**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**

**PROGRAMA DE DOUTORADO INTEGRADO EM ZOOTECNIA**

**ENRIQUECIMENTO DO ÂMNIO COM TREONINA EM EMBRIÕES DE FRANGOS CORTE: 1. DESEMPENHO E MORFOFISIOLGIA INTESTINAL E 2. EFEITO SOBRE A CONTAGEM DE *SALMONELLA* ENTERITIDIS E MICROBIOTA CECAL**

**ALEXANDRE LEMOS DE BARROS MOREIRA FILHO**

**AREIA - PB**

**MARÇO – 2017**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**

**PROGRAMA DE DOUTORADO INTEGRADO EM ZOOTECNIA**

**ENRIQUECIMENTO DO ÂMNIO COM TREONINA EM EMBRIÕES DE FRANGOS CORTE: 1. DESEMPENHO E MORFOFISIOLGIA INTESTINAL E 2. EFEITO SOBRE A CONTAGEM DE *SALMONELLA* ENTERITIDIS E MICROBIOTA CECAL**

**ALEXANDRE LEMOS DE BARROS MOREIRA FILHO**

Zootecnista

**AREIA - PB**

**MARÇO – 2017**

**ALEXANDRE LEMOS DE BARROS MOREIRA FILHO**

**ENRIQUECIMENTO DO ÂMNIO COM TREONINA EM EMBRIÕES DE FRANGOS CORTE: 1. DESEMPENHO E MORFOFISIOLGIA INTESTINAL E 2. EFEITO SOBRE A CONTAGEM DE *SALMONELLA* ENTERITIDIS E MICROBIOTA CECAL**

Tese apresentada ao Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia, da Universidade Federal da Paraíba da qual participam a Universidade Federal Rural de Pernambuco e Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Zootecnia.

Área de Concentração: Produção Animal

**Comitê de Orientação:**

Profª. Drª. Patrícia Emília Naves Givisiez

Prof. Dr. Celso José Bruno de Oliveira

Prof. Dr. Oliveiro Caetano de Freitas Neto

**AREIA - PB**

**MARÇO – 2017**

Ficha Catalográfica Elaborada na Seção de Processos Técnicos da

Biblioteca Setorial do CCA, UFPB, campus II, Areia – PB.

M838e Moreira Filho, Alexandre Lemos de Barros.

#### Enriquecimento do âmnio com treonina em embriões de frangos corte: 1. Desempenho e morfofisiolgia intestinal e 2. Efeito sobre a contagem de Salmonella Enteritidis e microbiota cecal / Alexandre Lemos de Barros Moreira Filho. - Areia: UFPB/CCA, 2017.

xii, 125 f.: il. color.

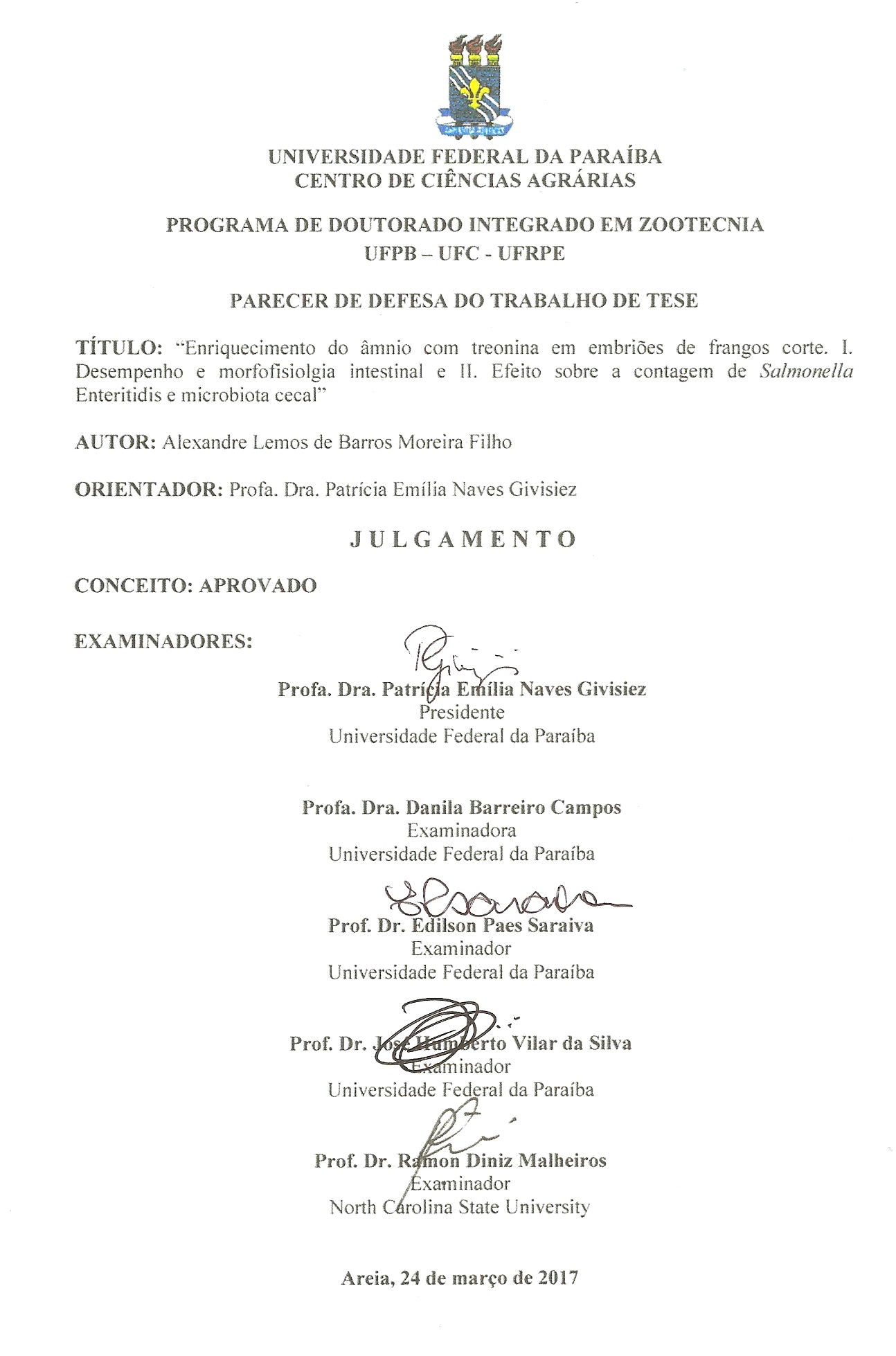
Tese (Doutorado em Zootecnia) - Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2017.

Bibliografia.

Orientador(a): Profa. Dra. Patrícia Emília Naves Givisiez.

1. Avicultura – Frango de corte. 2. Galináceos – desenvolvimento embrionário. 3. Galináceos – produção de mucinas. I. Givisiez, Patrícia Emília Naves (Orientador) II. Título.

UFPB/CCA CDU: 636.52/.58(043.2)

****

**DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**ALEXANDRE LEMOS DE BARROS MOREIRA FILHO,** filho de Alexandre Lemos de Barros Moreira e Vânia de Fátima Lima Carneiro Lemos Moreira, nasceu no dia 18 de agosto de 1988 na cidade de João Pessoa - PB. Em maio do ano de 2007, ingressou no curso de Zootecnia da Universidade Federal da Paraíba. Durante a graduação foi monitor das disciplinas de Química Orgânica e Bovinocultura de Corte e bolsista de Iniciação Científica – PIBIC/CNPq durante dois anos. No ano de 2010, foi contemplado com Bolsa de Intercâmbio pelo programa de Bolsas Luso-Brasileiras, Santander Universidades, cursando o semestre letivo 2010.2 na Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, Portugal. Diplomou-se Zootecnista no ano de 2011, sendo agraciado com o diploma de Láurea Acadêmica pelo excelente desempenho durante o curso de graduação. Em março de 2012, iniciou o curso de Mestrado em Zootecnia no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade Federal da Paraíba, na Área de Produção Animal, sub-área Fisiologia Aviária, obtendo o título de Mestre em Zootecnia no ano de 2014. No mesmo ano, iniciou o Doutorado em Zoootecnia no Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia, da Universidade Federal da Paraíba, Universidade Federal Rural de Pernambuco e Universidade Federal do Ceará. Foi contemplado com bolsa Capes pelo Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior, desenvolvendo parte de sua pesquisa no Prestage Department of Poultry Science, pertencente a North Carolina State University.

**EPÍGRAFE**

Muitas vezes as pessoas são egocêntricas, ilógicas e insensatas.  
Perdoe-as assim mesmo.

Se você é gentil, as pessoas podem acusá-lo de egoísta, interesseiro.  
Seja gentil assim mesmo.

Se você é vencedor, terá alguns falsos amigos e alguns inimigos verdadeiros.  
Vença assim mesmo.

Se você é honesto e franco, as pessoas podem enganá-lo.  
Seja honesto e franco assim mesmo.

O que você levou anos para construir, alguém pode destruir de uma hora para outra.  
Construa assim mesmo.

Se você tem paz e é feliz, as pessoas podem sentir inveja.  
Seja feliz assim mesmo.

O bem que você faz hoje pode ser esquecido amanhã.  
Faça o bem assim mesmo.

Dê ao mundo o melhor de você, mas isso pode nunca ser o bastante.  
Dê o melhor de você assim mesmo.

Veja você, que no final das contas, é entre você e Deus.  
Nunca foi entre você e outras pessoas.

***Madre Teresa de Calcutá***

À Deus e a Nossa Senhora de Fátima,

por estarem sempre ao meu lado nessa longa jornada,

me fazendo persistir na busca pelos meus objetivos.

**DEDICO**

**AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal da Paraíba (UFPB) pela oportunidade concedida.

Ao Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia (PDIZ) pela atenção e oportunidade.

À CAPES e ao CNPq, pelas concessões das bolsas de estudo.

Agradeço à Deus e a Nossa Senhora de Fátima pela presença constante na minha vida, por sempre povoarem meu coração com bons sentimentos e me manterem perseverante nos meus objetivos.

Aos meus pais (Alexandre e Vânia), pelo apoio durante toda minha jornada, pelo carinho, amor e amizade. Pela compreensão na minha ausência e por acreditarem no meu potencial, mesmo quando eu não acreditava. Aos meus irmãos Juliana e Ricardo pelo companheirismo e apoio em todos os momentos nesta trajetória. A todos os meus familiares.

À minha esposa Luana, pelo amor conquistado e renovado a cada dia, pelo carinho, pela amizade e compreensão. Por todas as noites e madrugadas de companheirismo estudando, fazendo análises laboratoriais e auxiliando na condução do experimento. Meu amor, eu não conseguiria sem você, Te amo!

A minha orientadora e amiga Profª. Patrícia, pela generosidade e paciência. Por acreditar no meu potencial durante essa longa jornada percorrida, nos últimos oito anos e principalmente pelo exemplo de profissional.

Ao Prof. Dr. Ramon Malheiros e sua família, pela amizade, pelo carinho e pela acolhida generosa durante o período de doutorado sanduíche realizado nos Estados Unidos.

Aos meus co-orientadores, Prof. Dr. Celso José Bruno de Oliveira e Prof. Dr. Oliveiro Caetano por auxiliarem no desenvolvimento do trabalho e por compartilharem seus conhecimentos.

Ao Prof. Peter Rudolf Ferket, por ter me recebido na North Carolina State University, durante a realização do período sanduíche realizado nos Estados Unidos e a toda sua equipe.

Aos demais professores que colaboraram com a realização desta pesquisa, professor Edilson Paes Saraiva, Danila Barreiros, Janete Gouveia, Severino Gonzaga, Fernando Guilherme, Denise Figueiredo e Paulo Sérgio.

Aos amigos de longas datas que me acompanham desde do ano 2007 nessa caminhada, todo meu agradecimento, carinho e amizade: Cristina, Flávio, Ana Jaqueline, Candice, Juraci, Leide, Ricardo, Nagnaldo e Clara. Vocês são amigos que levarei para o resto da vida.

À todos os membros do Laboratório de Produtos de Origem Animal (LAPOA), Candice, Paulo, Mauro, Edgley, Paulo, Juliana, Givanildo, Fátima, Alessandra, Rafaela, Raissa e Maylane por toda dedicação e apoio durante a execução do trabalho. Em especial, agradeço à Candice, Paulo e Mauro pela amizade e irmanidade, sem vocês o LAPOA não seria o mesmo.

|  |  |
| --- | --- |
| **SUMÁRIO** | |
| **Páginas** | |
| LISTA DE TABELAS..................................................................................................... | x |
| LISTA DE FIGURAS...................................................................................................... | xi |
| RESUMO GERAL.......................................................................................................... | 1 |
| GENERAL ABSTRACT................................................................................................. | 3 |
| **CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....................................................................................** | 4 |
|  |  |
| **CAPÍTULO 1:** Referencial Teórico............................................................................... | 7 |
| 1.Treonina e Mucina........................................................................................................ | 8 |
| 2. Aplicação da técnica de Nutrição *in Ovo*..................................................................... | 11 |
| 2.1 Histórico Nutrição *in Ovo*.......................................................................................... | 11 |
| 2.2 Estudos com Nutrição *in Ovo*.................................................................................... | 12 |
| 3. Desenvolvimento e Metabolismo Embrionário........................................................... | 15 |
| 3.1 Desenvolvimento dos anexos embrionários............................................................... | 15 |
| 3.2 Rotas metabólicas utilizadas pelo embrião................................................................. | 18 |
| 3.3 Controle hormonal do metabolismo........................................................................... | 23 |
| 3.4 Desenvolvimento intestinal durante a embriogênese................................................. | 25 |
| 4.Salmonelosese Microbiota intestinal........................................................................... | 29 |
| 4.1 Salmoneloses na produção de frangos de corte.......................................................... | 29 |
| 4.2 Microbiota Intestinal e funcionalidade....................................................................... | 31 |
|  |  |
| **CAPÍTULO 2:** Efeito do fornecimento de treonina *in ovo* sobre a morfologia intestinal, expressão gênica ileal e desempenho de frangos de corte de 1 a 21 dias de idade................................................................................................................................. | 43 |
| Resumo............................................................................................................................ | 44 |
| Abstract........................................................................................................................... | 45 |
| Introdução........................................................................................................................ | 46 |
| Material e Métodos.......................................................................................................... | 48 |
| Resultados........................................................................................................................ | 52 |
| Discussão.......................................................................................................................... | 58 |
| Conclusão......................................................................................................................... | 65 |
| Referências Bibliográficas............................................................................................... | 66 |
|  |  |
| **CAPÍTULO 3:** Suplementação de treonina *in ovo* afeta a morfofisiologia intestinal e  a contagem cecal de *Salmonella* Enteritidis em frangos de corte desafiados................... | 70 |
| Resumo............................................................................................................................. | 71 |
| Abstract............................................................................................................................. | 72 |
| Introdução......................................................................................................................... | 73 |
| Material e Métodos........................................................................................................... | 75 |
| Resultados......................................................................................................................... | 79 |
| Discussão.......................................................................................................................... | 86 |
| Conclusão......................................................................................................................... | 92 |
| Referências Bibliográficas................................................................................................ | 93 |
|  |  |
| **CAPÍTULO 4:** Caracterização da microbiota cecal de frangos de corte suplementados com treonina *in ovo* e desafiados com *Salmonella* Enteritidis na fase pós-eclosão.............................................................................................................................. | 96 |
| Resumo............................................................................................................................. | 97 |
| Abstract............................................................................................................................. | 98 |
| Introdução......................................................................................................................... | 99 |
| Material e Métodos........................................................................................................... | 101 |
| Resultados......................................................................................................................... | 108 |
| Discussão.......................................................................................................................... | 115 |
| Conclusão......................................................................................................................... | 120 |
| Referências Bibliográficas................................................................................................ | 121 |
| **CONSIDERAÇÕES FINAIS.........................................................................................** | **125** |

|  |  |
| --- | --- |
| **LISTA DE TABELAS** | |
|  |  |
| **CAPÍTULO 2** | **Páginas** |
|  |  |
| **Tabela1:** Composição química das soluções nutritivas................................................ | 48 |
| **Tabela 2.** Sequências dos primers utilizados para amplificação dos genes alvo e gene referência....................................................................................................................... | 51 |
| **Tabela 3.** Características de incubabilidade de ovos submetidos a suplementação de treonina.......................................................................................................................... | 52 |
| **Tabela 4.** Efeito da suplementação de treonina *in ovo* sobre as características de desempenho, peso inicial (g), peso final (g), ganho de peso (g), consumo de ração (g) e conversão alimentar (g/g) de frangos de corte de 1-7, 1-14 e 1-21 dias........................ | 53 |
| **Tabela 5.** Expressão relativa dos genes de mucina (*Muc2*), transportador de peptídeo (*PepT1*) e aminopeptidase (*AP*) no íleo de frangos de corte suplementados com diferentes níveis de treonina *in ovo* no dia da eclosão (DOH) e aos 21 dias de idade...... | 54 |
| **Tabela 6.** Efeito da suplementação de treonina *in ovo* sobre a altura de vilosidade (AV), profundidade de cripta (PC), relação vilo:cripta (V:C) e área de vilosidade de pintainhos de corte à eclosão.......................................................................................... | 56 |
| **Tabela 7.** Efeito da suplementação de treonina *in ovo* sobre a altura de vilosidade (AV), profundidade de cripta (PC), relação vilo:cripta (V:C) e área de vilosidade de frangos de corte aos 21 dias de idade.............................................................................. | 57 |
|  |  |
| **CAPÍTULO 3** |  |
| **Tabela 1:** Composição química das soluções nutritivas................................................ | 75 |
| **Tabela 2.** Características de incubabilidade de ovos submetidos à suplementação de treonina.......................................................................................................................... | 79 |
| **Tabela 3.** Peso inicial, peso final e ganho de peso de pintainhos suplementados *in ovo* com treonina............................................................................................................ | 79 |
| **Tabela 4.** Altura de vilosidade (AV), profundidade de cripta (PC), relação vilo:cripta (V:C) e área de vilosidade (Área) de frangos de corte suplementados *in ovo* com treonina.......................................................................................................................... | 80 |
| **Tabela 5.** Contagem bacteriana cecal (UFC/g) de frangos corte desafiados com *Salmonella* e suplementados *in ovo* com treonina.......................................................... | 81 |
| **Tabela 6.** Altura de vilosidade (AV), profundidade de cripta (PC), relação vilo:cripta (V:C) e área de vilosidade (Área) de frangos de corte 24 horas pós-desafio com *Salmonella* Enteritidis (dpi)........................................................................................... | 82 |
| **Tabela 7.** Altura de vilosidade (AV), profundidade de cripta (PC), relação vilo:cripta (V:C) e área de vilosidade (Área) de frangos de corte 96 horas pós-desafio com *Salmonella* Enteritidis (dpi)........................................................................................... | 83 |
| **Tabela 8.** Altura de vilosidade (AV), profundidade de cripta (PC), relação vilo:cripta (V:C) e área de vilosidade (Área) de frangos de corte 168 horas pós-desafio com *Salmonella* Enteritidis (dpi)........................................................................................... | 84 |
| **Tabela 9.** Peso inicial (2d), peso final (3, 6 e 9d) e ganho de peso de frangos de corte suplementados *in ovo* com treonina e desafiados com *Salmonella* Enteritidis pós-eclosão........................................................................................................................... | 85 |

|  |  |
| --- | --- |
| **LISTA DE FIGURAS** | |
|  |  |
| **CAPÍTULO 1** | Página |
| **Figura 1.** Desenvolvimento e vascularização da membrana vitelina............................. | 16 |
| **Figura 2.** Anexos embrionários e embrião de galinha.................................................... | 17 |
| **Figura 3**. Modificações do metabolismo embrionário de frangos de corte durante o processo de incubação................................................................................................................................. | 22 |
|  |  |
| **CAPÍTULO 2** |  |
| **Figura 1.** Expressão gênica de mucina (*MUC2*), transprtador de peptídeo (*PEPT1*) e aminopeptidase da borda escova (*AP*) de pintainhos de corte no dia da eclosão (A) e aos 21 dias de idade (B) suplementados com diferentes níveis de treonina *in ovo............* | 55 |
| **Figura 2.** Fotomicrografias de vilosidades do jejuno de frangos de corte no dia da eclosão, suplementados com treonina *in ovo*. (A) controle (0,0%), (B) 7,0%*.................................................................................................................................* | 56 |
|  |  |
| **CAPÍTULO 4** |  |
| **Figura 1.**Construto final para sequenciamento em plataforma Illumina, incluindo os iniciadores específicos para as regiões hipervariáveis do gene 16S RNAr (primers 5’ e 3’ específicos), as sequências de ligação CS1 e CS2 do sistema Fluidigm e os adaptadores Illumina i5 e i7............................................................................................. | 104 |
| **Figura 2.** Análises realizadas com a tabela Biom gerada pelo IM-TORNADO............ | 106 |
| **Figura 3.** Distribuição de filos bacterianos no dia da eclosão (DOH), 2, 3, 6 e 9 dias de idade, no ceco de frangos de corte. Foi utilizado o sequenciamento da região V3-V5 do gene 16s rRNA...................................................................................................... | 108 |
| **Figura 4.** Distribuição das famílias bacterianas com representatividade superior a 5% no dia da eclosão (DOH), 2, 3, 6 e 9 dias de idade. Foi utilizado sequenciamento da região V3-V5 do gene 16S rRNA do conteúdo e raspado de mucosa do ceco de frangos de corte............................................................................................................................ | 109 |
| **Figura 5.** Análise de alfa diversidade da comunidade bacteriana cecal de frangos de corte, em diferentes períodos de tempo (0, 2, 3 6 e 9 dias de idade), através do índice de Shannon (A) e Chao 1 (B)........................................................................................... | 110 |
| **Figura 6.** Análise de componentes principais baseada na medida de distância Unifrac não-ponderada (A) e ponderada (B), mostrando o agrupamento dos grupos bacterianos em diferentes períodos de tempo (0, 2, 3, 6 e 9 dias de idade)........................................... | 111 |
| **Figura 7.** Distribuição de filos bacterianos com representatividade superior à 5%, em três períodos de tempo (24, 96 e 168 horas), após o desafio com *Salmonella* Enteritidis (dpi) no ceco de frangos de corte suplementados com treonina *in ovo*. Foi utilizado sequenciamento da região V3-V5 do gene 16s rRNA. Para cada ponto de tempo, NT-Sal: solução salina *in ovo* e desafio com *Salmonella* pós-eclosão; NT-Sh: Solução salina *in ovo* sem desafio de *Salmonella* pós-eclosão; T-Sal: suplementação com treonina in ovo e desafio com *Salmonella* pós-eclosão; T-Sh: suplementação com treonina *in ovo* sem desafio pós-eclosão.......................................................................... | 112 |
| **Figura 8.** Distribuição das famílias bacterianas, com representatividade superior à 5%, em três períodos de tempo (24, 96 e 168 horas), após o desafio com *Salmonella* Enteritidis (dpi) no ceco de frangos de corte suplementados com treonina *in ovo*. Foi utilizado o sequenciamento da região V3-V5 do gene 16S rRNA. Para cada ponto de tempo, NT-Sal: solução salina *in ovo* e desafio com *Salmonella* pós-eclosão; NT-Sh: Solução salina *in ovo* sem desafio de *Salmonella* pós-eclosão; T-Sal: suplementação com treonina in ovo e desafio com *Salmonella* pós-eclosão; T-Sh: suplementação com treonina *in ovo* sem desafio pós-eclosão.......................................................................... | 113 |
| **Figura 9.** Análise de diversidade alfa da comunidade bacteriana cecal de frangos de corte, suplementados com treonina *in ovo* e desafiados com *Salmonella* Enteritidis no período de 96 horas pós-desafio, através do índice de Shannon (A) e Chao 1 (B).................................................................................................................................... | 114 |
| **Figura 10.** Análise de componentes principais baseada medida de distância Unifrac não-ponderada (A) e ponderada (B), mostrando o agrupamento dos grupos bacterianos no período de 96 horas pós-desafio com *Salmonella* Enteritidis...................................... | 114 |

