

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

AVALIAÇÃO DA PERDA LINFOCITÁRIA DO TIMO DE FRANGOS DE CORTE
UTILIZANDO SISTEMA DE ANÁLISE DIGITAL DE DEPLEÇÃO LINFÓIDE
(ADDL)

Autor: Daiane Carvalho

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na especialidade de Sanidade Avícola

Orientador: Carlos Tadeu Pippi Salle

PORTO ALEGRE

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

AVALIAÇÃO DA PERDA LINFOCITÁRIA DO TIMO DE FRANGOS DE CORTE
UTILIZANDO SISTEMA DE ANÁLISE DIGITAL DE DEPLEÇÃO LINFÓIDE (ADDL)

Autor: Daiane Carvalho

Dissertação apresentada como requisito
parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Veterinárias na
especialidade de Sanidade Avícola

Orientador: Carlos Tadeu Pippi Salle

PORTO ALEGRE

2013

Daiane Carvalho

Avaliação da Perda Linfocitária do Timo de Frangos de Corte Utilizando Sistema de Análise de Depleção Linfóide (ADDL)

Aprovada em 19 ABRIL 2013

APROVADO POR:

Prof. Dr. Carlos Tadeu Pippi Salle
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Hamilton Luiz de Souza Moraes
Membro da Comissão

Dr. Lucas Brunelli de Moraes
Membro da Comissão

Prof. Dr. Luiz Cesar Bello Fallavena
Membro da Comissão

Dedico este trabalho aos meus pais,
Maria e Alcides, por todo o apoio e
amor incondicionais dedicados a
mim!

Meu muito obrigada!

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da vida e por todas as oportunidades que me trouxeram até aqui. À minha família, em especial aos meus pais, Maria e Alcides, por estarem comigo a cada passo dado, compartilhando sonhos e vitórias. Não foi fácil chegar até onde cheguei e, certamente, tudo o que conquistei até hoje devo a vocês. Estejam certos de que nunca irei decepcioná-los!

Ao meu orientador, Professor Carlos Tadeu Pippi Salle, por todos os ensinamentos e pela confiança depositada!

Ao professor Hamilton Luiz de Souza Moraes e toda a família CDPA: estagiários, funcionários, colegas de mestrado e doutorandos. Foi um enorme prazer ter convivido com cada um de vocês.

Aos meus maninhos do coração: Gabi, Gustavo e Thiago. Com certeza se houveram pessoas que marcaram minha vida, posso dizer que essas foram vocês. Vão deixar muitas saudades aqueles almoços de domingo, as mateadas e as risadas. Não tenho palavras que possam expressar meu carinho e amizade. Minha vida gaúcha jamais seria a mesma sem vocês. Agradeço todos os dias a Deus por ter colocado amigos assim em meu caminho.

Lucas, creio que tudo o que eu fale em agradecimento a você seja pouco perto do que foi sua contribuição no desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada também pela amizade e pelos conhecimentos repassados. Valeu Xananai!!

À toda equipe dos laboratórios de Patologia e de Saúde das Aves do IPVDF, pela cessão do espaço físico para execução de parte do estudo.

À UFRGS e ao programa de pós-graduação da faculdade de veterinária pela oportunidade!

À CAPES pelo auxílio financeiro ao longo desses 24 meses!

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para conclusão de mais esta etapa.

**“Medicina é a arte da incerteza
e a ciência da probabilidade”**

William Osler

RESUMO

O timo é um dos órgãos linfóides mais acometidos pelas patologias imunodepressoras, o qual geralmente é avaliado quanto ao grau de perda linfocitária a partir de técnicas histológicas subjetivas. Este trabalho teve como propósito a adaptação e aplicação do sistema ADDL (Análise Digital de Depleção Linfóide) em timos, a fim de tornar sua análise mais precisa. Primeiramente, realizou-se um estudo piloto, no qual foram utilizadas amostras de timo do trabalho desenvolvido por Camillotti (2011), porém constatou-se um número insatisfatório de lobos tímicos para os três escores de depleção linfocitária adotados, assim como dificuldade na categorização com apenas 3 graus de lesão. Optou-se, então, pela indução de imunodepressão através da utilização de um glicocorticóide, e pela classificação dos timos em cinco escores (1 a 5). Para tanto, foram utilizados 70 aves de um dia de idade, sendo que aos 21 dias de idade, foram separadas 15 aves para composição do grupo controle e 55 para o grupo tratado. Foi empregado o protocolo de tratamento com dexametasona adaptado de Kong, *et al.* (2002). Durante as coletas, de cada uma das aves, ambas as cadeias tímicas eram pesadas, sendo selecionados seis lobos para o processamento histológico de rotina, análise quanto ao grau de depleção linfocitária por dois avaliadores (A e B) e submissão a todas as etapas de processamento pelo sistema ADDL. Foram construídas ao final, cinco RNAs (Redes Neurais Artificiais): duas tendo em vista o escore por lobo (escore do avaliador A; escore do avaliador B) e três considerando o escore por ave (moda dos escores de 6 lobos/ave do avaliador A; moda dos escores de 6 lobos/ave do avaliador B, moda conjunta dos escores dos avaliadores A + B). A fim de relacionar o peso relativo (PR) do timo ao escore digital de depleção, foi aplicado o teste de correlação de Spearman, seguido de análise de regressão, e para evidenciar diferenças entre os escores atribuídos pelos avaliadores, utilizou o teste de Wilcoxon-Mann-Whitney. Constatou-se que o tratamento com dexametasona permitiu a aquisição de timos com escores entre 1 a 5. Houve diferença significativa entre as leituras realizadas pelos avaliadores considerando o lobo e também entre a moda de escores dos dois avaliadores, assim como entre a moda do avaliador B e a moda conjunta ($p < 0,005$). Foi observado que as duas RNAs construídas por lobo obtiveram um percentual de 50% de classificações corretas. As RNAs construídas utilizando a moda mostraram um percentual de acerto de 86,57% para o avaliador A, 80,60% para avaliador B e 94,03% para a rede construída a partir da moda conjunta dos avaliadores. Paralelamente, observou-se $r = -0,77$ e $R^2 = 0,58$ entre as variáveis “PR” e “Escore digital de depleção linfocitária”. Em conclusão, foi possível a aplicação do sistema ADDL para timos, sendo a RNA treinada com a moda conjunta dos escores dos avaliadores A e B, o modelo que alcançou melhor desempenho. Portanto, o uso de ferramentas de análise de imagem em conjunto com as RNAs, torna possível uma avaliação do sistema imune da ave adotando critérios objetivos para as análises histológicas quanto a perda linfocitária.

Palavras-chave: frangos de corte; timo; depleção linfocitária; sistema ADDL

ABSTRACT

The thymus is a lymphoid organs most affected by immunosuppressive diseases, which is usually assessed on the degree of lymphocyte loss from subjective histological techniques. This work aimed to the adaptation and application of the system DALD (Digital Analysis of Lymphoid Depletion) in the thymus in order to make your analysis more accurate. First, a pilot study was performed, in which samples from the thymus of the work of Camillotti (2011) were used, but it was found a number of poor thymic lobes for the three scores lymphocyte depletion adopted, as well as difficulty with categorization only three degrees of injury. It was decided, therefore, by inducing immunosuppression by using a glucocorticoid, and the classification of the five scores thymus (1 to 5). Therefore, 70 birds a day old were used, and at 21 days of age, 15 birds were separated for composition of the control group and 55 in the treated group. A treatment protocol with dexamethasone adapted Kong et al. (2002) was performed. During collection, each of the birds, both chains thymus were weighed, and selected six lobes for histological processing, analysis of the degree of lymphocyte depletion by two raters (A and B) and submission to all stages of DALD processing by the system. At the end of five ANNs (Artificial Neural Networks) were built: two in view of the score by lobe (The score evaluator, the evaluator score B) and three taking the score per bird (mode scores of 6 lobes / bird evaluator The; mode scores of 6 lobes / bird evaluator B, trendy joint scores of evaluators A + B). In order to relate the relative weight (RW) of the thymus to score digital depletion the Spearman correlation test was used, followed by regression analysis, and to highlight differences between the scores assigned by the evaluators used the Wilcoxon- Mann-Whitney test. It was found that treatment with dexamethasone permitted the acquisition of thymus with scores ranging from 1 to 5. Significant difference between the readings made by the evaluators considering the lobe and also between mode scores of two raters, as well as between mode evaluator B and joint mode ($p < 0.005$). It was observed that the two ANNs constructed by lobe obtained a percentage of 50% correct classifications. ANNs built using the fashion shown a percentage of accuracy of 86.57% for the evaluator A, 80.60% to avaliator B and 94,03% for the network constructed from the trendy joint assessors. In parallel, it was noted $r = -0.77$, and $R^2 = 0.58$ between "RW" and "digital lymphoid depletion score". In conclusion, it was possible to apply the system to DALD sweetbreads, and the trained ANN with mode combined scores of raters A and B, the model achieved better performance. Therefore, the use of image analysis tools along with the ANNs makes possible an assessment of the bird's immune system adopting objective criteria for histological analyzes as the lymphocyte loss.

Key-words: broiler; thymus; lymphoid depletion; DALD system.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Sala experimental do IPVDF utilizada para alojamento das aves.....	30
Figura 2 -	Aplicação de dexametasona na musculatura do peito da ave.....	31
Figura 3 -	Coleta das duas cadeias tímicas da ave localizadas anatomicamente ao longo da região cervical.....	33
Figura 4 -	Produto da clivagem dos seis lobos tímicos em cápsulas histológicas devidamente identificados.....	34
Figura 5 -	Ausência de depleção linfocitária caracterizando um lobo tímico com escore óptico 1 (H&E,200X).....	35
Figura 6 -	Depleção linfocitária caracterizando um lobo tímico com escore óptico 2 (H&E,200X).....	36
Figura 7 -	Depleção linfocitária caracterizando um lobo tímico com escore óptico 3 (H&E,200X).....	36
Figura 8 -	Depleção linfocitária caracterizando um lobo tímico com escore óptico 4 (H&E, 200X).....	37
Figura 9 -	Depleção linfocitária caracterizando um lobo tímico com escore óptico 5 (H&E, 200X).....	37
Figura 10 -	Esquema quanto a determinação dos escores finais de depleção linfocitária/ave considerando a leitura dos lobos tímicos pelos avaliadores A e B.....	38
Figura 11 -	Determinação dos três escores finais de depleção linfocitária de cada ave considerando as leituras dos avaliadores A e B.....	39
Figura 12 -	Imagem ilustrativa da divisão do lobo tímico em octantes e da numeração das áreas a serem analisadas. As marcações em amarelo correspondem às áreas selecionadas para fotomicrografia.....	40
Figura 13 -	Imagem histológica da área de um dos octantes do lobo tímico selecionada para fotomicrografia (H&E, 200X).....	41
Figura 14 -	Imagem histológica em escala de cinza de um dos octantes do lobo tímico no processamento pelo <i>software</i> MATLAB [®] 6.5 – MATHWORKS.....	42
Figura 15 -	Aplicação da ferramenta de seleção correspondente a área de um dos octantes do lobo tímico a ser analisada no processamento pelo <i>software</i> MATLAB [®] 6.5 – MATHWORKS.....	42

Figura 16 -	Área segmentada da imagem de um dos octantes do lobo tímico no processamento pelo <i>software</i> MATLAB [®] 6.5 – MATHWORKS.....	43
Figura 17 -	Número de pixels por tonalidade de cinza representado no histograma de processamento de uma fotomicrografia de um dos octantes do lobo tímico pelo <i>software</i> MATLAB [®] 6.5 – MATHWORKS.....	43
Figura 18 -	Valores de AE, AD, AP, PM e IM representados no histograma de processamento de uma fotomicrografia correspondente a um dos octantes do lobo tímico pelo <i>software</i> MATLAB [®] 6.5 – MATHWORKS.....	44
Figura 19 -	Esquema de construção das RNAs classificatórias caracterizando as variáveis de entrada, treinamento e número de redes criadas ao final.....	45
Figura 20 -	Distribuição dos escores ópticos do timo ao longo do tratamento com dexametasona.....	48
Figura 21 -	Aspecto macroscópico dos timos dos grupos controle e tratado 8 horas após a última administração de dexametasona. As setas em vermelho indicam os lobos tímicos.....	48
Figura 22 -	Aspecto macroscópico dos timos dos grupos controle e tratado 16 horas após a última administração de dexametasona. As setas em vermelho indicam os lobos tímicos.....	49
Figura 23 -	Aspecto macroscópico dos timos dos grupos controle e tratado 24 horas após a última administração de dexametasona. As setas em vermelho indicam os lobos tímicos.....	49
Figura 24 -	Aspecto macroscópico dos timos dos grupos controle e tratado 32 horas após a última administração de dexametasona. As setas em vermelho indicam os lobos tímicos.....	50
Figura 25 -	Aspecto macroscópico dos timos dos grupos controle e tratado 40 horas após a última administração de dexametasona. As setas em vermelho indicam os lobos tímicos.....	50
Figura 26 -	Aspecto macroscópico dos timos dos grupos controle e tratado 8 dias após a última administração de dexametasona. As setas em vermelho indicam os lobos tímicos.....	51
Figura 27 -	Representação gráfica da relação entre as variáveis “peso relativo do timo” e “escores digitais de depleção linfocitária” utilizando a moda conjunta dos avaliadores A e B.....	59
Figura 28 -	Modelos de regressão obtidos através da análise estatística das variáveis “peso relativo do timo” e “escore óptico de depleção linfocitária”.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número total de aves e número de aves sacrificadas e tratadas no dia 5; 8, 16, 24, 32, 40 horas e 8 dias pós-tratamento com Dexametasona.....	32
Tabela 2 - Número (N) total de aves, número de aves sacrificadas e número de aves submetidas ao tratamento com Dexametasona do Dia 0 ao Dia 4.....	32
Tabela 3 - Distribuição dos 402 lobos tímicos entre as 5 categorias de escore óptico de depleção linfocitária pelos avaliadores A e B.....	46
Tabela 4 - Categorização dos lobos tímicos quanto ao grau de depleção linfocitária pelas RNAs classificatórias treinadas os escores ópticos atribuídos pelo avaliador A.....	51
Tabela 5 - Categorização dos lobos tímicos quanto ao grau de depleção linfocitária pelas RNAs classificatórias treinadas com os escores ópticos atribuídos pelo avaliador B.....	53
Tabela 6 - Categorização das aves quanto ao grau de depleção linfocitária pelas RNAs classificatórias treinadas com a moda dos escores ópticos atribuídos pelo avaliador A.....	55
Tabela 7 - Categorização das aves quanto ao grau de depleção linfocitária pelas RNAs classificatórias treinadas com a moda dos escores ópticos atribuídos pelo avaliador B.....	56
Tabela 8 - Categorização das aves quanto ao grau de depleção linfocitária pelas RNAs classificatórias treinadas com a moda dos escores ópticos atribuídos pelos avaliadores A e B.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS

UBA	- União Brasileira de Avicultura
ADDL	- Análise Digital de Depleção Linfóide
EMBRAPA	- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
RNAs	- Redes Neurais Artificiais
CDPA	- Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária
UFRGS	- Universidade Federal do Rio Grande do Sul
ANOVA	- Análise de Variância
IPVDF	- Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor
FEPAGRO	- Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária
AE	- Área esquerda
AD	- Área direita
AP	- Área ponto
PM	- Ponto maior
IM	- Índice maior
PR	- Peso relativo
EO	- Escore óptico
ED	- Escore digital
VPP	- Valor preditivo positivo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1	Anatomia, histologia e importância do timo nas aves.....	18
2.2	Avaliação histopatológica do timo.....	20
2.3	Sistema de análise de imagem.....	21
2.4	Redes neurais artificiais.....	24
3	EXPERIMENTO 1 – ESTUDO PILOTO.....	27
3.1	Objetivo.....	27
3.2	Materiais e métodos.....	27
3.2.1	Amostras de timo.....	27
3.2.2	Processamento histológico.....	27
3.2.3	Avaliação histopatológica.....	27
3.3	Resultados e discussão.....	28
4	EXPERIMENTO 2.....	29
4.1	Objetivos.....	29
4.2	Materiais e métodos.....	29
4.2.1	Submissão ao comitê de ética.....	29
4.2.2	Local de estudo.....	29
4.2.3	Aves.....	29
4.2.4	Delineamento experimental.....	30
4.2.5	Administração de dexametasona.....	30
4.2.6	Sacrifício das aves e coleta do timo.....	33
4.2.7	Destino das carcaças.....	34
4.2.8	Preparação dos cortes histológicos.....	34

4.2.9	Avaliação histológica das lâminas.....	35
4.2.10	Obtenção das imagens.....	39
4.2.11	Análise de imagens.....	41
4.2.12	Redes neurais artificiais	44
4.2.13	Peso relativo do timo.....	45
4.2.14	Análise Estatística.....	45
4.3	Resultados.....	46
4.3.1	Estabelecimento de escores ópticos de depleção linfocitária por lobo tímico.....	46
4.3.2	Estabelecimento de escores ópticos de depleção linfocitária por ave.....	47
4.3.3	Escore óptico do timo ao longo do período de administração de dexametasona.....	47
4.3.4	Redes neurais artificiais.....	51
4.3.4.1	Criação de RNA classificatória utilizando para treinamento os escores por lobo das leituras do avaliador A.....	51
4.3.4.2	Criação de RNA classificatória utilizando para treinamento os Escores por lobo das leituras do avaliador B.....	53
4.3.4.3	Criação de RNA classificatória utilizando para treinamento a moda dos escores ópticos por ave das leituras realizadas pelo avaliador A.....	54
4.3.4.4	Criação de RNA classificatória utilizando para treinamento a moda dos escores ópticos por ave das leituras do avaliador B.....	56
4.3.4.5	Criação de RNA classificatória utilizando para treinamento a moda dos escores ópticos por ave das leituras dos avaliadores A e B de forma conjunta.....	57
4.3.5	Peso relativo do timo x Escores ópticos de depleção linfocitária.....	58
4.4	Discussão.....	61
5	CONCLUSÕES.....	66
6	ATIVIDADES FUTURAS.....	67
	REFERÊNCIAS.....	68
	ANEXO 1.....	72

APÊNDICE 1 - Delineamento experimental aplicado aos grupos controle e tratado no Experimento 2.....	73
APÊNDICE 2 – Interface da RNA classificatória por ave utilizando a moda conjunta dos escores dos avaliadores A e B.....	74

1 INTRODUÇÃO

A avicultura constitui-se em um setor crescente do agronegócio mundial, sendo de extrema relevância do ponto de vista sócio-econômico (BAMPI, 2009). Segundo relatório de 2012 da União Brasileira de Avicultura (UBA), a produção de carne de frango no Brasil tem sido crescente nos últimos anos, chegando a aproximadamente 13 milhões de toneladas em 2011. Deste total, cerca de quatro milhões de toneladas teve como destino o mercado externo, principalmente países do Oriente Médio. Sendo assim, este ramo do agronegócio é responsável por colocar o país em posição de destaque no cenário mundial. Atualmente o Brasil consolidou-se como o terceiro maior produtor de carne de frango, além de líder na exportação de produtos avícolas desde 2004, a frente de países tradicionais e competitivos, como os Estados Unidos da América (EUA).

Neste contexto, a preocupação com o aspecto sanitário dos plantéis torna-se uma constante. A intensa tecnificação da atividade avícola faz com que a capacidade de alojamento seja maior, levando a existência de criações com elevada densidade de animais por área. Este fato, aliado ao processo de melhoramento genético, tornam as aves cada vez mais susceptíveis ao desenvolvimento de enfermidades. Dentre as doenças de maior importância estão aquelas que afetam diretamente a integridade do sistema imune, sendo responsáveis por reduzir o desempenho dos animais e afetar negativamente os índices produtivos. Além disso, este déficit de imunidade acaba por tornar as aves mais susceptíveis a infecções por agentes oportunistas, gerando prejuízos econômicos ainda maiores.

Dentre os órgãos mais acometidos pelas doenças imunodepressoras destaca-se o timo. Abordagens acerca da caracterização do dano tecidual neste órgão estão mais comumente ligadas a técnicas de histopatologia, as quais são realizadas de forma amplamente variável e não havendo um método “ouro” de avaliação. Na maioria das vezes, a análise do timo dá-se de forma descritiva, não se atribuindo valor algum à perda linfocitária. Cada técnico elabora seus próprios parâmetros de avaliação e, conseqüentemente, acaba por imprimir subjetividade nas estimativas quanto à severidade da lesão. Este viés, presente nas atuais metodologias envolvendo o estudo do timo, é resultado de uma ausência de critérios claros e objetivos. Tais critérios mostram-se essenciais a fim de fornecer suporte para a tomada de decisões fundamentadas, possibilitando a determinação do grau de comprometimento do tecido

linfóide do órgão. Soma-se a isso, a ausência de repetibilidade e reprodutibilidade nos métodos empregados, características essas imprescindíveis em se tratando de uma ferramenta laboratorial tão difundida como a histopatologia.

Moraes *et al.*(2010), ao propor uma nova metodologia visando a determinação da perda de linfócitos na Bolsa de Fabrício, de modo a excluir a subjetividade da avaliação, criaram um sistema denominado de Análise Digital de Depleção Linfóide (ADDL), obtendo resultados satisfatórios. Este sistema, baseia-se na utilização de ferramentas computacionais de análise de imagem em conjunto com tecnologias relacionadas a inteligência artificial, propondo-se a criação de um método mais preciso de quantificação de lesão.

Este trabalho tem por objetivo a adaptação e aplicação do sistema ADDL em amostras de timo de frangos de corte. Tal abordagem permitirá também um melhor conhecimento dos prejuízos causados pelas patologias imunodepressoras neste órgão. Ainda, este trabalho vem a complementar uma série de outros estudos, os quais vem sendo realizados integrando a linha de pesquisa em Redes Neurais Artificiais (RNAs) desenvolvida pelo Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia (CDPA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Anatomia, histologia e importância do timo nas aves

O timo nas aves consiste em um órgão linfóide par, um de cada lado da região cervical, sendo que cada uma das metades é formada por um número de seis a oito lobos de formato ovóide e achatados (AKTER, *et al.* 2006). Segundo Ciriaco, *et al.* (2003), os lobos possuem formato de grão de feijão, chegando a um tamanho máximo de 6 – 12 mm de diâmetro antes de iniciar sua involução fisiológica.

