 metaplasia epitelial e traqueite. Ambas as alterações promovem o aumento da
271 mucosa traqueal (ELDEMERY *et al.*, 2017; TORO *et al.*, 2012), pois na metaplasia há
272 proliferação de células epiteliais e na traqueite há infiltrado de células inflamatórias.

273 Em conclusão, mesmo em diferentes níveis de NH₃ e diferentes condições
274 ambientais, não foi possível notar diferença significativa quanto às alterações
275 histopatológicas entre as aves dos diferentes grupos. Na histomorfometria verificamos
276 que no período de temperaturas elevadas, as mucosas traqueais apresentaram
277 maiores mensurações, já os diferentes níveis de amônia em um mesmo período do
278 ano, não demonstraram diferenças nas mensurações de mucosa traqueal.

279

280 Referências bibliográficas

- 281 ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório anual 2021**. p.1-75.
282 2021.
- 283 AL-MASHHADANI, E. H.; BECK, M. M. Effects of atmospheric ammonia on the surface
284 ultrastructure of the lung and trachea of broiler chicks. **Poultry Science**, n.64, p.2056
285 – 2061. 1985.
- 286 ANDERSON, D. P.; BEARD, C. W.; HANSON, R. P. The Adverse Effects of Ammonia
287 on Chickens Including Resistance to Infection with Newcastle Disease Virus **Avian**
288 **Diseases**, n.8, v. 1, p. 369 – 379. 1964.
- 289 ANSARI, A. R.; GE, X.; HUANG, H.; HUANG, X.; ZHAO, X.; PENG, K.; ZHANG, J.;
290 LIU, H. Effects of lipopolysaccharide on the histomorphology and expression of toll like
291 receptor 4 in the chicken trachea and lung. **Avian Pathology**, n.45, v.5, p. 530 – 537.
292 2016.
- 293 ASTON, E.J., JACKWOOD, M.W., GOGAL, R.M., HURLEY, D.J., FAIRCHILD, B.D.,
294 HILT, D.A., CHENG, S., TENSA, L.R., GARCIA, M. e JORDAN, B.J. Ambient ammonia
295 does not appear to inhibit the immune response to infectious bronchitis virus
296 vaccination and protection from homologous challenge in broiler chickens.
297 **Veterinary immunology and immunopathology**, n. 109932, v. 217. 2019.
- 298 CAMPOS M.F.F.S., TEÓFILO T.S., CHAVES D.P., SANTOS A.C.G., LOPES B.C.A.,
299 BEZERRA N.P.C. e TORRES M.A.O. Identificação parasitológica da cama de frango