**ENRIQUECIMENTO DO ÂMNIO COM TREONINA EM EMBRIÕES DE FRANGOS CORTE: 1. DESEMPENHO E MORFOFISIOLGIA INTESTINAL E 2. EFEITO SOBRE A CONTAGEM DE *SALMONELLA* ENTERITIDIS E MICROBIOTA CECAL**

**Resumo Geral:** A fase logo após a eclosão é determinante na vida do pintainho, pois ocorrem grandes transformações para garantir sua sobrevivência. A principal delas constitui o rápido desenvolvimento do tratogastrintestinal para garantir a assimilação de nutrientes. Na eclosão, o pintainho torna-se exposto a diversos tipos de microrganimos e seus mecanimos de defesa encontram-se pouco desenvolvidos. A utilização de nutrientes que tenham envolvimento com resposta imune intestinal pode ser uma alternativa viável na melhoria da resposta de pintainhos a patógenos. Assim, o fornecimento de treonina durante a vida embrionária do pintainho, poderia resultar em melhoria na resposta dos pintainhos frente ao desafio por microrganismos patogênicos. Com isso, o estudo foi desenvolvido com intuito de avaliar o efeito do fornecimento de treonina *in ovo* sobre o desenvolvimento da mucosa intestinal, expressão de genes intestinais, e da microbiota cecal em resposta ao desafio com *Salmonella.* Para tanto, foram realizados dois experimentos, o primeiro na North Carolina State University e o segundo no Laboratório de Fisiologia Animal e Biologia Molecular, pertencente ao Centro de Ciências Agrária da Universidade Federal da Paraíba (CCA/UFPB)*.* No Capítulo II estão apresentados os dados do primeiro experimento, em que avaliou-se o efeito de níveis (0,0; 1,75; 3,5; 5,25;7,0%) de treonina fornecidos *in ovo* sobre o desempenho de frangos de 1 – 21 dias, o desenvolvimento da mucosa intestinal e expressão de genes intestinais, mucina (*MUC2*), transportador de peptídeo (*PepT1*) e enzima aminopeptidase (*AP*).A suplementação de treonina *in ovo* aumentou (p≤0,001) o peso final e o ganho de peso e reduziu a conversão alimentar dos animais no período de 1 a 21 dias de idade. Os níveis de treonina afetaram de forma benéfica a altura de vilosidade, a relação vilosidade:cripta e a área de vilosidade. No dia da eclosão todos os níveis de treonina suplementados in ovo aumentaram a expressão de *MUC2*, *PepT1* e *AP*, exceto para expressão de *AP* quando o menor e o maior nível (1,75 e 7,0%) foram semelhantes ao tratamento controle. Não foram observados efeitos significativos para expressão de *MUC2, PepT1* e *AP* quando avaliados aos 21 dias de idade. No Capítulo III, estão apresentados os dados referentes ao segundo experimento, em que avaliou-se o efeito da suplementação de treonina *in ovo* sobre a resposta de frangos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis na fase pós-eclosão, considerando a contagem bacteriana cecal, morfologia intestinal, o peso final e ganho de peso em diferentes períodos pós-desafio com *Salmonella.* A suplementação de 3,5% de treonina *in ovo* reduziu a contagem cecal de *Salmonella* Enteritidis no período de 168 horas pós-desafio. Além disso, o fornecimento de treonina proporcionou maior desenvolvimento da mucosa intestinal e melhorou o desempenho em frangos de corte na fase inicial. No Capítulo IV, estão apresentados os dados referentes à avaliação do efeito da inoculação *in ovo* de treonina sobre a diversidade e composição da microbiota cecal em diferentes períodos de pintainhos submetidos ao desafio com *Salmonella* Enteritidis. À eclosão, a microbiota é pouco diversa e formada principalmente por bactérias do filo Proteobactéria, com o avançar da idade, a microbiota torna-se diversa e sua composição é alterada, tornando-se composta principalmente por bactéria pertencentes ao filo Firmicutes. O desafio com *Salmonella* não promoveu nenhuma alteração na diversidade e composição da microbiota cecal. A suplementação de treonina *in ovo* alterou a diversidade e composição da microbiota no período de 96 horas após o desafio, favorecendo o estabelecimento de bactérias da família Lachnospiraceae. A suplementação de treonina *in ovo* melhora o desenvolvimento morfológico e funcional da mucosa intestinal e altera a diversidade da microbiota intestinal, favorecendo o estabelecimento da microbiota comensal, e promove melhorias na saúde intestinal de frangos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis.

**Palavras-chave:** aminoácidos, desenvolvimento embrionário, produção de mucinas, saúde intestinal

**ENRICHMENT OF AMNION WITH THREONINE IN CHICKEN EMBRYOS: 1. PERFORMANCE AND INTESTINAL MORPHOPHISIOLOGY AND 2. EFFECT ON *SALMONELLA* ENTERITIDIS COUNTS AND CECAL MICROBIOTA**

**General Abstract:** The phase after hatching is determinant in the life of the chick, during which crucial transformations occur to guarantee survival. The rapid development of the gastrointestinal tract to assure the assimilation of nutrients is one of the most important. At hatching, the chick is exposed to several types of microorganisms and defense mechanisms are still underdeveloped. Feeding of nutrients involved in intestinal immune response may be a viable alternative in improving the response of chicks to pathogens. *In ovo* supplementation of threonine during embryogenesis was studied as well as its effect on the development of the intestinal mucosa, expression of intestinal genes and cecal microbiota in response to challenge with *Salmonella*. In Chapter II, the effect of threonine levels (0.0; 1.75; 3.5; 5.25; 7.0%) provided *in ovo* was assessed by chick performance and the expression of mucin *(MUC2)*, peptide transporter *(PepT1)*, and aminopeptidase enzyme *(AP*) genes in the jejunum. *In ovo* threonine supplementation significantly increased (p <0.001) the final weight, weight gain, and reduced feed conversion over the 1 to 21 day period. Threonine levels beneficially affected villus height, villus: crypt ratio and villous area. On the day of hatching all threonine levels supplemented *in ovo* increased expression of *MUC2*, *PepT1* and *AP*; it is worth noting that *AP* expression in the lowest and highest level of supplementation (1.75 and 7.0%) was similar to that of the control treatment. No significant effects were observed for *MUC2, PepT1* and *AP* expression at 21 days of age. In Chapter III, the effect of *in ovo* Threonine supplementation on the response of broilers challenged with *Salmonella* Enteritidis in the post-hatching phase was evaluated, considering the cecal bacterial count, intestinal morphology, final weight and weight gain in different periods post-challenge with *Salmonella*. Threonine supplementation *in ovo* at 3.5% reduced *Salmonella* Enteritidis counts in the cecum at 168-hour post inoculation (hpi). In addition, threonine supplementation improved the intestinal mucosa development and performance in broilers in the initial phase. In Chapter IV, data are presented on the evaluation of the effect of *in ovo* threonine on the diversity and composition of the cecal microbiota in different periods of chicks submitted to challenge with *Salmonella* Enteritidis. At hatching, diversity is limited and the populations consist mainly of bacteria of the phylum Proteobacteria. The diversity increases with age and the microbiota composition is shifted to a greater proportion of bacteria belonging to Firmicutes phylum. The challenge with *Salmonella* did not change the cecal microbiota diversity and composition. *In ovo* threonine supplementation altered the diversity and composition of the microbiota in the period of 96 hours after the challenge, favoring the establishment of bacteria of the family Lachnospiraceae. In conclusion, the *in ovo* threonine supplementation beneficially affected the morphological and functional development of the intestinal mucosa and promoted changes in the intestinal microbiota, favoring the establishment of the commensal microbiota, promoting improvements in the intestinal health of broilers challenged with *Salmonella* Enteritidis.

**Key words:** amninoacids, embryonic development, health intestinal, mucin production

**CONSIDERAÇÕES INICIAIS**

Na avicultura industrial é cada vez maior a preocupação com segurança dos produtos avícolas, visto que nos últimos anos foi crescente o número de intoxicações alimentares causadas pela ingestão de produtos de origem animal. Dentre estes, destacam-se os ovos e carne de frango. Como consequência, os consumidores são cada vez mais exigentes, buscando produtos com qualidade e que ofereçam segurança para sua saúde. Dentre os agentes responsáveis pela maior parte dos surtos de toxinfecções alimentares, destaca-se as bactérias do gênero *Salmonella sp*, consideradas grande ameaça para segurança alimentar. Além disso, existe preocupação quanto aos efeitos negativos dos surtos de salmoneloses sobre a produtividade animal, o que acarreta redução da produção e consequentemente prejuízos econômicos.

A *Salmonella sp*. é um gênero bacteriano comumente indesejado, mas que pode ser encontrado no trato gastrointestinal das aves, compondo e influenciando a microbiota intestinal. As aves são mais sensíveis à contaminação por *Salmonella sp*. durante os primeiros dias de vida, período em que a microbiota intestinal não está estabelecida e o sistema imune intestinal encontra-se imaturo, o que favorece a rápida colonização da mucosa intestinal pela bactéria. As populações bacterianas comensais do intestino desempenham importante papel protegendo o hospedeiro da colonização por agentes patogênicos, pois competem pelos sítios de ligação no epitélio e nutrientes disponíveis, como também produzem bacteriocinas, fortalecendo, assim, a resposta imune intestinal.

A microbiota intestinal é composta por inúmeras espécies bacterianas e a grande maioria não é cultivável por métodos microbiológicos tradicionais. Estima-se, na verdade, que, no máximo, 5% das espécies de um determinado tecido podem ser cultivadas. Nesse sentido, a aplicação da metagenômica fundamentada nas tecnologias de sequenciamento de última geração e bioinformática, representa alternativa promissora e inovadora para o entendimento da microbiota intestinal, pois pode fornecer respostas esclarecedoras sobre a dinâmica dos microrganismos, através da determinação das espécies e suas quantificações relativas.

A microbiota intestinal das aves desempenha importantes funções dentro do ambiente intestinal e pode ser afetada por diferentes fatores internos e externos ao organismo animal. Dentre os principais fatores, a nutrição vem sendo estudada como forma de manipular a microbiota residente, através do uso de nutrientes que desempenham funções que podem modular a fisiologia intestinal. A treonina pode ser uma alternativa viável na melhoria da resposta de aves a patógenos por estar intimamente relacionada com a produção de mucinas formando uma barreira de proteção contra a ação de enzimas digestivas e dano físico da digesta.

Estudos realizados pela equipe de pesquisa do Laboratório de Fisiologia Animal e Biologia Molecular (CCA/UFPB) têm demonstrado que o fornecimento de níveis elevados de treonina na dieta melhora a resposta de pintainhos na fase inicial frente ao desafio com *Salmonella* Enteritidis. No entanto, os mecanismos de ação da treonina sobre a manutenção da integridade intestinal e possíveis alterações na microbiota intestinal precisam ser melhores compreendidos. Acredita-se que os efeitos da treonina estejam relacionados com a promoção da produção de mucina e imunoglobulinas de mucosa, alterando a resposta imune intestinal, o que resultaria em melhor capacidade de suportar desafios causados por microrganismos patogênicos. A partir destas constatações, nossa hipótese é que o fornecimento de treonina em períodos precoces da vida do pintainho, como por exemplo durante a embriogênese, pode promover alterações significativas na dinâmica da microbiota intestinal de pintainhos frente ao desafio por *Salmonella.*

Assumindo estas proposições, o presente trabalho foi dividido em quatros capítulos; no primeiro, composto por uma revisão de literatura, em que abordaram-se diferentes temas explorados ao longo do trabalho: Treonina e mucinas, Aplicação da técnica de nutrição *in ovo*, Desenvolvimento e metabolismo embrionário, Salmoneloses e microbiota intestinal.

No segundo capítulo consta os dados referentes ao experimento realizado durante o período sanduíche na North Carolina State University (NCSU/USA). Neste estudo objetivou-se avaliar efeito de níveis de treonina suplementados *in ovo* sobre a morfofisiologia intestinal e desempenho de frangos de corte de 1 -21 dias de idade.

No terceiro capítulo, apresentamos os dados referentes ao trabalho desenvolvido no Laboratório de Fisiologia Animal e Biologia Molecular (CCA/UFPB), no qual avaliou-se o efeito da suplementação de treonina *in ovo* sobre a resposta de frangos de corte desafiado com *Salmonella* Enteritidis na fase pós-eclosão, considerando a contagem bacteriana cecal, morfologia intestinal, o peso final e ganho de peso em diferentes períodos pós-desafio com *Salmonella.*

No quarto e último capítulo, são apresentados os resultados referentes às análises realizadas no Departamento de Ciência Animal, University of Illinois at Urbana-Champaign, IL, EUA, foram estudados os efeitos da inoculação de treonina *in ovo* sobre a diversidade e composição da microbiota cecal em diferentes períodos de tempo em pintainhos submetidos ao desafio com *Salmonella* Enteritidis*.*

**CAPÍTULO I – REFENCIALTEÓRICO**

Enriquecimento do âmnio com treonina em embriões de frangos corte. I. Desempenho e morfofisiolgia intestinal e II. Efeito sobre a contagem de *Salmonella* Enteritidis e microbiota cecal

**REFERENCIAL TEÓRICO**

**1. Treonina e Mucina**

A treonina é o terceiro aminoácido limitante em dietas para frangos de corte após a metionina e a lisina, utilizando-se rações a base de milho e farelo de soja. A treonina (Thr) está envolvida em importantes funções biológicas como a manutenção, integridade e imunidade de diferentes mucosas e, como consequência, sua exigência pode variar de acordo com a importância de cada função (Azzam et al., 2011; Mao et al., 2011). No trato gastrintestinal (TGI), a integridade da mucosa é passo essencial para o processo de digestão e absorção dos nutrientes (Mao et al., 2011). A treonina é amplamente usada na síntese de mucina, o principal componente da camada de muco protetor da mucosa do TGI. O muco atua como uma camada de proteção do epitélio intestinal, prevenindo contra danos e infecção por bactérias patogênicas e como substrato de fixação para bactérias comensais (Linden et al., 2008).

A produção de mucina está intimamente relacionada aos níveis de treonina na dieta, portanto, níveis dietéticos elevados de treonina aparentemente podem auxiliar na proteção do epitélio intestinal (Santos et al., 2013). Segundo Le Bellego et al. (2002), aproximadamente 50% da treonina fornecida na dieta fica retida em nível intestinal, sendo utilizada principalmente para síntese de mucinas A camada de gel mucoso, secretada pelas células caliciformes, é constituída por 95% de água e 5% de mucinas, glicoproteínas particularmente ricas em treonina (Corfield et al., 2001).

Segundo Faure et al. (2004), a síntese de mucinas intestinais é prejudicada em casos de fornecimento limitado de treonina. Em situações de estresse, quando há maior utilização de treonina, a disponibilidade deste aminoácido pode tornar-se limitante para a síntese de mucinas intestinais e, como resultado, ocorrerá comprometimento da barreira de proteção do epitélio intestinal. Não é apenas a quantidade de mucinas que é alterada quando a treonina é deficiente, mas suas características são afetadas, o que podem ter significativos resultados funcionais (Law et al., 2007). O tipo e quantidade de mucina produzida no trato TGI influenciam as comunidades microbianas (por servir de substrato para a fermentação bacteriana e para fixação), a disponibilidade de nutrientes (via perda endógena de mucina, bem como pela absorção de nutrientes) e função imune (via controle da população microbiana) (Corzo et al., 2007).

Assim, o fornecimento de níveis limitados de treonina pode prejudicar a síntese de mucina e altera a integridade da barreira de proteção do epitélio intestinal (Law et al., 2007). Tal fato torna-se mais importante em situações de inflamação gastrintestinal, quando a treonina é retida pelo intestino para manter a integridade e função (Faure et al., 2006). Segundo Faure et al. (2007), em situações patológicas, os processos de defesa e reparação da mucosa aumentam a demanda por aminoácidos, em especial a treonina. Com isso, a suplementação de treonina pode melhor atender a demanda de aminoácidos resultantes da infecção, contribuindo para redução da mobilização da proteína muscular.

De fato, a treonina tem um importante papel na função intestinal. Santos et al. (2013) relataram que a suplementação de treonina associada a mananoligossacarídeo (MOS) foi capaz de reduzir os número de animais positivos para *Salmonella*, como também, a contagem bacteriana cecal. Da mesma forma, Moreira Filho et al. (2015) observaram que pintainhos desafiados com *Salmonella* suplementados com alto nível de treonina na dieta apresentaram redução no número de animais positivos para *Salmonella* e redução na contagem bacteriana cecal, no entanto, a redução não foi significativa.

Azzam et al. (2011) verificaram em seus estudos que a expressão de mRNA MUC2 aumentaram linearmente com o aumento da treonina dietética. Além da importante função na síntese de mucinas intestinais, outra importante função desempenhada pela treonina para proteção da mucosa intestinal relaciona-se com a síntese de imunoglobulinas A (IgA). Azzam et al. (2011) relataram aumento linear nos níveis de IgA na mucosa do íleo de galinhas poedeiras submetidas a estresse por calor a medida que aumentaram os níveis de treonina na dieta. Zaefarian et al. (2008) verificaram efeito benéfico da suplementação de treonina em diferentes linhagens de frangos de corte sobre a altura de vilosidade, espessura epitelial, número de células caliciformes e profundidade de cripta.

Nos últimos anos alguns estudos foram desenvolvidos com intuito de avaliar o efeito do fornecimento de treonina *in ovo.* Kadam et al. (2008), trabalhando com suplementação de níveis de treonina *in ovo* observaram tendência de aumento na atividade das enzimas pepsina e amilase em embriões suplementados com 20 e 30 mg de treonina, no entanto, tais aumentos não foram significativos. No mesmo estudo, observou-se maior consumo de ração em pintos suplementados com treonina, que poderia ser atribuído ao maior desenvolvimento funcional do TGI, uma vez que a treonina é elemento essencial componente de enzimas e mucina, como evidenciado pela maior população de células caliciformes no intestino de animais suplementados com treonina (Kadam et al., 2008).

Bhanja et al. (2014) observaram que o uso da treonina *in ovo*, regulou de forma positiva a expressão do gene *Muc2*, como também, de outros genes envolvidos com a resposta imune intestinal *(IL-4, IL-6 e TNF-α*). Kermanshari et al. (2015) observaram que a suplementação de treonina para embriões de codornas proporcionou aumentos da expressão de *Muc2* na eclosão e aos 10 dias de idade. Tahmasebi et al. (2015) observaram maior comprimento do jejuno e íleo nos animais suplementados *in ovo* com treonina, arginina (Arg) e treonina+arginina, quando comparados ao grupo não suplementado. Em relação aos parâmetros de morfologia intestinal, no mesmo estudo, observou-se aumento na altura de vilosidade nos animais suplementados com Thr e Arg no íleo, mas não no jejuno.

Kermanshahi et al. (2015) sugeriram que a maior expressão de *MUC2* que ocorreu quando foi feita suplementação de Thr em ovos de codornas seria capaz de promover maior proteção da mucosa intestinal contra agentes patogênicos, melhorando os processos de digestão e absorção de nutrientes, sendo estes fatores importantes para pintainhos recém eclodidos. Kadam et al. (2008) observaram que a suplementação de treonina *in ovo* melhorou resposta imune humoral, sugerindo que a suplementação de treonina proporcionou incremento da síntese de imunoglobulinas.

Assim, o fornecimento de treonina *in ovo* e em níveis elevados na dieta pode promover o amadurecimento precoce do trato gastrointestinal e melhorar a imunidade intestinal. Com isso, tornando-se uma alternativa viável na melhoria da resposta de pintainhos a agentes patogênicos.

**2. APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE NUTRIÇÃO *IN OVO***

**2.1 Histórico da Nutrição *in ovo***

Os estudos com o fornecimento de nutrientes *in ovo* foram iniciados por Al-Murrani (1982) com objetivo de demonstrar a necessidade de aumentar os níveis de proteínas na dieta de matrizes, como condição para melhorar a transferência de proteínas para os ovos. Assim, o estudo foi realizado injetando uma mistura de aminoácidos semelhante ao perfil de aminoácidos do ovo. A suplementação *in ovo* foi realizada no sétimo dia de desenvolvimento embrionário na região do saco vitelínico. Como resultado, observou-se melhorias no peso vivo na eclosão e aos 56 dias de idade. Os estudos posteriores foram realizados para otimizar a técnica de administração de vacinas *in ovo* (Sharma e Burmester, 1982; Hargis et al., 1989; Edens et al., 1997).