A localização do timo dá-se sob o tecido subcutâneo cervical, sendo incluso em uma cápsula de tecido conjuntivo. A porção anterior de cada cadeia tímica encontra-se a nível da terceira vértebra cervical e a extremidade posterior sobre a região da glândula tireóide, no interior da cavidade torácica. Ainda, o órgão em questão apresenta-se intimamente associado a veia jugular e ao nervo vago. Numerosos septos finos, oriundos da cápsula, projetam-se para o interior dos lobos resultando na sua divisão em estruturas denominadas de lóbulos. Cada lóbulo é constituído de duas regiões, o córtex e a medula, sendo que a diferenciação entre elas não é muito clara, tendendo a fusão de ambas as áreas (HODGES, 1974). Akter, *et al.* (2006), em estudo visando caracterizar a histomorfologia dos órgãos linfóides de frangos de corte, verificou que o comprimento de um lóbulo tímico é de $629,30 \pm 118,95 \mu\text{m}$, já a sua largura é de $376,03 \pm 98,92 \mu\text{m}$.

A porção cortical corresponde a periferia do lóbulo, e cora-se mais fortemente com hematoxilina, em virtude da maior concentração de linfócitos (linfócitos T) (MONTANARI, 2006). É importante ressaltar que há um predomínio de pequenos linfócitos, mas também estão presentes linfócitos de tamanho médio (HODGES, 1974). Segundo Clawson *et al.* (1967) a estrutura tímica linfocitária para frangos saudáveis de dois meses de idade é de uma população cortical possuindo consistência uniforme, sendo que as células apresentam uma estreita variação no tamanho (3,5 a $4\mu\text{m}$ de diâmetro), e uma fina borda de citoplasma circundando o núcleo. A medular caracteriza-se por conter menor quantidade de linfócitos em relação ao córtex, e conseqüentemente coloração mais pálida (HODGES, 1974).

No estroma tanto do córtex quanto da região medular há uma rede de células reticulares (LUCAS e JAMROZ, 1961), as quais possuem o núcleo em formato oval ou

alongado com poucos grânulos de cromatina e com um ou dois nucléolos (HODGE, 1974). Estas células formam uma camada contínua sob a cápsula e ao redor de septos e vasos, responsável por isolar o córtex e torná-lo impermeável a penetração de macromoléculas, formando a barreira hematotímica. Além disso, as células reticulares são responsáveis por constituir a estrutura de sustentação dos lobos (MONTANARI, 2006).

Em aves, as células reticulares sofrem um processo de degeneração, ocasionando a formação de estruturas semelhantes aos Corpúsculos de Hassall no timo de humanos. Inicialmente há formação de pequenos vacúolos, os quais parecem aumentar até o tamanho de uma única célula reticular, sendo que neste estágio tornam-se esféricas, delimitadas por uma membrana e contendo material eosinofílico homogêneo. Vesículas maiores, de formato mais irregular e correspondendo ao tamanho de duas ou mais células reticulares também podem ser observados, e dentro dessas pode haver linfócitos em degeneração e algumas vezes, apenas uma massa de grânulos bastante basofílicos (HODGES, 1974). Segundo Montanari (2006), a presença destas alterações nas células reticulares associada à ausência de linfócitos permite auxílio no diagnóstico do timo.

Tanto o timo quanto a bolsa de Fabrício são órgãos do sistema linfóide primário, sendo o timo responsável por mecanismos relacionados a imunidade celular (CHAMDRASEKHAR, *et al.*, 2012).

O timo desempenha um papel crucial no desenvolvimento de células T em aves e mamíferos. Estas células originam-se de progenitores derivados da medula óssea, os quais sofrem proliferação, rearranjo do gene receptor de célula T e diferenciação de timócitos para células T, as quais expressam os co-receptores CD4 e CD8 (COOPER, *et al.*, 1991; KISIELOW & VON BOEHMER, 1995; SHORTMAN e WU, 1996).

Cooper, *et al.* (1966) realizaram um trabalho, onde um dos objetivos era avaliar a função do “sistema” timo em frangos. Para tanto, os autores submetem um grupo de pintinhos recém-eclodido à timectomia, seguida de doses subletais de irradiação X e realização de um enxerto de pele. Como resultado, constatou-se que, assim como nos mamíferos, os animais timectomizados e irradiados tiveram respostas diminuídas de hipersensibilidade e rejeição ao enxerto. Porém os centros germinativos, plasmócitos e a capacidade de síntese de imunoglobulina permaneceram intactas, ou seja, um comprometimento do timo não reflete sobre a imunidade humoral.

2.2 Avaliação histopatológica do timo

Doenças imunodepressoras, como anemia infecciosa das galinhas, doença infecciosa da bolsa e aflatoxicoses, constituem-se como umas das principais responsáveis pela perda de linfócitos em órgãos como o timo, bolsa de Fabrício e baço.

A caracterização de alterações histológicas no timo, incluindo o grau de depleção linfocitária, é realizada de forma amplamente variável entre os histopatologistas.

Henry *et al.* (1980) realizaram um experimento buscando determinar escores de lesão microscópica para Bolsa de Fabrício, timo, baço e rim em aves experimentalmente infectadas com o vírus da Doença de Gumboro. Para o timo foram estabelecidos escores de zero a três, sendo o timo de escore 0 caracterizado por apresentar-se histologicamente normal, aqueles considerados como escore 1 por mostrar na região cortical poucos espaços vazios, presença pronunciada de hiperemia e infiltração heterofílica especialmente na medular. Os órgãos classificados como escore 2 apresentavam um aumento do número de espaços vazios na cortical, presença de infiltração heterofílica e aumento de hiperemia tanto na cortical quanto na medular. Os timos escore 3, segundo os autores, foram caracterizados por conter numerosos agregados (12 a 16µm) de debris celulares e núcleos picnóticos, assim como redução da densidade de timócitos no córtex e da hiperemia no córtex e na medula.

Sharma *et al.* (1993) também estabeleceram escores de lesão para avaliação microscópica do timo. Para tanto, foi realizado um experimento elucidando a presença de alterações sem a replicação viral no timo de frangos expostos ao Vírus da Doença de Gumboro. A classificação foi feita como segue: 0- sem lesão; 1- suave, necrose cortical multifocal, ou suave atrofia cortical (30 a 40% da seção folicular transversal); 2- necrose moderada multifocal dos linfócitos corticais; 3- atrofia cortical moderada difusa (20 a 30% da seção folicular transversal); 4- atrofia da cortical severa difusa (20% da seção folicular transversal).

Inoue *et al.* (1994), em estudo avaliando lesões tímicas em frangos inoculados com duas diferentes cepas do vírus da Doença de Gumboro, descreveram as alterações microscópicas do timo das aves levando em consideração a quantidade de linfócitos que apresentavam condensação da cromatina nuclear, a distribuição dos linfócitos na cortical, assim como atrofia e depleção desta região. Na porção medular, a presença de células

inflamatórias e hemorragia também foram elucidadas como parâmetro de lesão. Para quantificação da depleção e hemorragia foram atribuídos graus de leve, moderado e alto.

Smyth *et al.* (2009) na realização de um estudo em frangos de três e seis semanas de idade inoculados com o Vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas, avaliaram lesões no timo pelo aumento de tamanho do núcleo nos linfócitos T, coloração pálida da cromatina, inclusões intranucleares (características do vírus), depleção linfocitária cortical e presença de estruturas semelhantes a corpos apoptóticos.

Em um estudo realizado no Irã, avaliou-se os achados sorológicos, hematológicos e histológicos em frangos de corte infectados com o Vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas. Com relação a análise histopatológica do timo, considerou-se apenas a presença ou ausência de depleção (KARIMI, 2010).

Além de avaliações do timo a fim de estabelecer o dano tecidual causado pelas enfermidades imunodepressoras, Hadpour, *et al.* (2011) realizaram um estudo, onde o objetivo era avaliar o efeito do vírus da Influenza Aviária sobre os órgãos linfóides de frangos de corte, dentre eles o timo. Como parâmetros empregados para caracterização do quadro lesional no timo utilizou-se apenas presença/ausência de necrose do tecido linfóide e de depleção na área medular do órgão. Hussain, *et al.* (2012), em estudo visando avaliar a imunodisfunção causada pelo adenovírus tipo IV em frangos de corte, analisou o timo a partir do estabelecimento de 5 escores baseados na necrose de cortical e atrofia: 0 - sem lesões; 1 - necrose multifocal suave de linfócitos na cortical; 2 - necrose multifocal moderada de linfócitos na cortical ou atrofia cortical difusa suave; 3 - atrofia cortical difusa moderada; 4 - atrofia cortical difusa severa.

2.3 Sistema de análise de imagem

Os mecanismos de análise de imagem vem sendo amplamente difundidos, acompanhando toda a evolução tecnológica que se deu em inúmeras áreas, inclusive no campo da biociências.

Seu emprego na Medicina Veterinária tem sido de relevância como método auxiliar na busca por maior acurácia e confiabilidade na avaliação histológica dos mais distintos tecidos animais. Dentre as vantagens deste sistema pode-se destacar a reprodutibilidade e rapidez no

que diz respeito ao estabelecimento de métodos que corroborem com o diagnóstico clínico e *post mortem*. Segundo Moraes *et al.* (2010), as análises realizadas nas áreas biológicas são muitas vezes subjetivas, e, portanto, dependentes do grau de experiência do técnico que as realiza. A utilização destes novos métodos de análise de imagem visa reduzir este erro, fornecendo uma maior objetividade à avaliação. Porém, é importante ressaltar que estas ferramentas não dispensam o profissional capacitado na área.

Van Santen, *et al.* (2004) buscando comparar as rotas intramuscular e oral de infecção para estabelecer a patogenia do Vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas, realizaram a avaliação do timo, a fim de determinar o grau de depleção linfocitária do mesmo através de análise de imagem. Primeiramente, foi feita uma fotografia de um lóbulo representativo do timo na objetiva de 4x e com o software Image J versão 1.29x procedeu-se a delimitação do perímetro do lóbulo, conversão da imagem para escala de cinza (8-bit) e segmentação automática (distinção entre cortical e medular). Para cada lóbulo foram estipuladas duas mensurações: uma para área rica em linfócitos (córtex) e outra para área total do lóbulo, sendo posteriormente realizada a relação entre as medidas obtidas para obtenção do raio. O valor do raio foi testado por Análise de Variância (ANOVA) e seguiu-se a comparação entre os grupos pelo teste de Tukey.

Toro *et al.* (2009), observando o efeito do vírus da anemia infecciosa das galinhas e da doença de Gumboro em frangos comerciais, realizaram avaliação histopatológica do timo seguindo o mesmo princípio de morfometria aplicado por Van Santen *et al.* (2004), porém com algumas modificações: foi feita uma fotografia de um lóbulo tímico com ampla extensão de córtex na objetiva de 5x, sendo a imagem analisada com o software Image J 1.29x. Foi delimitado o perímetro do lóbulo, convertida a imagem para escala de cinza (8-bit), efetuada a segmentação automática e por fim as mensurações da espessura da cortical do lóbulo: direita, direita - centro, centro, esquerda - centro e esquerda. Os resultados obtidos foram submetidos a ANOVA e teste de Tukey.

Araújo *et al.* (2009) objetivando fornecer um método que auxilie no diagnóstico diferencial ou sirva como indicador de transformação neoplásica, utilizou análise digital a fim de realizar a avaliação histológica e histoquímica de fatores prognósticos em pacientes com retocolite ulcerativa. Para tal procedimento, fragmentos de 4µm de tecido intestinal foram coletados e submetidos a técnica de imuno-histoquímica para identificação da proteína

galectina- 3. As imagens microscópicas foram obtidas com câmera digital acoplada a um computador contendo o software OPTIMAS[®].

Park *et al.* (1998) utilizaram o sistema de análise de imagens em conjunto com Redes Neurais Artificiais (RNAs) a fim de promover a classificação e reconhecimento de carcaças de frango. A amostragem consistia em 70 carcaças condenadas por septicemias, tumores, traumatismos, ascite, leucose e aerossaculite e 21 sem lesão aparente. Ao avaliar as características de imagem obtidas, como intensidade de reflectância, constatou-se diferença significativa entre as categorias de carcaças submetidas ao estudo. Os níveis de acertos da classificação pelas RNAs foi igual ou maior que 90%.

Nishizawa, *et al.* (2007), realizaram um estudo visando uma avaliação anatomopatológica, sorológica e de resposta imunológica protetiva em frangos vacinados com cinco vacinas vivas comerciais para Doença de Gumboro e submetidas ao desafio com o vírus. Para a bolsa de Fabrício, além da análise histológica convencional, empregou-se análise de imagem, a fim de se mensurar a quantidade de linfócitos presentes no órgão. A técnica consistia em conectar um microscópio a um computador, e através de um programa chamado E-bursa, lia-se o percentual de células linfocitárias.

Moraes *et al.*(2010) visando reduzir a subjetividade no exame histopatológico da Bolsa de Fabrício, o qual busca classificar o órgão por escores de depleção, estabeleceu uma nova metodologia intitulada de Sistema de Análise Digital de Depleção Linfocitária (ADDL). Foram utilizadas 50 Bolsas de Fabrício, sendo primeiramente realizada a avaliação óptica subjetiva para classificação em escores de depleção conforme Musket *et al.* (1979). Ao total foram efetuadas três leituras em ordem aleatória das lâminas e dias distintos, obtendo-se a média de todas as leituras. Para aplicação do sistema ADDL, as 50 lâminas foram divididas em quadrantes, sendo sacadas fotos de três folículos por quadrante na objetiva de 200X. O processamento das imagens seguiu com o programa MATLAB[®] 6.5 – MATHWORKS. As variáveis do histograma correspondentes às características de cada imagem (área direita, área esquerda, área ponto, ponto maior e índice maior) foram analisadas pelo teste ANOVA, para classificação em cinco e três escores de depleção, e pelo teste T – *student* para classificação em dois escores apenas. Posteriormente, os dados do histograma também foram utilizados como valores de entrada para as RNAs, e como saída obteve-se o escore classificatório de depleção para cada lâmina.

2.4 Redes neurais artificiais

No setor avícola, a subdivisão entre os setores de produção em matrizes, incubatório, recria e frigorífico caracteriza o sistema de integração. Esta subdivisão auxilia na constatação e monitoramento dos pontos críticos nas mais variadas fases de produção. A complexidade e relação entre os distintos fatores envolvidos na cadeia produtiva tornam inviável a mente humana prever com segurança as consequências oriundas da implantação ou modificação de estratégia de manejo, sanidade, nutrição, seleção, entre outras, para todo o processo produtivo. A fim de solucionar esta questão e, auxiliar na tomada de decisões por parte de técnicos, o uso de modelos computacionais apresentam-se como uma boa alternativa, tanto no campo quanto no âmbito da pesquisa (RONDÓN, 2002).

Em trabalho efetuado por Salle, *et al.* (1999), utilizaram-se modelos matemáticos a fim de proporcionar uma interpretação objetiva dos resultados sorológicos e da resposta imune para a Doença de Newcastle, em reprodutoras de perus. As equações obtidas explicaram os resultados sorológicos de forma objetiva e demonstraram confiabilidade estatística, possibilitando assim, o estabelecimento de modelos preditivos.

Estudo realizado por pesquisadores envolvidos com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), em Concórdia–SC, visou estimar os pesos de frangos de corte machos e fêmeas mediante uso de modelos matemáticos. Através dos resultados os autores concluíram que o uso desses por criadores poderia ser realizado para prever o crescimento corporal relacionando com a idade, verificar a proporção relativa de crescimento corporal entre os sexos, estimar a conversão alimentar diária, além de padronizar o crescimento para a seleção de novas linhagens para posterior comparação com outros tratamentos (FIALHO *et al.*, 2000^a; FIALHO *et al.*, 2000^b).

Salle, *et al.* (2000) destacaram a necessidade de critérios objetivos de tomada de decisões e na interpretação de resultados de monitoria. A estatística convencional vem sendo amplamente utilizada, porém novas tecnologias estão surgindo a fim de facilitar a tomada de decisões, entre elas, as redes neurais artificiais.

Esta nova tecnologia é baseada na estruturação neuronal e sua atividade biológica. As redes neurais “aprendem” ajustando as interconexões dos pesos entre as camadas neuronais, de maneira análoga as conexões sinápticas no sistema nervoso central. Desta forma, os

resultados obtidos são comparados constantemente com as respostas corretas, e os pesos ajustados a cada vez, em direção a resposta tida como certa. Para uma maior precisão são adicionados quantos neurônios ocultos forem necessários (ASTION e WILDING, 1992; ROUSH *et al.*, 1997).

De acordo com Astion e Wilding (1992), os “neurônios” da rede podem receber importância relativa de entradas excitatórias ou inibitórias dos demais neurônios, produzindo assim, uma saída, a qual, geralmente, consiste em uma função não linear da entrada da rede.

O modelo de redes neurais tem base nos dados disponíveis, a fim de obter um modelo geral. Em virtude deste fato, a fase de treinamento das redes deve ser rigorosa e idônea, visando evitar o aparecimento de falsos modelos. O conhecimento das redes está nas sinapses (pesos atribuídos as conexões entre neurônios). Para aprendizado das redes neurais usa-se em torno de 50 a 90% de dados, da totalidade existente, escolhidos ao acaso. Esta metodologia tem por objetivo que a rede aprenda e não decore exemplos. Com os demais dados, usa-se repassar as redes na fase de testes, buscando assim, a inter-relação entre os mesmos (TATIBANA e KAETSU, 2006).

Segundo Salle (2005), a rede tem início buscando relações lineares entre as importâncias relativas das variáveis de entrada e saída. A estas ligações são atribuídos pesos, entre os neurônios de entrada e saída. Posteriormente, a camada oculta são adicionados outros neurônios, a fim de identificar relações não lineares. Os dados referentes a entrada são enviados a primeira camada e posteriormente repassados a segunda (oculta), após serem multiplicados pelo peso. Desta forma, são produzidas saídas, sendo essas baseadas na soma dos valores pesados que tiveram sua passagem por ela. Ocorre a transposição dos valores da camada oculta para a camada de saída, e os resultados esperados são obtidos.

Quanto ao seu uso, as redes neurais possuem inúmeras aplicações. São utilizadas no mercado financeiro, otimização de processos químicos, identificação de células cancerosas, reconhecimento de anormalidades cromossômicas, detectar fibrilação ventricular, prever trajetórias de entrada de naves espaciais, entre outras (LEMOS *et al.*, 2006). Segundo Pinto (2006), a implementação desta nova tecnologia em medicina veterinária ainda é recente, sendo que a avicultura mostra-se como a área mais contemplada com a sua utilização.

Roush *et al.* (1997), realizaram um estudo com o intuito de estimar a ocorrência de ascite em frangos de corte. Para tanto, fizeram uso das redes neurais artificiais.

Primeiramente, uma rede probabilística foi treinada a fim de prever ascite tendo como base fenômenos fisiológicos que não necessitam da morte da ave. Como variáveis de entrada, por importância relativa, teve-se o nível de oxigênio no sangue, peso corporal, eletrocardiograma, hematócrito, onda S e taxa cardíaca das aves. Com tal experimento, concluiu-se que o uso dos modelos desenvolvidos incrementaram o diagnóstico de ascite em frangos de corte, e os resultados foram úteis para seleção e desenvolvimento de linhagens de frango de corte que não venham a ser propensas a ascite.

Ainda no âmbito da sanidade avícola, Souza (2010) conseguiu determinar o índice de patogenicidade para *E. coli* através do uso de Redes Neurais. Para tanto, forneceu-se a camada de entrada alguns dos principais fatores de virulência encontrados em amostras patogênicas, sua origem e o índice de patogenicidade *in vivo*. Os resultados quanto as previsões corretas foram em torno de 80%, permitindo afirmar que as redes podem ser uma alternativa na substituição dos testes de patogenicidade *in vivo* para amostras de *E. coli* de origem aviária.

Na área de produção animal, Spohr (2011) realizou um estudo visando utilizar esta tecnologia, a fim de explicar os quatro setores da cadeia de produção avícola: reprodutoras pesadas, incubatório, produção de frango de corte e abatedouro frigorífico. Para tanto, fez-se uso de uma série de variáveis visando prever: eclosão total, eclosão vendável, fertilidade, mortalidade na primeira e quinta semana, perda de peso de ovo, peso as cinco semanas, tipo de pinto, condenação parcial e total. Como conclusão, o autor afirma que as Redes Neurais foram capazes de explicar todos estes fenômenos envolvidos nestas distintas etapas de produção. Portanto, cercado-se de critérios objetivos, esta ferramenta pode tornar-se importante na tomada de decisões pelos gestores envolvidos em cada setor.

3 EXPERIMENTO 1 – ESTUDO PILOTO

3.1 Objetivo

Averiguar a disponibilidade de distintos escores de depleção linfocitária (1 a 3) utilizando timos do experimento desenvolvido por Camillotti (2010).

3.2 Materiais e métodos

3.2.1 Amostras de timo

Foram utilizadas amostras de timo provenientes do experimento executado por Camillotti (2011), no qual as aves foram desafiadas com uma cepa do vírus da doença de Gumboro. Coletaram-se timos de cinco frangos de corte com 25 dias de idade (grupo controle não desafiado), de sete aves com 30 dias de idade (controle positivo – 5 dias pós-desafio) e de sete aves com 35 dias de idade (controle positivo – 10 dias pós-desafio). O número de lobos tímicos obtidos por animal foi variável (entre quatro a oito), perfazendo um total de 94 lobos.

3.1.2 Processamento histológico

As amostras encontravam-se fixadas em solução de formalina a 10% tamponada. Cada lobo foi clivado longitudinalmente, desidratado em concentrações crescentes de álcool, clarificado e impregnado em parafina. A partir dos blocos de parafina foram obtidos cortes com 5µm de espessura, posteriormente corados com hematoxilina e eosina (H&E), conforme Luna (1968).

3.2.3 Avaliação histopatológica

Os cortes histológicos foram analisados por dois avaliadores quanto ao grau de depleção linfocitária, sendo classificados em escores de 1 a 3. O escore 1 representou o timo

normal (sem depleção aparente de linfócitos), o escore 2 diz respeito a um timo com grau intermediário de depleção e, o escore 3, o timo de uma ave com alto grau de perda linfocitária. Ao total foram analisados 94 lobos, sendo realizada uma leitura por avaliador.

3.3 Resultados e discussão

A partir das leituras das lâminas realizadas pelos avaliadores, foi possível observar que 78,72% (70 lobos) apresentaram escore 2, 10,63% (10 lobos) escore 1 e 10,63% (10 lobos) escore 3. O número de lobos com os escores de depleção 1 e 3 somaram aproximadamente 20% das lâminas, sendo um valor aparentemente baixo para dar prosseguimento ao trabalho.

Visando a aplicação do método ADDL para timos, um número representativo de lobos classificados em cada escore é fundamental, resultado não encontrado neste experimento; já que apenas 10 lobos tímicos foram categorizados com grau 1 de depleção e, 10 com grau 3. O baixo número de lobos com escore 1 pode ser justificado pelo pequeno número de aves no grupo controle negativo. Em contrapartida, a carência de lâminas com escore 3 provavelmente ocorreu, pois trabalhou-se com uma cepa do vírus da doença de Gumboro que, segundo Inoue (1994), não possui atuação consistente no timo.