- 300 reutilizada em uma granja avícola. **Revista Brasileira Ciência Veterinária**, v. 25, n.
301 1, p. 27-30, jan./mar. 2018.
- 302 CARVALHO, T. M. R.; MOURA, D. J.; SOUZA, Z. M.; SOUZA, G. S.; BUENO, L. G. F.
303 Qualidade da cama e do ar em diferentes condições de alojamento de frangos de
304 corte. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, n.4, v.46, p. 351 – 361. 2011.
- 305 DAVID, B.; MEJDELL, C.; MICHEL, V.; LUND, V.; MOE, R. O. Air quality in alternative
306 housing systems may have na impact on laying henwelfare. Part II—ammonia.
307 **Animals**, n.5, p. 886 – 896. 2015.
- 308 DAVIS, M.; MORISHITA, T. Y. Relative ammonia concentrations, dust concentrations,
309 and presence of salmonella species and escherichia coli inside and outside
310 commercial layer facilities. **Avian Diseases**, n.49, p. 30 – 35, 2005.
- 311 ELDEMERY, F., JOINER, K.S., TORO, H. e van SANTEN, V.L. Protection against
312 infectious bronchitis virus by spike ectodomain subunit vaccine. **Vaccine**, n. 35, p.
313 5864-5871. 2017.
- 314 ELLIOTT, H. A.; COLLINS, N. E. Factors affecting ammonia release in broiler houses.
315 **Transactions of the ASAE**, n.25, v.2, p. 0413 – 0418. 1982.
- 316 FIDAN, E.D., KAYA, M., NAZLIGUL, A. e TURKYILMAZ, M.K. The effects of perch
317 cooling on behavior, welfare criteria, performance, and litter quality of broilers reared
318 at high temperatures with different litter thicknesses. **Brazilian journal of poultry
319 science**, v.22, n. 3, p. 001-012. 2020.
- 320 HAN, Q., ZHANG, J., SUN, Q., XU Y. e TENG, X. Oxidative stress and mitochondrial
321 dysfunction involved in ammonia-induced nephrocyte necroptosis in chickens.
322 **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 203, n. 110974, p. 1-9. 2020.
- 323 IVERSEN, M.; KIRYCHUK, S.; DROST, H.; JACOBSON, L. Human health effects of
324 dust exposure in animal confinement buildings. **Journal of agricultural safety and
325 health**, n.6, v.4, p. 283 – 288. 2000.
- 326 LIU, Z., WANG, L., BEASLEY, D. e OVIEDO, E. Effect of moisture content on ammonia
327 emissions from broiler litter: A laboratory study. **Journal of atmospheric chemistry**,
328 v. 58, p. 41-53. 2007.
- 329 MILES, D.M., ROWE, D.E. e CATHCART, T.C. High litter moisture content suppresses
330 litter ammonia volatilization. **Poultry science**, v. 90, p. 1397-1405. 2011.
- 331 NUNES J.E.S., VASCONCELOS A.C., JORGE M.A., GUIMARÃES E.B., PAIXÃO
332 T.A., MARTINS N.R.S. e RESENDE J.S. Estudo comparativo da virulência de
333 amostras de vacina do vírus da doença de Newcastle em galinhas SPF por meio da
334 análise morfométrica da espessura traqueal. **Arquivo Brasileiro de Medicina
335 Veterinária e Zootecnia**, v.54 p.335-339. 2002.
- 336 OYETUNDE, O. O. F.; THOMSON, R. G.; CARLSON, H. C. Aerosol exposure of
337 ammonia, dust and *Escherichia coli* in broiler chickens. **Canadian veterinary
338 journal**, n.19, p. 187 -193. 1978.
- 339 RATH, P.K.; BEHURA, N.C.; SAHOO, S.P.; PANDA, P.; MANDAL, K.D. e
340 PANIGRAHI, P.N. Amelioration of Heat Stress for Poultry Welfare: A Strategic
341 Approach. **International journal of livestock research**, v.5, n.3, p.1-9. 2015.
- 342 ROCHA. P.M.C.; BARROS, M.E.G. e EVÊNCIO-NETO, J. Análise morfométrica da
343 parede intestinal e dinâmica de mucinas secretadas no jejuno de frangos