Posteriormente, Ohta et al. (1999) retomaram as pesquisas realizadas por Al-Murrani (1982), estudando o efeito da suplementação de aminoácidos *in ovo* em diferentes compartimentos, no saco vitelino e na câmara de ar, com o objetivo de melhorar a eclodibilidade e o peso do pintinho na eclosão. A inoculação foi realizada nos dias 0 e 7 de desenvolvimento embrionário e observou-se que a administração de nutrientes na câmara de ar resultou em redução da eclodibilidade, sendo o saco vitelino o melhor compartimento para administrar nutrientes *in ovo*, garantindo melhor eclodibilidade e peso dos pintinhos (Ohta et al., 1999).

Vários estudos foram desenvolvidos por Uni e Ferket (2003), com o intuito de otimizar a técnica de nutrição *in ovo*. As pesquisas realizados por Uni e Ferket (2003) objetivaram administrar soluções nutritivas no líquido amniótico, garantindo o consumo do nutrientes pelo embrião. A principal diferença entre as pesquisas realizadas por Uni e Ferket (2003) e pesquisas anteriores, é que os autores visam apenas a administração de nutrientes via líquido amniótico, o que garante o consumo oral destes nutrientes e o contato destes com a mucosa intestinal. Assim, os autores patentearam a técnica de fornecimento de soluções nutritivas no líquido amniótico de embriões de frangos de corte e peru (Patente EUA # 6.592.878 B2).

A técnica patenteada por Uni e Ferket (2003), além de discriminar o melhor local para a suplementação de nutrientes *in ovo*, leva em consideração os aspectos relacionados aos tipos de nutriente, ao volume de solução aplicada, ao pH e osmolaridade da solução, como também, a melhor idade para aplicação da técnica. Primeiramente, foi realizado a identificação dos nutrientes com maior viabilidade de aplicação, que poderiam aumentar de forma direta ou indireta o crescimento das reservas energéticas do embrião e principalmente nutrientes moduladores entéricos. Assim, concluiu-se que a utilização de nutrientes na forma complexa não seria viável, visto que os sistemas enzimáticos dos embriões encontram-se pouco desenvolvidos. Assim, os nutrientes devem ser fornecidos na forma simples, como aminoácidos e açúcares simples (glicose, maltose e sacarose), vitaminas e minerais, além de prebióicos e moduladores entéricos.

Após a identificação dos nutrientes essenciais, Uni e Ferket (2003) procuraram identificar o volume da solução ideal, a osmolaridade ideal da solução e o estágio de desenvolvimento embrionário adequado para aplicação da técnica. Em embriões de frangos de corte, concluiu-se que o estágio de desenvolvimento ideal para aplicação da técnica seria em torno de 17 e 18 dias de incubação, que coincide com a ingestão do líquido amniótico. O volume ideal seria entre 0,6 – 1,0 mL de solução e osmolaridade em torno de 400 – 500 mOsm. Para embriões de peru, a idade ideal para administração de soluções nutritivas no líquido amniótico é por volta dos 23 dias de desenvolvimento embrionário, que também coincide com início da ingestão do líquido amniótico. O volume ideal de solução é de 1 – 2 mL, com osmolaridade semelhante a frangos de corte, não podendo ultrapassar 800 mOsm (Uni e Ferket, 2003).

**2.2 Estudos com nutrição *in ovo***

Diversos estudos foram realizados após padronização da técnica de fornecimento de soluções nutritivas *in ovo* com diferentes objetivos, entre os principais avaliar o desenvolvimento morfológico e funcional da mucosa intestinal, como também a manutenção das reservas de glicogênio. O estudo realizado por Uni et al. (2005) avaliou o efeito da suplementação de 1 mL da solução nutritiva contendo 25g/L de maltose, 25g/L de sacarose, 200g/L de dextrina, 1g/L de HMB em solução salina (0,5% de NaCl), sobre o as reservas de glicogênio. A administração da solução nutritiva proporcionou o aumento nas reservas de glicogênio hepático e muscular no final do processo de incubação, além de maior rendimento de músculo peitoral aos 25 dias de idade (Uni et al., 2005).

Tako et al. (2004) avaliaram o efeito da administração *in ovo* de 1 mL de solução contendo 0,5% de Zinco-metionina (ZnMet), sobre o desenvolvimento da mucosa intestinal. Foi observado que a suplementação de ZnMet proporcionou aumento na expressão do transportador de ZnMet, aumentou a atividade das enzimas da borda escova (aminopeptidase e isomaltase) e atuou de forma benéfica sobre o desenvolvimento da mucosa intestinal, aumentando a área de vilosidade. Sminorv et al. (2006) observaram que a suplementação de soluções de carboidratos em embriões de frangos de corte aumentou a área de vilosidade no dia da eclosão e 3 dias pós-eclosão, proporcionou aumentos na população de células caliciformes e maior expressão do gene da mucina *(MUC2),* sugerindo que pode haver benefícios em relação à resistência contra a colonização por patógenos.

No estudo realizado por Foye et al. (2006), o fornecimento *in ovo* de β-hidroxi β-metil butirato (HMB) e arginina em embriões de peru mostrou efeito positivo do HMB sobre o peso do pintainho na eclosão e aos 14 dias de idade. Tanto o HMB como arginina aumentaram a concentração plasmática do fator de crescimento semelhante a insulina tipo I (IGF-I), na eclosão e aos 3 e 7 dias de idade, além disso, a suplementação de HMB e Arginina aumentaram a reserva de glicogênio hepático na eclosão (Foye et al., 2006). Foye et al. (2009) avaliaram o efeito do HMB e arginina fornecidos *in ovo* sobre a expressão de enzimas e transportadores da mucosa intestinal, e observaram que a suplementação de HMB teve efeito positivo sobre a expressão dos transportadores de glicose *(SGLT-1)* e aminoácidos *(PepT1),* e de enzimas envolvidas na digestão de proteína *(*aminopeptidase-AP*)* e carboidratos *(*isomaltase-SI*).*

Kadam et al. (2008) avaliaram o efeito da suplementação de níveis de treonina (Thr) *in ovo* sobre o desempenho e atividade enzimática. Foi relatado maior ganho de peso nos períodos de 14-21 e 21 – 28 dias nos animais suplementados com Thr *in ovo* e melhorias na conversão alimentar com o aumento dos níveis de Thr *in ovo* (Kadam et al., 2008). A atividade das enzimas pepsina no proventrículo e da amilase no pâncreas foi aumentada e os autores atribuíram o maior consumo de ração dos pintainhos suplementados com treonina ao maior desenvolvimento funcional do TGI (Kadam et al., 2008).

O estudo realizado por Cheled-Shoval et al. (2011) avaliou o efeito da administração de mananooligossacarídeo (MOS) *in ovo* sobre o desenvolvimento da mucosa intestinal, expressão de transportadores intestinais (*PepT1 e SGLT-1*), das enzimas intestinais (*SI e AP*) e do gene da mucina (*MUC2*). Observou-se que o MOS age de forma benéfica sobre o desenvolvimento da mucosa intestinal, aumentando a área e altura de vilosidade, o número de células caliciformes e proporcionando maior desenvolvimento das criptas. Além disso, a suplementação de MOS foi capaz de aumentar a expressão dos genes das enzimas aminopeptidase e isomaltase, e do gene *MUC2* no dia da eclosão. Estes efeitos não foram mais observados aos 3 dias pós-eclosão (Cheled-Shoval et al., 2011).

Tahmasebi et al. (2015) observaram em seus estudos que os animais suplementados com Thr *in ovo* apresentaram maior consumo de ração durante todo período experimental, o que refletiu em um maior peso ao final do ciclo produtivo (42 dias), além disso, foi observado que a suplementação de Thr melhorou o rendimento de carcaça no período de 1-11 dias de idade, mas esse efeito não persistiu até final do ciclo. A suplementação de treonina e arginina promoveu aumento no comprimento do jejuno e íleo e aumento da altura de vilosidade no íleo, mas não no jejuno.

Alguns estudos foram realizados com o intuito de avaliar os efeitos da suplementação de nutrientes *in ovo* sobre a resposta imune. Bhanja et al. (2014a) avaliaram o efeito da suplementação de lisina, arginina, treonina e metionina+cistina sobre genes relacionados a resposta imune (*IL-2*, *IL-4*, *IL-6*, *IL-12* e *TNF-α*) e o gene da mucina (MUC2). A suplementação de treonina e arginina aumentaram a expressão do gene *MUC2*. Aves que receberam treonina e metionina+cistina *in ovo* apresentaram maior expressão dos genes *IL-2*, *IL-6* e *TNF-α*. Em outro estudo, os autores avaliaram os efeitos da suplementação de carboidratos (glicose, frutose e ribose) *in ovo* sobre os mesmos genes e sobre o gene *IL-10*. A suplementação de glicose proporcionou maior expressão dos *IL-6* e *IL-10*, enquanto a suplementação de ribose favoreceu a maior expressão *IL-2* e *IL-12* (Bhanja et al., 2014b).

De modo geral, observa-se que a suplementação de nutrientes *in ovo* estimula o desenvolvimento precoce do pintainho que, caso contrário, só ocorreria após a eclosão; melhorando a eficiência digestiva, o desenvolvimento muscular, desenvolvimento do sistema imune, manutenção das reservas de glicogênio e redução da mortalidade pós-eclosão. Entretanto, o grau de resposta a essa prática pode depender da genética, da idade da matriz, tamanho de ovo, das condições de incubação, do tipo de nutriente, da metodologia aplicada entre outros.

**3**. **DESENVOLVIMENTO E METABOLISMO EMBRIONÁRIO**

**3.1 Desenvolvimento dos anexos embrionários**

O desenvolvimento dos anexos embrionários ou membranas extraembrionárias ocorrem em paralelo ao desenvolvimento do embrião. O saco vitelínico, o âmnio, o córion e o alantoide são fundamentais para o desenvolvimento e sobrevivência do embrião durante a embriogênese, sendo responsáveis pela nutrição, proteção, respiração e armazenamento de metabólitos oriundos do metabolismo embrionário respectivamente. O saco vitelino fornece ao embrião todos os nutrientes essenciais para o seu desenvolvimento, sendo proteínas, lipídeos, carboidratos e sais minerais armazenados na gema durante a formação do ovo para futura utilização pelo embrião (Uni et al., 2011). O saco vitelino é formado em sua maior proporção pelo conteúdo da gema e em pequenas quantidades por proteínas do albúmen. Além disso, o saco vitelínico é um importante local de síntese de células sanguíneas, principalmente os eritrócitos (Yadgary et al., 2014).

A utilização do conteúdo saco vitelínico é dependente do desenvolvimento da membrana do saco vitelino. O início do desenvolvimento do saco vitelínico ocorre nas primeiras horas da incubação, a membrana se desenvolve a partir da região intestinal do embrião envolvendo todo conteúdo da gema. Durante a primeira semana de incubação, a membrana aumenta sua área e recobre a gema e, por volta do décimo dia de desenvolvimento embrionário (10DE), a gema encontra-se totalmente envolta e vascularizada (Figura 1) (Yadgary et al., 2014). A membrana do saco vitelino é recoberta por uma camada de células endoteliais, responsáveis pela transferência dos nutrientes presentes na gema para circulação embrionária (Yadagary et al. 2011).

O transporte de nutrientes oriundos da gema é realizado através de dois mecanismos. O transporte do conteúdo lipídico ocorre por endocitose mediada por receptores de lipoproteínas localizados na membrana das células endoteliais (Hermann et al., 2000). Dentro das células, as lipoproteínas passam por digestão lisossomal, liberando ácidos graxos e glicerol, que então são reesterificados, formando triglicerídeos e exportados para o embrião (Bauer et al., 2013). Por outro lado, moléculas de proteínas e glicose não são passíveis de transporte por endocitose, com isso, as células da membrana vitelina atuam de forma semelhante aos enterócitos, expressando transportadores de nutrientes e enzimas digestivas (Uni et al., 2012). No estudo realizado por Yadgary et al. (2011), foi observado que a membrana do saco vitelino expressa os transportadores de aminoácidos catiônicos (CAT1), de di e tripeptídeos (PepT1), de glicose (SGLT1), de minerais (NPT2b), como também, expressa as enzimas aminopetidase (AP) e isomaltase (SI), mostrando que, além do transporte de nutrientes, a membrana do saco vitelino é um local onde ocorre digestão.

Segundo Yadagary et al. (2014), o saco vitelino desempenha diferentes papéis na tentativa de apoiar ou substituir funções de vários órgãos que ainda não atingiram sua plena capacidade funcional. Assim, atua como o fígado na síntese de proteínas plasmáticas para transporte de triglicerídeos, atua como a medula óssea na síntese de células sanguíneas e como o intestino na digestão e transporte de nutrientes para o embrião.

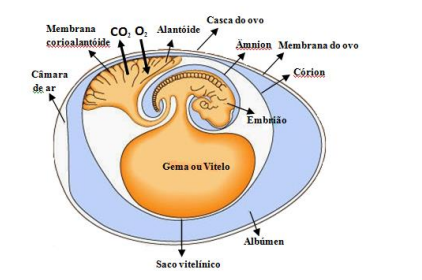


**Figura 1.** Desenvolvimento e vascularização da membrana vitelina (Fonte: University of Kentucky).

Ao final do processo de incubação, em torno do 19DE, o saco vitelino começa a ser internalizado na cavidade abdominal do embrião e ao nascimento o mesmo, corresponde aproximadamente, entre 15 a 20% do peso do pintinho (Yadgary et al., 2010). O saco vitelino é primordial para sobrevivência do pintinho nas primeiras 48 horas, constituindo a única fonte de nutrientes até que o pintinho tenha acesso a alimentação exógena. Além disso, o saco vitelino constitui uma importante via de transferência de anticorpos maternais.

O âmnio é a membrana que envolve o embrião. A camada interna de células do âmnio secretam o fluido amniótico, o qual banha e protege o embrião contra choques mecânicos, térmicos e evita a desidratação. Pouco antes de eclodir (17DE), o embrião ingere o fluido amniótico como fonte de água e nutrientes. O líquido amniótico passa através do trato gastrointestinal e, como nesta fase a capacidade de digestão e absorção dos nutrientes é pouco desenvolvida, a presença do líquido amniótico para o desenvolvimento da mucosa intestinal é fundamental, preparando o embrião para eclosão (De Oliveira, 2007).

O córion é a membrana que envolve todas as estruturas embrionárias e serve como membrana protetora do embrião e das membranas extraembrionárias. O alantóide ou saco alantóide é responsável pelo depósito de substâncias excretadas durante o desenvolvimento embrionário (Cesario, 2013). À medida que o embrião se desenvolve, o alantóide aumenta em tamanho e passa a circundar o saco amniótico, o saco vitelino e o albúmen, atingindo seu volume máximo no 13DE, diminuindo à medida que as células da membrana alantoide iniciam a reabsorção de água, sódio e cloreto (Everaert e Decuypere, 2013). O alantoide, então, funde-se com o córion e se torna a membrana corioalantóide.



**Figura 2.** Anexos embrionários e embrião de galinha (Fonte: Cesario, 2013)

A membrana corioalantóide é responsável pelo transporte de cálcio da casca do ovo para o embrião. A remoção do cálcio ocorre através da fusão da membrana com os poros da casca, fragilizando e reduzindo a espessura da casca, o que facilita sua ruptura durante a eclosão (Cesario, 2013). Além disso, a membrana corioalantóide serve também como órgão respiratório, e desempenha papel importante no equilíbrio ácido-básico no embrião, através da reabsorção de água e eletrólitos da cavidade alantoide (Gabrielli e Accili, 2010).

**3.2 Rotas metabólicas utilizadas pelo embrião**

O metabolismo do embrião das aves é totalmente dependente da disponibilidade dos nutrientes do ovo, e como visto anteriormente o conteúdo de carboidratos no ovo é muito pobre, representando menos de 1% da sua composição total, sendo o ovo rico em lipídeos e proteínas. Assim, as alterações no metabolismo do embrião aviário são decorrentes do tipo de substrato disponível e do suprimento de oxigênio, o qual está diretamente relacionado com o desenvolvimento dos anexos embrionários. Segundo Moran (2007), o metabolismo embrionário pode ser divido em 3 fases: implantação do embrião, finalização do embrião e preparação para eclosão.

O desenvolvimento inicial do embrião é caracterizado pelo baixo suprimento de oxigênio, visto que a membrana corioalantóide encontra-se pouco desenvolvida e as células sanguíneas imaturas. Com isso, a glicose disponível no ovo é o principal substrato energético para o metabolismo inicial do embrião (Moran, 2007). A glicose disponível é utilizada através da via glicolítica ou glicólise, que constitui a via central do metabolismo. Quando o oxigênio é limitado, a glicólise constitui a principal via para produção de energia na forma de adenosina trifosfato (ATP). Ao entrar na via glicolítica a molécula de glicose gera duas moléculas de piruvato. Quando há disponibilidade de oxigênio, as moléculas de piruvato entram no Ciclo de Krebs e são oxidadas liberando ATP e CO2 (Lehninger et al., 2000).

No entanto, devido ao baixo suprimento de oxigênio, o piruvato é convertido a lactato e acumulado dentro das células, até que o suprimento de oxigênio seja restabelecido. Quando o suprimento de oxigênio é restabelecido, o lactato produzido nos diferentes tecidos da ave é exportado para o tecido hepático, onde será reciclado a glicose, através da gliconeogênese (Christensen et al., 2003). Segundo De Oliveira (2007), existem duas fases em que o Ciclo de Cori encontra-se ativo no metabolismo embrionário: na primeira semana, período em que a membrana corioalantóide encontra-se pouco desenvolvida, e durante o processo de eclosão quando o embrião rompe a membrana corioalantóide.

A segunda fase do metabolismo embrionário é caracterizada pelo completo desenvolvimento da membrana corioalantóide, assegurando o suprimento adequado de oxigênio para o desenvolvimento do embrião (Moran, 2007). Nesta fase, o embrião se desenvolve rapidamente, necessitando assim de maior aporte energético (De Oliveira, 2007). Com suprimento adequado de oxigênio, os ácidos graxos armazenados no conteúdo do saco vitelino, na forma de triglicerídeos e fosfolipídios, são extensivamente utilizados, constituindo os principais substratos energéticos durante todo desenvolvimento embrionário (De Oliveira et al., 2008). Durante essa fase é observado brusca redução do conteúdo da gema (65% no dia 13DE e 44% no dia 21DE) (Pulikanti et al., 2010).

Os triglicerídeos e fosfolipídeos oriundos do conteúdo do saco vitelino são transportados por endocitose pelas células endoteliais da membrana do saco vitelino e direcionados ao embrião (Herman et al., 2000). No organismo do embrião, os ácidos graxos liberados a partir das moléculas de triglicerídeos e fosfolipídeos são exportados para os diferentes tecidos e oxidados pelo processo de β-oxidação, liberando moléculas de acetil-CoA (De Oliveira et al., 2008). As moléculas de glicerol formadas pela hidrólise dos triglicerídeos podem ser reaproveitadas na gliconeogênese, contribuindo para formação de glicose (De Oliveira, 2007). As moléculas de acetil-CoA, formadas pela oxidação dos ácidos graxos, seguem através do ciclo de Krebs e são oxidadas, liberando ATP. Durante todo desenvolvimento embrionário, o ciclo de Krebs constitui a principal via de geração de ATP para o crescimento e desenvolvimento do embrião. No entanto, sua funcionalidade é dependente do suprimento de oxigênio e, sendo assim, sua atividade é drasticamente reduzida durante a primeira semana, como também, durante o período que antecede o processo de eclosão (De Oliveira et al., 2008).

Em paralelo à utilização dos ácidos graxos no processo de beta oxidação, outros substratos são utilizados para síntese de glicose através da gliconeogênese. Os principais precursores utilizados na síntese de glicose são o lactato, formado durante a primeira semana de desenvolvimento; o glicerol, gerado pela hidrólise do triglicerídeos da gema, e as proteínas da gema (Foye, 2005). A glicose gerada pela via gliconeogênica é utilizada para formação dos estoques de glicogênio, que serão utilizados durante a última semana de incubação. Segundo Uni et al. (2005), a formação dos estoques de glicogênio no fígado e a glicose gerada pela gliconeogênese são fundamentais para manutenção da homeostase de glicose no período final da incubação. A insuficiente formação de glicogênio forçará o embrião a mobilizar a proteína muscular para geração de glicose, reduzindo o crescimento do embrião no final da incubação (Uni et al., 2005). No décimo sétimo dia de desenvolvimento embrionário (17DE), o embrião ingere líquido amniótico, o que lhe garante substratos para aumentar as reservas de glicogênio (Uni e Ferket, 2004; De Oliveira et al., 2008).

 O período que antecede a eclosão é crítico para o desenvolvimento do embrião. Durante esse período ocorre grandes mudanças no ambiente interno do ovo que provocam alterações no metabolismo embrionário. A redução na disponibilidade de oxigênio, em consequência do rompimento da membrana corioalantóide provocado pela movimentação do embrião, torna o processo de utilização dos ácidos graxos (AGs) menos eficaz. Com isso, os AGs não conseguem mais suprir todas as necessidades energéticas do embrião (Moran, 2007). O metabolismo embrionário é então modificado para atender a demanda energética, sendo o embrião conduzido ao catabolismo anaeróbico da glicose, que é dependente da quantidade de glicose estocada no fígado, rins e no músculo na forma de glicogênio, e da glicose gerada pela via da gliconeogênese a partir de aminoácidos, glicerol e lactato (Uni e Ferket, 2004). Segundo Moran (2007), a gliconeogênese no fígado constitui o principal mecanismo de suprimento de glicose no terço final da incubação.