Ainda, constatou-se dificuldade na categorização dos lobos utilizando apenas três escores de depleção linfocitária, sentindo-se necessidade de criação de mais escores intermediários (2 e 4).

Em virtude dos resultados obtidos neste estudo, houve necessidade de realização de um segundo experimento, no qual fossem obtidos timos com diversos graus de depleção. Para tanto, optou-se pela indução de imunodepressão, com a utilização de um glicocorticóide, e pela classificação dos timos em cinco escores.

4 EXPERIMENTO 2

4.1 Objetivos

Obtenção de timos que apresentem escores de depleção linfocitária oscilando entre 1 a 5, a partir da utilização de dexametasona, possibilitando um representativo número de lobos para cada escore. Aliado a isso, visou-se estabelecer um método de coleta de imagens do timo para processamento digital.

4.2 Materiais e métodos

4.2.1 Submissão ao comitê de ética

O projeto de pesquisa foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF) – Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO), Protocolo 21/2012 (Anexo 1).

4.2.2 Local de estudo

O alojamento das aves e processamento histológico das amostras foram realizados no IPVDF - FEPAGRO, município de Eldorado do Sul/RS. O tratamento estatístico dos dados e construção das RNAs foram realizados no CDPA/UFRGS, município de Porto Alegre/RS.

4.2.3 Aves

Foram utilizados 70 pintinhos da linhagem Cobb com um dia de idade, provenientes de uma agroindústria localizada da região do Vale do Taquari/RS. Após chegada dos animais, as aves foram alojadas em sala climatizada e com iluminação artificial. Os animais foram distribuídos em gaiolas-criadeiras de metal, dispostas em cinco andares; com as seguintes dimensões: 1,0m de largura x 2,0m de comprimento x 0,3m de altura (Figura 1).

As aves receberam água e ração “ad libitum” durante todo o período. Diariamente foram realizados o controle de temperatura da sala e a limpeza das bandejas das baterias.

Figura 1: Sala experimental do IPVDF utilizada para alojamento das aves.



4.2.4 Delineamento experimental

Aos 21 dias de idade, foram separadas 15 aves para composição do grupo controle, as quais ficaram alojadas em um único andar da bateria, isoladas das demais apenas para facilitar a identificação do grupo. As aves restantes (55) ficaram dispostas nos demais andares da bateria experimental (aproximadamente 14/andar), sendo submetidas ao tratamento com o glicocorticóide. Durante o período de alojamento, três dos 55 animais do grupo tratado morreram por causas naturais.

4.2.5 Administração de dexametasona

Inicialmente se montou o plano experimental conforme desenvolvido por Kong *et al.* (2002): aos 21 dias de idade (dia zero) os animais receberiam a administração de dexametasona (DEXIUM® na concentração 2mg/ml) por via intramuscular (5mg/kg) em

doses diárias por sete dias (Figura 2). A partir do 8º dia, os tratamentos seriam em dias alternados até o 14º dia. Amostras diárias de timo seriam coletadas até o final do experimento, sendo uma do grupo controle e quatro do grupo tratado.

Em virtude da rapidez na involução das cadeias tímicas após o segundo dia de tratamento (dia 1), optou-se por suspender a utilização do glicocorticoide no dia 2. Como a análise visual das cadeias tímicas era o único critério a disposição, a descontinuidade do tratamento no dia 2 visou a obtenção de timos com graus intermediários de depleção linfocitária. Sendo assim, foi estabelecido um intervalo de 48 horas entre os tratamentos, a fim de permitir a parcial recuperação do órgão. A aplicação de dexametasona também foi suspensa no dia 4, já que se observou efeito cumulativo dos tratamentos anteriores sobre a cadeia tímica (dias 0, 1 e 3).

Como mencionado, durante o período compreendido entre os dias 0 e 4 foram sacrificadas 5 aves/dia para coleta do timo, sendo uma pertencente ao grupo controle e quatro ao grupo tratado, com exceção do dia 5, no qual sacrificou-se uma ave do grupo controle e uma do grupo tratado apenas.

O delineamento experimental utilizado entre os dias 0 a 4 está resumidamente apresentado na tabela 1.

Figura 2: Aplicação de dexametasona na musculatura do peito da ave.



Tabela 1: Número (N) total de aves, número de aves sacrificadas e número de aves submetidas ao tratamento com Dexametasona do Dia 0 ao Dia 4*.

Dia (coleta)	Dia 0 (1)		Dia 1 (2)		Dia 2 (3)		Dia 3 (4)		Dia 4 (5)	
Grupo	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T
N total	15	52	14	48	13	44	12	40	11	36
N aves sacrificadas	1	4	1	4	1	4	1	4	1	4
N aves tratadas	-	48	-	44	-	-	-	36	-	-

C= Grupo Controle; T= Grupo Tratado

*Delineamento experimental aplicado aos grupos controle e tratado a partir da adaptação do protocolo estabelecido por Kong *et al.* (2002).

Tendo como referência a involução tímica entre os dias 0 e 4 nos animais do grupo tratado, foram feitas mais algumas modificações no delineamento experimental. Tomou-se esta decisão, tendo em vista que em 48 horas após o tratamento realizado no dia 1, o timo recuperou-se de maneira satisfatória, ficando muito próximo aos dos animais do grupo controle no aspecto macroscópico. Optou-se, portanto, em realizar o tratamento das demais aves no Dia 5, coletando-se os timos a cada oito horas (até que se completasse 40 horas após último tratamento) e 8 dias após esta última administração do fármaco (Tabela 2). Este procedimento teve por finalidade obter mais timos com escores intermediários de depleção linfocitária.

Tabela 2: Número total de aves e número de aves sacrificadas e tratadas no dia 5; 8, 16, 24, 32, 40 horas e 8 dias pós-tratamento com Dexametasona*.

Dia (coleta)	Dia 5 (6)		8h pt (7)		16h pt (8)		24h pt (9)		32h pt (10)		40h pt (11)		8 dias pt (12)	
Grupo	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T
N total	10	32	9	31	8	26	7	21	6	16	5	11	4	6
N aves sacrificadas	1	1	1	5	1	5	1	5	1	5	1	5	4	6
N aves tratadas	-	31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

C= Grupo Controle; T= Grupo Tratado; pt: Pós-tratamento

*Delineamento experimental aplicado aos grupos controle e tratado a partir da adaptação do protocolo estabelecido por Kong *et al.* (2002).

A metodologia completa do tratamento com dexametasona e de coleta das amostras está ilustrada no apêndice 1.

4.2.6 Sacrifício das aves e coleta do timo

Para evitar qualquer tipo de sofrimento ou angústia nas aves, as mesmas foram previamente anestesiadas com a associação de Quetamina 20mg/Kg (concentração comercial 2%) e Xilazina 3mg/Kg (concentração comercial 10%) por via intramuscular em dose única (TRANQUILIM *et al.* 2007). Após entrarem em plano anestésico, os animais foram eutanasiados por eletrocussão (110V). Para tanto, foram utilizados dois eletrodos, sendo um deles colocado na cloaca e outro na crista dos animais.

Imediatamente após a eutanásia, as aves foram pesadas e necropsiadas. Prosseguiu-se com a coleta (Figura 3) e pesagem das duas cadeias tímicas. As amostras de timo foram devidamente acondicionadas em frascos individuais previamente identificados contendo solução de formalina à 10% tamponada.

Figura 3: Coleta das duas cadeias tímicas da ave localizadas anatomicamente ao longo da região cervical.



4.2.7 Destino das carcaças

Todas as carcaças foram mantidas em tonéis próprios, localizados dentro da sala experimental, sendo recolhidos por uma empresa terceirizada, a qual providenciou o destino adequado às mesmas.

4.2.8 Preparação dos cortes histológicos

Após tempo mínimo de fixação de 24 horas, foram selecionados três lobos de cada uma das cadeias tímicas (totalizando seis lobos/ave), tendo como critério de escolha aqueles que apresentassem total separação com os lobos adjacentes. Realizou-se a dissecação de toda gordura externa aos lobos selecionados e em seguida realizou-se a clivagem longitudinal dos mesmos.

O produto da clivagem de cada lobo (Figura 4) foi devidamente identificado, desidratado, clarificado em xileno, impregnado com parafina, seccionado com 5µm de espessura e corado com hematoxilina e eosina, segundo Luna (1968).

Figura 4: Produto da clivagem dos seis lobos tímicos em cápsulas histológicas devidamente identificados.



4.2.9 Avaliação histológica das lâminas

Primeiramente, selecionou-se uma lâmina de cada uma das nove coletas realizadas. Tais lâminas foram avaliadas quanto ao grau de depleção linfocitária por dois avaliadores (A e B), os quais, de comum acordo, estabeleceram escores de 1 a 5 para cada uma delas. O escore 1 representou a ausência de depleção, e o escore 5, a máxima perda linfocitária. Em seguida, foram sacadas fotomicrografias, sendo as imagens (Figuras 5, 6, 7, 8 e 9) utilizadas como critério para determinação dos escores ópticos dos demais lobos.

Seguiu-se com a análise do restante das lâminas, sendo as leituras feitas “às cegas”, em ordem aleatória e sem troca de informações entre os avaliadores.

Figura 5: Ausência de depleção linfocitária caracterizando um lobo tímico com escore óptico 1 (H&E,200X).

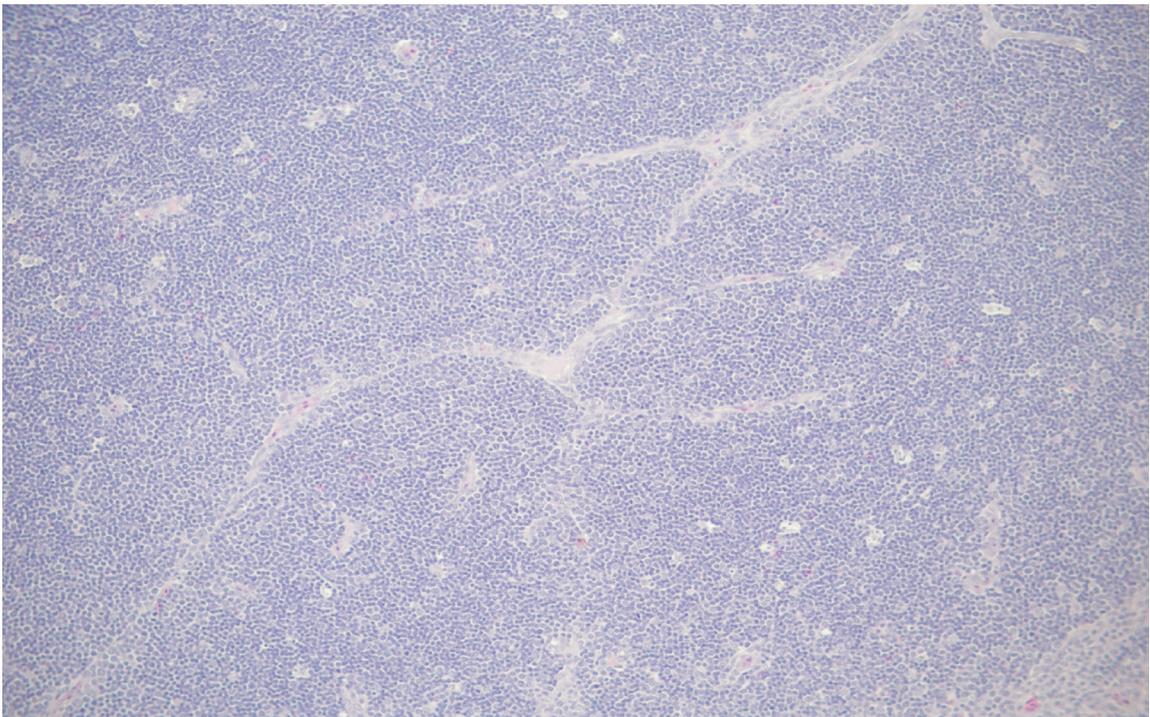


Figura 6: Depleção linfocitária caracterizando um lobo tímico com escore óptico 2 (H&E,200X).

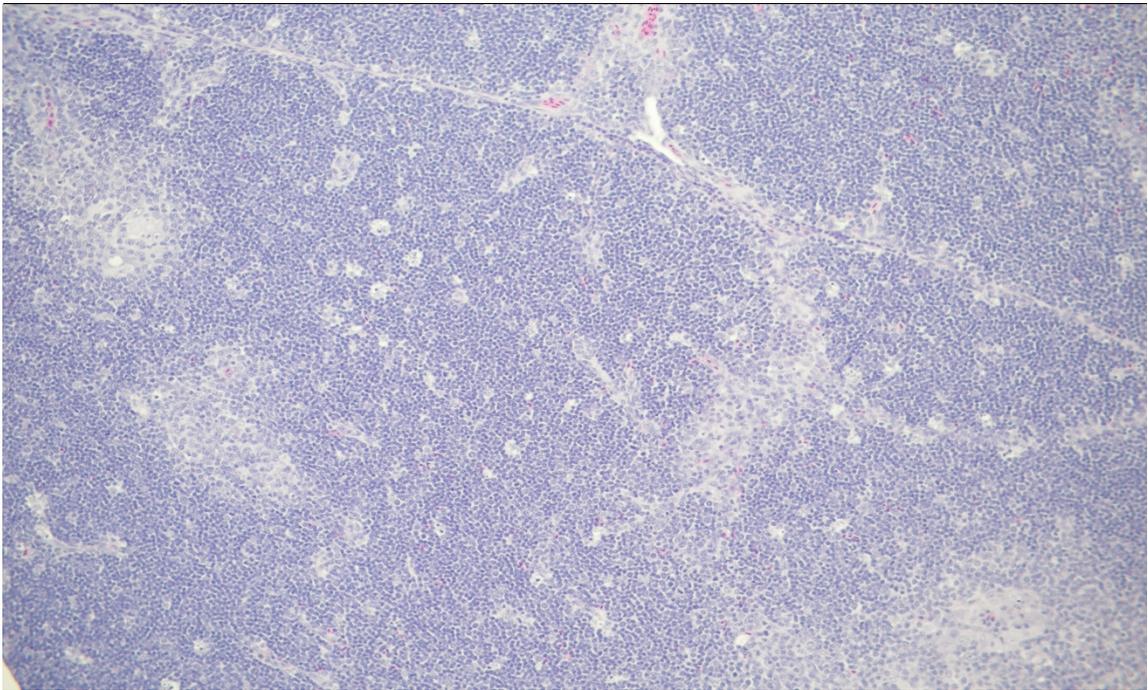


Figura 7: Depleção linfocitária caracterizando um lobo tímico com escore óptico 3 (H&E,200X).

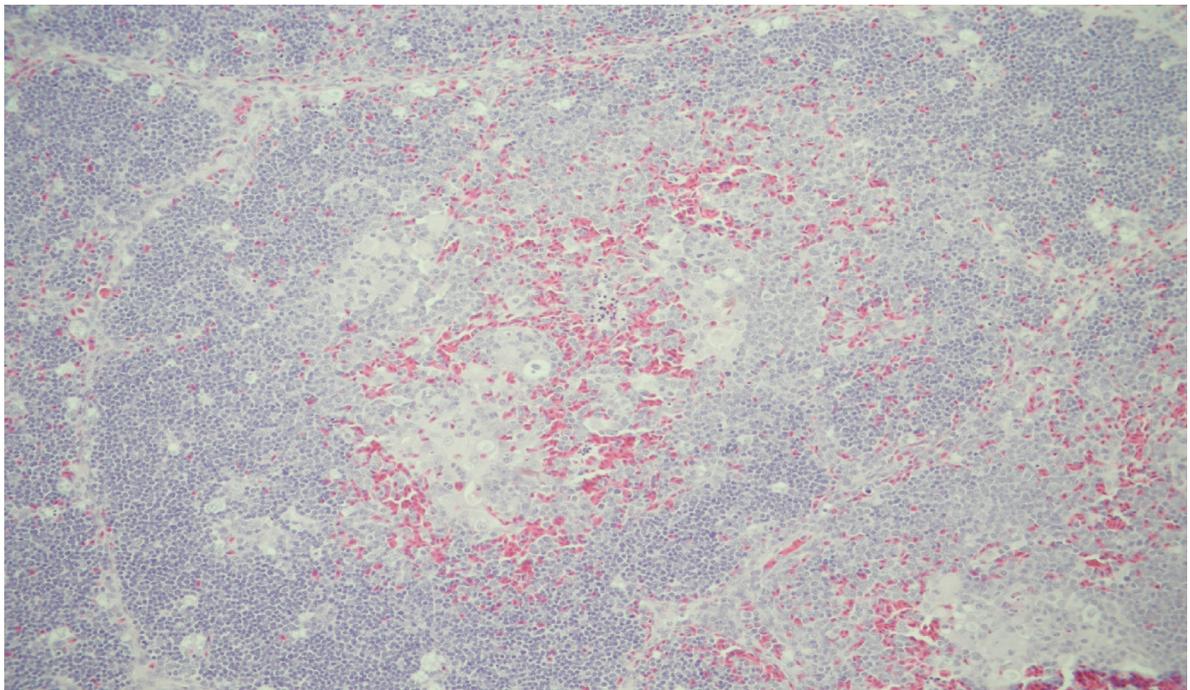


Figura 8: Depleção linfocitária caracterizando um lobo tímico com escore óptico 4 (H&E, 200X).

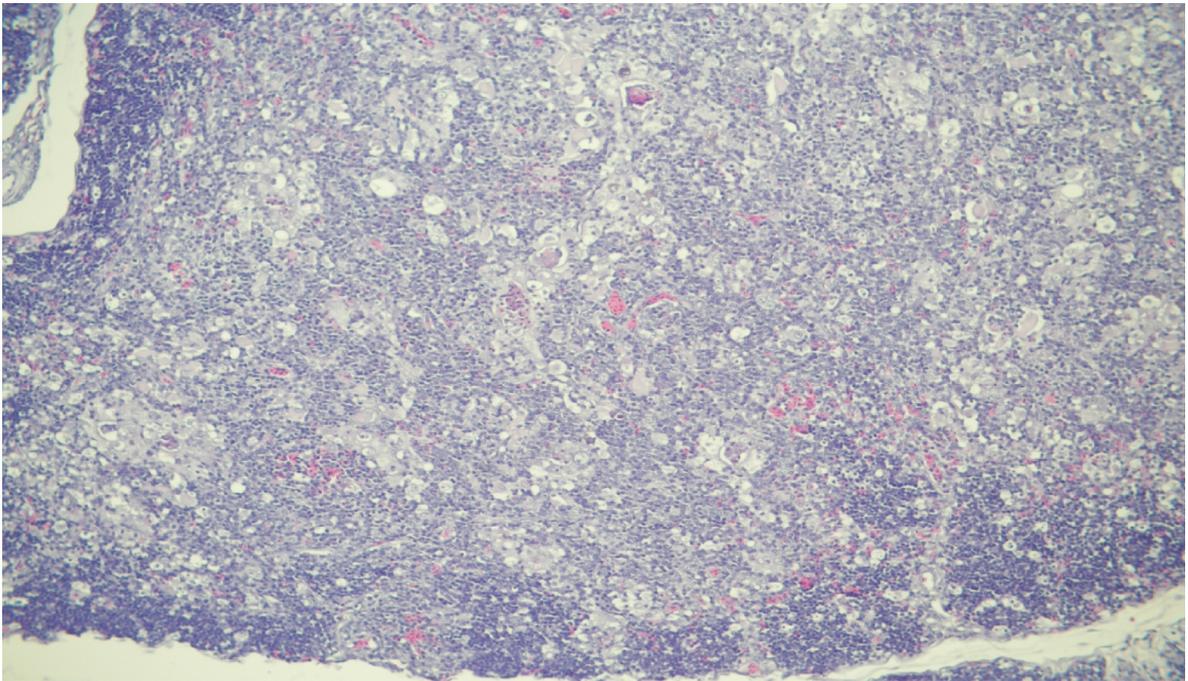
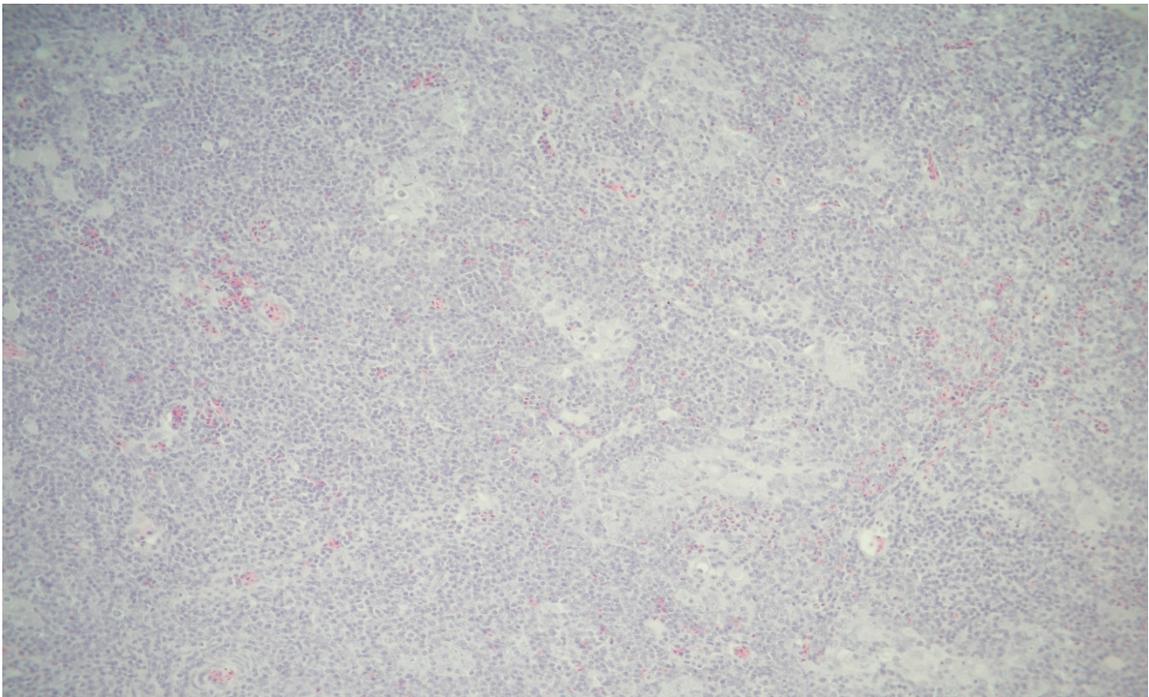
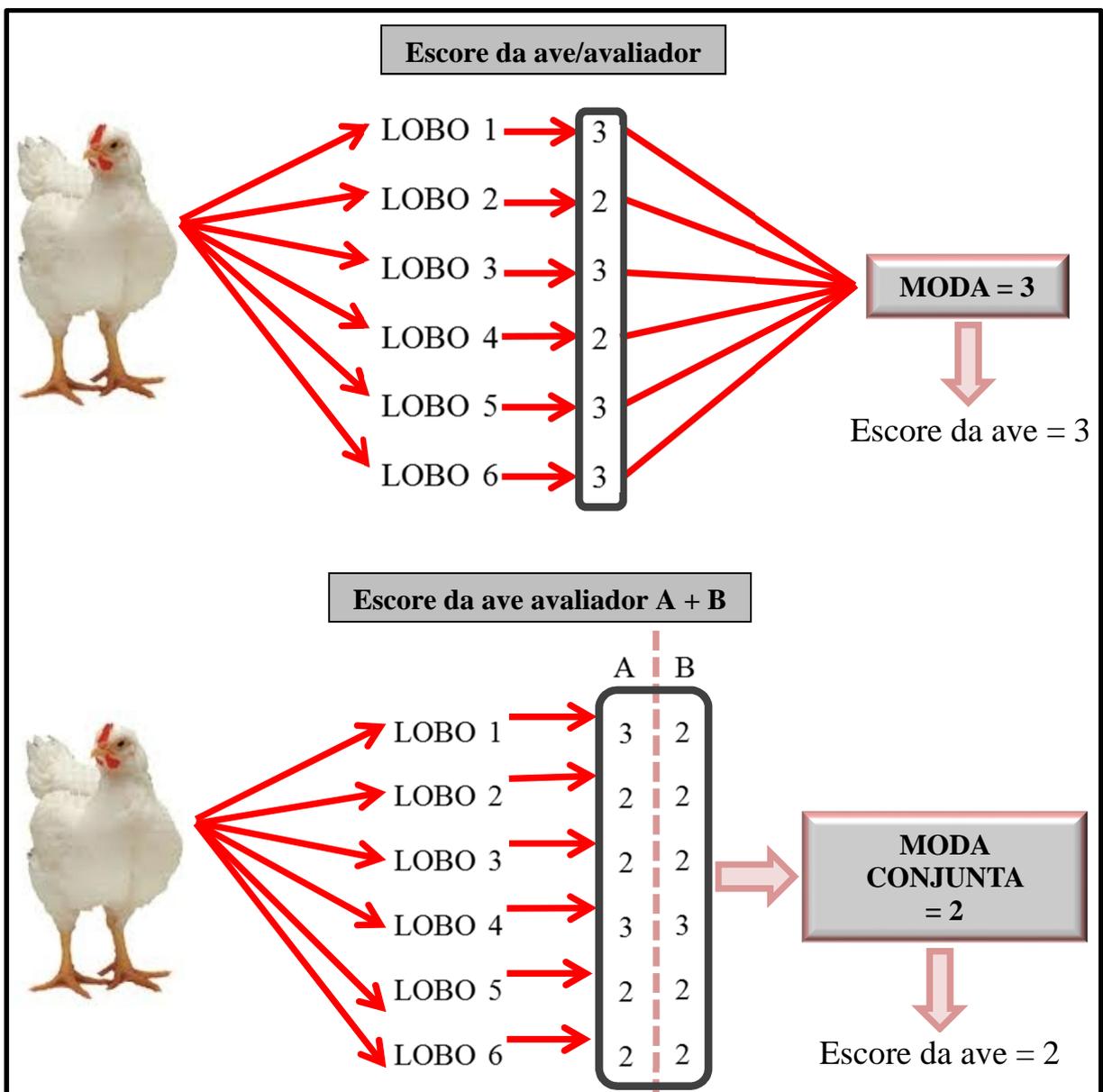