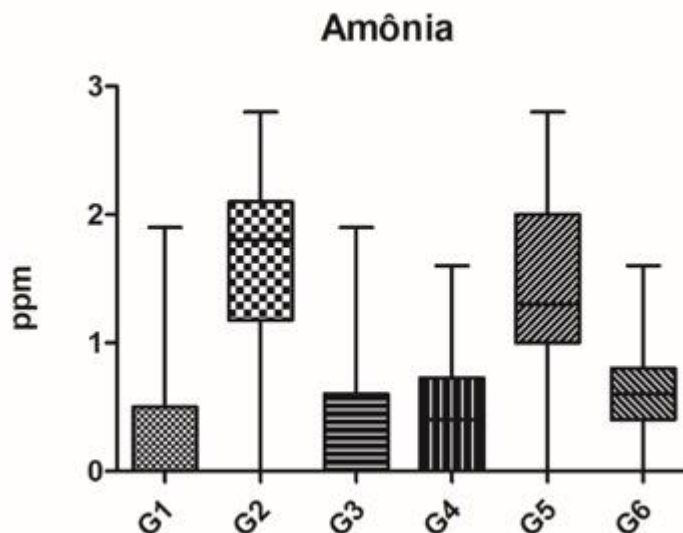
- 344 suplementados com probiótico *Bacillus subtilis* cepa C3102¹. **Pesquisa veterinária**
345 **brasileira**, v.36, n.4, p.312-316. 2016.
- 346 SCHIFFMAN, S. S. Livestock odors: implications for human health and well-being.
347 **Journal of animal Science**, n.76, p. 1343 – 1355. 1998.
- 348 SESTI L., KNEIPP C., PARANHOS R., PAULET P., CABAZAN C. Field safety and
349 efficacy of vector Marek's/Newcastle Disease Vaccine (r-HVT-NDV) as assessed by
350 clinical and productive performance in a large population of commercial broilers. *In*:
351 WESTERN POULTRY DISEASE CONFERENCE (WPDC), Sacramento, California.
352 **Anais [...]**. 2013. p.19-22.
- 353 SHI, Q., WANG, W., CHEN M., ZHANG, H. e XU, S. Ammonia induces Treg/Th1
354 imbalance with triggered NF- κ B pathway leading to chicken respiratory inflammation
355 response. **Science of the total environment**, v. 659, p. 354-362. 2019.
- 356 STOJCIC, M. D.; BJEDOV, S.; ZIKIC, D.; PERIC, L.; MILOSEVIC, N. Effect of straw
357 size and microbial amendment of litter on certain litter quality parameters, ammonia
358 emission, and footpad dermatitis in broilers. **Archives animal breeding**, n. 59, p. 131
359 – 137. 2016.
- 360 TERZICH, M., QUARLES, C., GOODWIN, M.A. e BROWN J. Effect of Poultry Litter
361 Treatment[®] (PLT[®]) on the development of respiratory tract lesions in broilers. **Avian**
362 **pathology**, v. 27, n. 6, p. 566-569. 1998.
- 363 TORO, H., PENNINGTON, D., GALLARDO, R.A., van SANTEN, V.L., van GINKEL,
364 F.W., ZHANG, J. e JOINER, K.S. Infectious Bronchitis Virus Subpopulations in
365 Vaccinated Chickens After Challenge. **Avian diseases**, v. 56, p. 501-508. 2012.
- 366 WANG, L., LIBURN, M. e YU, Z. Intestinal microbiota of broiler chickens as affected
367 by litter management regimens. **Frontiers in microbiology**, v. 7, n. 593, p. 1-12. 2016.
- 368 WANG L., SHI X., ZHENG S. e XU S. Selenium deficiency exacerbates LPS-induced
369 necroptosis by regulating miR-16-5p targeting PI3K in chicken tracheal tissue.
370 **Metallomics**, n. 12, p. 562-571. 2020.
- 371 XING, H., LUAN, S., SUN, Y., AS, R. e ZHANG, H. Effects of ammonia exposure on
372 carcass traits and fatty acid composition of broiler meat. **Animal nutrition**, v. 2, p. 282-
373 287. 2016.
- 374 YI B., CHEN L., AS R., ZHONG R., XING H. e ZHANG H. Transcriptome Profile
375 Analysis of Breast Muscle Tissues from High or Low Levels of Atmospheric Ammonia
376 Exposed Broilers (*Gallus gallus*). **PLoS ONE**, v.11, n.9, p.1-15. 2016.
- 377 ZHOU, Y., LIU, Q.X., LI, X.M., MA, D.D., XING, S., FENG, J.H. e ZHANG, M.H. Effects
378 of ammonia exposure on growth performance and cytokines in the serum, trachea, and
379 ileum of broilers. **Poultry Science**, v. 99, p. 2485-2493. 2020.
- 380 ZHOU, Y., ZHANG, M., LIU, Q. e FENG, J. The alterations of tracheal microbiota and
381 inflammation caused by different levels of ammonia exposure in broiler chickens.
382 **Poultry Science**, n. 100, p. 685-696. 2021.

Influência do gás amônia quanto a histomorfometria e histopatologia de traqueias de frangos de corte

Jéssica de Torres Bandeira, Tatiane Bandeira da Silva; Bruno César Azevedo Brito; Renato Souto Maior Muniz de Moraes; Maria Edna Gomes Barros; Priscilla Maria Cavalcante Rocha; Francisco de Assis Leite Souza; Joaquim Evêncio-Neto.

Local no corpo do texto – linha 170

Figura 1: Níveis de amônia (ppm) mensurados nos diferentes manejos de cama aviária, em duas épocas do ano, de temperatura mais elevada e de temperatura amena. Cada padrão representa um grupo experimental, sendo eles: G1 e G4 – aves criadas em galpão com cama aviária nova; G2 e G5 – aves criadas em galpão com cama aviária reutilizada; G3 e G6 – aves criadas em galpão com cama reutilizada e umedecida. Os grupos G1, G2 e G3 foram criados em período do ano com temperaturas elevadas e os grupos G4, G5 e G6 foram criados em período do ano com temperaturas amenas.