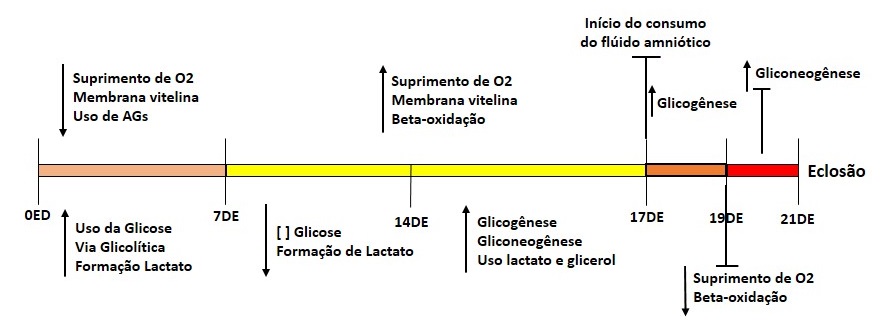
No estudo realizado por De Oliveira et al. (2013) em perus, foi observado que o papel da β-oxidação no suprimento energético do embrião é de fato reduzido no final da incubação; segundo os autores, a partir do 22 DE as enzimas enoil-CoA-hidratase e 3-hidroxiacil-CoA-desidrogenase, responsáveis pelo segundo e terceiro passos da β-oxidação, foram negativamente reguladas. Além disso, o gene da enzima acetil-CoA-acetiltransferase, responsável pela remoção das unidades de acetil-CoA, apresentou redução a partir do 22DE. De igual forma, o gene da enzima lipase lipoproteíca, que faz a hidrólise dos triglicerídeos, liberando os ácidos graxos para β-oxidação, apresentou redução da sua atividade durante este período (De Oliveira et al., 2013).

Em contraste, as vias relacionadas com a homeostase de glicose apresentam aumento nas suas atividades. O metabolismo hepático do glicogênio é fundamental para manutenção do desenvolvimento embrionário nos últimos dias de incubação (Moran, 2007). Segundo De Oliveira et al. (2013), foi observado que o período de 24-26 dias de desenvolvimento embrionário em perus é caracterizado por aumento na expressão da enzima glicogênio sintetase no fígado e no músculo peitoral, promovendo, assim, o aumento nas reservas de glicogênio hepática e muscular. No entanto, ao tempo que se aproxima da eclosão (~28 DE), ocorre redução na atividade da glicogênio sintetase e aumento considerável na atividade da glicogênio fosforilase, responsável pela mobilização do glicogênio de reserva (De Oliveira et al., 2013). A taxa de utilização do glicogênio hepático é superior à utilização do glicogênio estocado no músculo peitoral e no músculo da eclosão (De Oliveira et al., 2013). Isso ocorre porque glicogênio estocado no fígado é distribuído para manutenção da homeostase de glicose em diversos tecidos, ao contrário do glicogênio muscular, que é utilizado apenas para manutenção da demanda do músculo (De Oliveira et al., 2008).

A glicose mobilizada das reservas de glicogênio é rapidamente consumida pelo metabolismo do embrião, através da via glicolítica, formando duas moléculas de piruvato. De fato, De Oliviera et al. (2013) observaram em embriões de peru que as enzimas reguladoras da via glicolítica, hexoquinase, fosfofrutoquinase e piruvato quinase, são reguladas positivamente à medida que o glicogênio é mobilizado. Durante o final do processo de incubação, o piruvato gerado é novamente desviado do Ciclo de Krebs para a síntese de lactato, devido ao baixo suprimento de oxigênio. Em contraste com a regulação positiva das enzimas envolvidas na via glicolítica, a atividade das enzimas (citrato sintase, isocitrato desidrogenase e malato desidrogenase), envolvidas no Ciclo de Krebs, são reguladas negativamente no período final da incubação (De Oliveira et al., 2013). O lactato formado nos diferentes tecidos é exportado para o fígado, onde é convertido a glicose (Ciclo de Cori), isso ocorre quando o suprimento de oxigênio é restaurado (De Oliveira et al., 2008).

À medida que as reservas de glicogênio vão se esgotando, ocorre aumento paralelo da atividade das enzimas glicose 6-fosfatase e a fosfoenolpiruvato carboxiquinase, envolvidas na via da gliconeogênese (De Oliveira et al., 2013). Segundo Uni e Ferket (2004), a gliconeogênese a partir do catabolismo proteico provavelmente constitui a única fonte de glicose para o embrião no final do processo de incubação. O músculo peitoral constitui a principal fonte de aminoácidos, que irá fornecer intermediários para o processo de gliconeogênese (Lu et al., 2007). Como consequência do aumento do catabolismo proteico, o crescimento e o desenvolvimento do pintainho são afetados de forma negativa, levando a redução do peso corporal (Uni & Ferket, 2004).

O fígado sempre foi referido com o principal local de estoque de glicose na forma de glicogênio, como também, de síntese de glicose a partir de substratos não carboidratos pela via gliconeogênica, sendo considerado essencial para manutenção do metabolismo embrionário. No entanto, os estudos realizados por Yadagary e Uni, (2012) constataram que saco vitelino possui maior capacidade de armazenamento de glicose na forma de glicogênio quando comparado ao fígado. Da mesma forma que o tecido hepático, o glicogênio armazenado no saco vitelino é degrado com a proximidade da eclosão; a glicose gerada é então transferida para o embrião e utilizada para manutenção da homeostase de glicose (Yadgary e Uni, 2012).



**Figura 3**. Modificações do metabolismo embrionário de embriões de frangos de corte durante o processo de incubação.

A síntese de glicogênio no saco viltelino ocorre de forma semelhante ao tecido hepático, por volta da metade do processo de incubação (13 – 17 DE), ocorre aumento na expressão do gene da enzima glicogênio sintetase, que coincide com o aumento nos níveis de glicogênio do saco vitelino (Yadgary e Uni, 2012). Além do estoque de glicogênio, foi observado no mesmo estudo que o saco vitelino é importante local de síntese de glicose através da gliconeogênese, atestado pela alta atividade das enzimas regulatórias da via gliconeogênica, especificamente a frutose 1,6 bifosfatase, glicose 6-fosfatase e a fosfoenolpiruvato carboxquinase (Yadgary e Uni, 2012). Acredita-se que o principal intermediário utilizado pela via da gliconeogênese no saco vitelino seja o glicerol resultante da hidrólise dos triglicerídeos e o lactato gerado a partir da glicose liberada pelas reservas de glicogênio do próprio saco vitelino (Yadgary et al., 2013).

Desta forma, é possível que, durante a última semana de desenvolvimento embrionário, o saco vitelino forneça a maioria dos nutrientes para o embrião, em vez do fígado que sempre foi referenciado como principal órgão de gliconeogênese e de síntese de glicogênio. De fato, Uni et al. (2012) afirmaram que o saco vitelino é o principal órgão de síntese de glicose e de armazenamento de glicogênio, sendo capaz de estocar 20 vezes mais glicogênio que o tecido hepático. Além disso, segundo os mesmo autores, a capacidade de transferência de glicose do saco vitelino para o embrião é 10 vezes maior que a capacidade do fígado.

**3.3 Controle hormonal do metabolismo embrionário**

O desenvolvimento do sistema endócrino do embrião tem início nos primeiros dias de desenvolvimento embrionário (3-8 DE), com o aparecimento de células na hipófise, hipotálamo e pâncreas (Sunny, 2008). Segundo Zhou et al. (2007), os principais hormônios envolvidos no controle do metabolismo embrionário são: insulina, glucagon, T3, T4, IGF-I e IGF-II. O desenvolvimento do pâncreas embrionário é fundamental para controle do metabolismo do embrião. Assim como em animais adultos, a insulina e glucagon desempenham papéis fundamentais no controle do metabolismo. A insulina é importante para o controle das concentrações de aminoácidos e glicose no plasma, líquido amniótico e fluido alantoide em embriões de aves (Lu et al., 2007). O glucagon está diretamente relacionado com as necessidades de glicose do embrião; quando os níveis de glicose estão baixos, ocorre aumento na síntese de glucagon, principalmente nos primeiros 10 dias de incubação e durante a última semana antes da eclosão (Lu et al., 2007).  A insulina e o glucagon são hormônios protéicos que atuam de forma antagônica no metabolismo celular, entre as ações da insulina estão incluídas, a promoção da síntese glicogênio, lipídeos e proteínas e inibição de processos catabólicos, glicogenólise, lipólise e proteólise. O principal estímulo para secreção de insulina é o aumento das concentrações de glicose no sangue, como também, de aminoácidos. Enquanto isso, a secreção de glucagon ocorre em resposta a baixos níveis de glicose e os principais efeitos da sua liberação na corrente sanguínea é atuar principalmente sobre o tecido hepático para aumentar as concentrações plasmáticas de glicose, através dos processos de glicogenólise e gliconeogênese.

No trabalho realizado por Lu et al. (2007) foi observado que o nível de glicose no plasma do embrião aumenta a partir de 10 DE e estabiliza-se no início do processo de eclosão (19 DE). O mesmo comportamento é observado para os níveis de insulina no plasma embrionário, aumentando a partir do 10 DE (30 pg/mL) e no 21 DE (717 pg/mL). Provavelmente, o aumento dos níveis de glicose a partir do 10 DE está relacionado com o aproveitamento do lactato gerado durante a primeira semana de desenvolvimento e do glicerol gerado pela hidrólise dos triglicerídeos, ambos utilizados com substrato na gliconeogênese para gerar glicose (Foye, 2005). A manutenção dos níveis altos de glicose até o início do processo de eclosão é decorrente da ingestão do líquido amniótico, que é iniciado por do 17 DE até o 19 DE (Uni e Ferket, 2004).

A resposta ao aumento dos níveis de glicose no plasma do embrião é a liberação de insulina, que promoverá síntese de glicogênio no tecido hepático e muscular. A formação das reservas de glicogênio são fundamentais para o desenvolvimento final do embrião (Moran, 2007). Além disso, a insulina parece ser importante promotor do crescimento do embrião, através da promoção da deposição de proteína muscular, principalmente durante o período de intenso crescimento muscular do embrião, que ocorre por volta da segunda semana de incubação, caracterizada pelo aumento nos níveis de insulina plasmática e utilização do conteúdo de proteínas armazenadas na gema e no albúmen (Lu et al., 2007).

À medida que se aproxima da eclosão, ocorre redução da geração de energia via oxidação dos ácidos graxos, isso ocorre devido ao baixo suprimento de oxigênio, como foi visto anteriormente, o embrião é então forçado a utilizar suas reservas de glicogênio, para manutenção da homeostase de glicose (De Oliveira et al., 2013). Os níveis plasmático de glucagon aumentaram a partir do 15 DE, atingindo nível significativamente maior aos 18 DE, e continua aumentando a medida que se aproximava da eclosão (Lu et al., 2007). Durante o final da incubação, a ação do glucagon é fundamental na promoção da glicogenólise (quebra do glicogênio) e da gliconeogênese a partir da proteína muscular (Christensen et al., 2001).

Os hormônios tireoidianos (tiroxina e triiodotironina) também desempenham funções importantes durante o desenvolvimento do embrião. As funções do T3 e T4 estão relacionadas com regulação da produção de calor, mobilização de reservas de glicogênio, mobilização de gorduras e crescimento muscular do embrião (Christensen et al., 2003). Além disso, os hormônios tireoidianos atuam sobre o desenvolvimento do músculo da eclosão que auxilia o rompimento da casca durante a eclosão (Christensen et al., 2003). No estudo desenvolvido por Lu et al. (2007) observou-se comportamento diferenciado para os níveis de T3 e T4 no plasma de embriões, os níveis de T3 se mantiveram praticamente constantes durante todo o processo de incubação, apresentando súbito aumento na eclosão, o qual prolongou-se durante a primeira semana de vida, já os níveis de T4 foram aumentados a partir do 15 DE e tendeu a aumentar significativamente até atingir um pico aos 19 DE.

O aumento do nível plasmático de T3 na eclosão é relacionado com aumento do suprimento de oxigênio devido ao estabelecimento da respiração pulmonar (Lu et al., 2007). Como é sabido, os hormônios tireoidianos aumentam o consumo de oxigênio tecidual, resultando em maior produção de calor, esse fato pode ser de grande importância para pintainho durante a primeira semana de vida, pois seu sistema termorregulador encontra-se pouco desenvolvido. Os hormônios da tireoide também estimulam o aumento da captação de aminoácidos pelas células do tecido muscular e, como foi observado no estudo de Lu et al. (2007), os níveis de T4 são aumentados no plasma do embrião a partir do de 15 DE, que coincide com um período de rápido desenvolvimento do embrião e maior disponibilidade de aminoácidos pela ingestão do líquido amniótico. Assim, é possível que o T4 promova maior captação de aminoácido durante a fase final para garantir o desenvolvimento do embrião e além disso, é possível que atue de forma sinérgica com o glucagon na promoção da glicogenólise. Segundo Lu et al. (2007), a tiroxina está mais envolvida em contribuir com desenvolvimento do embrião durante a incubação e o T3 apresenta maior participação no período pós-eclosão (Lu et al., 2007).

O papel dos fatores de crescimento semelhante a insulina IGF-I e II na regulação do metabolismo embrionário ainda não foi bem esclarecido. A presença de IGF-I e II foi detectada no fluido amniótico e alantoide dos embriões de frango e é provável que o IGF-I atue na regulação do uso de aminoácidos destes fluidos (Karcher et al., 2005). É possível que os IGF-I e II atuem no embrião promovendo a síntese de glicogênio hepático e síntese proteica (De Oliveira, 2007). Segundo Decuypere e Buyse (2005), o IGF-I atua sobre a células musculares aumentando a captação de aminoácidos e síntese de proteínas e regula de forma negativa a degradação da proteína muscular em frangos de corte. No trabalho realizado por Lu et al. (2007) observou-se que os níveis plasmáticos de IGF-I e de IGF-II aumentaram significativamente a partir 10 DE até o 14 DE, observou-se redução lenta daí até o período de eclosão. Assim, é possível que os IGF’s desempenhem papel crítico na regulação da maturação dos tecidos, influenciando diretamente o crescimento e desenvolvimento do embrião, a partir da metade do processo de incubação.

**3.4 Desenvolvimento intestinal durante a embriogênese**

O trato gastrointestinal se desenvolve ao longo de todo processo de incubação, no entanto, as habilidades funcionais do intestino delgado só se desenvolvem a partir do terço final da incubação, o que é evidenciado por extensas modificações morfológicas, celulares e moleculares (Uni et al., 2003a; Dibner e Richards, 2004). Segundo Uni e Ferket (2004), a capacidade funcional do trato gastrointestinal em embriões de frango de corte começa a se desenvolver quando o fluido amniótico é oralmente consumido em torno 16° - 17º dia de desenvolvimento embrionário (Uni e Ferket, 2004). A ingestão do líquido amniótico constitui a primeira refeição do pintainho, sendo a quantidade e qualidade nutricional do âmnio determinante para transição fisiológica e metabólica do mesmo, preparando-o para as mudanças no período pós-eclosão (Uni et al., 2005). O consumo do líquido amniótico proporciona substratos para síntese de glicogênio, o que é fundamental para o processo de emergência e desenvolvimento do pintainho na fase pós-eclosão (De Oliveira et al., 2008).

No terço final da incubação, o peso do intestino aumenta em velocidade superior ao peso corporal do embrião. O peso do intestino em proporção ao peso do embrião aumenta de 1% aos 17 dias de desenvolvimento embrionário (17DE) para 3,5% no dia da eclosão (Uni et., 2003a). Tais mudanças estão relacionadas com o maior desenvolvimento da mucosa intestinal, com a maior atividade das enzimas da borda em escova, as quais atuam na digestão de dissacarídeos e de dipeptídeos e tripeptídeos, e com a maior expressão dos transportadores intestinais a partir do 16DE, aumentada entre 15 e 40 vezes sua atividade próximo a eclosão (20DE) (Uni et al., 2003a).

A parede intestinal é composta por pregas microscópicas denominadas vilosidades, que proporcionam aumento da superfície interna do órgão e, consequentemente, da área de digestão e absorção. Estas estruturas são constituídas por células caliciformes, enterócitos e células enteroendócrinas, que respondem juntas pelas funções de defesa, digestão e absorção, além da regulação desses processos (Dibner e Richards, 2004). A mucosa intestinal tem crescimento contínuo e é afetada não apenas pelos hormônios metabólicos, mas também por outros fatores relacionados com o alimento, como características físicas e químicas dos nutrientes e microbiota intestinal (Maiorka et al., 2000).

O início das alterações morfológicas na mucosa intestinal tornam-se visíveis a partir do 15 DE, com a presença de vilosidades rudimentares, aos 17 DE podem ser observadas vilosidades em diferentes fases de desenvolvimento com dois principais estágios (V1 e V2), que diferem quanto ao comprimento e forma (Uni et al., 2003a). As vilosidades no estágio V1 são caracterizadas por serem mais longas com formato digitiforme, enquanto que as vilosidade no estágio V2 são curtas e apresentam forma pontiaguda. Aos 17 DE, as vilosidades do tipo V2 encontram-se em maior proporção na mucosa intestinal (65%), mas à medida que se aproxima a eclosão, essa proporção é invertida e as vilosidades do tipo V1 representam a maior parte da mucosa intestinal (Uni et al., 2003a).

O desenvolvimento morfológico da mucosa intestinal de embriões de peru foi estudado por Borhorquez et al. (2011). Foram observadas vilosidades rudimentares no jejuno a partir do 15 DE, as quais apresentavam enterócitos dispersos em sua cobertura, e os enterócitos apresentavam-se recobertos por uma camada microvilosidades esparsas. Aos 19 DE, os enterócitos já recobriam as vilosidades formando uma camada uniforme, da mesma forma se apresentavam os microvilos (Borhorquez et al., 2011). No período de 23–25 DE, foi relatado aumento de duas vezes na altura das vilosidades, período que coincide com a ingestão do líquido aminiótico em embriões de peru (Borhorquez et al., 2011).

Além do desenvolvimento morfológico intestinal, durante o terço final do processo de incubação também é iniciado o desenvolvimento funcional da mucosa intestinal. O transporte de nutrientes entre o lúmen intestinal e o interior do enterócitos é essencial para que haja assimilação dos nutrientes, garantindo o crescimento e desenvolvimento final do embrião. Na membrana da borda em escova, estão localizadas várias enzimas que atuam na hidrólise de peptídeos e sacarídeos, liberando aminoácidos, di e tripeptídeos e monossacarídeos, que em seguida são transportadores para interior do enterócitos através de transportadores específicos (Speier et al., 2012). Os aminoácidos na forma livre são transportados através da mucosa intestinal por um grupo variado de transportes com especificidade por aminoácidos aniônicos, catiônicos e neutros (Hyde et al., 2003). Os di e tripeptídeos através do transportador PepT1 dependente de sódio (Gilbert et al., 2008). O transporte de glicose é realizado através do transportador SGLT-1, também dependente de sódio (Uni et al., 2003a).

Durante a embriogênese a atividade das enzimas da borda em escova é mínima, devido à baixa disponibilidade de nutrientes. No entanto, com a aproximação do período de eclosão a atividade enzimática aumenta, provavelmente devido a ingestão oral do líquido amniótico no terço final do processo de incubação. A presença da enzima isomaltase foi detectada a partir do décimo quinto dia de desenvolvimento embrionário (15DE) em frangos de corte e a atividade das enzimas sacarase e maltase aumentam rapidamente entre os períodos pré-eclosão e dois dias pós-eclosão, com estabilização posteriormente (Uni et al., 2003a). Em perus, a expressão das enzimas isomaltase, sacarase e aminopeptidases foi detectada a partir do 24DE e apresentaram comportamento semelhante a frangos de corte, com aumentos na expressão com a proximidade do processo de eclosão (Foye et al., 2007). A expressão da enzima aminopeptidase *(*AP*)* apresenta padrão semelhante ao transportador de peptídeo, iniciando por volta do 15 DE e aumentando à medida que se aproxima da eclosão (Uni et al., 2003a; Speier et al., 2012). A enzima aminopeptidase é responsável pela digestão dos peptídeos originários da fase luminal da digestão, gerando substratos como di e tripeptídeos e aminoácidos (AA) livres para absorção intestinal.

Além do desenvolvimento funcional da mucosa intestinal, também ocorre o desenvolvimento funcional de glândulas anexas ao trato gastrointestinal. O pâncreas desenvolve a capacidade de secretar enzimas no final do processo de incubação, a atividade das enzimas carboxipeptidase A, quimiotripsina e lipase pancreática aumenta progressivamente a partir do 16DE até a eclosão (Marchaim Kulka, 1967, citado por Uni et al., 2003a). As enzimas amilase e tripsina produzidas pelo pâncreas foram detectadas no dia 18 de desenvolvimento embrionário, apresentando aumento significativo logo após a eclosão, mas o aumento é diferente para cada enzima (Moran et al. 1985, citado por Noy e Sklan, 1997).

A expressão do gene *PepT1* durante o desenvolvimento embrionário de frangos de corte foi detectado a partir do 15 de desenvolvimento embrionário (DE) e aumenta à medida que o embrião se aproxima da eclosão (Speier et al., 2012). Da mesma forma, De Oliveira et al. (2009) observaram que o padrão de expressão de *PepT1* em embriões de peru é semelhante ao de embriões de frangos de corte, com início no 23 DE e aumentos de expressão até a eclosão 28DE. Além disso, foi observado que há padrões de expressão diferenciados entre os segmentos do intestino delgado, sendo expressão de *PepT1* superior no duodeno e em menor proporção no jejuno e íleo (Gilbert et al., 2007). A expressão do transportador de glicose (*SGLT-1*) foi detectada a partir do 15 DE em embriões de frangos de corte, mantendo-se baixa durante o período de 15 – 17 DE e aumentando mais do que três vezes aos 21DE (Uni et al., 2003a).

Embora o desenvolvimento morfológico e funcional do intestino sejam iniciados no período que antecede à eclosão, o maior desenvolvimento ocorre na fase pós-eclosão, quando o pintinho tem acesso à dieta. Durante o período pós-eclosão o crescimento alométrico do intestino é expressivo, em taxas mais rápidas do que peso corporal, como resultado da rápida proliferação e diferenciação dos enterócitos na mucosa intestinal (Geyra et al., 2001). Logo após a eclosão, o pintinho utiliza suas limitadas reservas corporais para garantir o desenvolvimento funcional do trato gastrointestinal, tornando-se capaz de digerir e assimilar os nutrientes, o que é de suma importância para sobrevivência do pintinho. Quanto mais cedo o pintinho for capaz de utilizar os nutrientes da dieta, maior será sua capacidade de expressar seu potencial genético e de resistir a microrganismos patogênicos (Uni e Ferket, 2004).