Figura 9: Depleção linfocitária caracterizando um lobo tímico com escore óptico 5 (H&E, 200X).



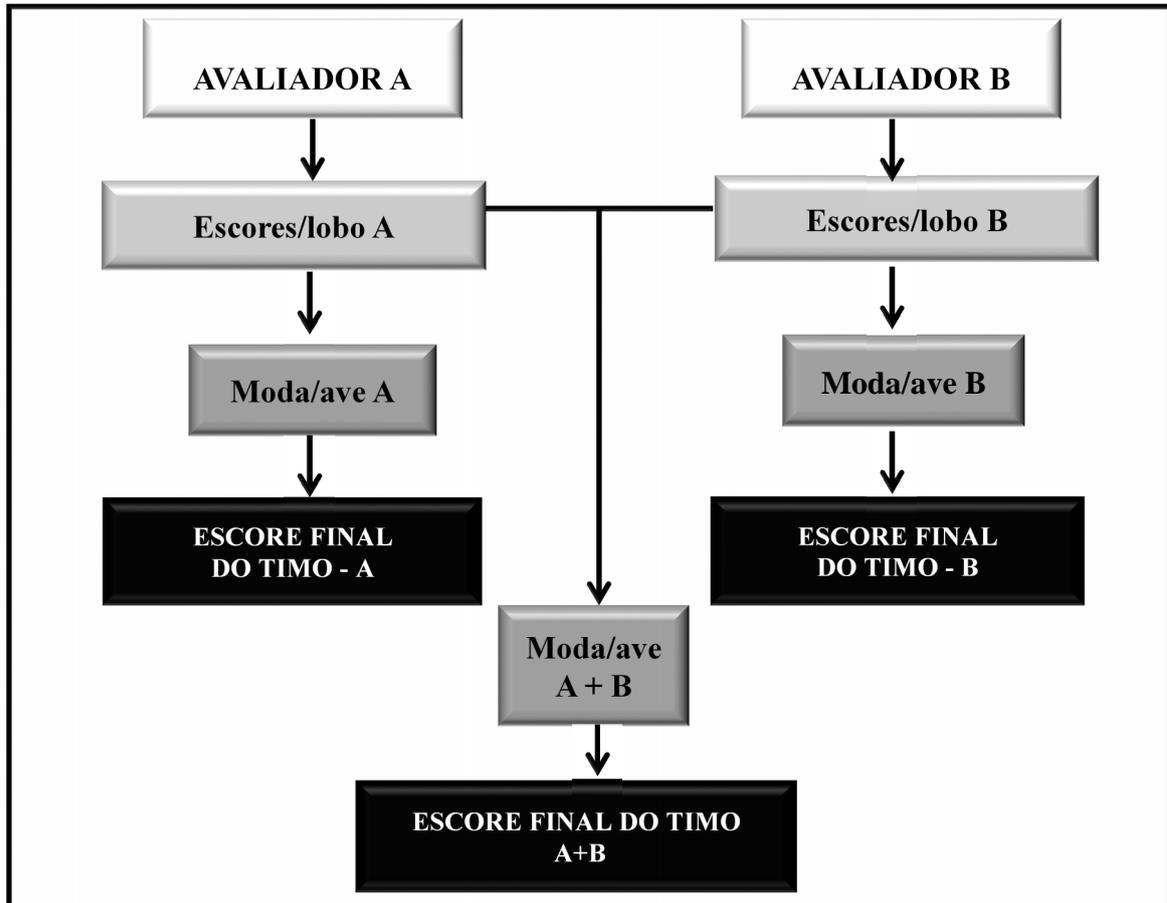
Atribuído o escore por lobo, o escore de depleção linfocitária de cada ave foi dado utilizando-se a moda das leituras dos dois avaliadores. Por se tratarem de dados categóricos, esta medida de tendência central é a que melhor pode caracterizar a perda linfocitária em um órgão multilobado como o timo. A figura 10 ilustra um exemplo do esquema para determinação dos escores finais de depleção/ave tendo como base as leituras histológicas por lobo de ambos avaliadores.

Figura 10: Exemplo do esquema quanto a determinação dos escores finais de depleção linfocitária/ave considerando a leitura dos lobos tímicos pelos avaliadores A e B.



Ao final, obtiveram-se três escores por ave, conforme representado na figura 11.

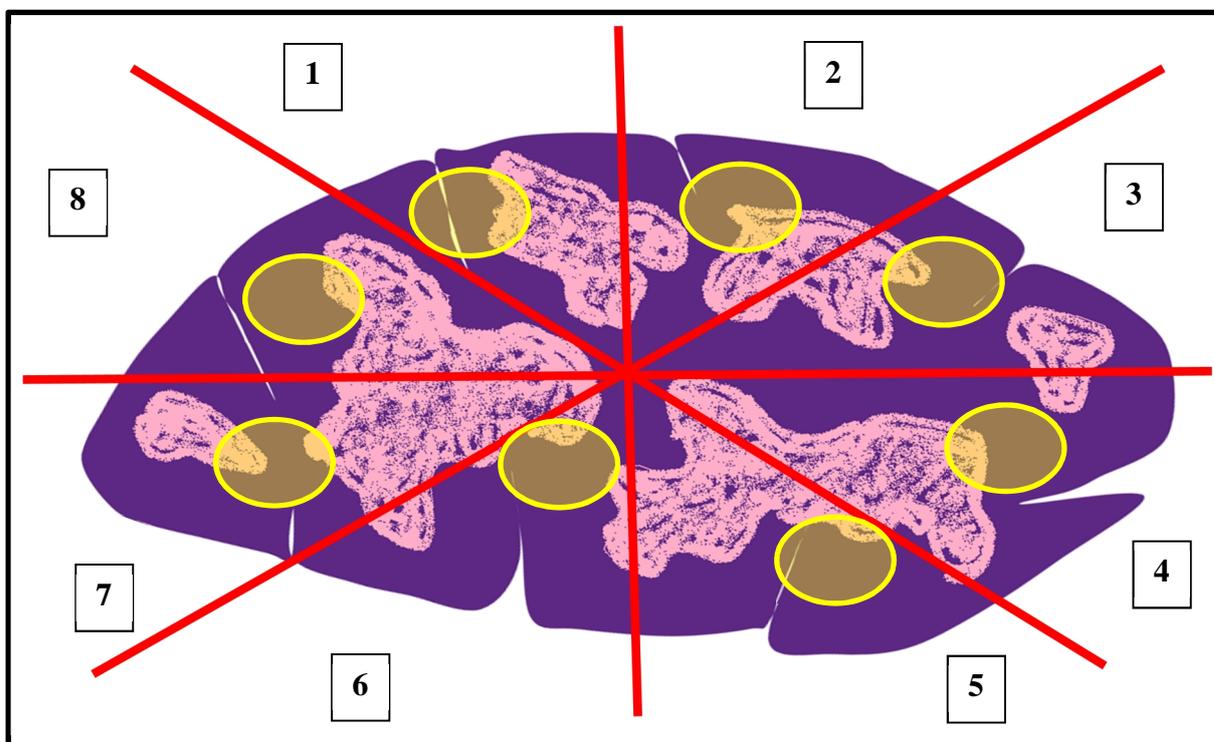
Figura 11: Determinação dos três escores finais de depleção linfocitária de cada ave considerando as leituras dos avaliadores A e B.



4.2.10 Obtenção das imagens

Os 402 lobos típicos foram individualmente divididos em oito partes (octantes), e numerados em sentido horário de 1 a 8. Foram obtidas fotomicrografias digitais (Figura 12) de cada um dos octantes.

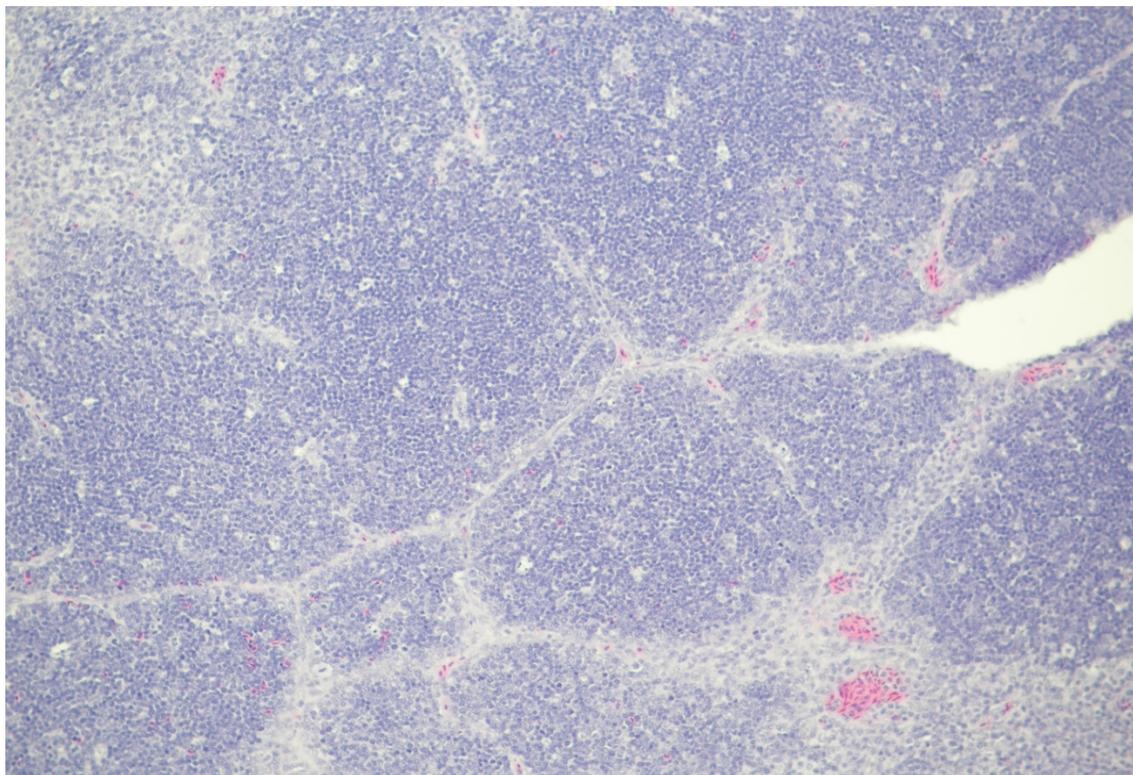
Figura 12: Imagem ilustrativa da divisão do lobo tímico em octantes e da numeração das áreas a serem analisadas. As marcações em amarelo correspondem às áreas selecionadas para fotomicrografia.



As imagens foram sacadas utilizando-se uma câmera OLYMPUS® C-7070 acoplada a um microscópio trinocular OLYMPUS® CX40, com uma magnificação de 200X, formato TIFF e resolução de 3072x2304.

Tomou-se o cuidado para “entrar” com a câmera sempre na ausência de foco em todos os octantes, visando que a área selecionada para fotomicrografia fosse obtida de modo aleatório. Regiões que apresentassem artefatos foram evitadas. Também, atentou-se para que a imagem abrangesse tanto a porção medular quanto a cortical dos lobos, de modo que quando isto não ocorria, partia-se para a área adjacente. A figura 13 representa uma imagem histológica da área fotografada correspondente a um dos octantes.

Figura 13: Imagem histológica da área de um dos octantes do lobo tímico selecionada para fotomicrografia (H&E, 200X).



4.2.11 Análise de imagens

As imagens foram processadas conforme estabelecido por Moraes *et al.* (2010), através da utilização do *software* MATLAB ® 6.5 – MATHWORKS. Para tanto, as imagens foram convertidas em escala de 256 tons de cinza (Figura 14) e realizada a seleção na área de interesse (Figura 15). Prosseguiu-se com a segmentação das mesmas (Figura 16) e, obtenção das características dos histogramas (Figura 17). Ao final, os valores apresentados pelo histograma foram exportados para uma tabela de Microsoft Excel a fim de se calcular a Área Direita (AD), Área Esquerda (AE), Área Ponto (AP), Ponto Maior (PM) e Índice Maior (IM) (Figura 18).

Figura 14: Imagem histológica em escala de cinza de um dos octantes do lobo tímico no processamento pelo *software* MATLAB[®] 6.5 – MATHWORKS.

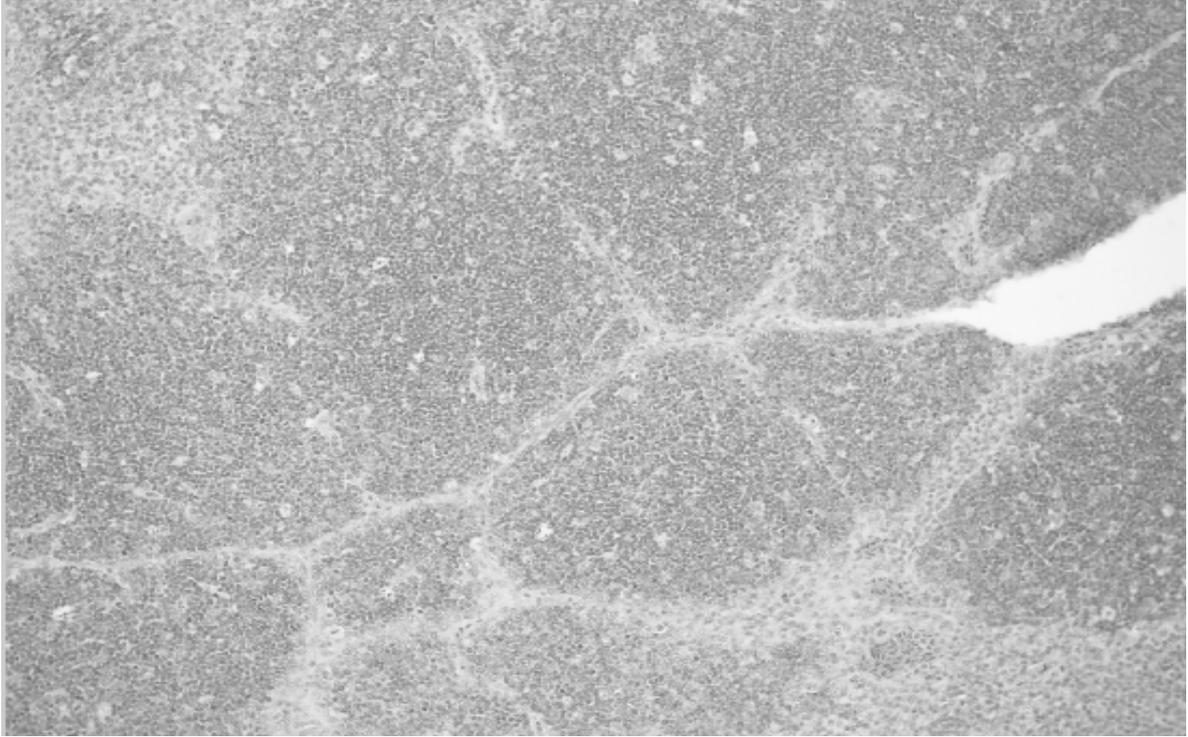


Figura 15: Aplicação da ferramenta de seleção correspondente a área de um dos octantes do lobo tímico a ser analisada no processamento pelo *software* MATLAB[®] 6.5 – MATHWORKS.

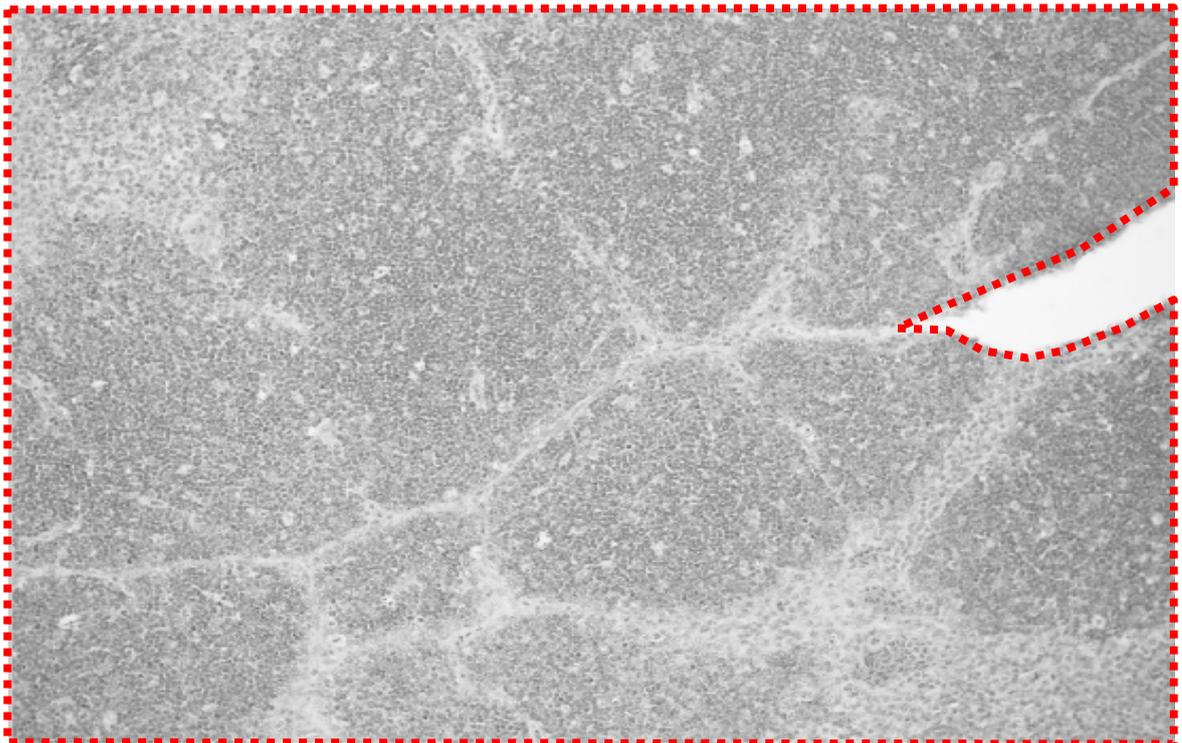


Figura 16: Área segmentada da imagem de um dos octantes do lobo tímico no processamento pelo *software* MATLAB[®] 6.5 – MATHWORKS.