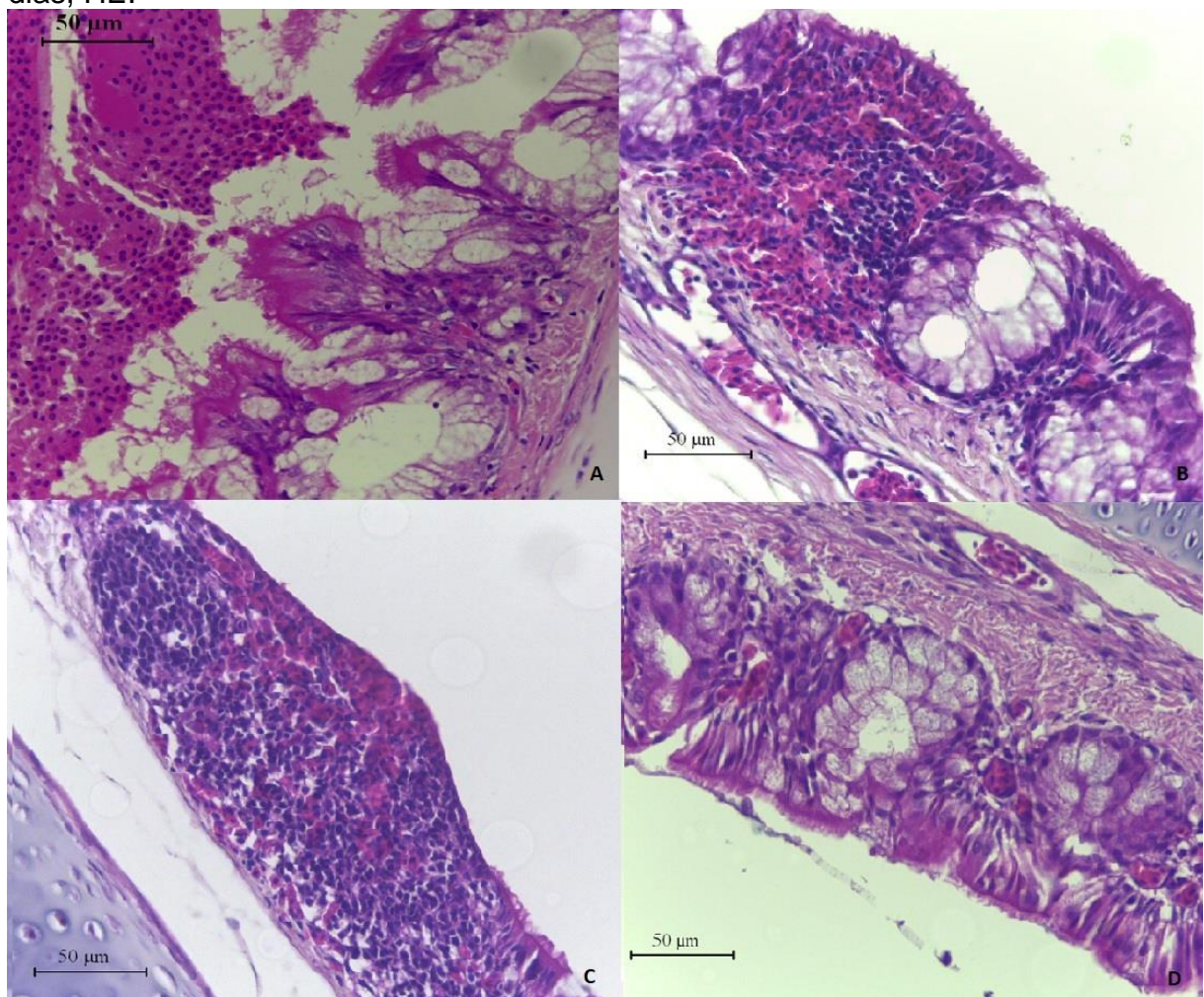


Influência do gás amônia quanto a histomorfometria e histopatologia de traqueias de frangos de corte

Jéssica de Torres Bandeira, Tatiane Bandeira da Silva; Bruno César Azevedo Brito; Renato Souto Maior Muniz de Moraes; Maria Edna Gomes Barros; Priscilla Maria Cavalcante Rocha; Francisco de Assis Leite Souza; Joaquim Evêncio-Neto.