**4. SALMONELOSES E MICROBIOTA INTESTINAL**

**4.1 Salmoneloses na produção de frangos de corte**

As salmoneloses são enfermidades bacterianas causadas por bactérias do gênero *Salmonella,* consideradas de grande importância para saúde animal e excepcionalmente para saúde humana como uma das principais zoonoses de origem alimentar em todo mundo, sendo os produtos avícolas (ovos e carne) considerados as mais importantes fontes de *Salmonella* para os seres humanos, com isso, medidas que visem conter a prevalência desses microrganismos em aves são constantemente propostas e avaliadas (Crhanova et al., 2011). No entanto, a alta prevalência de *Salmonella* no setor avícola, pode ser associado ao intenso monitoramento dentro do setor, ao longo de toda cadeia produtiva, algo que não é observado em outras cadeias produtivas.

As bactérias do gênero *Salmonella* pertencem à família das *Enterobacteriaceae* e se dividem em três espécies: a *Salmonella* enterica, que contém mais de 2.500 sorovares, *Salmonella* bongori, com 22 sorovares e Salmonella subterrânea que foi descrita como espécie recentemente. A espécie *Salmonella* enterica subdivide-se em seis subespécies, que são capazes de infectar, além do homem, uma grande variedade de animais. Entre os diversos sorovares existentes da espécie *S.* enterica, o sorovar *Salmonella* Enteritidis (SE) está entre os cinco principais associados a infecções alimentares em humanos (Foley et al., 2011).

O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos estima que cerca de 1,2 milhões de americanos são acometidos anualmente com Salmonelose (Scallan et al. 2011). Entre os diversos sorovares existentes da espécie *S. enterica*, o sorovar *Salmonella* Enteritidis (SE) está entre os cinco principais associados a infecções alimentares em humanos (Foley et al., 2011). Segundo os dados Ministério da Saúde do Brasil, de 2000 à 2015 aproximadamente 15% dos surtos de toxinfecções alimentares foram causadas por bactérias do gênero *Salmonella* (MS, 2015)*.*

A epidemiologia da *Salmonella* em aves é complexa devido a diferentes formas de transmissão, pois envolve a transmissão vertical e a horizontal. Na forma vertical de transmissão, ocorre contaminação do tecido reprodutivo na matriz e, durante formação do folículo da gema ou formação do albúmen no oviduto e antes da formação da casca, os ovos férteis são contaminados com a bactéria (Cox et al., 2000). Desses ovos, eclodirão pintinhos infectados. A transmissão horizontal está relacionada com a contaminação do ambiente bem como das rações, sendo que a doença passa entre os animais do plantel (Sterzo et al., 2008).

Os ovos também podem ser contaminados em vários momentos após a formação da casca, como durante a passagem pela cloaca ou pelo contato com as fezes na cama, material de ninho, mãos do tratador, água, bandejas, cama, piso ou em qualquer local contaminado, inclusive nos incubatórios. Essa forma de contaminação é menos agressiva, pois a casca e suas membranas constituem uma barreira física rígida que limita a penetração de bactérias, enquanto o albúmen possui uma série de substâncias antimicrobianas, como lisozima, coalbumina e avidina, que impedem a multiplicação e o deslocamento bacteriano (Cox et al., 2000).

A *Salmonella* invade o organismo da ave através da mucosa intestinal, provocando a ruptura e afastamento das microvilosidades e posteriormente seguindo para a corrente sanguínea, tecido linfático, fígado, baço, medula óssea e tecido reprodutivo. Esta disseminação causa sérias lesões no organismo do animal e prejudica seu desempenho produtivo (Chadfield et al., 2003). A adesão a mucosa intestinal é facilitada pela presença de flagelos e fímbrias ao longo da superfície das células bacterianas (Van Asten e Van Diijk, 2005).

As aves são mais susceptíveis à contaminação por *Salmonella* durante os primeiros dias de vida, quando ainda não apresenta a microbiota intestinal estabelecida, o que favorece a rápida colonização pela bactéria. As populações bacterianas comensais do intestino desempenham importante papel protegendo o hospedeiro da colonização por agentes patogênicos, pois competem pelos sítios de ligação no epitélio e nutrientes disponíveis, como também produzem bacteriocinas, fortalecendo, assim, a resposta imune intestinal (Linden et al., 2008).

Aves jovens possuem o sistema imune intestinal imaturo e por esta razão os agentes patogênicos, tais como *Salmonella e Escherichia coli*, podem multiplicar-se no lúmen intestinal e permanecer por longos períodos, causando prejuízos ao desenvolvimento do sistema imune, danos à mucosa intestinal e, finalmente, baixos parâmetros zootécnicos na fase adulta (Ito et al., 2007). Quando contaminados ainda jovens, os animais podem permanecer infectados até a idade do abate, aumentando o risco de transmissão para humanos.

Durante anos a avicultura industrial fez uso dos antimicrobianos como a principal ferramenta no combate aos agentes patogênicos, o que contribuiu para obtenção de altos índices produtivos. No entanto, o uso de antimicrobianos é cada vez mais restrito no setor, pois o uso indiscriminado destes compostos pode levar ao aparecimento de cepas bacterianas resistentes (Gabriel et al., 2006). Com as proibições impostas pela União Europeia, os países exportadores tiveram que se adequar a tais exigências, assim é cada vez maior a busca por novas tecnologias (prebióticos, probióticos e ácidos orgânicos) que venham a substituir o uso de antimicrobianos na avicultura industrial.

**4.2 Microbiota intestinal e funcionalidade**

A microbiota intestinal nas aves interfere em importantes funções no organismo, estando envolvida no desenvolvimento da competência imunológica, nos processos de utilização e produção de nutrientes, no desenvolvimento estrutural do trato gastrointestinal (Gabriel et al., 2006) e na proteção do hospedeiro, impedindo a colonização de bactérias com potencial patogênico via exclusão competitiva e produção de bacteriocinas (Lan et al., 2005; Chambers e Gong, 2011). A estrutura e função das comunidades microbianas em aves têm recebido especial atenção devido à sua importância para esses processos e de sua relação com segurança alimentar, nutrição e saúde dos animais (Qu et al., 2008).

A microbiota do trato gastrointestinal (TGI) é uma mistura de bactérias, fungos e protozoários, porém as bactérias são os microrganismos predominantes (Gabriel et al., 2006). A colonização do TGI dos pintainhos é iniciada imediatamente após a eclosão e, à medida que o pintainho se desenvolve, a microbiota torna-se diversificada e complexa, até se tornar relativamente estável (Pan e Yu, 2014). Diferente dos mamíferos, em que a principal fonte de microrganismos para os animais recém-nascidos é o canal do parto e contato com os animais adultos, na produção comercial de frangos de corte o pintainho recém-eclodido não tem contato com aves adultas, sendo assim, a microbiota do pintainho é formada principalmente por microrganismos presentes no ambiente do incubatório e criação, como também, por microrganismos oriundos da dieta (Dibner et al., 2008; Polansky et al., 2016).

As populações microbianas são encontradas ao longo de todo trato TGI, e suas composições são alteradas de acordo com as condições locais de cada compartimento (Gong et al., 2007). Além disso, dentro do próprio compartimento existe diferença entre a microbiota do lúmen e a microbiota aderida à mucosa. A microbiota presente no lúmen é influenciada pelos nutrientes disponíveis, pela taxa de trânsito e presença ou ausência de substâncias antimicrobianas, enquanto que, a microbiota aderida a mucosa é dependente dos locais de adesão específico, da taxa de produção de muco e de anticorpos de mucosa e do processo de extrusão das células que compõem a mucosa (Gabriel et al., 2006).

Além dos fatores relacionados as condições do TGI, outros fatores podem influenciar na formação da comunidade microbiana, tais como o ambiente, a alimentação e a manipulação dos animais (Stanley et al., 2013). Além disso, acredita-se que a microbiota comensal é principalmente influenciada pela idade e porção intestinal a qual se localiza (Ranjitkar et al., 2016). O trato gastrointestinal do pintainho é inicialmente colonizado por bactérias gram-negativas pertencentes principalmente à família *Enterobacteriacea* (filo Proteobacteria); na primeira semana de vida a microbiota intestinal passa por diversas transformações e torna-se mais diversa, passando a ser composta por ampla variedade de bactérias gram-positivas, pertences principalmente as famílias *Lachnospiraceae* e *Ruminococcaceae* do filo Firmicutes (Ballou et al., 2016).

Conjuntamente ao efeito da idade, parece haver uma relação direta entre o desenvolvimento da microbiota intestinal e o desenvolvimento do sistema digestivo. Na eclosão, o sistema digestivo das aves está anatomicamente completo, mas sua capacidade funcional de digestão e absorção de nutrientes é limitada (Uni e Ferket, 2004). Sendo assim, o fornecimento de substratos (aminoácidos, glicose e etc.) torna-se restrito, tanto para o pintainho, como para os microrganismos, o que afeta o desenvolvimento de ambos. Os microrganismos competem com o hospedeiro pelos nutrientes disponíveis no lúmen e na camada de muco que recobre a mucosa intestinal, sendo a disponibilidade de nutrientes essencial para o crescimento da microbiota (Lam et al., 2005; Gabriel et al., 2006). À medida que o pintainho se desenvolve, ocorre amadurecimento funcional do TGI e, consequentemente, maior disponibilidade de substratos ou nutrientes, o que favorece o crescimento da microbiota comensal (Pan e Yu, 2014).

A relação entre o desenvolvimento da microbiota e do sistema digestivo ganha maior evidência se levarmos em consideração que a microbiota está estabelecida a partir da segunda semana de vida do pintainho (Pedroso et al., 2005; Gabriel et al., 2006), coincidindo com o desenvolvimento quase que completo da capacidade funcional do trato gastrointestinal (Uni et al., 2003b). Segundo Polansky et al. (2016), a disponibilidade de carboidratos reduzida nos primeiros dias pós-eclosão limita o desenvolvimento de determinadas espécies bacterianas pertencentes a filo Firmicutes, que utilizam principalmente carboidratos para manutenção do metabolismo.

O desenvolvimento do trato gastrointestinal (TGI) propicia o ambiente ideal para o estabelecimento da microbiota intestinal, ao mesmo tempo que, à microbiota desempenha importante papel no desenvolvimento do TGI. Estudos anteriores observaram que animais livres de microrganismos “germ free” apresentam retardo no amadurecimento do intestino delgado e ceco, com redução do peso intestinal e menor desenvolvimento da mucosa (Gabriel et al., 2006). Foi sugerido, que a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) auxilia no crescimento e proliferação dos enterócitos, o que explicaria o efeito estimulante da microbiota sobre o desenvolvimento intestinal (Pam et al., 2014).

A produção de AGCC é decorrente da fermentação anaeróbia dos carboidratos que ocorre na região cecal. A produção cecal de ácidos graxos de cadeia curta (acetato, propionato e butirato) é mínima e quase inexistente nos pintainhos com 1 dia de idade, no entanto, com o estabelecimento da microbiota, por volta da segunda semana (14 d), a produção de AGCC pode atingir altas concentrações e depois permanecem estáveis (Pan e Yu, 2014). Além de auxiliar no controle de bactérias com potencial patogênico, os AGCC são importantes estimuladores do desenvolvimento da mucosa intestinal, contribuindo com a energia para o processo de proliferação das células que compõem a mucosa (Chambers et al., 2011).

As bactérias pertencentes à família *Lachonospiraceae* estão associados a produção de ácido butírico, que tem se mostrado como um excelente modulador da microbiota intestinal, reduzindo o crescimento de bactérias patogênicas (Rinttila e Apajalahti, 2013). A utilização de ácido butírico na dieta de frangos de corte tem se mostrado potente inibidor da colonização de *Salmonella* no trato gastrointestinal, como também, estimulador da mucosa intestinal (Van Immerseel et al., 2005). Dessa forma, a antecipação do estabelecimento dos membros desta família pode garantir vantagens ao pintainho na melhoria saúde da intestinal e no desenvolvimento precoce da mucosa intestinal na fase inicial (Panda et al., 2009).

A atividade das comunidades bacterianas no intestino afeta a utilização dos nutrientes pelo hospedeiro, isso porque, grande parte dos nutrientes utilizados como fonte de energia para o metabolismo microbiano é desviada do processo digestivo do hospedeiro para manutenção da microbiota, tornando indisponível parte da energia que de outra forma seria disponível para crescimento do animal (Lan et al., 2015). Portanto, embora a microbiota intestinal desempenhe importante papel na digestão de componentes da dieta que encontram-se indisponíveis para hospedeiro, a mesma, utiliza-se do processo digestivo do animal para atender sua demanda energética, fortalecendo a relação simbiótica hospedeiro-microbiota.

No contexto de saúde intestinal e sistêmica, a microbiota residente no intestino desempenha importante papel no desenvolvimento do sistema imune intestinal, servindo como estímulo primário ao desenvolvimento da competência imunológica. A presença de uma microbiota “saudável” no intestino mantém o sistema imune intestinal em estado constante de alerta, o que facilita uma resposta mais efetiva quando o mesmo for exposto à presença de microrganismos patogênicos. Além disso, a presença da microbiota reduz a capacidade de crescimento de populações bacterianas com potencial patogênico, através do mecanismo de exclusão competitiva. Entende-se por exclusão competitiva o mecanismo que auxilia na redução ou inibição do crescimento de populações bacterianas patogênicas, através da ocupação física dos sítios de ligação, competição pelos recursos disponíveis (nutrientes) e produção de bacteriocinas. Todos esses fatores evitam o desequilíbrio ecológico e funcional do intestino, causado pelo alojamento de microrganismos patogênicos (Oakley et al., 2014).

Assim, devido à importância da microbiota em diversas funções do organismo animal e a maior preocupação com a segurança de alimentos de origem animal, em decorrência da proibição do uso de antibióticos na produção de frangos. Nos últimos anos, os estudos voltados à compreensão da dinâmica de colonização da microbiota intestinal têm recebido especial atenção por parte de pesquisadores e empresas na tentativa de compreender os principais fatores que influenciam e/ou modulam a microbiota, como forma de encontrar alternativas viáveis que garantam resultados produtivos semelhantes aos que são observados com o uso de antibióticos como promotores de crescimento.

**REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA**

AL-MURRANI, W. Effect of injecting amino acids into the egg on embryonic and subsequent growth in the domestic fowl. **British Poultry Science**, v. 23, p. 171–174, 1982.

AZZAM, M.M.M.; ZOU, X.T.; DONG, X.Y. et al. Effect of supplemental L-threonine on mucin 2 gene expression and intestine mucosal immune and digestive enzymes activities of laying hens in environments with high temperature and humidity. **Poultry Science**, v.90, p.2251-2256, 2011.

BALLOU, A.N.; ALI, R.A.; MENDOZA, M.A. et al. Development of the chick microbiome: How early exposure influences future microbial diversity. **Frontiers in Veterinary Science**, v.3, p.1-12, 2016.

BAUER, R.; PLIESCHNIG, J.A.; FINKES, T. et al. The developing chicken yolk sac acquires nutrient transport competence by an orchestrated differentiation process of its endodermal epithelial cells. **Journal Biological Chemistry**, v. 288, p. 1088–1098, 2013.

BHANJA, S.K.; GOEL, A.; PANDEY, N. et al. *In ovo* carbohydrate supplementation modulates growth and immunity-related genes in broiler chickens. **Journal Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 99, p. 163-173, 2014b.

BHANJA, S.K.; SUDHAGAR M.; GOEL, A. et al. Differential expression of growth and immunity related genes influenced by *in ovo* supplementation of amino acids in broiler chickens. **Journal of Animal Science**, v. 9, p. 399-408, 2014a.

BHANJA, S.K.; SUDHAGAR, M.; GOEL, A. et al. Differential expression of growth and immunity related genes influenced by *in ovo* supplementation of amino acids in broiler chickens. **Journal of Animal Science**, v.9, p.399-408, 2014.

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

CESARIO, M.D. Desenvolvimento embrionário pré e pós-postura – perídos críticos. In: MACARI, M.; GONZALES, E.; PATRÍCIO, I.S. et al. (ed) **Manejo da Incubação**. Jaboticabal: Facta, 2013, p. 48 – 62.

CHADFIELD, M.S.; BROWN, D.J.; AABO, S. et al. Comparison of intestinal invasion and macrophage response of Salmonella Gallinarum and other host-adapted Salmonella enterica serovar in the avian host. **Veterinary Microbiology**, v.20, p.49-64, 2003.

CHAMBERS, J.R.; GONG, J. The intestinal microbiota and its modulation for *Salmonella* control in chickens. **Food Research International**. v.44, p.3149-3159, 2011.

CHAMBERS, J.R.; GONG, J. The intestinal microbiota and its modulation for *Salmonella* control in chickens. **Food Research International**. v.44, p.3149-3159, 2011.

CHELED-SHOVAL, S.L.; AMIT-ROMACH, E.; BARBAKOV, M. et al. The effect of in ovo administration of mannan oligosaccharide on small intestine development during the pre- and posthatch periods in chickens. **Poultry Science**, v. 90, p. 2301-2310, 2011.

CHRISTENSEN, V.L.; GRIMES, J.L.; WINELAND, M.J. et al. Accelerating embryonic growth during incubation following prolonged egg storage. 2. Embryonic growth and metabolism. **Poultry Science**, v. 82, p. 1869 – 1878, 2003.

CHRISTENSEN, V.L.; WINELAND, M.J.; FASENKO, G.M. et al. Egg storage effects of plasma glucose and supply and demand tissue glycogen concentrations of broilers embryos. **Poultry Science**, v. 80, p. 1729-1735, 2001.

CORFIELD, A.P.; CARROLL, D.; MYERSCOUGH, N. et al. Mucins in the gastrointestinal tract in health and disease. **Frontiers in Bioscience**, v.6, p.1321-1357, 2001.

CORZO, A.; KIDD, M.T.; DOZIER III, W.A. et al. Dietary threonine needs for growth and immunity of broilers raised under different litter conditions. **Journal Applied Poultry Research**, v.16, p.574-582, 2007.

COX, N. A.; BERRANGE, M.E.; CASON, J.A. Salmonella penetration of eggs shells and proliferation in broiler hatching eggs. **Poultry Science**, v.79, p.1571-1574, 2000.

CRHANOVA, M.; HRADECKA, H.; FALDYNOVA, M. et al. Immune response of chicken gut to natural colonization by gut microﬂora and to *Salmonella* enterica Serovar Enteritidis infection. **Infection and Immunity**, v.79, p.2755-2763, 2011.

DE OLIVEIRA, J. Effects of in ovo feeding on turkey embryos development, energy status, intestinal maturation, gene expression and post-hatch development. 2007. 316f. **Dissertation** (Phd in Poultry Science) - North Carolina State University, Raleigh.

DE OLIVEIRA, J.E.; DRUYAN, S.; UNI, Z. et al. Metabolic profiling of late-term turkey embryos by microarrays. **Poultry Science**, v. 92, p. 1011 – 1028, 2013.

DE OLIVEIRA, J.E.; UNI, Z.; FERKET, P.R. Important metabolic pathways in poultry embryos prior to hatch. **World’s Poultry Science Journal**, v. 64, p. 488 – 499, 2008.

DECUYPERE, E.; BUYSE, J. Endocrine control of postnatal growth in poultry. **Journal of Poultry Science**, v. 42, p. 1-13, 2005.

DIBNER, J.J.; RICHARDS, J.D. The digestive system: challenges and opportunities. **Journal Applied Poultry Research**, v. 13, p. 86-93, 2004.

DIBNER, J.J.; RICHARDS, J.D.; KNIGHT, C.D. Microbial imprinting in gut development and health. **Journal Applied Poultry Research**. v.17, p.174-188, 2008.

EVERAERT, N.; DECUYPERE, E. Fisiologia do Embrião. In: In: MACARI, M.; GONZALES, E.; PATRÍCIO, I.S. et al. (ed) **Manejo da Incubação**. Jaboticabal: Facta, 2013, p. 31 – 45.

FAURE, M.; CHONE, F.; METTRAUX, C. et al. Threonine utilization for synthesis of acute phase proteins, intestinal proteins, and mucins is increased during sepsis in rats. **The Journal of Nutrition**, v.137, p.1802-1807, 2007.

FAURE, M.; METTRAUX, C.; MOENNOZ, D. et al. Specific amino acids increase mucin synthesis and microbiota in dextran sulfate sodium-treated rats. **The Journal of Nutrition**, v.136, p.1558-1564, 2006.

FAURE, M.; MOENNOZ, D.; MONTIGON, F. et al. Dietary threonine restriction specifically reduces intestinal mucin synthesis in rats. **The Journal of Nutrition**, v.135, p.486-491, 2004.

FOLEY, S.L.; NAYAK, R.; HANNING, I.B. et al. Population dynamics of Salmonella enterica serotypes in commercial egg and poultry production. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, p.4273–4279, 2011.

FOYE, O.T. The biochemical and molecular effects of amnionic nutrient administration, “*in ovo* feeding” on intestinal development and function and carbohydrate metabolism in turkey embryos and poults. 2005. 324f. **Dissertation** (Phd in Poultry Scicence). North Carolina State University. Raleigh.

FOYE, O.T.; ASHWELL, C.; UNI Z. et al. The effects of Intra-Amniotic feeding of Arginine and/or β-hyroxy-β-methylbutyrate on jejunal gene expression in the turkey embryo and hatchling. **International Journal of Poultry Science**, v. 5, p. 437-445, 2009.

FOYE, O.T.; UNI, Z.; FERKET, P.R. Effect of *In Ovo* Feeding Egg White Protein, βHydroxy-β-Methylbutyrate, and Carbohydrates on Glycogen Status and Neonatal Growth of Turkeys. **Poultry Science**, v. 85, 309-317, 2006.

FOYE, O.T.; UNI, Z.; FERKET, P.R. The effects of *in ovo* feeding arginine, beta-hydroxy-beta-methylbutyrate, and protein on jejunal digestive and absorptive activity in embryonic and neonatal turkey poults. **Poultry Science**, v. 86, p. 2343-2349, 2007.

GABRIEL, I.; LESSIRE, M.; MALLET, S. et al. Microflora of the digestive tract: critical factors and consequences for poultry. **World’s Poultry Science Journal**, v.62, p.499-511, 2006.

GABRIELLI, M.G.; ACCILI, D.The chick chorioallantoic membrane: a model of molecular, structural and functional to transepithelial ion transport and barrier function during embryonic development. **Journal of Biomedicine & Biotechonolgy**, p. 1 – 12, 2010.