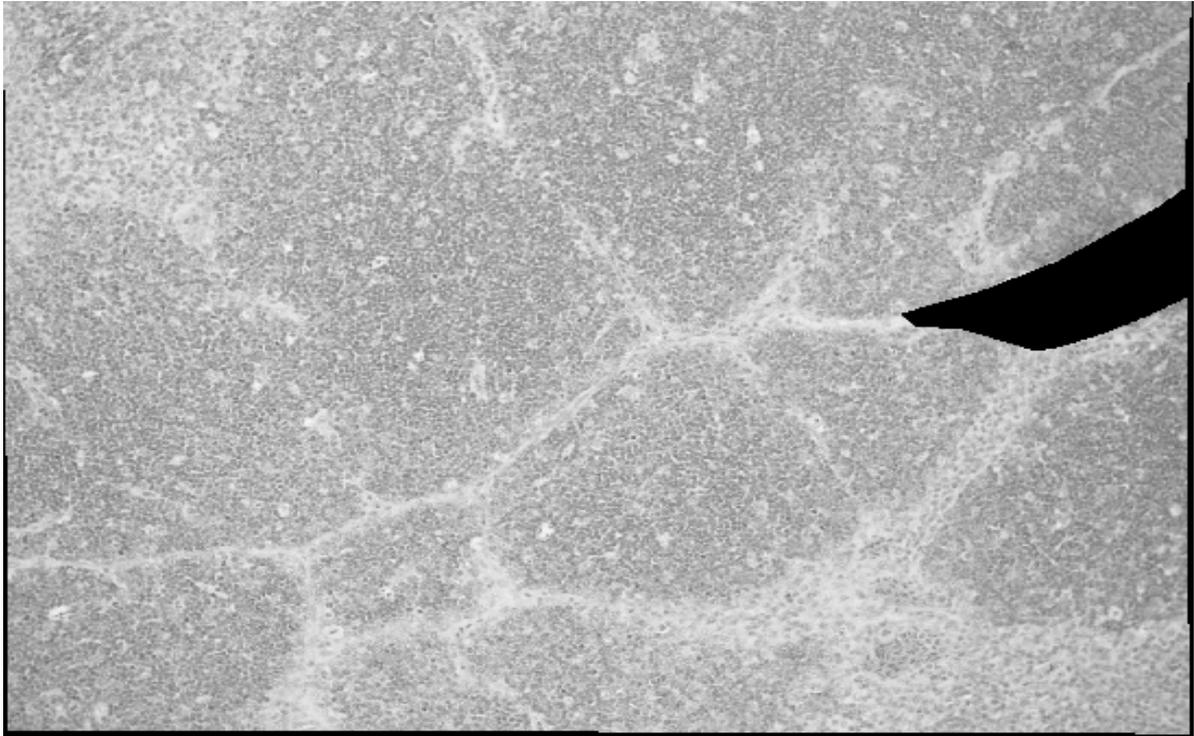


Figura 17: Número de pixels por tonalidade de cinza representado no histograma de processamento de uma fotomicrografia de um dos octantes do lobo tímico pelo *software* MATLAB[®] 6.5 – MATHWORKS.

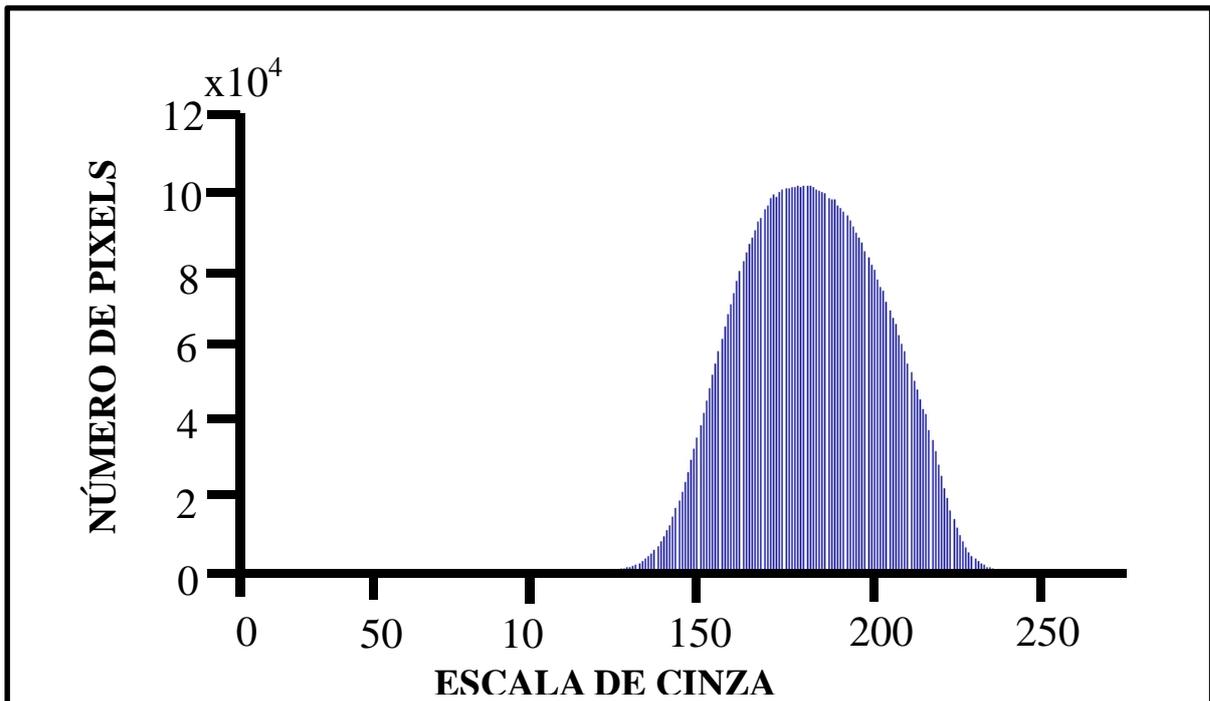
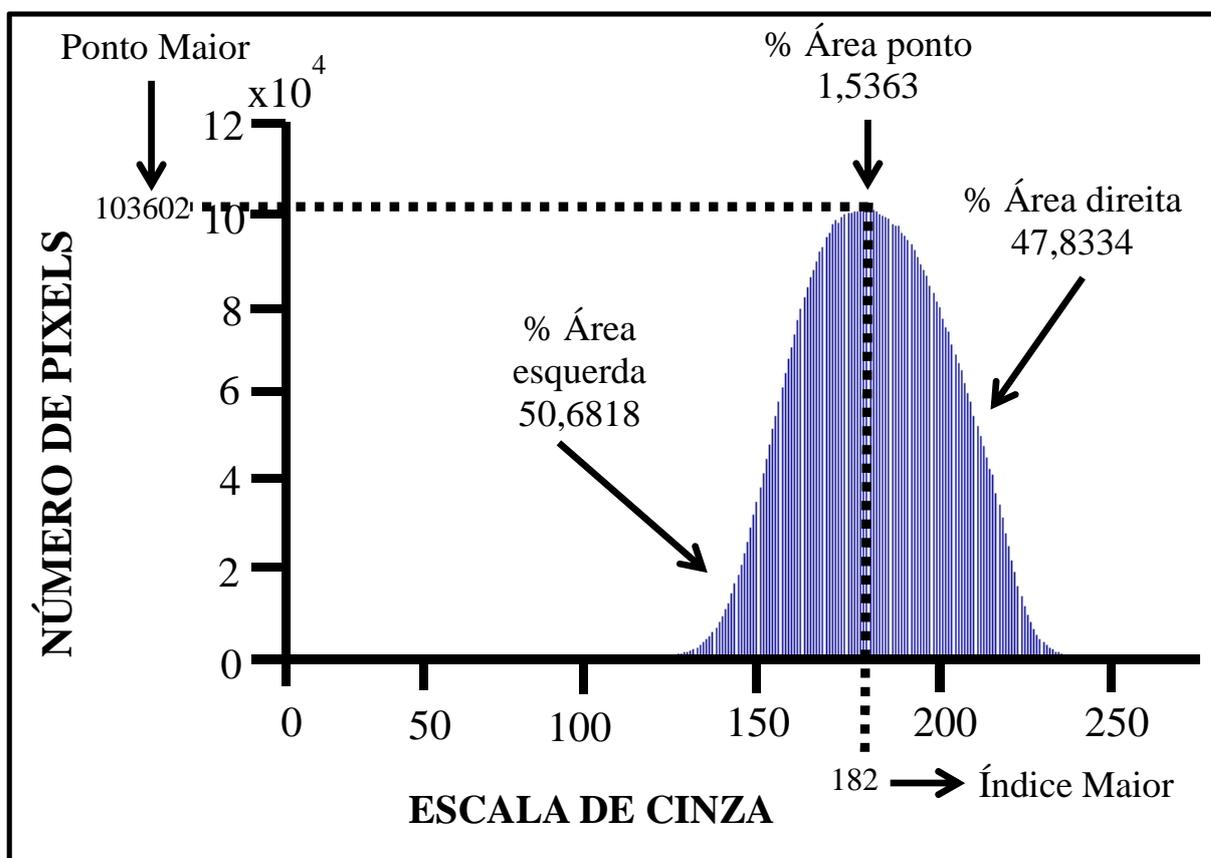


Figura 18: Valores de AE, AD, AP, PM e IM representados no histograma de processamento de uma fotomicrografia correspondente a um dos octantes do lobo tímico pelo *software* MATLAB[®] 6.5 – MATHWORKS.



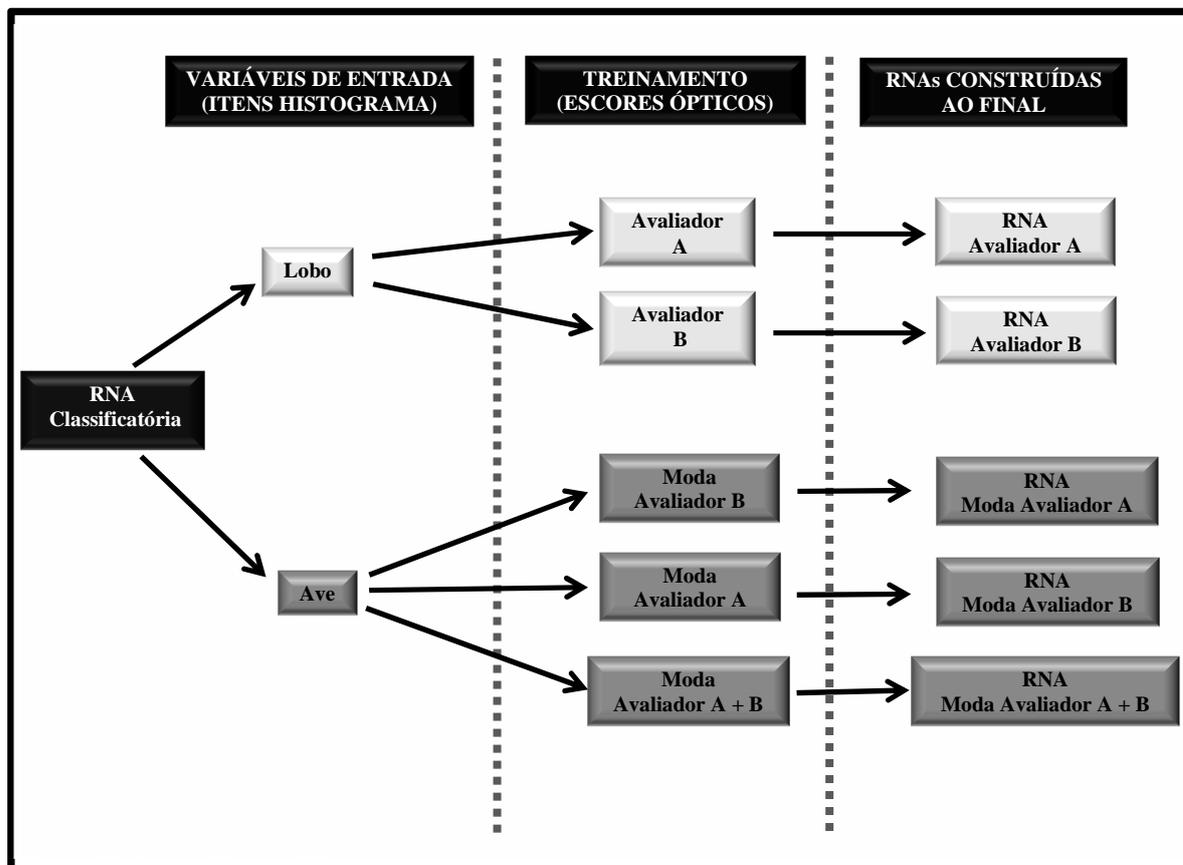
4.2.12 Redes neurais artificiais

Com os itens dos histogramas foram treinadas RNAs, de modo a classificar e reconhecer as imagens nos distintos escores ópticos de depleção linfocitária. Sendo assim, os valores de AD, AE, AP, PM e IM foram fornecidos a rede como variáveis de entrada e, como variável de saída, obteve-se o escore digital caracterizando a perda linfóide.

Neste estudo, foram utilizadas RNAs classificatórias através do *software* NEUROHELL[®] CLASSIFIER.

O esquema da figura 19 demonstra a construção das RNAs para este estudo, caracterizando a origem das variáveis de entrada, assim como dos escores ópticos utilizados no treinamento de cada rede classificatória construída.

Figura 19: Esquema de construção das RNAs classificatórias caracterizando as variáveis de entrada, treinamento e número de redes criadas ao final.



4.1.13 Peso Relativo do Timo

Com os valores obtidos do peso de cada ave e do seu respectivo timo, foi calculado do peso relativo (PR) do órgão conforme descrito abaixo:

$$\text{Peso Relativo Timo (\%)} = \frac{\text{Peso do Timo (gramas)}}{\text{Peso da ave (gramas)}} \times 100$$

4.2.14 Análise estatística

A variável PR foi utilizada a fim de se verificar o grau de associação entre o peso do timo e os escores digitais de depleção. Para tanto, empregou-se o teste de correlação de Spearman, fazendo-se uso do escore final da ave, o qual foi obtido com o cálculo da moda

conjunta das leituras dos avaliadores. Prosseguiu-se com o tratamento estatístico destas duas variáveis com Análise de Regressão.

Ainda, com a finalidade de se verificar diferenças na atribuição de escores por lobo entre os avaliadores A e B, e entre a moda das leituras realizadas pelos mesmos, utilizou-se o teste de Wilcoxon-Mann-Whitney.

Todas as análises estatísticas foram realizadas no *software* SPSS versão 18.

4.3 Resultados

4.3.1 Estabelecimento de escores ópticos de depleção linfocitária por lobo tímico

Através das análises histológicas dos 402 lobos tímicos, foi possível estabelecer 5 escores relacionados a perda linfocitária. A tabela 3 representa a distribuição dos lobos dentro destas cinco categorias, obtida com a leitura realizada pelos avaliadores A e B.

Tabela 3: Distribuição dos 402 lobos tímicos entre as 5 categorias de escore óptico de depleção linfocitária pelos avaliadores A e B.

Escore	Número de Lobos Tímicos			
	Avaliador A	%	Avaliador B	%
1	42	10,45	76	18,90
2	121	30,10	123	30,60
3	127	31,60	117	29,10
4	70	17,41	54	13,44
5	42	10,44	32	7,96
TOTAL	402	100	402	100

Estatisticamente observou-se que houve diferença significativa na atribuição de escores entre ambos os avaliadores ($p < 0,005$).

Pôde-se constatar que aproximadamente 60% dos 402 lobos concentraram-se nos escores 2 e 3, para ambos os avaliadores. Em relação ao escore 1, o avaliador B considerou 18,90% das amostras como sendo pertencentes a esta categoria, cerca de 8% a mais em relação ao avaliador A. Observa-se ainda, que o avaliador B categorizou 54 e 32 lobos, nos escores 4 e 5, respectivamente, números estes inferiores quando comparamos a distribuição das amostras nestes mesmos escores para o avaliador A.

Cabe ressaltar também que nas leituras realizadas, houve variação de escores entre os lobos de uma mesma cadeia tímica para ambos os avaliadores.

4.3.2 Estabelecimento de escores ópticos de depleção linfocitária por ave

Através do teste de Wilcoxon-Mann-Whitney pôde-se constatar que houve diferença significativa entre moda dos avaliadores A e B e, entre a moda do avaliador B e a moda conjunta dos avaliadores, para a mesma ave. No entanto, não se evidenciou diferença da moda conjunta em relação à moda do avaliador A ($p < 0,005$).

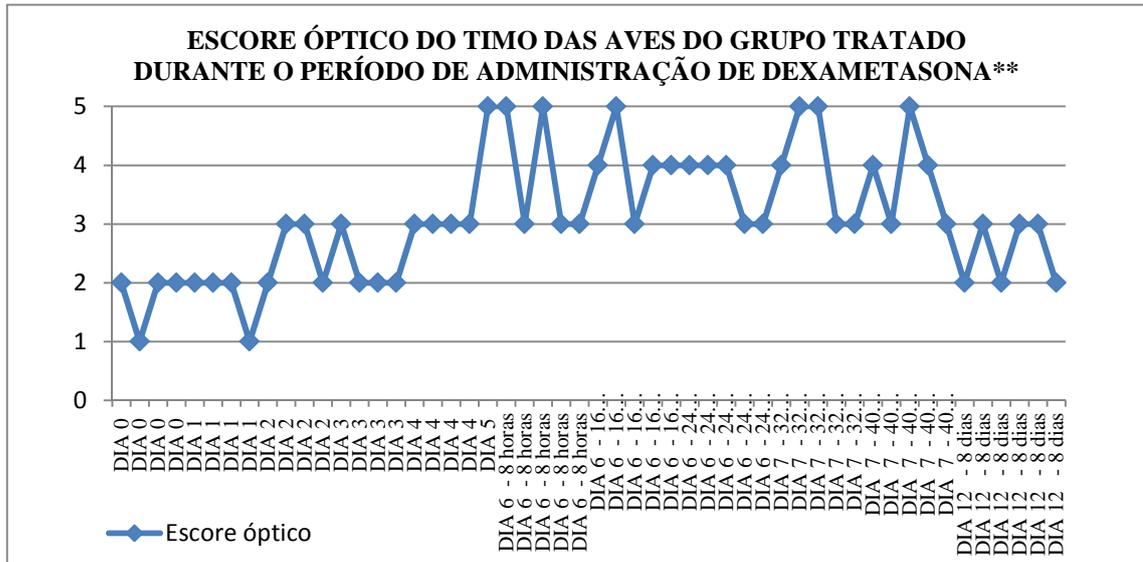
4.3.3 Escore óptico do timo ao longo do período de administração de dexametasona

Conforme gráfico da figura 20 observou-se que entre os dias 0 a 5 os escores de perda linfocitária ficaram entre 1 a 3.

A partir do tratamento realizado no dia 5, seguido de coletas a cada 8 horas, o grau de depleção foi maior. Durante este período que os escores mais extremos de perda linfóide (4 e 5) foram verificados.

Na última coleta, realizada 8 dias após a última administração do fármaco, indícios de recuperação no timo foram observados. Nesta última etapa do estudo, os escores 2 e 3 predominaram para os animais do grupo tratado.

Figura 20: Distribuição dos escores ópticos do timo ao longo do tratamento com dexametasona*.



*: Protocolo adaptado de Kong, *et al.* (2002)

** : Escore Óptico atribuído à moda conjunta dos avaliadores A e B.

A sequência de figuras de 21 a 26 ilustram o timo de aves pertencentes aos grupos controle e tratado 8h, 16h, 24h, 32h, 40h e 8 dias após o tratamento realizado no dia 5.

Figura 21: Aspecto macroscópico dos timos dos grupos controle e tratado 8 horas após a última administração de dexametasona. As setas em vermelho indicam os lobos tímicos.

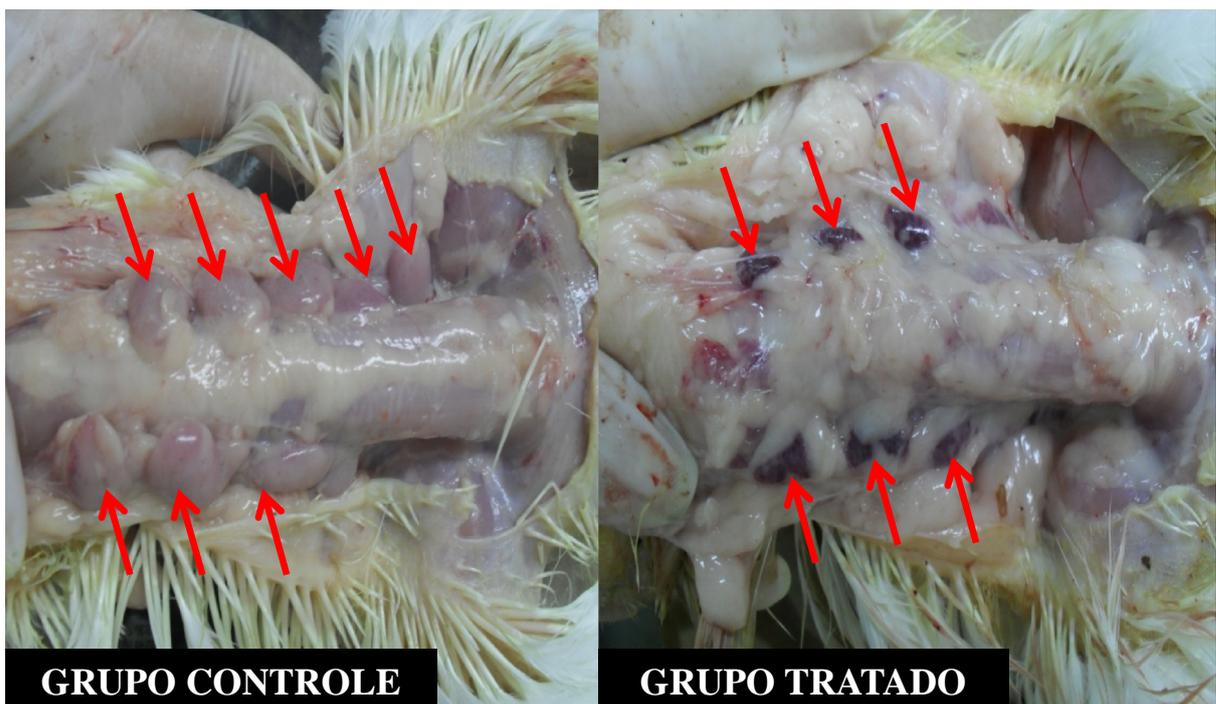


Figura 22: Aspecto macroscópico dos timos dos grupos controle e tratado 16 horas após a última administração de dexametasona. As setas em vermelho indicam os lobos tímicos.