Local no corpo do texto – linha 224

Figura 2: Fotomicrografia de traqueia de frango de corte. A – Desprendimento de epitélio da mucosa e áreas de depleção e hipertrofia de glândulas mucosas de frango criado em galpão com cama aviária nova, em época de temperaturas elevadas aos 42 dias, HE. B – Traqueíte com hemorragia e hiperemia em mucosa traqueal de frango criado em galpão com cama aviária nova, em época de temperaturas elevadas aos 35 dias, HE. C – Traqueíte com hemorragia e perda de cílios em mucosa traqueal de frango criado em galpão com cama aviária nova, em época de temperaturas elevadas aos 35 dias, HE. D – Congestão em mucosa traqueal de frango criado em galpão com cama aviária reutilizada e umedecida, em época de temperaturas elevadas aos 21 dias, HE.

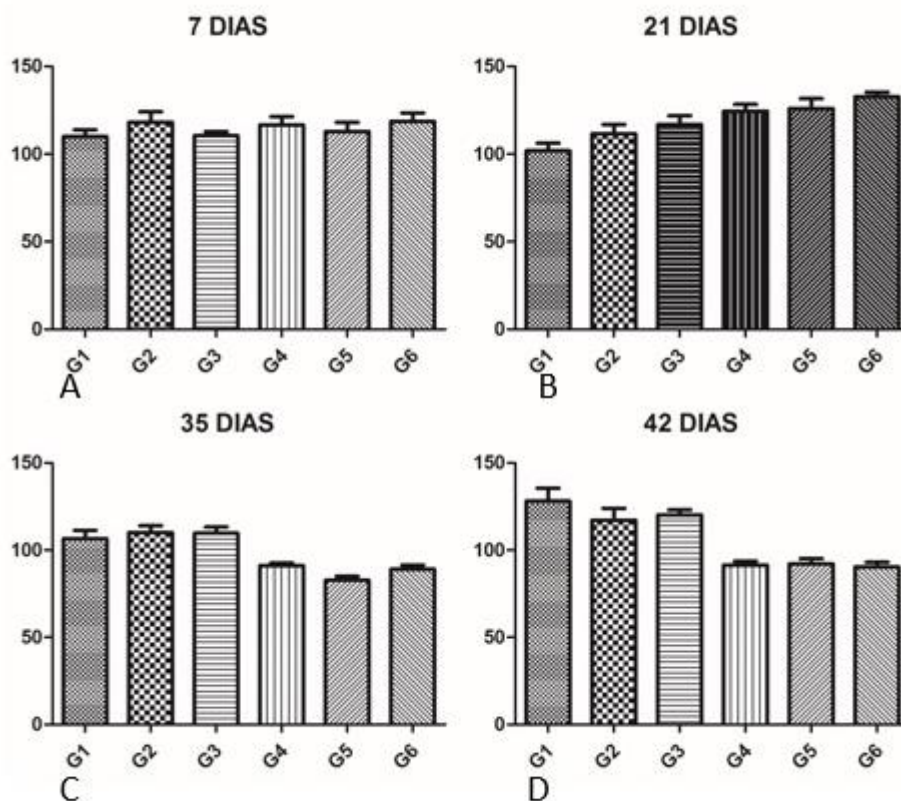


Influência do gás amônia quanto a histomorfometria e histopatologia de traqueias de frangos de corte

Jéssica de Torres Bandeira, Tatiane Bandeira da Silva; Bruno César Azevedo Brito; Renato Souto Maior Muniz de Moraes; Maria Edna Gomes Barros; Priscilla Maria Cavalcante Rocha; Francisco de Assis Leite Souza; Joaquim Evêncio-Neto.

Local no corpo do texto – linha 266

Figura 3: Análise histomorfométrica da mucosa traqueal de frangos de corte aos 7, 21, 35 e 42 dias de vida, criados em diferentes manejos de cama aviária. Cada padrão representa um grupo experimental, sendo eles: G1 e G4 – aves criadas em galpão com cama aviária nova; G2 e G5 – aves criadas em galpão com cama aviária reutilizada; G3 e G6 – aves criadas em galpão com cama reutilizada e umedecida. Os grupos G1, G2 e G3 foram criados em período do ano com temperaturas elevadas e os grupos G4, G5 e G6 foram criados em período do ano com temperaturas amenas. Apenas nos dias 35 e 42 foram encontradas diferenças na espessura de mucosa traqueal das aves, entre os períodos do ano ($p>0.05$).