GEYRA, A; UNI, Z; SKLAN, D. The effect of fasting at different ages on growth and tissue dynamics in the small intestine of the young chick. **British Journal of Nutrition**, v. 86, p. 53 -61, 2001.

GILBERT, E.R.; LI, H.; EMMERSON D.A. et al. Dietary protein quality and feed restriction influence abundance of nutrient transporter mRNA in the small intestine of broiler chicks. **The Journal of Nutrition,** v. 138, p. 262-271, 2008.

GILBERT, E.R.; LI, H.; EMMERSON, D.A. et al. Developmental regulation of nutrient transporter and enzyme mRNA abundance in the small intestine of broiler. **Poultry Science**, v. 86, p. 1739-1753, 2007.

HARGIS, P.; PARDUE, S.; LEE, A. et al. *In ovo* growth hormone alters growth and adipose tissue development of chickens. **Growth Development Aging**, v. 53, p. 93–99, 1989.

HERMAN, M.; MAHON, M.G.; LINDSTEDT, K.A. et al. Lipoprotein receptors in extraembryonic tissues of the chicken. **Journal Biological Chemistry**, v. 275, p. 16837–16844, 2000.

HYDE, R.; TAYLOR, P.M.; HUNDAL, H.S. et al. Amino acids transporters: roles in amino acid sensing and signaling in animal cells. **Biochemical Journal**, v. 373, p. 1-18, 2003.

ITO, N.M.K.; MIYAJI, C.I.; OKABAYASHI, S.M. Saúde intestinal em frangos de corte. **Circular Técnica**: Avigen Brasil, 2007.

KADAM, M.M.; BHANJA, S.K.; MANDAL, A.B. et al. Effect of *in ovo* threonine supplementation on early growth, immunological responses and digestive enzyme activities in broiler chickens. **British Poultry Science**. v.49, p.736-741, 2008.

KARCHER, D.M; MCMURTRY, J.P.; APPLEGATE, T.J. Development changes in amniotic and allantoic fluid insulin-like growth factor (IGF) I and II concentrations of avian embryos. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. A42, p. 404-409, 2005.

KERMANSHAHI, H.; DANESHMAND, A.; KHODAMBASHI, E. et al. Effect of *in ovo* injection of threonine on Mucin2 gene expression and digestive enzyme activity in Japanese quail (Coturnix japonica). **Research in Veterinary Science**. v.10, p.257-262, 2015.

LAN, Y.; VERSTEGEN, M.W.A.; TAMMINGA, S. et al. The role of the commensal gut microbial community in broiler chicken. **World’s Poultry Science Journal**. v.61, p.95-104, 2005.

LAW, G.K.; BERTOLO, R.F.; ADJIRI-AWERE, A. et al. Adequate oral threonine is critical for mucin production and gut function in neonatal piglets. **American Journal Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.292, p.12931301, 2007.

LE BELLEGO, L.; RELANDEAU, C.; VAN CAUWENBERGHE, S. Threonine requirement in pigs - Benefits of L-Threonine supplementation. Ajinomoto Eurolysine. **Technical information,**  v.26, p.1-23, 2002.

LINDEN, S.K.; SUTTON, P.; KARLSSON, N.G. et al. Mucins in the mucosal barrier to infection. **Mucosal Immunology**, v.1, p.183–197, 2008.

LINDEN, S.K.; SUTTON, P.; KARLSSON, N.G. et al. Mucins in the mucosal barrier to infection. **Mucosal Immunology**, v.1, p.183–197, 2008.

LU, J.W.; MCMURTRY, J.P.; COON, C.N. Development changes of plasma insulin, glugacon, insulin-like growth factors, thyroid hormones, and glucose concentrations in chicks embryos and hatched chicks. **Poultry Science**, v. 86, p. 673-683, 2007.

LU, J.W.; MCMURTRY, J.P.; COON, C.N. Development changes of plasma insulin, glugacon, insulin-like growth factors, thyroid hormones, and glucose concentrations in chicks embryos and hatched chicks. **Poultry Science**, v. 86, p. 673-683, 2007.

MAIORKA, A.; SILVA A.V.F.; SANTIN, E. et al. Influência da suplementação de glutamina sobre o desempenho e o desenvolvimento de vilos e criptas do intestino delgado de frangos. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, 2000.

MAO, X.; ZENG, X.; QIAO, S. et al. Specific roles of threonine in intestinal mucosal integrity and barrier function. **Frontiers in Bioscience**, v.E3, p.1192-1200, 2011.

MORAN, E.T. Digestion and absorption of carbohydrates in fowl and events through prenatal development. **The Journal of Nutrition**, v. 115, p. 665- 674, 1985.

MOREIRA FILHO, A.L.B.; OLIVEIRA, C.J.B.; OLIVEIRA, H.B. et al. High incubation temperature and threonine dietary level improve ileum response against post-hatch *Salmonella* Enteritidis inoculation in broiler chickens. **PloSOne**, p.1-13, 2015.

OAKLEY, B.B.; LILLEHOJ, H.S.; KOGUT, M.H. et al. The chicken gastrointestinal microbiome. **Microbiology Letter**, p.1-13, 2014.

OHTA, Y; TSUSHIMA, N.; KOIDE, K. et al. Effect of amino acid injection in broiler breeder eggs on embryonic growth and hatchability of chicks. **Poultry Science**, v. 78, p. 1493–1498, 1999.

PAN, D.; YU, Z. Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet. **Gut Microbes**. v.5, p.108-119, 2014.

PANDA, A.K.; RAMA RAO, S.V.; RAJU, M.V.L.N. et al. Effect of butyric acid on performance, gastrointestinal tract health and carcass characteristics in broiler chicken. **Asian-Austrian Journal Animal Science**, v.22 p.1026-1031, 2009.

PEDROSO, A.A.; MENTEN, J.F.M.; LAMBAIS, M.R. The structure of bacterial community in the intestines of newly hatched chicken. **Journal Applied Poultry Research**, v.14, p.232-237, 2005.

POLANSKY, O.; SEKELOVA, Z.; FALDYNOVA, M. et al. Important metabolic pathways and biological processes expressed by chicken cecal microbiota. **Applied and Environmental Microbiolgy**. v.82, p.1569-1576, 2016.

PULIKANTI, R.; PEEBLES, E.D.; KEIRS, R.W. et al. Pipping muscle and liver metabolic profile changes and relationships in broiler embryos on days 15 and 19 days of incubation. **Poultry Science**, v. 89, 860 – 865, 2010.

QU, A.; BRULC, J.M.; WILSON, M.K. et al. Comparative metagenomics reveals host specific metavirulomes and horizontal gene transfer elements in the chicken cecum microbiome. **PloSOne**. v.3 p.e2945, 2008.

RANJITKAR, S.; LAWLEY, B.; TANNOCK, G. et al. Bacterial sucession in the broiler gastrointestinal tract. **Applied and Environmental Microbiology**. v.82, p.2399-2410, 2016.

RINTTILA, T.; APAJALAHTI, J. Intestinal microbiota and metabolites – Implications for broiler chicken health and performance. **Journal Applied Poultry Research**. v.22, p.647-658, 2013.

SANTOS, E.G.; COSTA, F.G.P.; SILVA, J.H.V. et al. Protective effect of mannan oligosaccharides against early colonization by Salmonella Enteritidis in chicks is improved by higher dietary threonine levels. **Journal of Applied Microbiology**, v.114, p.1158–1165, 2013.

SHARMA, J.; BURMESTER, B. Resistance of Marek’s disease at hatching in chickens vaccinated as embryos with the turkey herpes virus. **Avian Disease**, v. 26, p. 134–149, 1982.

SMIRNOV, A.; TAKO, E.; FERKET, P.R. et al. Mucin gene expression and mucin content in the chicken intestinal goblet cells are affected by *in ovo* feeding of carbohydrates. **Poultry Science**, v. 85, p. 669-673, 2006.

SPEIER, J.S.; YADAGARY, L.; UNI, Z. et al. Gene expression of nutrients transporters and digestive enzymes in the yolk sac membrane and small intestine of the developing embryonic chick. **Poultry Science**, v. 91, p. 1941-1949, 2012.

STANLEY, D.; GEIER, M.S.; HUGHES, R.J. et al. Highly variable microbiota development in the chicken gastrointestinal tract. **PloSOne**. v.8, p.e84290, 2013.

STERZO, E.V.; VARZONE, J.R.M.; FERRARI, R. Salmoneloses aviárias. **Ensaios e Ciências: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v.12, p.129-138, 2008.

SUNNY, N.E. Integrating macronutrient metabolism in developing chicken embryos. 2008. 157f. **Dissertation** (Phd in Physiology). University of Maryland. Maryland.

TAHMASEBI, S.; TOGHYANI M. Effect of arginine and threonine administered *in ovo* on digestive organ developments and subsequent growth performance of broiler chickens. **Animal Physiology and Animal Nutrition**. v.5, p.947-956, 2015.

TAKO, E.; FERKET, P.R.; UNI, Z. Effects of in ovo feeding of carbohydrates and beta-hydroxy-beta methylbutyrate on the development of chicken intestine. **Poultry Science**, v. 83. p. 2023-2028, 2004.

UNI, Z.; FERKET, P.R. Methods for early nutrition and their potential. **World’s Poultry Science Journal**, v. 60, p.101-111, 2004.

UNI, Z.; FERKET, P.R.; TAKO, E. In ovo feeding improves energy status of late-term chicken embryos. **Poultry Science**, v. 84, p. 764-770, 2005.

UNI, Z.; SMIRNOV, A.; SKLAN, D. Pre- and posthatch development of globet cells in the broiler small intestine: effect of delayed access to feed. **Poultry Science**, v. 82, p. 320 -327, 2003b.

UNI, Z.; TAKO, E.; GAL-GARBER, O. et al. Morphological, molecular, and functional changes in the chicken small intestine of the late-term embryo. **Poultry Science**, v. 82, p. 1747 – 1754, 2003a.

UNI, Z.; TAKO, E.; GAL-GARBER, O. Morphological, molecular, and functional changes in the chicken small intestine of the late-term embryo. **Poultry Science**. v.82, p.1747-1754, 2003.

UNI, Z.; YADGARY, L.; YAIR, R. et al. Nutritional limitations during poultry embryonic development. **Journal Applied Poultry Research**, v. 21, p. 175-184, 2012.

UNI, Z; FERKET, PR. Enhancement of development of oviparous species by in ovo feeding. **United States Patent (US6592878B2)**, 2003.

VAN ASTEN, A.J.; VAN DIJK, J.E. Distribution of “classic” virulence factors among Salmonella spp. **Immunology Medical Microbiology**, v.44, p.251–259, 2005.

VAN IMMERSEEL, F.; BOYEN, F.; GANTOIS, L. et al. Supplementation of coated butyric acid in the feed reduces colonization and shedding of *Salmonella* in Poultry. **Poultry Science**, v.84, p.1851-1856, 2005.

YADGARY, L.; CAHANER, A.; KEDAR, O. et al. Yolk sac nutrient composition and fat uptake in late-term embryos in eggs from young and old broiler breeder hens. **Poultry Science**, v. 89, p. 2441 – 2452, 2010.

YADGARY, L.; KEDAR, O.; ADEPEJU, O. et al. Changes in yolk membrane absorptive area and fat digestion during chick embryonic development. Poultry Science, v. 92, p. 1634-1640, 2013.

YADGARY, L.; UNI, Z. Yolk sac carbohydrate levels and gene expression of key gluconeogenic and glycogenic enzymes during chick embryonic development. **Poultry Science**, v. 91, p. 444-453, 2012.

YADGARY, L.; WONG, E.A.; UNI, Z. Temporal transcriptome analysis of the chicken embryo yolk sac. **BMC Genomics**, v. 15, P. 1-15, 2014.

YADGARY, L.; YAIR, R.; UNI, Z. The chick embryo yolk sac membrane expresses nutrient transporter and digestive enzyme genes**. Poultry Science**, v. 90, p. 410 – 416, 2011.

ZAEFARIAN, F.; ZAGHARI, M.; SHIVAZAD, M. The threonine requirements and its effects on growth performance and gut morphology of broiler chicken fed different of protein. **International Journal of Poultry Science**, v.12, p. 12071215, 2008.

ZHOU, H.; EVOCK-CLOVER, C.M.; MCMURTRY, J.P. et al. Genome-wide linkage analysis to identify chromosomal regions affecting phenotypic traits in the chicken. IV. Metabolic traits. **Poultry Science**, v. 86, p. 267-276, 2007.

**CAPÍTULO II**

**Efeito do fornecimento de treonina *in ovo* sobre a morfologia intestinal, expressão gênica ileal e desempenho de frangos de corte de 1 a 21 dias de idade**

**Efeito do fornecimento de treonina *in ovo* sobre a morfologia intestinal, expressão gênica ileal e desempenho de frangos de corte de 1 a 21 dias de idade**

**Resumo:** No presente estudo avaliou-se o efeito da suplementação de treonina *in ovo* sobre a morfologia intestinal, expressão gênica no íleo e o desempenho de frangos de corte no período de 1 a 21 dias de idade. No 17,5 dia de desenvolvimento embrionário 950 ovos férteis foram distribuídos em cinco tratamentos experimentais referentes aos níveis de treonina inoculados, 0,0; 1,75; 3,5; 5,25 e 7,0%. Após a eclosão, os pintainhos foram alimentados com dieta comercial a base de milho e soja. O consumo de ração (CR), o peso final (PF) e a conversão alimentar (CA), foram avaliados durante os períodos de 1 – 7, 1 – 14 e 1 – 21 dias de idade. A expressão ileal de mucina *(MUC2),* do transportador de peptídeo *(PepT1)* e da enzima aminopeptidase *(AP)*, foram avaliadas no dia da eclosão e aos 21 dias de idade, como também, o desenvolvimento morfométrico do intestino. A suplementação de treonina *in ovo* aumentou (p≤0,001) o peso final, o ganho de peso e reduziu a conversão alimentar no período de 1 a 21 dias de idade. Os níveis de treonina afetaram de forma benéfica a altura de vilosidade, a relação vilosidade:cripta e a área de vilosidade. No dia da eclosão todos os níveis de treonina suplementados in ovo aumentaram a expressão de *MUC2*, *PepT1* e *AP*, exceto para expressão de *AP* quando o menor e o maior nível (1,75 e 7,0%) foram semelhante ao tratamento controle. Não foram observados efeitos significativos para expressão dos *MUC2, PepT1* e *AP* quando avaliados aos 21 dias de idade. Em conclusão, a suplementação de treonina *in ovo* afeta de forma benéfica o desenvolvimento morfológico e funcional da mucosa intestinal, o que resulta em melhorias no desempenho no dia da eclosão e aos 21 dias de idade.

**Palavras-chave:** absorção de nutrientes, desenvolvimento embrionário, mucosa intestinal, produção de mucinas

**Effect of *in ovo* feeding of threonine on intestinal morphology, Ileal gene expression and performance of broiler chicken 1 – 21 days age**

**Abstract:** This study assessed the effect of *in ovo* threonine (Thr) supplementation on intestinal morphology, ileal gene expression and performance of broiler chicken between 1 and 21 days age. On day 17.5 of incubation fertile eggs were randomly allotted to ﬁve experimental treatments through injection in the amniotic ﬂuid including: 0,0; 1,75; 3,5; 5,25; 7,0 of threonine (Thr). After hatching, chicks were given a commercial corn–soybean diet up to 21 days of age. Daily feed intake (FI), body weight (BW) and food conversion ratio (FCR) of chicks were measured during different periods 1-7, 1-14 and 1-21 days. The ileal gene expression of mucin (*Muc2*), peptide transporter (*PepT1*) and aminopeptidase enzyme (*AP*) were evaluated on day of hatch and at 21 days of age, as well as the intestinal morphometric traits. *In ovo* threonine supplementation signiﬁcantly increased FI and BW and decreased FCR in the period from 1 to 21 days. Threonine levels affected beneficially the villus height, vilo:crypt ratio and villus area on day of hatch and at 21 days of age. At hatch, all threonine levels increased the expression of *MUC2*, *PepT1* and *AP*, but for *AP* expression when comparing the control group and the lowest and the highest Threonine levels (1.75 and 7%). There was no effect of threonine on the expression of *MUC2*, *PepT1* and *AP* at 21 days of age. In conclusion, supplementation of threonine *in ovo* affected beneficially on the morphological and functional development of the intestinal mucosa, which ensured improved performance of chicks at hatch and at 21 days of age.

**Key words:** embryonic development, intestinal mucosa,mucin production, nutrient absorption

**1.INTRODUÇÃO**

No período que antecede à eclosão, o embrião aumenta sua taxa metabólica preparando-se para o processo de nascimento, o que demanda utilização das suas reservas corporais. No terço final da incubação, os estoques de glicogênio são rapidamente consumidos para fornecer energia necessária para o desenvolvimento final do embrião (Lu et al., 2007). No entanto, a manutenção da reserva de glicogênio é vital para garantir o desenvolvimento dos sistemas imunológico, digestivo, termorregulatório e esquelético no período pós-eclosão (Uni et al., 2003; Dibner et al., 2007).

O período logo após a eclosão é crítico para a vida do pintainho e durante essa fase grandes transformações ocorrem para garantir a sobrevivência do animal. A principal transformação constitui o rápido desenvolvimento do trato gastrintestinal para garantir a assimilação de nutrientes. Além disso, nas primeiras horas pós-nascimento, o acesso à alimentação pode ser atrasado por até 72 horas, dependendo da janela de nascimento e do tempo de transporte até a granja. Sabe-se que a demora para o animal ter acesso à alimentação pode trazer graves consequências.

O atraso no acesso à alimentação prejudica o desenvolvimento da mucosa intestinal e a atividade de enzimas da borda em escova, retardando o amadurecimento intestinal e prejudicando a capacidade funcional do intestino (Uni et al., 2003). Foi demonstrado por Geyra et al. (2001) que o acesso tardio à alimentação reduziu a altura de vilosidades e área de superfície de absorção e promoveu alterações na taxa de migração dos enterócitos. Uni et al. (2003) relataram, ainda, alterações na dinâmica de mucina, o que afeta as funções de absorção e de proteção do intestino delgado. Portanto, o acesso a alimentação logo após à eclosão torna-se essencial para garantir a sobrevivência do pintainho nos primeiros dias de vida.

Com isso, garantir o amadurecimento precoce do trato gastrintestinal (TGI) é de grande importância para o período pós-eclosão, pois o TGI constitui o principal fornecedor de nutrientes e energia, fundamental para o crescimento, desenvolvimento, termorregulação, reposição das reservas de energia e defesa do organismo (Foye et al., 2009). Segundo Uni e Ferket (2004), o fornecimento de nutrientes *in ovo* pode garantir maior amadurecimento do TGI, melhorar a assimilação de nutrientes, reduzir a mortalidade pós-eclosão e estimular a resposta imune intestinal.

A treonina (Thr) está envolvida em importantes funções biológicas como a manutenção, integridade e imunidade de diferentes mucosas e, como consequência, sua exigência pode variar de acordo com a importância de cada função (Azzam et al., 2011; Mao et al., 2011). No trato gastrintestinal, a integridade da mucosa é passo essencial para o processo de digestão e absorção dos nutrientes (Mao et al., 2011). A treonina é amplamente usada na síntese de mucina, o principal componente da camada de muco protetor da mucosa do TGI. O muco atua como uma camada de proteção do epitélio intestinal, prevenindo contra danos e infecção por bactérias patogênicas e como substrato de fixação para bactérias comensais (Linden et al., 2008). Além disso, fornece ambiente adequado para a atividade das enzimas da borda em escova e facilita a absorção de nutrientes (Sminorv et al., 2006).

A suplementação de Thr *in ovo* aumentou a expressão de mucina (*Muc2*) em pintainhos quando comparada à suplementação com outros aminoácidos (Bhanja et al., 2014). O mesmo foi observado em codornas, sugerindo-se que a maior expressão poderia promover maior proteção da mucosa intestinal contra agentes patogênicos (Kermanshahi et al., 2015). Kadam et al. (2008) relataram que a suplementação de 20 e 30 mg de Thr no saco vitelino pode melhorar o crescimento pós-eclosão e atividade das enzimas digestivas em frangos de corte.

Poucos estudos foram realizados para avaliar o potencial da treonina fornecida *in ovo* em promover o amadurecimento precoce do TGI, melhorar a imunidade intestinal e o desempenho de pintainhos na fase pós-eclosão. Objetivou-se com a pesquisa avaliar o efeito dos níveis de treonina *in ovo* sobre as características de desempenho, morfologia intestinal e expressão dos genes intestinais da mucina (*Muc2*), transportador de peptídeo (*Pept1*) e aminopeptidase (*AP*).

**2. MATERIAL E MÉTODOS**

A pesquisa foi conduzida no Poultry Science Nutrition Laboratory, pertencente ao Prestage Department of Poultry Sciences, North Carolina State University (NCSU), Raleigh-NC, EUA. Todas as práticas de manejo, abate e procedimentos de amostragem da presente pesquisa foram aprovadas pelo Institutional Animal Care and Use Committee at North Carolina State University.

***2.1 Incubação e suplementação* in ovo**

Foram utilizados 950 ovos, provenientes de matrizes da linhagem Ross 708 e pertencentes à fazenda experimental da North Carolina State University (NCSU). Os ovos foram distribuídos em 5 tratamentos, sendo 190 ovos por tratamento. Em seguida, foram alojados em incubadora com controle de temperatura e viragem automática. Os ovos foram mantidos em condições normais de incubação com temperatura de 37,7ºC e umidade relativa de 60% com viragem a cada hora até 17 dias de incubação. No décimo primeiro dia de incubação (DE11), procedeu-se à ovoscopia com o objetivo de descartar os embriões mortos, com desenvolvimento atrasado e ovos claros. A suplementação *in ovo* foi realizada no 17,5 dia de desenvolvimento embrionário (17,5DE) de acordo com a metodologia descrita por Uni & Ferket (2003). Todos os ovos foram previamente higienizados com solução de etanol a 70% e perfurados na região da câmara de ar para deposição do inóculo. A solução nutritiva (Tabela 1) (0,6 mL) foi aquecida a 30ºC e depositada no líquido aminiótico utilizando-se seringas de 1 mL e agulha estéreis de 21 G. Após a inoculação, os ovos foram devolvidos para o nascedouros e mantidos à temperatura de 36,7ºC.