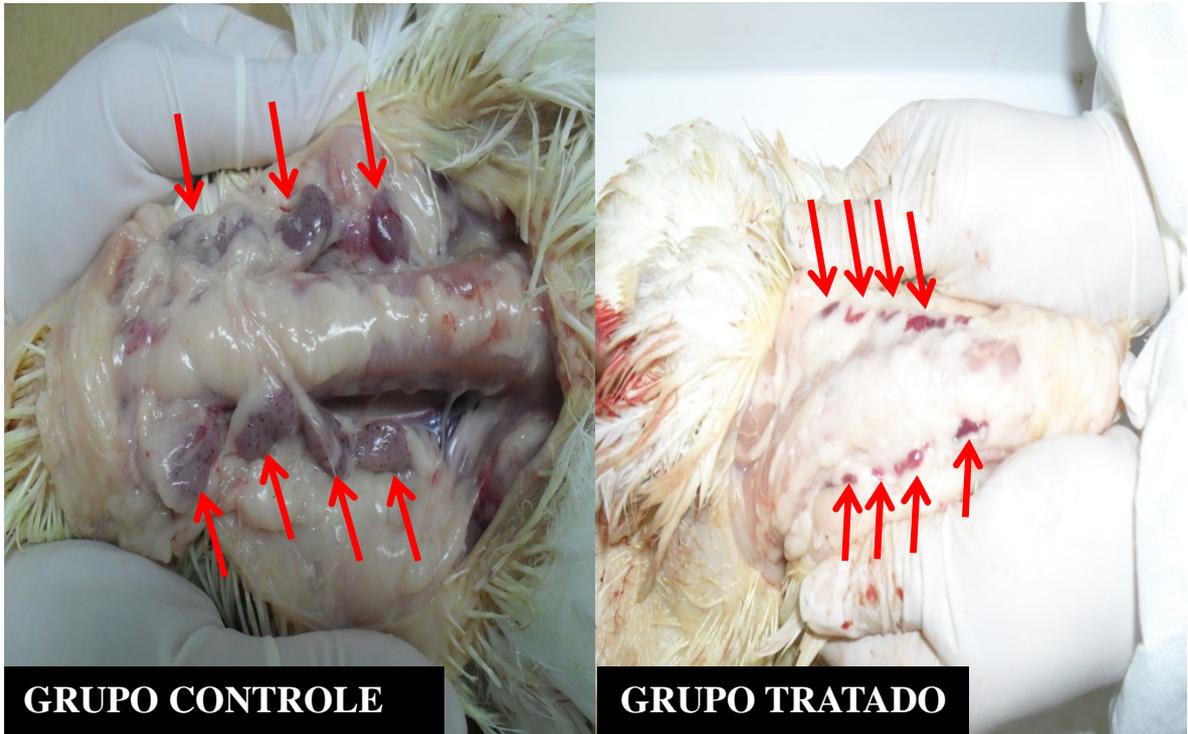


Figura 23: Aspecto macroscópico dos timos dos grupos controle e tratado 24 horas após a última administração de dexametasona. As setas em vermelho indicam os lobos tímicos.

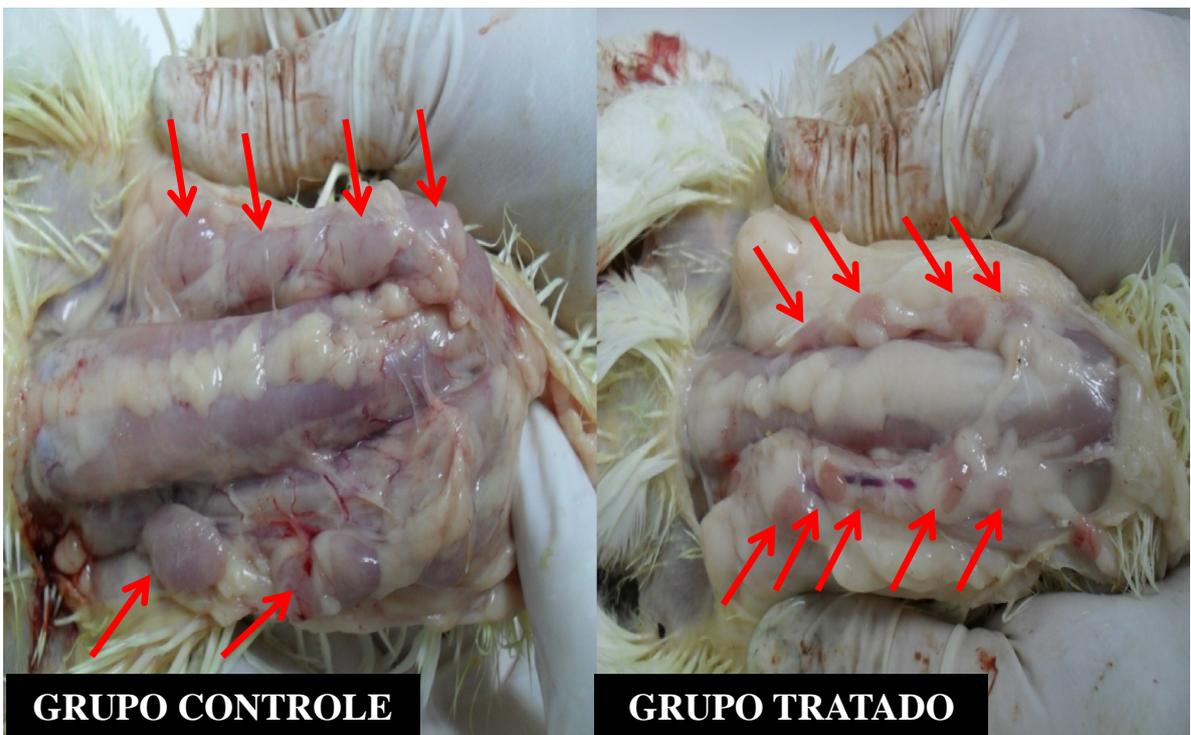


Figura 24: Aspecto macroscópico dos timos dos grupos controle e tratado 32 horas após a última administração de dexametasona. As setas em vermelho indicam os lobos tímicos.

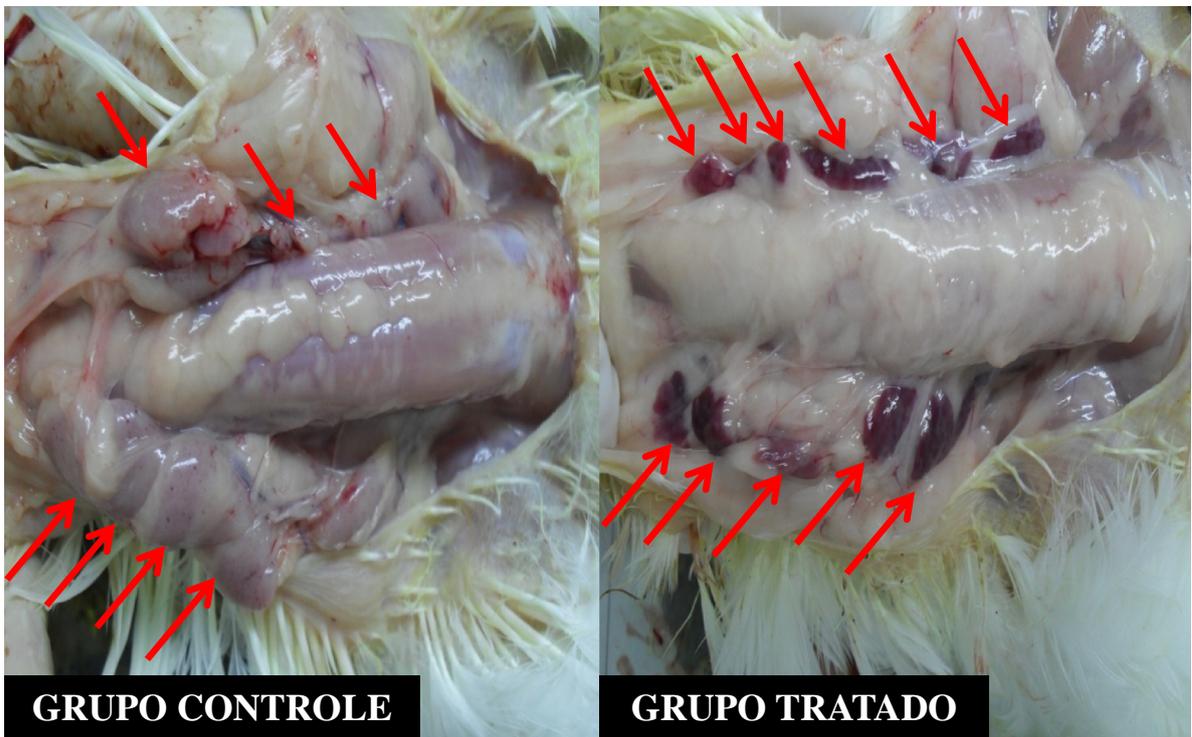


Figura 25: Aspecto macroscópico dos timos dos grupos controle e tratado 40 horas após a última administração de dexametasona. As setas em vermelho indicam os lobos tímicos.

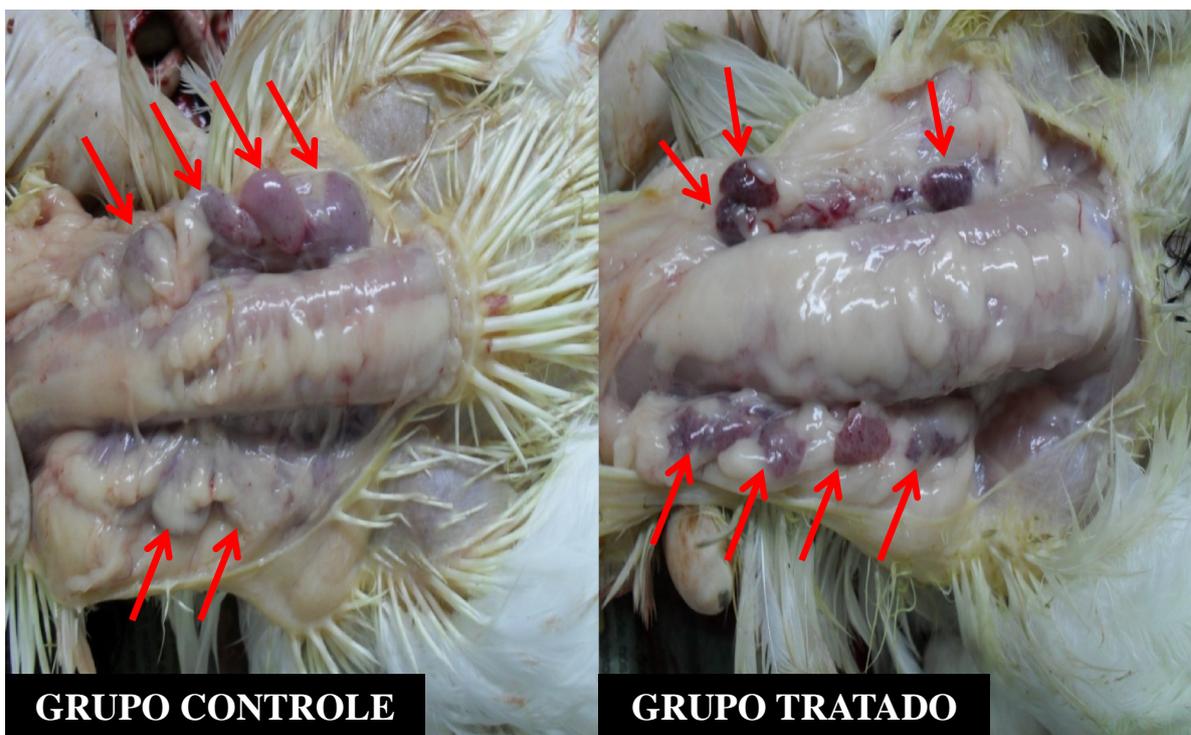
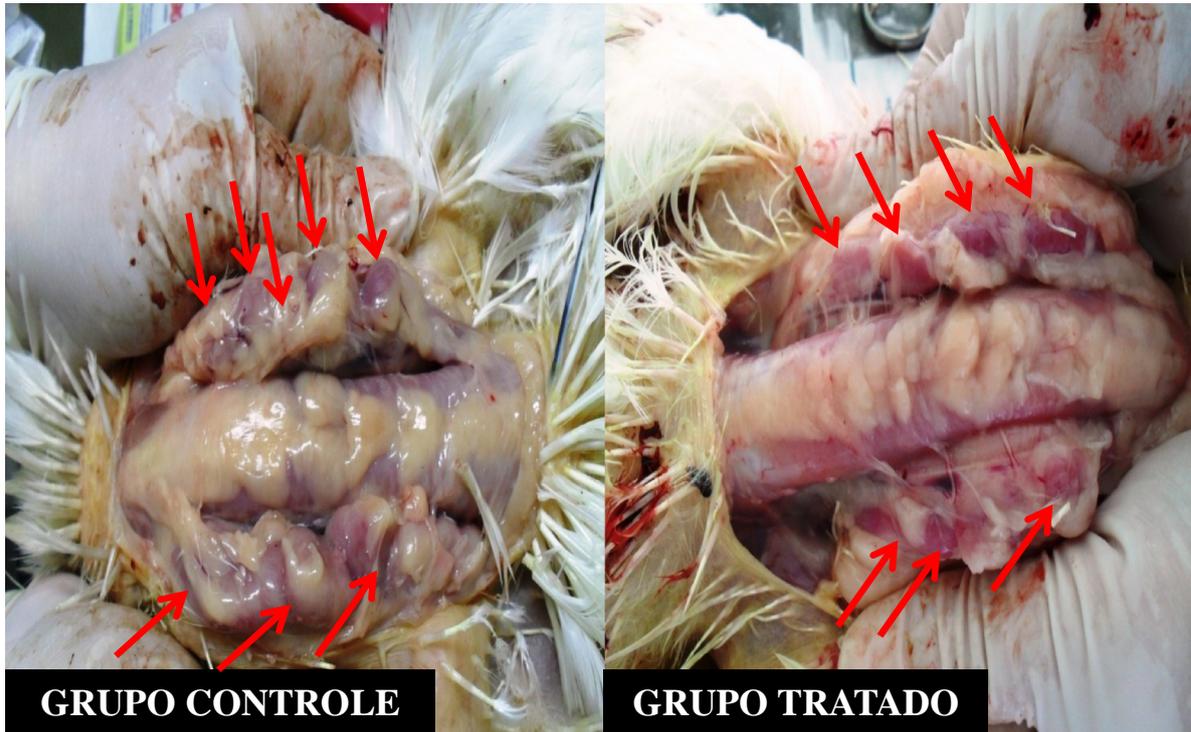


Figura 26: Aspecto macroscópico dos timos dos grupos controle e tratado 8 dias após a última administração de dexametasona. As setas em vermelho indicam os lobos tímicos.



4.3.4 Redes neurais artificiais

4.3.4.1 - Criação de RNA classificatória utilizando para treinamento os escores por lobo das leituras do avaliador A

A Tabela 4 representa os resultados da classificação dos lobos utilizando-se para treinamento das RNAs os escores ópticos de depleção linfocitária atribuídos pelo avaliador A.

Tabela 4: Categorização dos lobos tímicos quanto ao grau de depleção linfocitária pelas RNAs classificatórias treinadas os escores ópticos atribuídos pelo avaliador A.

	EO 1	EO 2	EO 3	EO 4	EO 5	Total	VPP (%)
ED 1	7	4	1	0	0	12	58,33
ED 2	27	71	31	9	6	144	49,31
ED 3	5	41	87	32	18	183	47,54

ED 4	2	5	6	29	6	48	60,42
ED 5	1	0	2	0	12	15	80,0
Total	41	121	127	70	42	402	-
Sensibilidade (%)	16,67	58,68	68,5	41,43	28,57	-	-
Especificidade (%)	98,61	74,02	65,09	94,28	99,17	-	-

EO: Escore Óptico; ED: Escore Digital
VPP: Valor Preditivo Positivo

Esta rede demonstrou um alto valor de especificidade para os escores 1 (98,61%), 4 (94,28%) e 5 (99,17%)¹. No entanto, estes mesmos escores obtiveram um baixo percentual de classificações corretas (16,67; 41,43 e 28,57%, respectivamente). Para os escores 2 e 3 foi constatado sensibilidade de 58,68% e 68,5% e, especificidade de 74,02% e 65,09%, respectivamente.

Os VPP, ou seja, o percentual de lobos classificados corretamente pela RNA, oscilaram entre 47,54% (escore 3) e 80% (escore 5).

Para a EO-1, observou-se que 7 dos 12 lobos foram alocados adequadamente. Entretanto, as demais amostras foram distribuídas entre os ED-2 (65,85%), 3 (12,19%), 4 (4,87%) e 5 (2,43%).

A RNA classificou corretamente mais de 50% dos 121 lobos no escore 2. O ED- 3 respondeu por 33,88% de categorizações inadequadas, seguido do ED- 4 (4,13%) e do ED- 1 (3,30%). Nenhum lobo foi classificado no ED- 5.

A maioria das 127 amostras do escore 3 foram idoneamente classificadas (68,5%). Uma amostra foi incorretamente categorizada no ED-1 (0,78%), 31 no ED-2 (24,40%), 6 no ED-4 (4,72%) e 2 no ED-5 (1,57%).

No escore 4, a RNA distribui 29 (41,43%) dos 70 lobos tímicos de forma adequada. Os lobos restantes, foram classificados no ED-2 e ED-3, correspondendo a duas (12,85%) e 32 (45,71%) amostras, respectivamente. Nos ED-1 e ED-5 não foram classificadas amostras.

Com relação ao escore 5, categorizou-se satisfatoriamente 12 amostras (28,57%). O ED-3 abrangeu 42,85% das classificações incorretas. Da mesma forma, os ED-2 e ED-4, obtiveram 14,28% de lobos alocados erroneamente.

Ao final, esta RNA apresentou 206 (51,24%) dos 402 lobos do timo categorizados de modo correto dentro dos ED, já 196 lobos (48,76%) foram distribuídos de modo inadequado entre os cinco ED.

4.3.4.2 - Criação de RNA classificatória utilizando para treinamento os escores por lobo das leituras do avaliador B

A tabela 5 representa os resultados da classificação dos lobos utilizando-se para treinamento das RNAs os escores ópticos de depleção linfocitária atribuídos pelo avaliador B.

Tabela 5: Categorização dos lobos tímicos quanto ao grau de depleção linfocitária pelas RNAs classificatórias treinadas com os escores ópticos atribuídos pelo avaliador B.

	EO 1	EO 2	EO 3	EO 4	EO 5	Total	VPP (%)
ED 1	43	15	6	1	2	67	64,18
ED 2	13	68	26	14	6	127	53,54
ED 3	18	39	83	28	14	182	45,6
ED 4	1	1	1	9	2	14	64,29
ED 5	1	0	1	2	8	12	66,67
Total	76	123	117	54	32	402	-
Sensibilidade (%)	56,58	55,28	70,94	16,67	25	-	-
Especificidade (%)	92,64	78,85	65,26	98,56	98,92	-	-

EO: Escore Óptico; ED: Escore Digital

VPP: Valor Preditivo Positivo

O maior valor de sensibilidade foi observado para o escore 3 (70,94%), sendo que as categorias 1, 2, 4 e 5 assumiram valores inferiores, oscilando entre 16,67% e 56,58%. Quanto a especificidade, constatou-se que, com exceção das categorias 2 e 3, os demais escores obtiveram valores superiores a 90%. O menor valor positivo (VPP) foi encontrado no escore digital (ED) 3 (45,6%), já o maior VPP (66,57%) pertence ao ED- 5.

Para o escore 1, foram classificados corretamente 43 dos 76 lobos tímicos. O restante dos lobos foram classificados nas demais categorias, sendo 13 no ED-2, 18 no ED-3, um no ED-4 e um no ED-5.

A maioria das amostras do EO-2 é classificada de forma correta (55,28%). Categorizou-se erroneamente 15 lobos no ED-1, 39 no ED-3 e um no ED-4. Nenhum lobo foi classificado na categoria 5.

Com relação ao EO-3, categorizou-se de maneira correta a maioria dos 117 lobos (70,94%), sendo o restante das amostras distribuídos dentro dos demais escores como segue: 5,12% como ED-1, 22,22% como ED-2, 0,85% como ED-4 e 0,85% como ED-5.

A RNA classifica corretamente 9 lobos no EO-4 (16,67%). Foram alocados de maneira incorreta uma amostra no ED-1 (1,85%), 14 no ED-2 (25,92%), 28 no ED-3 (51,85%) e duas no ED-5 (3,70%).

Para o EO-5, categorizou-se 8 lobos adequadamente (25%). Apenas duas amostras foram inapropriadamente classificadas no ED-1 (6,25%), seis no ED-2 (18,75%), 14 no ED-3 (43,75%) e duas no ED-4 (6,25%).

Analisando de forma geral a rede construída para as leituras realizadas pelo avaliador B, constatou-se que o percentual de classificações corretas foi de 52,49%.

4.3.4.3 – Criação de RNA classificatória utilizando para treinamento a moda dos escores ópticos por ave das leituras realizadas pelo avaliador A.

A Tabela 6 representa os resultados da classificação das aves utilizando-se para treinamento das RNAs a moda dos escores ópticos de depleção linfocitária, os quais foram atribuídos pelo avaliador A.

Tabela 6: Categorização das aves quanto ao grau de depleção linfocitária pelas RNAs classificatórias treinadas com a moda dos escores ópticos atribuídos pelo avaliador A.

	EO 1	EO 2	EO 3	EO 4	EO 5	Total	VPP (%)
ED 1	4	0	0	0	0	4	100,0
ED 2	2	19	3	0	0	24	79,17
ED 3	0	3	18	0	0	21	85,71
ED 4	0	0	0	9	1	10	90,0
ED 5	0	0	0	0	8	8	100,0
Total	6	22	21	9	9	67	-
Sensibilidade (%)	66,67	86,36	85,71	100,0	88,89	-	-
Especificidade (%)	100,0	88,89	93,48	98,28	100,0	-	-

EO: Escore Óptico; ED: Escore Digital

VPP: Valor Preditivo Positivo

Observa-se que, com exceção do escore 1, as demais categorias obtiveram sensibilidade elevada, sendo superior a 85%. Altos níveis de especificidade foram constatados em todos os escores, os quais assumiram valores superiores a 88%. Com relação a proporção de classificações corretas nos diferentes ED (VPP), os valores oscilaram entre 100% (escores 1 e 5) e 79,17% (escore 2).

Para o escore 1, evidenciou-se que quatro aves (66,66%) foram devidamente classificadas, e apenas duas classificadas no escore subsequente. Já para o escore 2, a RNA categorizou de maneira correta 19 (86,36%) das 22 aves, alocando somente 3 (13,64%) no ED-3. Com relação ao escore 3, obteve-se 85,71% de classificações corretas. Todos os animais pertencentes ao escore 4 foram satisfatoriamente classificados no ED-4. O escore 5 teve apenas uma ave alocada incorretamente no ED-4, obtendo-se assim, 88,89% de categorizações adequadas.

Esta RNA apresentou 86,57% (58 aves) de classificações corretas ao final, de modo que somente 13,43% (9 aves) foram indevidamente alocadas nos diferentes ED.

4.3.4.4 – Criação de RNA classificatória utilizando para treinamento a moda dos escores ópticos por ave das leituras do avaliador B.

A Tabela 7 representa os resultados da classificação das aves utilizando-se para treinamento das RNAs a moda dos escores ópticos de depleção linfocitária, os quais foram atribuídos pelo avaliador B.

Tabela 7: Categorização das aves quanto ao grau de depleção linfocitária pelas RNAs classificatórias treinadas com a moda dos escores ópticos atribuídos pelo avaliador B.