Anexo 4 – Normas da Revista Brasileira de Ciência Avícola

Layout do Manuscrito

1. Formato: cada manuscrito original deve ser devidamente identificado pelo título e nome(s) do(s) autor(es). A fonte utilizada deve ser Arial (tamanhos de fonte: 16pt para o título, 14pt para os subtítulos no corpo do texto e 12pt para o corpo do texto), em espaçamento duplo e em papel A4 (21,0 x 29,7cm) com margens de 1,5 cm. As linhas e páginas devem ser numeradas consecutivamente. O manuscrito deve ser salvo em .doc (Microsoft Word ou editor de texto compatível). Somente nomenclaturas oficiais e reconhecidas serão aceitas. Abreviações não devem ser utilizadas no título.

2. folha de rosto: todos os manuscritos devem ter uma folha de rosto com o título, o(s) nome(s) completo(s) do(s) autor(es) e a instituição de origem. Uma nota de rodapé com o endereço para correspondência completo e o email do autor a quem principal deve ser incluída nesta página.

3. Tabelas: as tabelas devem ser numeradas consecutivamente em números indo-arábicos e devem ter um título descritivo. Todas as explicações devem ser dadas em uma legenda imediatamente abaixo da figura. Todas as abreviações que apareçam na tabela devem ser explicadas nesta legenda, mesmo que sejam também explicadas no corpo do texto. As tabelas devem poder ser compreendidas sem qualquer referência ao corpo do texto.

4. Ilustrações (fotografias, gráficos e desenhos): as ilustrações devem ser numeradas consecutivamente em números indo-arábicos e devem ser enviadas no mesmo documento (arquivo) mas em páginas separadas, que devem também trazer o nome do artigo, o(s) nome(s) do(s) autor(es) e a indicação do local no corpo do texto onde a ilustração deve aparecer. Fotografias, figuras e material escaneado devem ser enviados em alta resolução (no mínimo 600 dpi) e no formato .tif ou .jpg. As figuras serão publicadas em preto e branco. Um acordo em relação aos custos da impressão colorida deve ser firmado caso o autor deseje publicar as ilustrações coloridas.

5. Unidades: o Sistema Internacional de Unidades (SI) deve ser usado para medidas e abreviações.

6. Referências: as referências devem aparecer em ordem alfabética de acordo com o sobrenome do autor. A lista completa de referências deve ser mencionada. Todos os autores de cada artigo devem ser citados.

Exemplos:

Bakst MR, Gupta K, Akuffo V. Comparative development of the turkey and chicken embryo from cleavage through hypoblast formation. *Poultry Science* 1997; 76(1):83-90.

Bouzoubaa K, Nagaraja KV. Epidemiological studies on the incidence of salmonellosis in chicken breeder/hatchery operations in Marocco. In: Snoeyenbos GH, editor. *Proceedings of the International Symposium on Salmonella*; 1984; Kenneth Square, PA: American Association Avian Pathologists; 1985. p.337.

Briceno WNO, Guimarães FCR, Cruz FGG. Efeitos da densidade populacional de frangos de corte em época quente no município de Manaus. In: 10o Congresso Brasileiro de Avicultura; 1987; Natal, Rio Grande do Norte. Brasil. p. 131-2.

Gabriel JE. Efeitos do nível energético da ração e do estresse térmico na expressão da proteína de choque térmico Hsp70 e nos níveis do seu mRNA no fígado de frangos de corte em diferentes estágios de desenvolvimento. [Dissertation]. Jaboticabal (SP): Universidade Estadual Paulista; 1996.

Ginsburg M. Primordial germ cell development in avians. *Poultry Science* 1997; 76(1):91-5.

Simon VA, Oliveira C. Vacinação em avicultura através da água de bebida. In: Macari M, editor. *Água na avicultura industrial*. Jaboticabal: Funep-Unesp; 1996. p. 73-85.

Summers JD, Leeson S. *Commercial poultry nutrition*. 2 ed. New York; N.Y / State Manual Book & Periodical Services; 1997.

7. Citações no corpo do texto: o sobrenome do autor deve ser seguido pelo ano em parênteses. No caso de dois autores, os dois sobrenomes devem aparecer. No caso de mais de dois autores, a citação deve ser feita usando-se o sobrenome do primeiro autor seguido pela expressão et al.(em itálico).

Exemplos:

Simon (1996)

Silva & Silva (1988)

Briceno et al. (1987)

8. nomes científicos de microorganismos: seguir as recomendações do Berg's Manual