**Tabela 1:** Composição química das soluções nutritivas

|  |  |
| --- | --- |
| **Tratamento** | **Composição** |
| Treonina 0.00% | 9 gramas de NaCl/L |
| Treonina 1.75% | 17,5 gramas de treonina/L de solução salina |
| Treonina 3.50% | 35 gramas de treonina/L de solução salina |
| Treonina 5.25% | 52,5 gramas de treonina/L de solução salina |
| Treonina 7.00% | 70 gramas de treonina/L de solução salina |

NaCl: Cloreto de Sódio

***2.2 Variáveis de incubação***

As variáveis avaliadas foram o peso do pinto à eclosão, o percentual de eclodibilidade total (número de pintainhos nascidos como porcentagem do total de ovos incubados), o percentual de eclodibilidade fértil (número de pintainhos nascidos como porcentagem do total de ovos férteis), número de ovos bicados e a mortalidade embrionária através da quebra dos ovos não eclodidos para definir a idade aproximada da morte embrionária.

**2.3 *Eclosão e instalações***

Após a eclosão, os pintainhos (n=260) foram pesados individualmente e distribuídos em delineamento experimental inteiramente ao acaso com 5 tratamentos e 4 repetições de 13 animais por tratamento. Os animais foram alojados em gaiolas de arame galvanizado. As gaiolas foram equipadas com aquecedor elétrico, comedouro e bebedouro recomendados para fase inicial. A dieta experimental foi elaborada a base de farelo de milho e soja para a fase inicial (1-21 dias) seguindo as recomendações do National Research Council (1994). A ração fornecida aos animais foi a mesma para todos os tratamentos experimentais, sendo composta de 23,00% de proteína bruta (PB), 3,200 kcal/kg de energia metabolizável, 1,10% de lisina total, 0,90% de metionina + cistina total e 0,80% de treonina total.

***2.4 Análise histológica***

Nas idades de 1 e 21 dias seis animais por tratamentos foram eutanasiados por deslocamento cervical e amostras de aproximadamente 2 cm da porção medial do jejuno e íleo foram colhidas. As amostras foram lavadas com solução salina 0,9% NaCl e fixadas em formol a 10%. Em seguida, foram desidratadas em série crescentes de álcoois, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Foi então realizada microtomia semi-seriada e os cortes colocados em lâminas, as quais foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) e Alcian Blue e analisadas em microscopia de luz. O estudo morfométrico foi realizado utilizando-se o sistema analisador de imagens AmScope versão 3.7. As variáveis estudadas foram altura de vilosidade, profundidade de cripta, relação vilosidade:cripta, largura do ápice da vilosidade, largura da base da vilosidade e área de vilosidade. A altura de vilosidade foi determinada do ápice até a sua região basal que coincide com a superfície da cripta até seu ápice; a profundidade de cripta foi medida a partir da região de transição vilosidade cripta até sua base; e a largura de vilosidade foi medida no ápice e na base da vilosidade. Para cada animal foram realizadas 10 mensurações, totalizando 60 mensurações por tratamento e para cada variável estudada foi retirada a média das leituras por variável por animal. A partir dos resultados obtidos para altura de vilosidade e profundidade de cripta, procedeu-se o cálculo da relação vilosidade:cripta. A área da vilosidade foi calculada de acordo com a equação descrita por Solos de Los Santos et al. (2005).

((LA+LB)/(AV\*2))

Onde:

LA: largura no ápice da vilosidade

LB: largura na base da vilosidade

AV: altura de vilosidade

***2.5 Extração de RNA e expressão gênica***

No dia da eclosão e aos 21 dias de idade, foram colhidas amostras de mucosa ileal de cinco animais por tratamento. Os tecidos foram imersos em solução de RNA Later (Ambion®) e incubados em temperatura ambiente por 24 horas e posteriormente foram armazenados a -20ºC e permaneceram até o processo de extração ser iniciado. O RNA foi extraído utilizando o kit Qiagen RNeasy®Mini Kit (Cat. n.74106) de acordo com as recomendações do fabricante. A concentração e pureza do material extraído foi avaliado em espectrofotômetro (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Wilmington, DE), utilizando as relações de absorbância de 260/280 e 260/230, para atestar a qualidade do DNA extraído. A síntese do cDNA foi realizada utilizando o kit cDNA High Capacity cDNA Reverse Transcripition (Applied Biosystems), de acordo com as recomendações do fabricante.

# A expressão gênica relativa foi determinada através reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR), utilizando o SYBR Power SYBR® green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Applied Biosystems). Os ciclos da RT-PCR foram realizados no termociclador StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). A expressão relativa foi calculada com base no método 2-ΔΔCt Ct, descrito por Livak e Schmittgen (2001). Os dados de expressão foram normalizados utilizando o gene gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) como gene de referência.

# **Tabela 2.** Sequências dos primers utilizados para amplificação dos genes alvo e gene referência

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| ***Genes*** | ***Sequências*** | ***Origem*** |
| MUC2 F | AAG CCA GTC TCC TTC AGT AA | Beacon Designer |
| MUC2 R | TGG TGT GGG AGC AGT GGT T | Beacon Designer |
| PEPT1 F | CCG CTG AGG AGG ATC ACT GTT | Beacon Designer |
| PEPT1 R | CAA AAG AGC AGC AGC AAT GA | Beacon Designer |
| AP F | TGG AAT GAC CTG TGG TTG AA | Foye et al. (2009) |
| AP R | TCG ATG AAG GGA TCA TTG ATC | Foye et al. (2009) |
| GAPDH F | GGT GAA AGT CGG AGT CAA CGG | Beacon Designer |
| GAPDH R | TCG ATG AAG GGA TCA TTG ATC | Beacon Designer |

F: Forward; R: Reverse; MUC2: mucina 2; PEPT1: transportador de peptídeo; AP: enzima aminopeptidase e GAPDH: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase.

***2.6 Análise de desempenho***

Em todas as fases, avaliaram-se o consumo de ração (CR), o ganho de peso (GP) e a conversão alimentar (CA). O consumo de ração foi calculado pela diferença entre a quantidade de ração fornecida e as sobras, pesadas no início e ao final de cada fase experimental. Para determinação do ganho de peso, as aves foram pesadas no início e ao final de cada fase experimental. A conversão alimentar das aves foi calculada dividindo-se o consumo de ração acumulado pelo ganho de peso no período e ajustando-se os dados pela pesagem das sobras de ração e mortalidade.

***2.7 Análise estatística***

As análises dos dados foram realizadas de acordo com delineamento experimental inteiramente casualizado com cinco tratamentos, correspondendo aos níveis de suplementação de treonina *in ovo* (0; 1,75; 3,50; 5,25 e 7%). Para o estudo morfométrico, considerou-se seis repetições e para os parâmetros avaliadores de desempenho foram consideradas quatro repetições, com 13 animais cada. Os dados foram submetidos a análise de regressão utilizando-se os efeitos lineares e quadráticos, através do programa estatístico SAS. Os dados de expressão gênica foram submetidos à análise de variância e as médias de todos os tratamentos foram contrastadas com o grupo controle, através do teste de Dunnet à 5% de probabilidade. Os dados referentes aos parâmetros de incubação foram analisados por meio do aplicativo Microsoft Excel, empregando-se estatística descritiva simples.

**3. RESULTADOS**

Os percentuais mais elevados de eclodibilidade total e fértil foram observados nos tratamentos com nível de suplementação de 3.5 e 7.0%, enquanto que os piores valores foram observados nos níveis de 0.0 e 1.75% (Tabela 3). É possível observar que houve redução da mortalidade embrionária nos níveis de 3.5 e 7.0% e que maior mortalidade foi encontrado nos embriões suplementados com 0.0%.

**Tabela 3.** Características de incubabilidade de ovos submetidos a suplementação de treonina

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| ***Variáveis*** | ***Níveis de treonina (%)*** | | | | |
| **0,0** | **1,75** | **3,5** | **5,25** | **7.0** |
| Ovos incubados | 190 | 190 | 190 | 190 | 190 |
| Pintainhos nascidos | 94 | 92 | 116 | 104 | 121 |
| Ovos claros | 41 | 48 | 43 | 50 | 31 |
| Eclodibilidade total (%) | 49.47 | 48.42 | 61.05 | 54.74 | 63.68 |
| Eclodibilidade fértil (%) | 63.08 | 64.78 | 78.91 | 74.28 | 81.20 |
| Mortalidade total (%) | 36.92 | 35.22 | 21.09 | 25.72 | 18.8 |

Na tabela 4, estão apresentados os dados referentes ao peso inicial (PI), peso final (PF), ganho de peso (GP), consumo de ração (CR) e conversão alimentar (CA) de frangos de corte para as fases, 1–7, 1–14 e 1–21 dias de idade. Os níveis de suplementação de treonina *in ovo* influenciaram de forma quadrática (p≤0,05) o peso inicial, o peso final e o ganho de peso dos pintainhos na fase de 1–7 dias de idade. O peso inicial máximo estimado (46,82 g/ave), o peso final máximo (158,39 g/ave) e ganho de peso máximo estimado (111,72 g/ave) foram obtidos nos níveis de 5,87; 4,60 e 4,33% de treonina suplementada *in ovo*, representados respectivamente pelas equações Ŷ = -0,0847x2 + 0,9944x + 43,905 (r2= 0,92), Ŷ = -0,4693x2 +4,3249x + 148,43 (r2= 0,78) e Ŷ = -0,3841x2 + 3,3273x + 104,52 (r2= 0,73). Não foram observados efeitos (p>0,05) para as variáveis consumo de ração e conversão alimentar, apresentando médias gerais de 136,14 g/ave e 1,25 respectivamente.

O peso final e ganho de peso dos pintainhos na fase de 1–14 dias de idade foram influenciados de forma linear crescente (p≤0,05) pelos níveis de suplementação de treonina *in ovo*. A cada 1.75% de suplementação, houve aumento de 17,5 g/ave no peso final (Ŷ=459,23 + 10,008x, r2=0,79) e de 16,83 g/ave para o ganho de peso (Ŷ=414,8 + 9,6291x, r2= 0,78). Ademais, houve diminuição de 0,02 na conversão alimentar (Ŷ=1,222 - 0,0131x, r2= 0,57).

**Tabela 4.** Efeito da suplementação de treonina *in ovo* sobre as características de desempenho, peso inicial (g), peso final (g), ganho de peso (g), consumo de ração (g) e conversão alimentar (g/g) de frangos de corte de 1-7, 1-14 e 1-21 dias

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Fases** | **Variáveis** | **Níveis de treonina (%)** | | | | | **ER** | **P** | **CV(%)** |
| 0,00 | 1,75 | 3,50 | 5,25 | 7,00 |
| 1-7 | PI (g) | 43,84 | 45,38 | 46,76 | 46,25 | 46,92 | Q\* | 0,004 | 1,28 |
| PF (g) | 148,26 | 154,01 | 160,47 | 155,21 | 156,76 | Q\* | 0,001 | 1,79 |
| GP (g) | 104,42 | 108,63 | 113,70 | 108,96 | 109,84 | Q\* | 0,003 | 2,38 |
| CR (g) | 132,91 | 135,21 | 136,17 | 137,73 | 138,71 | ns | 0,69 | 6,55 |
| CA (g/g) | 1,27 | 1,25 | 1,20 | 1,25 | 1,26 | ns | 0,33 | 6,50 |
| 1-14 | PI (g) | 43,84 | 45,38 | 46,76 | 46,25 | 46,92 | Q\* | 0,004 | 1,28 |
| PF (g) | 443,37 | 497,96 | 499,04 | 502,04 | 528,9 | L\* | 0,005 | 2,87 |
| GP (g) | 399,52 | 452,58 | 452,28 | 456,17 | 481,98 | L\* | 0,001 | 3,33 |
| CR (g) | 506,36 | 525,38 | 521,58 | 537,59 | 548,38 | ns | 0,35 | 3,07 |
| CA (g) | 1,26 | 1,16 | 1,15 | 1,17 | 1,14 | L\* | 0,008 | 3,12 |
| 1-21 | PI (g) | 43,84 | 45,38 | 46,76 | 46,25 | 46,92 | Q\* | 0,004 | 1,28 |
| PF (g) | 975,42 | 978,63 | 1014,97 | 1007,93 | 1019,10 | L\* | 0,005 | 2,40 |
| GP (g) | 931,58 | 933,25 | 968,21 | 961,68 | 972,18 | L\* | 0,01 | 2,53 |
| CR (g) | 1373,63 | 1337,71 | 1382,17 | 1367,94 | 1374,33 | ns | 0,79 | 2,14 |
| CA (g) | 1,47 | 1,43 | 1,43 | 1,42 | 1,41 | L\* | 0,03 | 2,89 |

Valor de P=significância; L=linear; Q=quadrática; CV=coeficiente de variação

Observou-se comportamento semelhante para a fase de 1-21 dias de idade; as variáveis peso final e ganho de peso foram influenciadas de forma linear crescente e a conversão alimentar foi influenciada de forma linear decrescente (p≤0,05) com a suplementação de treonina durante a embriogênese. A cada 1,75 de suplementação de treonina, houve aumento de 11,66 g/ave no peso final (Ŷ = 975,88 +6,6663x, r2=0,80) e 10,96 g/ave no ganho de peso (Ŷ = 931,45 + 6,2646x, r2= 0,79), e redução de 0,012 na conversão alimentar (Ŷ = 1,458 – 0,0074x, r2= 0,81).

A suplementação de treonina *in ovo* influenciou a expressão dos genes *MUC2*, *PEPT1* e *AP* no dia da eclosão (Tabela 5). A expressão dos genes *MUC2* e *PEPT1* aumentou (p<0,05) em todos os tratamentos em comparação ao grupo controle, exceto para o tratamento com 7.00% de suplementação, cuja expressão foi semelhante à do grupo controle. A expressão de aminopeptidase (AP) foi superior em todos os tratamentos quando comparados com o controle, exceto para os tratamentos 1.75% e 7.0%, os quais foram semelhante ao grupo controle (Figura 1A).

**Tabela 5.** Expressão relativa dos genes de mucina (*Muc2*), transportador de peptídeo (*PepT1*) e aminopeptidase (*AP*) no íleo de frangos de corte suplementados com diferentes níveis de treonina in ovo no dia da eclosão (DOH) e ao 21 dias de idade

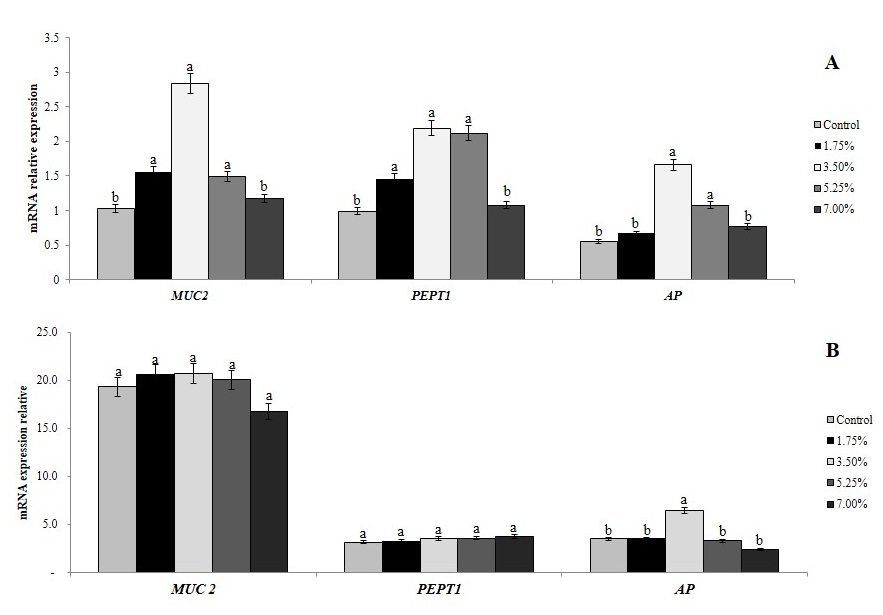
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Genes** | **Níveis de treonina (%) - DOH** | | | | | | | | | | EPM | | Valor P | | CV(%) |
| 0,00 | | 1,75 | | 3,50 | | 5,25 | | 7,00 | |
| *MUC2* | 1,03 b | | 1,56 a | | 2,84 a | | 1,49 a | | 1,18 b | | 0,32 | | 0,001 | | 11,21 |
| *PEPT1* | 0,99 b | | 1,46 a | | 2,19 a | | 2,12 a | | 1,08 b | | 0,25 | | 0,001 | | 8,22 |
| *AP* | 0,55 b | | 0,67 b | | 1,66 a | | 1,08 a | | 0,77 b | | 0,19 | | 0,001 | | 11,17 |
| **Variáveis** | | **Níveis de Treonina (%) – 21 dias** | | | | | | | | | | EPM | | Valor P | CV(%) |
| 0,00 | | 1,75 | | 3,50 | | 5,25 | | 7,00 | |
| *MUC2* | | 19,32 | | 20,59 | | 20,70 | | 20,06 | | 16,80 | | 0,71 | | 0,06 | 11,06 |
| *PEPT1* | | 3,12 | | 3,23 | | 3,53 | | 3,55 | | 3,74 | | 0,11 | | 0,90 | 32,52 |
| *AP* | | 3,46 b | | 3,49 b | | 6,34 a | | 3,27 b | | 2,39 b | | 0,69 | | 0,001 | 20,05 |

EPM=erro padrão da média; P=significância; CV=coeficiente de variação

\*Dados de expressão foram normalizados utilizando o gene GAPDH como gene de referência

a

Não houve efeito (p>0,05) da suplementação de treonina *in ovo* sobre a expressão dos genes *MUC2* e *PEPT1* aos 21 dias de idade (Tabela 5). A expressão do gene *AP* foi maior (p≤0,05) em aves que foram inoculadas in ovo com 3.5% de treonina quando comparadas com o tratamento controle (Figura 1B). Pode-se notar, no entanto, que a variação entre os tratamentos foi menor aos 21 dias do que à eclosão. A expressão gênica aumentou em torno de 5 vezes para o gene MUC2 entre a eclosão e 21 dias de idade.

****

**Figura 1.** Expressão gênica de mucina (*MUC2*), transportador de peptídeo (*PEPT1*) e aminopeptidase da borda escova (*AP*) de pintainhos de corte no dia da eclosão (A) e aos 21 dias de idade (B) suplementados com diferentes níveis de treonina *in ovo*.

A altura de vilosidade, a profundidade de cripta e a relação vilo:cripta no jejuno no dia da eclosão foram influenciados de forma quadrática (p<0,05) com a suplementação de treonina *in ovo*. A maior altura de vilosidade (357,92 µm), a menor profundidade de cripta (44,44 µm) e a maior relação vilo:cripta (7,58 µm) foram estimadas para os níveis 6,46, 3,81 e 4,66% de suplementação de treonina *in ovo*, representados respectivamente pelas equações, Ŷ = -2,9248x2 + 37,8x + 235,8 (r2= 0,93), Ŷ = 0,557x2 – 4,3969x + 52,82 (r2= 0,52) e Ŷ = -0,1269x2 + 1,1704x + 4,8869 (r2=0,73).

**Tabela 6.** Efeito da suplementação de treonina *in ovo* sobre a altura de vilosidade (AV), profundidade de cripta (PC), relação vilo:cripta (V:C) e área de vilosidade de pintainhos de corte à eclosão

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| ***Variáveis***  ***(Jejuno)*** | ***Níveis de treonina (%)*** | | | | | CV% | ER | P |
| 0 | 1,75 | 3,50 | 5,25 | 7,00 |
| AV (µm*)* | 230,47 | 300,09 | 343,00 | 332,25 | 366,00 | 8,34 | Q\* | 0,004 |
| PC (µm*)* | 54,02 | 45,32 | 42,04 | 50,50 | 48,30 | 9,59 | Q\* | 0,001 |
| V:C (µm:µm*)* | 4,66 | 6,81 | 8,00 | 6,51 | 7,28 | 10,55 | Q\* | 0,001 |
| Área (mm2) | 0,010 | 0,015 | 0,013 | 0,023 | 0,020 | 25,60 | ns | 0,54 |
|  | ***Íleo*** | | | | |  |  |  |
| AV (µm*)* | 163,57 | 229,10 | 237,89 | 230,80 | 260,40 | 8,53 | Q\* | 0,005 |
| PC (µm*)* | 47,44 | 37,20 | 46,47 | 55,18 | 54,17 | 11,37 | ns | 0,20 |
| V:C (µm:µm*)* | 3,44 | 6,22 | 5,53 | 4,42 | 4,76 | 9,31 | ns | 0,06 |
| Área (mm2) | 0,007 | 0,011 | 0,012 | 0,011 | 0,012 | 9,56 | Q\* | 0,001 |

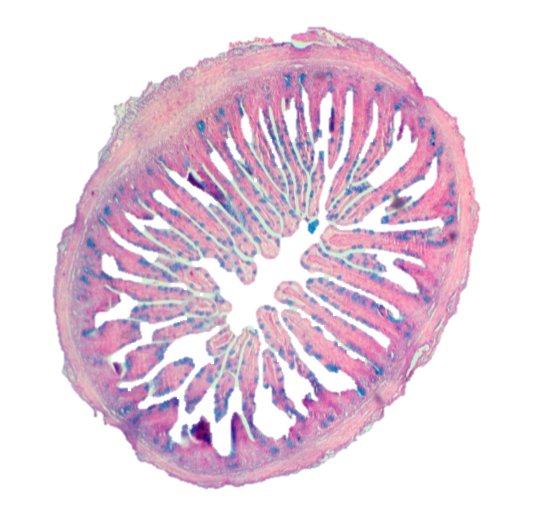
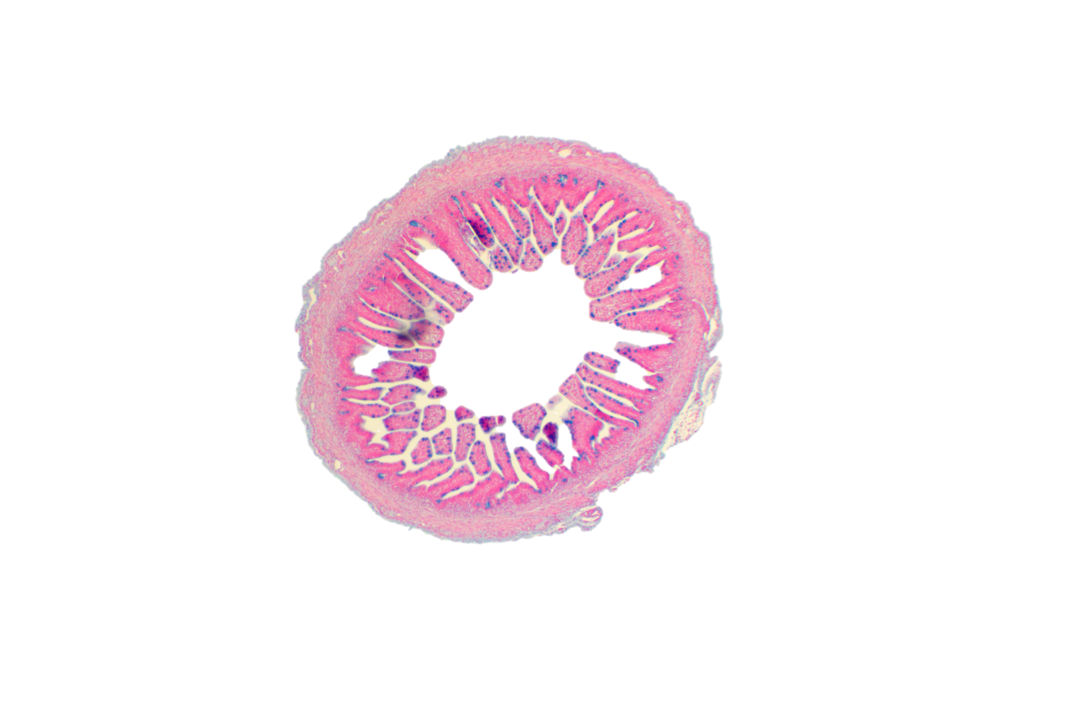
CV= coeficiente de variação; ER= equação de regressão; P= significância

No íleo, observou-se efeito quadrático (p≤0,05) para as variáveis altura de vilosidade e área de vilosidade. A maior altura de vilosidade (252,1µm) e a maior área de vilosidade (0,0122) foram estimadas para os níveis de 6,23 e 4,75% de suplementação de treonina, representados respectivamente pelas equações Ŷ = -2,0464x2 + 25,488x + 172,75 (r2= 0.83) e Ŷ = -0,0002x2 + 0,0019x + 0,0075 (r2= 0.84).