	EO 1	EO 2	EO 3	EO 4	EO 5	Total	VPP (%)
ED 1	12	2	0	0	0	12	85,71
ED 2	1	16	4	0	0	21	76,19
ED 3	1	2	17	2	1	23	73,91
ED 4	0	0	0	5	0	5	100,0
ED 5	0	0	0	0	4	4	100,0
Total	14	18	21	7	5	67	-
Sensibilidade (%)	85,71	80,0	80,95	71,43	80,0	-	-
Especificidade (%)	96,23	89,36	86,96	100,0	100,0	-	-

EO: Escore Óptico; ED: Escore Digital

VPP: Valor Preditivo Positivo

De acordo com a tabela acima, pôde-se verificar que os valores encontrados para a sensibilidade do método estão entre 71,43 e 85,71%, não sendo, portanto, tão elevados quanto aos observados na rede treinada com os escores do avaliador A, considerando a ave como unidade amostral. A especificidade observada atingiu bons níveis, assumindo valores entre 86,96% para o escore 3 e 100% para os escores 4 e 5. Quanto ao VPP, apenas os escores 2 e 3 obtiveram menos de 80% de classificações corretas nos ED, já os escore 1 apresentou 85,71%, seguido dos escores 4 e 5, com VPP de 100%.

Das 14 amostras do escore 1, apenas duas não foram corretamente classificadas, sendo a uma delas atribuído o ED-2 e a outra o ED-3. Para o escore 2, 16 aves (80%) foram acertadamente categorizadas. A maioria dos animais pertencentes ao escore 3 (80,95%) foram classificados de forma adequada pela RNA, com exceção de quatro (19,05%), para os quais

foi atribuído o ED-2. Ainda, a RNA realiza de modo satisfatório cinco categorizações entre as sete unidades amostrais do escore 4, sendo conferido o ED-3 a 2 delas (28,57%). Com relação ao escore 5, apenas uma ave foi indevidamente classificada o ED-3, correspondendo assim, a 80% de classificações corretas para esta categoria de perda linfocitária. Ao total, esta RNA classificou devidamente 54 aves (80,60%).

4.3.4.5 – Criação de RNA classificatória utilizando para treinamento a moda dos escores ópticos por ave das leituras dos avaliadores A e B de forma conjunta.

A Tabela 8 representa os resultados da classificação das aves nos diferentes graus de depleção linfocitária, utilizando-se para treinamento das RNAs a moda dos escores ópticos atribuídos pelos avaliadores A e B em conjunto.

Tabela 8: Categorização das aves quanto ao grau de depleção linfocitária pelas RNAs classificatórias treinadas com a moda dos escores ópticos atribuídos pelos avaliadores A e B.

	EO 1	EO 2	EO 3	EO 4	EO 5	Total	VPP (%)
ED 1	9	0	0	0	0	9	100
ED 2	0	20	2	0	0	22	90,91
ED 3	0	1	19	0	0	20	95
ED 4	0	0	0	9	1	10	90
ED 5	0	0	0	0	6	6	100
Total	9	21	21	9	7	67	-
Sensibilidade (%)	100	95,24	90,48	100	85,71	-	-
Especificidade (%)	100	95,65	97,83	98,28	100	-	-

EO: Escore Óptico; ED: Escore Digital;
VPP: Valor Preditivo Positivo

Os resultados observados com a construção desta rede revelaram percentuais de classificações corretas superiores a 85% para todos os escores. A respeito da especificidade, níveis acima de 95% foram encontrados para todas as categorias. Quanto ao VPP, observa-se que, com exceção dos ED-1 e ED-5, os demais obtiveram proporções de verdadeiros positivos entre 80 e 95%.

Para o escore 1, constatou-se 100% de classificações corretas. Na categoria 2, 20 dos 21 animais (95,24%) foram adequadamente categorizados, sendo apenas um inserido no ED-3. Com relação ao escore 3, a RNA classificou com alto percentual de acerto 19 aves (90,48%), sendo somente duas (9,52%) alocadas no ED-2. Todas as nove amostras pertencentes ao escore 4 foram corretamente distribuídas no ED-4. Para a categoria 5 de depleção linfocitária, seis dos sete animais (85,71%) foram adequadamente enquadradas no ED-5.

Finalmente, esta RNA forneceu 94,03% (63 aves) de categorizações corretas, portanto, somente 5,97% dos animais foram indevidamente alocados em ED não condizentes com sua classificação pela metodologia óptica convencional.

No apêndice 2, consta a representação da interface desta RNA classificatória no *software* NEUROSHELL[®] CLASSIFIER.

4.3.5 Peso relativo do timo x escores digitais de depleção linfocitária

O teste de correlação de Spearman demonstrou uma forte relação linear entre o escore digital de depleção do timo e seu peso relativo ($r = -0,77$) a 5% de significância, ou seja, quanto maior o escore atribuído ao órgão, menor seu peso relativo (Figura 27).

Ainda com o objetivo de se avaliar a magnitude da relação entre estas duas variáveis, realizou-se análise de regressão. Com um coeficiente de determinação (R^2) de 0,58, a regressão cúbica foi o modelo que permitiu o maior grau de explicação para o PR do timo (Figura 28).

Figura 27: Representação gráfica da relação entre as variáveis “Peso relativo do timo” e “Escores digitais de depleção linfocitária” utilizando a moda conjunta dos avaliadores A e B.

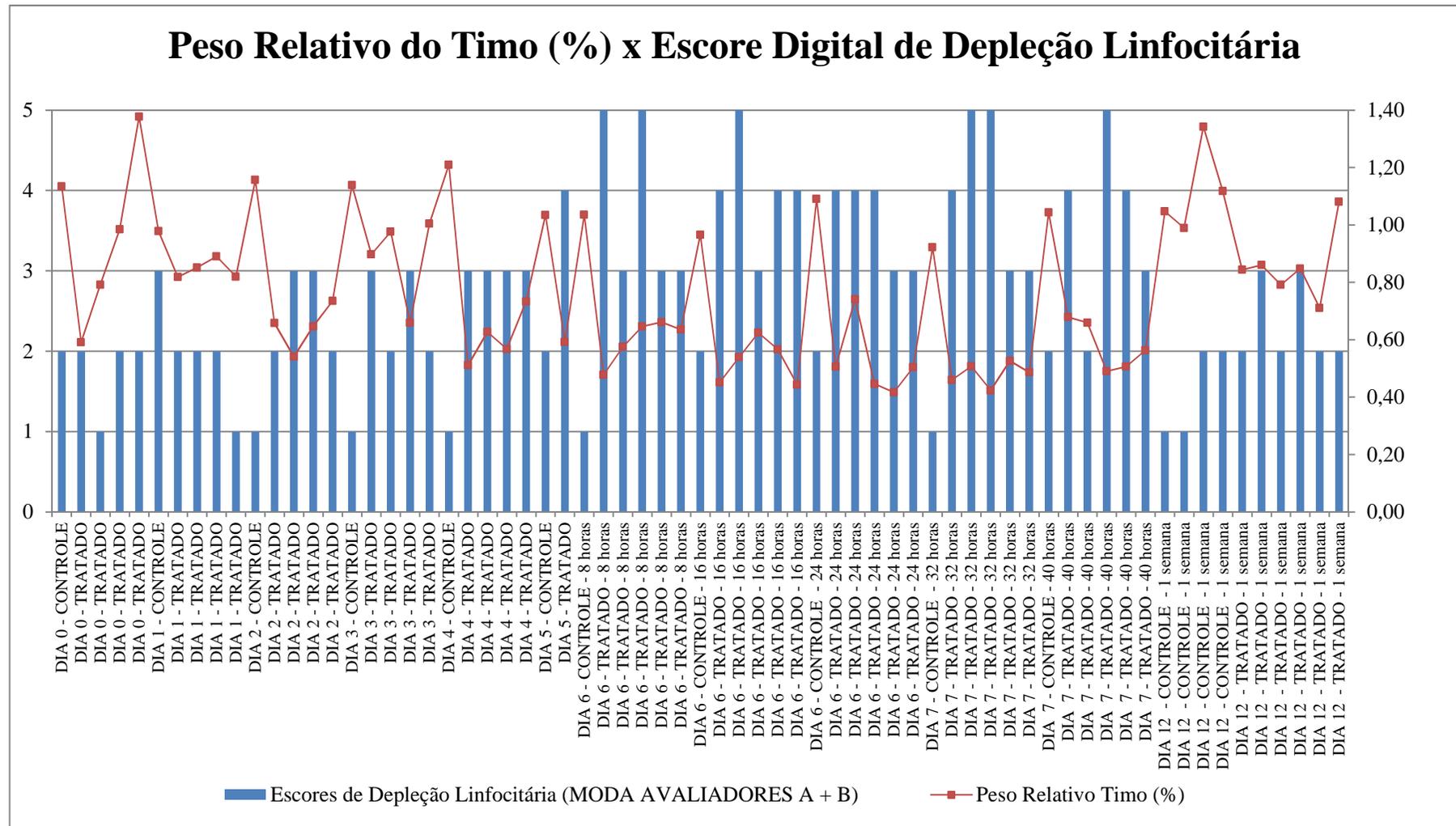
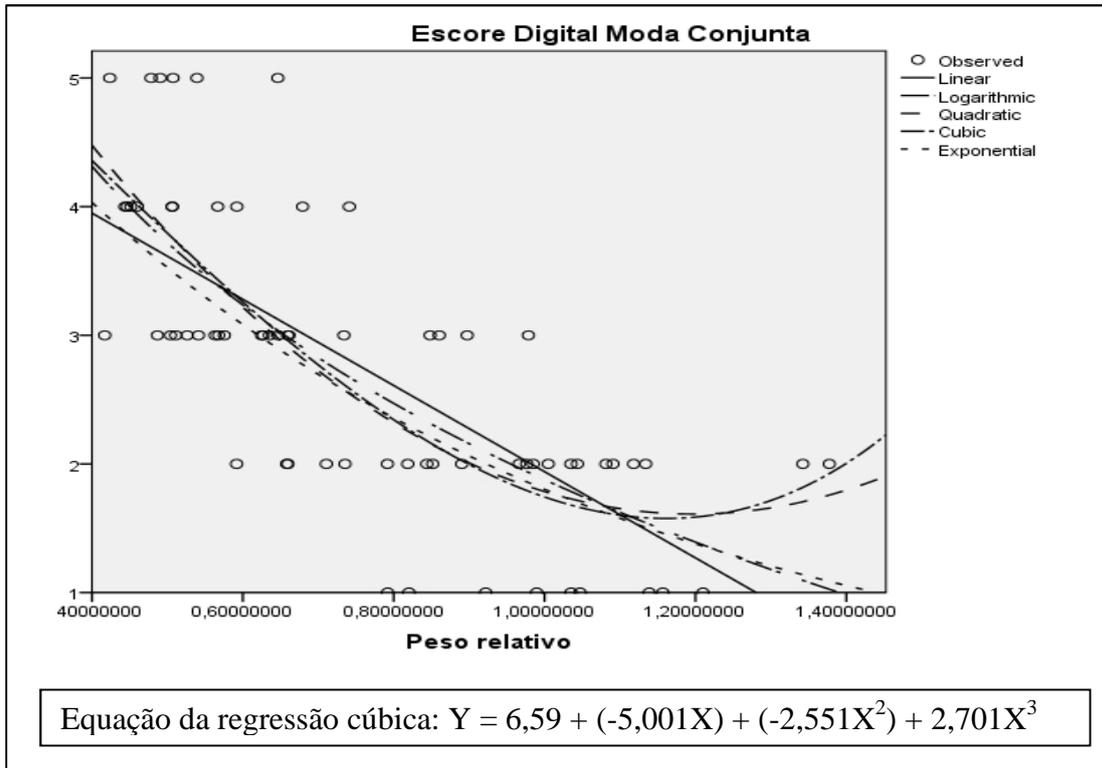


Figura 28: Modelos de Regressão obtidos através da análise estatística das variáveis “Peso relativo do timo” e “Escore digital de depleção linfocitária”.



4.4 Discussão

Constatou-se que a utilização de um glicocorticóide, a partir de adaptações no protocolo de tratamento desenvolvido por Kong *et al.* (2002), foi bem sucedida. Obtiveram-se, portanto, timos com distintos graus de depleção linfocitária. O uso deste medicamento, com o intuito de afetar diretamente o tecido linfóide, também foi proposto por Husar, *et al.* (2011). Neste estudo, o objetivo dos autores era induzir apoptose de linfócitos T em diferentes órgãos linfóides de ratos adultos Wistar. Como resultado, foi relatado um efeito mais pronunciado da dexametasona no timo em relação a outros tecidos. Verificou-se também que, com a interrupção do tratamento por uma semana, houve recuperação do órgão quanto à estrutura linfocitária. Estes achados concordam com os do presente trabalho, onde o timo foi consideravelmente afetado pelo tratamento, recuperando-se parcialmente após uma semana do término das administrações do fármaco.

O efeito do glicocorticóide sobre o sistema imune da ave veio a simular a ação de depleção de um agente causador de enfermidade imunodepressora. Porém, conforme Kong *et al.* (2002), este medicamento não afeta a sobrevivência e saúde geral das aves, ocasionando apenas retardo no crescimento, fato este observado no presente estudo. Segundo Isobe e Lillehoj (1993), dentre as vantagens de uso deste fármaco estão ainda, a fácil administração, baixo custo, ausência de sofrimento das aves no ato da inoculação, além de causar depleção da imunidade humoral e celular. Soma-se a isto, a não exigência de um ambiente de experimentação com alto grau de biossegurança, por não se trabalhar com agentes infecciosos ou de relevância em saúde pública (vírus, bactérias e fungos).

Quanto ao estabelecimento dos escores de perda de linfocitária, pode-se afirmar que a criação de mais dois graus intermediários de lesão (2 e 4) permitiram uma melhor classificação das amostras. Portanto, mesmo se tratando de uma avaliação unicamente baseada em critérios subjetivos, a atribuição de cinco escores tornou-se mais confortável para os avaliadores; quando comparado ao experimento 1, no qual a classificação consistia em apenas três escores de depleção.

A partir das leituras histológicas dos 402 lobos, constatou-se que o avaliador B foi mais conservador em suas análises quando comparado ao avaliador A. Este fato pode ser observado na classificação das amostras dentro do escore 1, onde o avaliador B teve

aproximadamente 8% a mais de lobos dentro desta categoria de lesão. Sendo assim, a distribuição das amostras entre os escores 4 e 5, também foi desigual: O avaliador A classificou 70 e 42 lâminas nestas categorias, respectivamente. Já o avaliador B, alocou 54 e 32 lâminas nos escores 4 e 5, respectivamente. Estes resultados refletem na diferença significativa encontrada entre as leituras de ambos os avaliadores considerando o lobo como unidade amostral.

Quanto aos resultados obtidos com as RNAs, considerando o ED por lobo como variável de saída, pode-se afirmar que não houve um bom desempenho classificatório. O percentual de categorizações corretas ficou próximo aos 50% para as duas redes construídas, sendo a dificuldade na classificação observada para as amostras de todos os EO. Este fato provavelmente ocorreu, em virtude da ampla variação nos graus de depleção dos lobos conferidos nas leituras ópticas. Consequentemente, é possível que para lobos com características de imagem semelhantes, tenha-se atribuído diferentes escores. Como o treinamento das RNAs dá-se em cima dos erros e acertos dos avaliadores, esse viés na categorização é reflexo da incerteza dos mesmos no estabelecimento dos graus de depleção.

As RNAs alcançaram um desempenho muito superior, quando a variável de saída foi o ED considerando a ave como unidade amostral. A rede construída para o avaliador A apresentou 86,57% de classificações corretas, já a do avaliador B 80,60%. Como o treinamento destas redes foi realizado empregando-se a moda dos escores obtidos da leitura de 6 lobos/ave, o erro embutido nas categorizações ópticas acaba por ser diluído, favorecendo as RNAs em uma distribuição mais acertada dos animais entre os escores de 1 a 5 quando comparado a rede por lobo. A diferença de aproximadamente 6% entre as duas redes construídas, provavelmente se deu devido ao distinto nível de experiência dos avaliadores. Sendo o avaliador A mais experiente, seus critérios de categorização tornam-se mais justos, fornecendo uma maior repetição do erro quando comparado ao avaliador B.

Eficiência ainda maior foi encontrada na RNA construída a partir do treinamento com a moda conjunta dos escores ópticos de depleção, onde o percentual de acerto foi de 94,03%. Este bom resultado é fruto de um efeito compensatório nas leituras entre os avaliadores, isto é, apesar da existência de vieses na categorização em ambas as avaliações, alguns deles não ocorreram para os mesmos lobos. Mais uma vez, em consequência da diluição do erro atribuído a subjetividade na determinação óptica dos escores, permitiu-se um melhor ajuste da rede. Este resultado vem a refletir nos valores de sensibilidade e especificidade, os quais

foram consideravelmente superiores às RNAs por lobo. Apesar deste alto percentual de classificações corretas para estas redes, cabe ressaltar que é sempre possível melhorá-la acrescentando a avaliação das lâminas por outros histologistas, o que diluiria ainda mais o erro embutido nas categorizações ópticas a aproximando ainda mais dos 100% de classificações acertadas.

Nestas três redes construídas a partir da moda, observou-se que mesmo quando o ED difere do EO, esta diferença classificatória dá-se apenas nos escores adjacentes ao correto, demonstrando o alto nível de ajuste obtido.

Ainda, ao se analisar as RNAs em que o ED da ave foi a variável de saída, pode-se afirmar que praticamente não houve dificuldade classificatória, ou seja, o ED conferido pela rede foi o mesmo EO fornecido no seu treinamento, com poucas exceções. Este fato vai de encontro ao obtido por Moraes, *et al.* (2010), os quais observaram uma “zona cinzenta” para classificação de folículos da Bolsa de Fabrício nos ED 2, 3 e 5.

Salle, *et al.* (2011) em trabalho publicado no 60° Western Poultry Disease Conference, visaram validar o sistema ADDL para bolsas de Fabrício. Foram utilizadas 50 bolsas de Fabrício, as quais foram submetidas a avaliação por três histologistas com distintos níveis de experiência, a fim de classificar o órgão nos distintos graus de perda linfocitária. Cada avaliador realizou uma leitura do conjunto de lâminas, com exceção de um deles, o qual avaliou as amostras duas vezes em diferentes ocasiões. Paralelamente, as 50 bolsas de Fabrício foram submetidas a avaliação pelo sistema ADDL executado por três diferentes operadores. Com os resultados encontrados, observou-se que houve diferença significativa entre as leituras de todos os histologistas, inclusive entre as duas leituras realizadas pelo mesmo avaliador. Não se constatou diferença significativa ao se analisar a depleção linfóide pelo sistema ADDL, considerando os distintos operadores. Em conclusão, os autores afirmaram que esta nova metodologia não é influenciada pela experiência de quem a realiza, necessitando apenas de treinamento para sua execução. Este fato, aliado aos dados obtidos presente estudo, demonstram que esta metodologia usada a fim de graduar os níveis de linfócitos no timo, é perfeitamente aplicável à rotina laboratorial e para atividades relacionadas à pesquisa, por caracterizar-se como um método passível de reprodutibilidade e repetibilidade. Outra vantagem desta técnica é o conhecimento preciso do erro e acerto das classificações, característica esta não observada nos métodos histológicos convencionais. Apesar destas inúmeras vantagens, o autor resalta também que esta técnica não é um método

de diagnóstico, sendo assim, não substitui a figura do histopatologista. Este sistema mostra-se útil para monitorias quanto ao *status* imunológico dos animais, permitindo também comparação científica de resultados.

Floyd (2011) em trabalho publicado no 62º Encontro Anual do Colégio Americano de Patologistas Veterinários, comparou métodos microscópicos para avaliação histopatológica da Bolsa de Fabrício. Foram utilizadas amostras de bolsas de Fabrício submetidas a análise por três diferentes técnicas. A primeira consistia no estabelecimento de escores ópticos subjetivos de 0 a 5. A segunda metodologia era denominada de “determinação de escores histológicos detalhados aditivos”, e consistia na geração de um escore geral pelo somatório de pontuações considerando os seguintes parâmetros: depleção linfóide; pregueamento do epitélio, infiltração heterofílica e inflamação intersticial, edema, fibrose e formações císticas. A terceira técnica foi baseada na mensuração da cortical e medular a partir de fotomicrografias em escala de cinza das bolsas de Fabrício. Como resultados, o autor encontrou diferenças significativas na classificação por escores de uma mesma bolsa entre os métodos utilizados, demonstrando o quão subjetivas são as metodologias ópticas atuais na determinação de graus de lesão.

Geralmente estudos envolvendo a avaliação do timo carecem de descrição metodológica mais detalhada quanto ao número de lobos avaliados. Com este trabalho provou-se que a distribuição da lesão ocorre de forma desigual dentro de uma mesma cadeia tímica, ou seja, há graus variados de depleção entre os lobos. Por isso, quando o objetivo é a avaliação histológica deste órgão deve-se atentar para que a mesma não seja realizada tendo em vista um lobo apenas, já que há a probabilidade de se sub ou superestimar o timo quanto os graus de perda linfocitária.

Neste contexto, pode-se afirmar que o presente estudo vem a complementar o trabalho elaborado por Moraes *et al.* (2010), preenchendo a lacuna da imunidade celular. Ainda, dispondo-se de ferramentas de análise de imagem em conjunto com as RNAs, é possível uma avaliação do sistema imune da ave adotando critérios objetivos para as análises histológicas.

Paralelamente ao estudo das RNAs, encontrou-se um forte grau de correlação entre as variáveis “Peso Relativo do Timo” e “Escore Óptico de Depleção” foi satisfatoriamente explicado pela análise de regressão. Com um $R^2 = 0,58$, foi possível explicar 58% das variações do peso do órgão em função da sua celularidade.

Estudos empregando análise de regressão com o objetivo de se elucidar o efeito de uma variável sobre a outra, vem sendo empregados na área de avicultura. Pinto (2006) realizou um trabalho em que, um dos objetivos era avaliar a contribuição de uma série de fatores (peso inicial da ave, peso final da ave, temperatura na entrada e saída do *chiller* e pré-*chiller*) na predição dos resultados de testes de absorção de carcaça. Obtendo um $R^2 = 0,99$, conseguiu-se explicar 99% da variação dos resultados de *drip test* considerando os fatores analisados. Altos valores nos coeficientes de determinação também foram encontrados por Reali (2004), ao verificar o efeito de 5 variáveis (quantidade de pintos, quilograma de ração, aves abatidas, índice de conversão alimentar e índice de eficiência) sobre o ganho de peso diário das aves. Com um $R^2 = 0,99$, foi possível prever o ganho de peso dos animais em função dos fatores estudados.

Apesar do coeficiente de determinação encontrado neste estudo não estar próximo a casa dos 90%, é importante ressaltar que se avaliou a influência de apenas uma variável sobre o PR, e que modelos com níveis de explicação próximo a 60% devem ser considerados satisfatórios para a área de ciências biológicas. Este resultado mostra-se de grande relevância para técnicos e médicos veterinários que trabalham a campo, pois dispendo apenas de uma balança, facilmente se obtém o PR do timo. A partir deste dado, pode-se então inferir um escore de depleção linfocitária de 1 a 5, visando-se determinar o grau de comprometimento do órgão e, com boas chances de êxito. Este método faz-se útil quando não há tempo ou se tem à disposição ferramentas para uma análise mais apurada do timo, como seria com a realização de um exame histológico. Apesar de este trabalho ter demonstrado uma forte relação entre estas duas variáveis, a literatura carece de estudos que enfoquem nesta correlação para avaliação do timo das aves.

5 CONCLUSÕES

Em relação ao exposto, pode-se afirmar que:

1. Através do tratamento de frangos de corte com 21 dias de idade utilizando-se um glicocorticóide (dexametasona), obtiveram-se timos com distintos escores de depleção linfocitária.
2. Foi possível o estabelecimentos de 5 escores ópticos relacionados a perda de linfócitos para o timo de frangos de corte.
3. Foi possível a criação de um método de coleta de imagens dos lobos tímicos para o processamento digital.
4. As RNAs classificatórias por lobo não mostraram ter bom desempenho quanto a classificação das amostras nos 5 escores de depleção.
5. As três RNAs classificatórias utilizando a moda dos escores demonstraram ser eficazes na categorização em 5 escores.
6. A análise do timo empregando-se a RNA obtida a partir do treinamento com a moda conjunta das leituras feitas pelos avaliadores A e B, mostrou-se como a melhor para categorização do timo quanto aos 5 graus de perda linfocitária.
7. A adaptação e aplicação do sistema ADDL em timos foi bem sucedida, uma vez que empregando-se critérios claros e objetivos foi possível sua avaliação quanto a perda linfocitária de modo a excluir a subjetividade.
8. A partir da análise de regressão, grande parte da variação do peso do timo (59%) pôde ser explicada em função de sua celularidade, sendo esta informação de grande valia para os médicos veterinários a campo.

6 ATIVIDADES FUTURAS

1. Elucidar questões quanto a distribuição da lesão dentre os lobos componentes da cadeia tímica;
2. Averiguar uma possível predileção dos agentes causadores de enfermidades imunodepressoras por lobos mais craniais ou caudais ou ambos, no momento de instalar a infecção no timo;
3. Relacionar a celularidade do timo a da bolsa de Fabrício.

REFERÊNCIAS

- AKTER, S.H.; KHAN, M.Z.I.; JAHAN, M.R.; KARIM, M.R.; ISLAM, M.R. Histomorphological Study of the Lymphoid Tissues of Broiler Chickens. **Bangl. J. Vet. Med.** v 4 (2), p. 87–92, 2009.
- ARAÚJO, G.L.S.; TELLES, A.M.S.; LIMA, F.E.A.; PONTES FILHO, N.T.; MACHADO, M.C.F.P. Análise Histológica e Histoquímica de Fatores Prognósticos em Pacientes com Retocolite Ulcerativa. **Revista Brasileira de Coloproctologia.** v.29(1), p. 7-14, 2009.
- ASTION, M. L.; WILDING, P. The application of back propagation neural networks to problems in pathology and laboratory medicine. **Arch Pathol Lab Med.**; v. 116, p. 995-1001, 1992.
- BAMPI, V. Comentário Avícola: Raio X do Mercado Brasileiro. 2009. Disponível em: <<http://www.aviculturaindustrial.com/Portalgessuli/Website/noticias>>. Acesso em: 06/03/2013.
- CAMILLOTTI, E.; DE MORAES, L.B.; FURIAN, T.; BORGES, K.A.; MORAES, H.L.S.; SALLE, F.O.; SALLE, C.T.P. Infectious Bursal Disease: Evaluation of the Pathogenicity and Immunogenicity of Commercial Vaccines in Brazil. **Proceedings of the Sixtieth Western Poultry Disease Conference.** . 60th Western Poultry Disease Conference, Sacramento, CA, EUA. p. 89-92, 2011.
- CHANDRASEKHAR, L.; PRASAD, R.V.; JAMUNA, K.V. Ultrastructural Studies of Involuting Bursa and Thymus of Giriraja Birds (*Gallus domesticus*). **International Journal of Poultry Science** v 11 (6): p. 397-399, 2012.
- CIRIACO, E.; PINERA, P.P.; DIAZ – ESNAL e LAURA, B. Age-related changes in the avian primary lymphoid organs (thymus and bursa of Fabricius). **Microsc. Res. Technol.** v 62: p. 482-487, 2003.
- CLAWSON, C.C., COOPER, M.D. GOOD, R.A. Lymphocyte fine structure in the bursa of Fabricius, the thymus and the germinal centers. **Lab. Invest.**, V.16, p. 407 – 421, 1967.
- COOPER, M.D. PETERSON, R.D.A.; SOUTH, M.A.; GOOD, R.A. The Functions of the Thymus System and the Bursa System in the Chicken. **Journal of Experimental Medicine.** v. 123, p. 1-35, 1966.
- COOPER, M.D.; CHEN, C.H.; BUCY, R.P.; THOMPSON, C.B. Avian T Cell Ontogeny. **Adv. Immunol.** v 50, p. 87-117, 1991.
- FIALHO, F. B.; LEDUR, M. C. Modelo matemático para curvas de produção de ovos. **Comunicado Técnico.** n. 256. Embrapa Suínos e Aves. 256, 1-3. 2000a.
- FIALHO, F. B.; LEDUR, M. C. Estimador da produção de ovos. **Comunicado Técnico.** n. 257. Embrapa Suínos e Aves 257, 1-2. 2000b

- FLOYD, W.D. Bursa Morphometrics (Comparison of Microscopic Methods for Bursa Histopathology Evaluation). **62nd Annual Meeting of the American College of Veterinary Pathologists and 46th Annual Meeting of the American Society for Veterinary Clinical Pathology - Nashville, Tennessee, USA.** P. 15-17, 2011.
- HADIPOUR, M.M.; FARJADIAN, SH.; AZAD, F.; SHEIBANI, N.; OLYAIE, A. Histologic Lesions of Thymus and Bursa of Fabricius in Commercial Broiler Chickens Inoculated with H9N2 Avian Influenza Virus. **International Journal of Animal and Veterinary Advances.** v. 3(3): p. 186-188, 2011.
- HENRY, C. W.; BREWER, R. N.; EDGAR, S. A. Studies on Infectious Bursal Disease in Chickens. 2. Scoring Microscopic Lesions in the Bursa of Fabricius, Thymus, Spleen, and Kidney in Gnotobiotic and Battery Reared White Leghorns Experimentally Infected with Infectious Bursal Disease Virus. **Poultry Science.** V. 59, p. 1006-1017, 1980.
- HODGES, R.D. The Histology of the Fowl. New York. Academic Press. P. 489-496, 1974.
- HUSSAIN, I.; MAHMOOD, M.S.; ARSHAD, M.I. Immune system dysfunction in broiler chickens experimentally inoculated with fowl adenovirus serotype-4 associated with inclusion body hepatitis hydropericardium syndrome. **Turk. J. Vet. Anim. Sci.** v 36(3): 223-230, 2012.
- HUSSAR, P.; TOKIN, I.; FILIMONOVA, G.; TOKIN, I.; HUSSAR, U. Dexamethasone Induced T Lymphocyte Apoptosis in Different Lymphoid Organs. **Papers on Anthropology XX**, p. 117-127, 2011.
- INOUE, M.; FUKUDA, M.; MIYANO, K. Thymic Lesions in Chicken Infected with Infectious Bursal Disease Virus. **Avian Disease.** V. 38, p. 839-846, 1994.
- ISOBE, T.; LILLEHOJ, H.S. Dexamethasone suppresses T cell-mediated immunity and enhances diseases susceptibility to Eimeria mivati infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.39, n.4, p.431-445, 1993.
- KARIMI, I.; MAHZOUNIEH, M.; BAHADORAN, S.; AZAD, F. Chicken anemia virus infection in broiler chickens in Shahrekord, Iran: serological, hematological and histopathological findings. **Comp. Clin. Pathol.** V.19, p. 63-67, 2010.
- KISIELOW, P.; VON BOEHMER, H. Development and Selection of T Cells: Facts and Puzzels. **Adv. Immunol.** v 58, p. 87-209, 1995.
- KONG, F.K.; CHEN, C.H.; COOPER, M.D. Reversible Disruption of Thymic Function by Steroid Treatment. **J. Immunol.** v. 168; 6500-6505, 2002.
- LEMOS et. al. Inteligência artificial e consciência. 2006. Disponível em: <<http://www.geocities.com/Athens/Sparta/1350/ia/finais.html>>. Acesso em: 13/03/2013.
- LUCAS, A. M. e JAMROZ, C. Atlas of Avian Hematology. **Agriculture Monograph**, U.S. Dept.of Agriculture, Washington. V.25, p.123-134, 1961.
- LUNA, P. G. Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 13ed. New York: McGraw – Hill, 258p., 1968.

- MORAES, L. B.; OSÓRIO, F. S.; SALLE, F. O.; SOUZA, G. F.; MORAES, H. L. S.; FALLAVENA, L. C. B.; SANTOS, L. R.; SALLE, C.T.P. Evaluation of follicular lymphoid depletion in the Bursa of Fabricius: An alternative methodology using digital image analysis and artificial neural networks. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. V. 30 (4), p. 340-344, 2010.
- MONTANARI, T. Histologia: Texto, Atlas e Roteiro de Aulas Práticas. Editora da UFRGS. p. 56-68, 2006.
- MUSKETT, J. C.; HOPKINS, I. G.; EDWARDS, K. R.; THORNTON, D. H. Comparason of Two Infectious Bursal Disease Vaccine Strains: Efficacy an Potential Hazards in Susceptible an Maternally Immune Birds. **The Veterinary Record**, v.104, p.332-334, 1979.
- NISHIZAWA, M.; PAULILLO, A.C.; BERNARDINO, A.; ALESSI, A.C.; SAYD, S.; OKADA, L.S.N.; DORETTO JÚNIOR, L. Evaluation of Anatomopathological, Serological, Immunological Responses and Protection in Broilers Vaccinated with Live Infectious Bursal Disease Vaccines. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.74, n.3, p.219-226, jul./set., 2007
- PARK, B.; CHEN, Y.R.; NGUYEN, M. Multispectral Image Analysis Using Neural Network Algorithm for Inspection of Poultry Carcasses. **Journal of Engng. Researche**, v.69, p. 351-363, 1998.
- PINTO, P. Uso de Redes Neurais Artificiais no gerenciamento de matadouros frigoríficos de aves e suínos no sul do Brasil. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.
- REALI, E. Utilização de Inteligência Artificial (Redes Neurais Artificiais) no Gerenciamento de Frangos de Corte. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.
- RONDÓN, E. O. Modelagem computacional para produção e pesquisa em avicultura. **Revista Brasileira de Agrociência**, n. 4. p. 199-207. 2002.
- ROUSH, W. B.; KIRBY, Y. K.; CRAVENER, T. L.; WIDEMAN, R. F. Probabilistic neural network prediction of ascites in broilers based on minimally invasive physiological factors. **Poultry Science**. v. 76, n. 11, p. 1513-1516, 1997.
- SALLE, C. T. P.; CÉ, M. C.; LORENZINI, G.; SFOGGIA, M. V. B.; GUAHYBA, A. D. S.; MORAES, H. L. D. S. Correlaction between aflatoxin and ocratoxin levels with production parameters in a poultry company. In: Melbourne – Australia. 1998.
- SALLE, C. T. P.; SOARES, R. C. B.; CÉ, M. C.; MORAES, H. L. D. S.; NASCIMENTO, V. P. D.; GUAHYBA, A. D. S. Immune response assessment in turkey breeders vaccinated against Newcastle disease using mathematical models. In: Vancouver-Canada. P. 129, 1999.
- SALLE, C. T. P.; SILVA, A. B. D. Prevenção de Doenças / Manejo Profilático / Monitorização. In: **BERCHIERI JUNIOR, A.; MACARI, M. Doenças das Aves**. p. 03-12, 2000.

SALLE, F. de O. Utilização de Inteligência Artificial (Redes Neurais Artificiais) no gerenciamento do incubatório de uma empresa avícola do sul do Brasil. 2005. *Tese (mestrado em Medicina Veterinária)* – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

SALLE, C.T.; MORAES, L.B.; ZIMERMAM, F.C.; FALLAVENA, L.C.B.; OSÓRIO, F.S.; SALLE, F.O.; MORAES, H.L.S. Comparative Avaluation of Lymphoid Depletion of Bursa of Fabricius Using the ADDL System and the Conventional Subjective Method. **Proceedings of the Sixtieth Western Poultry Disease Conference**. 60th Western Poultry Disease Conference, Sacramento, CA, EUA. p. 130-131, 2011.

SHARMA, J.M.; DOHMS, J.; WALSER, M.; SNYDER, D.B. Presence of Lesions without Virus Replication in the Thymus of Chicken Exposed to Infections Bursal Disease Virus. **Avian Disease**. V.37, p.741-748, 1993.

SHORTMAN, K.; WU, L. Early T Lymphocytes Progenitors. **Annu. Ver. Immunol.** v. 14, p. 29-47, 1996.

SMYTH, A.J.; MOFFETT, D.A.; CONNOR, T.J.; MC NULTY, M. S. Chicken anaemia virus inoculated by the oral route causes lymphocyte depletion in the thymus in 3 – week – old and 6 – week – old chickens. **Avian Pathology**. V. 35 (3), p. 254-259, 2009.

SOUZA, G.F. Estabelecimento de um Novo Índice de Patogenicidade para amostras de *E. coli* e Uso de Inteligência Artificial. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

SPOHR, A. Gerenciamento Através de Redes Neurais Artificiais das Atividades de Produção de Reprodutoras Pesadas e do Frango de Corte, de um Incubatório e de um Abatediuro Avícola. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

TATIBANA, C. Y.; KAETSU, D. Y. Redes Neurais. **GSI – Grupo de Sistemas Inteligentes**. 2006. Disponível em: <<http://www.din.uem.br/ia/neurais/>>. Acesso em: 22/02/2013.

TORO, H.; VAN SANTEN, V. L.; HOERR, F. J.; BREEDLOVE, C. Effects of Chicken Anemia Virus and Infectious Bursal Disease Virus in Commercial Chickens. **Avian Diseases**. V.53, p.94-102, 2009.

TRANQUILIM, M.V.; BOTELHO, G.G.K.; BORTOLINI, Z.; LEHMKUHL, R.C.; LANG, R.R. Osteossíntese de úmero em *Ramphastos dicolorus* (tucano de bico verde): relato de caso. **Ambiência - Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais** V. 3 N. 2 Maio./Agosto 2007.

UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA. **Relatório Anual 2012**. Brasília, p. 01-113, 2012.

VAN SANTEN, V. L.; JOINER, K. S.; MURRAY, C.; PETRENKO, N.; HOERR, F. J.; TORO, H. Pathogenesis of Chicken Anemia Virus: Comparison of the Oral and Intramuscular Routes of Infection. **Avian Diseases**. V. 48, p. 494-504, 2004.

ANEXO 1

Ofício n.º 24/12 – CEUA/IPVDF

Eldorado do Sul, 10 de julho de 2012.

Senhor Pesquisador:

Com relação ao Projeto de Pesquisa – *Avaliação da perda linfocitária do timo de frangos de corte utilizando Sistema de Análise Digital de Depleção Linfóide (ADDL)* - sob orientação do Prof. Dr. Carlos Tadeu Pippi Salle e colaborador Dr. Lucas Brunelli de Moraes, protocolado para análise e parecer sob o n.º 21/2012 pela mestranda Daiane Carvalho, em 11 de junho de 2012, cabe referir o seguinte:

A Comissão de Ética no Uso de Animais – IPVDF reuniu-se ordinariamente em 05 de julho de 2012, no Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor e subsequentemente emitiu **PARECER FAVORÁVEL** à pesquisa a ser desenvolvida.

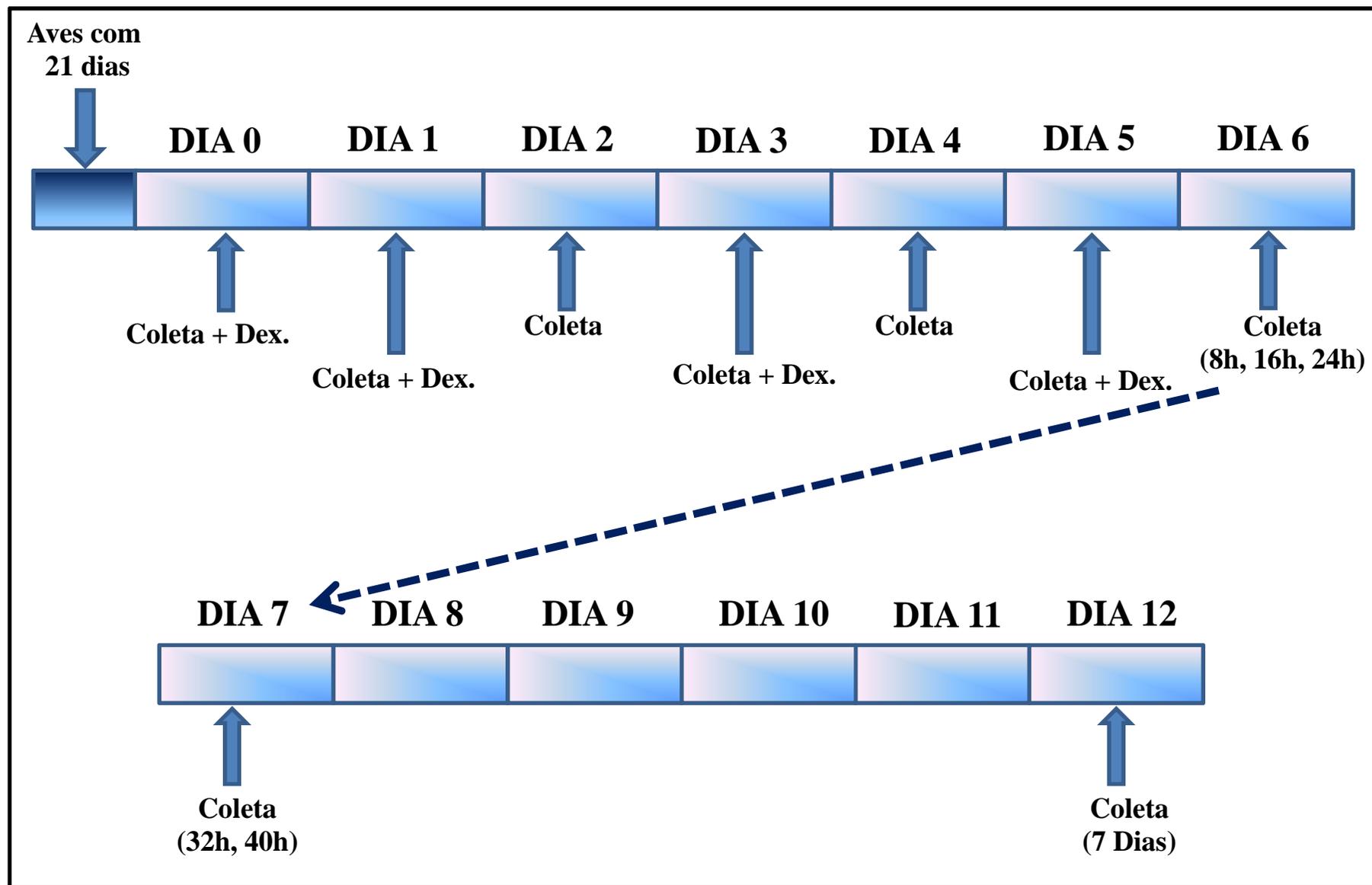
É o parecer.

Atenciosamente,


FERNANDO SÉRGIO CASTILHOS KARAM
Presidente CEUA - IPVDF.

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

APÊNDICE 1 - Delineamento experimental aplicado aos grupos controle e tratado no experimento 2.



APÊNDICE 2 – Interface da RNA classificatória por ave utilizando como treinamento a moda conjunta dos escores dos avaliadores A e B.

Statistics resulting from classifying the data rows with the network:

General statistics:

Enhanced generalization Advanced...

Rows classified correctly: 63 94.03%

Rows classified incorrectly: 4 5.97%

Rows processed: 67 Rows not classified: 0 0.00%

Type of statistics:

Agreement matrix

Probabilities

ROC curve

Classification probabilities:

Display: All rows

Precision: Reduced

* = incorrect classification(s)

*	P(1)	P(2)	P(3)	P(4)	P(5)	Actual	Classified as
1	0.000	0.613	0.387	0.000	0.000	2	2
2	0.056	0.914	0.030	0.000	0.000	2	2
3	0.516	0.484	0.000	0.000	0.000	1	1
4	0.000	0.999	0.000	0.000	0.000	2	2
5	0.275	0.675	0.049	0.000	0.000	2	2
6	0.000	0.007	0.993	0.000	0.000	3	3
7	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	2	2
8	0.110	0.890	0.000	0.000	0.000	2	2
9	0.001	0.999	0.000	0.000	0.000	2	2
10	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1	1
11	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1	1
12	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	2	2
13	0.000	0.425	0.575	0.000	0.000	3	3
14	0.004	0.153	0.843	0.000	0.000	3	3
15	0.321	0.672	0.006	0.000	0.000	2	2
16	0.999	0.000	0.000	0.000	0.000	1	1
17	0.000	0.016	0.983	0.000	0.000	3	3
18	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	2	2
19	* 0.000	0.003	0.996	0.001	0.000	2	3
20	0.001	0.996	0.000	0.000	0.002	2	2
21	0.971	0.029	0.000	0.000	0.000	1	1
22	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	3	3
23	0.000	0.004	0.996	0.000	0.000	3	3
24	0.000	0.010	0.990	0.000	0.000	3	3

Agreement Matrix (Contingency Table) Statistics:

	Actual "1"	Actual "2"	Actual "3"	Actual "4"	Actual "5"	Total	Positive Predictive Value
Classified as "1"	9	0	0	0	0	9	100.0%
Classified as "2"	0	20	2	0	0	22	90.91%
Classified as "3"	0	1	19	0	0	20	95.0%
Classified as "4"	0	0	0	9	1	10	90.0%
Classified as "5"	0	0	0	0	6	6	100.0%
Total	9	21	21	9	7	67	
True-pos. ratio	1.0	0.9524	0.9048	1.0	0.8571		
False-pos. ratio	0.0	0.0435	0.0217	0.0172	0.0		
True-neg. ratio	1.0	0.9565	0.9783	0.9828	1.0		
False-neg. ratio	0.0	0.0476	0.0952	0.0	0.1429		
Sensitivity	100.0%	95.24%	90.48%	100.0%	85.71%		
Specificity	100.0%	95.65%	97.83%	98.28%	100.0%		