Na figura 2, estão apresentadas fotomicrografias de vilosidades do jejuno, observamos que o tratamento com 7% (Fig. 2B) de suplementação de treonina *in ovo* apresentou maior desenvolvimento das vilosidade intestinais e maior proporção de células caliciformes (coradas em azul), quando comparado com o tratamento controle 0% de treonina (Fig. 2A).

**B**

**A**



**Figura 2.** Fotomicrografias de vilosidades do jejuno de frangos de corte no dia eclosão, suplementados com treonina *in ovo*. (A) controle (0,0%), (B) 7,0%*.*

Na tabela 7, estão apresentados os dados de altura de vilosidade, profundidade de cripta, relação vilo:cripta e área de vilosidade aos 21 dias de idade de frangos de corte suplementados com treonina *in ovo*. A altura de vilosidade, relação vilo:cripta e área de vilosidade no jejuno foram influenciadas de forma linear crescente (p≤0,05). Observou-se que, a cada 1,75% de suplementação, houve aumento de 60,20 µm na altura de vilosidade (Ŷ = 1365,2 + 34,402x, r2= 0,90), de 1,35 µm na relação vilo:cripta (Ŷ = 9,206 + 0,7737x, r2= 0,84) e de 0,023 mm2 na área de vilosidade (Ŷ = 0,1968 + 0,0133x, r2= 0,72). A variável profundidade de cripta foi influenciada de forma quadrática (p>0,05) pelos níveis de treonina. A menor profundidade de cripta (44,50 µm) foi estimada para o nível de 3,81% de suplementação, representado pela equação Ŷ = 0,577x2 -4,4969x + 52,822 (r2= 0,55).

**Tabela 7.** Efeito da suplementação de treonina *in ovo* sobre a altura de vilosidade (AV), profundidade de cripta (PC), relação vilo:cripta (V:C) e área de vilosidade de frangos de corte aos 21 dias de idade

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| ***Variáveis***  ***(Jejuno)*** | ***Níveis de treonina (%)*** | | | | | CV% | ER | P |
| 0.0 | 1.75 | 3.50 | 5.25 | 7.00 |
| AV (µm*)* | 1326.77 | 1468.76 | 1504.88 | 1530.89 | 1596.72 | 4.25 | L\* | 0.05 |
| PC (µm*)* | 123.06 | 155.20 | 131.53 | 107.48 | 115.81 | 7.88 | Q\* | 0.001 |
| V:C (µm:µm*)* | 9.84 | 9.58 | 11.46 | 14.58 | 14.11 | 6.32 | L\* | 0.001 |
| Área (mm2) | 0.179 | 0.254 | 0.222 | 0.278 | 0.283 | 11.86 | L\* | 0.05 |
|  | ***Íleo*** | | | | |  |  |  |
| AV (µm*)* | 652.58 | 656.03 | 684.38 | 710.84 | 840.72 | 4.96 | L\* | 0.004 |
| PC (µm*)* | 106.70 | 108.63 | 105.69 | 107.86 | 114.16 | 4.93 | Ns | 0.96 |
| V:C (µm:µm*)* | 6.20 | 6.06 | 6.54 | 7.39 | 7.97 | 5.60 | L\* | 0.003 |
| Área (mm2) | 0.092 | 0.107 | 0.119 | 0.118 | 0.148 | 5.10 | Q\* | 0.003 |

CV= coeficiente de variação; ER= equação de regressão; P= significância

No íleo, os níveis de treonina suplementados *in ovo* influenciaram de forma linear crescente (p<0,05) a altura de vilosidade e a relação vilo:cripta. A suplementação de treonina promoveu um aumento de 43,10 µm na altura de vilosidade (Ŷ = 622,69 + 24,634x, r2= 0,78) e de 0,49 µm na relação vilo:cripta a cada 1,75 de treonina suplementada (Ŷ = 5,858 + 0,2783x, r2= 0,88). A área de vilosidade foi influenciada de forma quadrática (p<0,05); a maior área de vilosidade (0,129 mm2) foi estimada para o nível de 5,37% de treonina *in ovo*, de acordo com a equação Ŷ = 0,0004x2 + 0,0043x +0,0946 (r2= 0,91).

**4. DISCUSSÃO**

Os resultados deste estudo indicaram que suplementação de treonina (Thr) *in ovo* foi benéfica, aumentando a taxa de eclosão e reduzindo a mortalidade embrionária. O processo de eclosão tem um custo energético elevado para o embrião, e muitas vezes ocorre déficit energético, o que reduz a taxa de eclosão, aumentando a mortalidade embrionária. Durante o período que antecede a eclosão, as reservas de glicogênio hepática e do músculo peitoral são esgotadas, devido à intensa atividade muscular, exercida pelos músculos envolvidos no processo de eclosão (Foye et al., 2006). Segundo Shafey et al. (2011), o empobrecimento das reservas de glicogênio no final do processo de eclosão pode resultar em aumento da mortalidade embrionária e eclosão de pintainhos fracos. Além disso, Uni e Ferket (2003) relataram em seus estudos que as taxas de eclodibilidade foram positivamente correlacionadas com o conteúdo de glicogênio no fígado de embriões de peru no período que antecede a eclosão.

Em diversos estudos realizados por Uni e Ferket (2004), foi demonstrado que a suplementação de nutrientes *in ovo* é benéfica na manutenção das reservas de glicogênio, garantindo ao pintainho na fase pós-eclosão o uso mais eficiente dos nutrientes, redução da mortalidade, melhoria da resposta imune, redução da incidência de distúrbios esqueléticos, maior desenvolvimento muscular e melhorias no desempenho durante o ciclo produtivo. Kornasio et al. (2011) observaram aumentos significativos nas reservas de glicogênio hepática e do músculo peitoral 24 horas após a suplementação do composto β-hidrox β-metilbutirato em embriões de frangos. Da mesma forma, Shafey et al. (2011) observaram que suplementação de diferentes níveis de carboidratos *in ovo* asseguram a manutenção da reserva de glicogênio hepático no período logo após a eclosão em pintainhos.

Estudos realizados por Kadam et al. (2008) e Tehmasebi et al. (2015) não observaram quaisquer efeitos da suplementação de treonina *in ovo* sobre a taxa de eclosão. Além de fatores relacionados com a manutenção das reservas de glicogênio, a taxa de eclosão pode ser igualmente afetada por fatores relacionados com a técnica da nutrição *in ovo*, tais como o volume do inóculo, o local da inoculação, a idade de administração do inóculo, a manuseio dos ovos durante a inoculação, a temperatura do inóculo e a concentração da solução a ser inoculada. Todos esses fatores fazem com que haja uma grande variação nos resultados, principalmente quando se trata de taxa de eclosão.

Além dos efeitos benéficos sobre a taxa de eclosão e redução da mortalidade embrionária, a suplementação de Thr *in ovo* proporcionou melhorias no peso inicial, como também, nos parâmetros de desempenho nos períodos de 1-7, 1-14 e 1-21 dias de idade. Todos os níveis de suplementação apresentaram pesos iniciais superiores ao grupo controle (0%). O nível de suplementação de 7% de treonina proporcionou incremento de 7,02% no peso inicial do pintainho quando comparado ao grupo controle. O peso final e ganho de peso apresentaram crescimento linear, e a conversão alimentar se comportou de maneira linear decrescente para os níveis de suplementação de treonina *in ovo* nas fases 1-14 e 1-21 dias. Estudos realizados por Uni e Ferket (2004) revelaram que a suplementação *in ovo* de soluções contendo carboidratos e proteínas promoveram aumentos no peso do pintainho de 3% a 7%, que foi mantido até 35 dias de idade.

Resultados semelhantes aos nossos foram apresentados no estudo de Kadam et al. (2008), que observaram maior ganho de peso nos períodos de 14-21 e 21-28 dias para animais suplementados com Thr *in ovo*. Da mesma forma, foram observadas melhorias na conversão alimentar com o aumento dos níveis de Thr *in ovo* (Kadam et al., 2008). Tahmasebi et al. (2015) observaram em seus estudos que os animais suplementados com Thr *in ovo* apresentaram maior consumo de ração durante todo período experimental, o que refletiu em maior peso ao final do ciclo produtivo (42 dias). A suplementação de Thr melhorou também o rendimento de carcaça da eclosão até os 11 dias de idade, mas o efeito não persistiu até a idade de abate (Tahmasebi et al., 2015).

O melhor desempenho apresentado pelos animais suplementados *in ovo* provavelmente envolve alterações no metabolismo durante o desenvolvimento embrionário. Como abordado anteriormente, no terço final da incubação, as reservas de glicogênio são rapidamente mobilizadas para suportar o rápido desenvolvimento do embrião e para garantir o processo de eclosão. Diante disto, o metabolismo do embrião é alterado para garantir o suprimento energético. Durante a formação final do embrião, o processo de β-oxidação a partir dos lipídeos da gema é restrito, devido ao baixo suprimento de oxigênio, o que reduz o suprimento energético do embrião (De Oliveira et al., 2008). Segundo Uni e Ferket (2004), a gliconeogênese, a partir do catabolismo proteico, provavelmente constitui a única fonte de glicose para o embrião. O músculo peitoral constitui a principal fonte de aminoácidos, que irá fornecer intermediários para o processo de gliconeogênese (Lu et al., 2007). Como consequência do aumento do catabolismo proteico, o crescimento e o desenvolvimento do pintainho são afetados de forma negativa, levando à redução do peso corporal (Uni & Ferket, 2004).

Assim, fica demonstrado que a manutenção da homeostase de glicose no terço final da incubação é dependente da quantidade de glicose armazenada na forma de glicogênio no tecido hepático, e da capacidade de gerar glicose a partir do catabolismo proteico por meio da gliconeogênese. Portanto, o esgotamento das reservas de glicogênio forçar o embrião a mobilizar aminoácidos do tecido muscular para serem utilizados como substratos no processo de gliconegênese, restringindo o crescimento e o desenvolvimento do embrião (Uni et al., 2005).

Com isso, é possível que o fornecimento de treonina no terço final da incubação tenha amparado o suprimento de aminoácido para serem utilizados na gliconeogênese, reduzindo desta forma, a depleção da proteína muscular e, como consequência, houve a melhoria no peso do pintainho na eclosão, ocasionando melhorias durante todo ciclo produtivo. Kadam et al. (2013) afirmam que a suplementação de treonina *in ovo* reduz a mobilização de proteína muscular e favorece a síntese proteica.

Outro fator determinante para melhoria do desempenho apresentada pelos pintainhos suplementados com treonina *in ovo,* consiste no amadurecimento precoce do trato gastrintestinal. Segundo Uni & Ferket (2004), ao injetar nutrientes no líquido amniótico, o embrião naturalmente vai consumi-los antes da eclosão e consequentemente haverá estímulo para maior desenvolvimento do trato gastrointestinal e melhoria da capacidade do embrião em digerir e assimilar os nutrientes na fase pós-eclosão. Sabe-se que a treonina tem importante envolvimento com o desenvolvimento intestinal e com a manutenção da integridade da mucosa intestinal (Moreira Filho et al., 2015). Em nosso estudo, os animais suplementados apresentaram desenvolvimento superior da mucosa intestinal em relação ao grupo controle no dia da eclosão. A suplementação de treonina promoveu aumento da altura de vilosidade e relação vilo:cripta no jejuno e, no íleo, aumentou altura de vilosidade e a área de vilosidade. No presente estudo, o efeito da treonina sobre o desenvolvimento intestinal tornou-se mais pronunciado aos 21 dias de idade, quando foi observado efeitos lineares crescentes para altura de vilosidade, relação vilo:cripta e área de vilosidade no jejuno e para altura de vilosidade e relação vilo:cripta no íleo.

O amadurecimento precoce o TGI observado nos animais suplementados com treonina *in ovo* pode ter garantido aos pintainhos melhor aproveitamento dos nutrientes, resultando em melhorias no desempenho durante todo período experimental. Quanto mais cedo a capacidade funcional do trato gastrointestinal é atingida, o pintainho pode utilizar de maneira mais eficiente os nutrientes da dieta, resultando em melhorias no desempenho produtivo (Uni et al., 2006). Tal fato torna-se mais importante se levarmos em consideração a primeira semana pós eclosão, período em que o pintainho passa por diversas transformações, havendo, assim, alto requerimento energético para garantir o rápido desenvolvimento do TGI e do sistema imune, a termorregulação e desenvolvimento corporal intenso (Uni et al., 2003; Uni e Ferket, 2004). No trabalho realizado por Tako et al. (2004), foi observado que o desenvolvimento intestinal de pintainhos suplementados *in ovo* foi semelhante ao de um pintainho com dois dias de idade.

Os efeitos benéficos da suplementação de treonina *in ovo* sobre o desenvolvimento intestinal também foram evidenciados em outros estudos. Kadam et al. (2008), trabalhando com suplementação de níveis de treonina *in ovo*,observaram aumento na atividade da pepsina no pro-ventrículo e da amilase no pâncreas.  No mesmo estudo, os autores atribuíram o maior consumo de ração dos pintainhos suplementados com treonina ao maior desenvolvimento funcional do TGI. Tahmasebi et al. (2015) observaram que a suplementação de treonina e arginina *in ovo* promoveu aumento no comprimento do jejuno e íleo e maior altura de vilosidade no íleo, quando comparados ao grupo não suplementado.

De acordo com Mao et al. (2011), a treonina é fundamental para garantir a manutenção da integridade da mucosa intestinal, o que é essencial para o processo de digestão e absorção dos nutrientes. Segundo. Le Bellego et al. (2002), aproximadamente 50% da treonina fornecida na dieta fica retida ao nível intestinal, sendo utilizada principalmente para síntese de mucinas. A mucina é o principal componente da camada de muco protetor, que atua como uma camada de proteção do epitélio intestinal prevenindo contra os danos e infecção por bactérias patogênicas e como substrato de fixação para bactérias comensais (Linden et al., 2008). Além disso, a camada de muco pode influenciar os processos de digestão e absorção de nutrientes (Bhanja et al., 2014), como também, o estabelecimento de populações microbianas comensais (Faure et al., 2006). A produção de mucina está intimamente relacionada aos níveis de treonina na dieta, portanto, níveis dietéticos elevados de treonina aparentemente podem auxiliar na proteção do epitélio intestinal (Santos et al., 2013).

Estudos anteriores demonstraram que a suplementação de treonina *in ovo* foi benéfica sobre a síntese de mucinas no intestino. Bhanja et al. (2014) observaram que o uso da treonina *in ovo*, regulou de forma positiva a expressão do gene *Muc2*, como também, de outros genes envolvidos com a resposta imune intestinal *(IL-4, IL-6 e TNF-α*). Kermanshari et al. (2015) observaram que a suplementação de treonina para embriões de codornas proporcionou aumentos da expressão de *Muc2* na eclosão e aos 10 dias de idade. Em nosso estudo, observamos que suplementação de treonina aumentou a expressão de *Muc2* em todos os níveis de suplementação, exceto para o nível de 7%, em relação ao tratamento controle. É necessário ressaltar que aparentemente ocorre aumento crescente na expressão de mucina até a suplementação com 3,5%, ocorrendo declínio na expressão após este nível, com menor expressão em nível de 7% de Thr que teve comportamento semelhante ao grupo controle.

No estudo realizado por Wang et al. (2007), observou-se que tanto a escassez como excesso de treonina reduzem a síntese de mucinas no jejuno de leitões jovens; no entanto, apenas a deficiência de treonina ocasionou prejuízos ao desempenho dos leitões pós-desmame. Curiosamente, em nosso estudo observou-se o mesmo comportamento; a expressão de mucina foi menor quando a treonina não foi suplementada ou foi suplementada no nível máximo (7%). No entanto, o nível de 7% garantiu os melhores resultados de desempenho. É sabido que, em determinadas situações, os níveis dietéticos recomendados de treonina limita a síntese de mucinas intestinais (Faure et al., 2005; Law et al., 2007; Azzam et al., 2011; Moreira Filho et al., 2015) prejudicando a barreira de proteção da mucosa. No entanto, pouco se sabe do efeito de altos níveis de treonina sobre a regulação negativa da síntese de mucinas. Wang et al. (2007) acreditam que o fornecimento em excesso de treonina resulta em desequilíbrio de aminoácidos no lúmen intestinal e alterações na absorção de outros aminoácidos, o que acarreta no comprometimento da síntese de mucinas.

A camada de muco é vital para proteção do pintainho, principalmente nas primeiras horas pós-eclosão. À eclosão, o pintainho torna-se exposto a diversos tipos de microrganimos e seus mecanismos de defesa encontram-se pouco desenvolvidos, tornando o intestino um nicho ecológico de fácil colonização, tanto para microflora comensal, como para microrganismos patogênicos. Com isso, o aumento na síntese de *Muc2* no período logo após a eclosão é benéfica, podendo promover melhorias na resposta imune na fase pós-eclosão. Entretanto, o efeito benéfico da suplementação de treonina *in ovo* sobre a expressão de mucina não foi observado, quando avaliado aos 21 dias de idade, não havendo diferenças entre os tratamentos e o grupo controle. É possível que o efeito da suplementação *in ovo* sobre a expressão de *Muc2* esteja restrito à fase logo após a eclosão, e que o acesso à dieta com os níveis adequadas de treonina para todos os tratamentos garanta proporcionalidade na produção de mucinas em ambos os tratamentos.

O desenvolvimento e integridade da mucosa intestinal não se refere apenas ao desenvolvimento morfométrico; ele também é relacionado à funcionalidade dos transportadores de nutrientes e enzimas digestivas, responsáveis pela digestão e absorção de nutrientes. Com o intuito de avaliarmos o efeito da treonina *in ovo* sobre o desenvolvimento funcional do TGI, foram medidas a expressão dos genes do transportador de peptídeo *(PepT1*) e da enzima aminopeptidase (*AP*) no íleo dos pintainhos.

No presente estudo, os aumentos nas expressões dos genes *PepT1* e *AP* demonstram que a suplementação de treonina atuou de forma benéfica tanto no desenvolvimento morfológico, como também, o desenvolvimento funcional do TGI. Foye et al. (2009) observaram que o fornecimento de arginina e β-hidrox β-metilbutirato regulou positivamente a expressão de *AP* e *PepT1* no dia da eclosão.

O transportador de peptídeo dependente de hidrogênio (H+) é a proteína transportadora responsável pelo transporte das moléculas de di e tri peptídeos liberadas após o processo de digestão do conteúdo proteico. O perfil de expressão do *PepT1* durante o desenvolvimento embrionário de frangos de corte foi detectado a partir do 15° dia de desenvolvimento embrionário (DE) e aumenta à medida que o embrião se aproxima da eclosão (Spieir et al., 2012). Da mesma forma, Oliveira et al. (2009), estudando a expressão de *PepT1* em embrião de peru, observaram o padrão de expressão semelhante ao de embriões de frangos de corte, com início no 23 DE e aumentos de expressão até a eclosão 28DE (eclosão). Além disso, foi observado que há padrões de expressão diferenciada entre os segmentos do intestino delgado, sendo expressão de PepT1 superior no duodeno e em menor proporção no jejuno e íleo (Gilbert et al., 2007). A expressão de AP apresenta padrão de expressão semelhante ao transportador de peptídeo, iniciando por volta do 15 DE e aumentando a expressão à medida que se aproxima da eclosão (Uni et al., 2003; Spieir et al., 2012). A enzima aminopeptidase é responsável pela digestão dos peptídeos originários da fase luminal da digestão, gerando substratos como di e tri peptídeos e aminoácidos (AA) livres para absorção intestinal.

O aumento na expressão dos genes do transportador de peptídeo e da enzima aminopeptidase, com a aproximação da eclosão, coincide com período em que os embriões ingerem o líquido amniótico. A ingestão do líquido amniótico é iniciada por volta do 17 DE, que constitui a primeira refeição do pintainho, sendo a quantidade e qualidade nutricional do âmnio determinante para transição fisiológica e metabólica do pintainho, preparando o pintainho para as mudanças no período pós-eclosão (Uni & Ferket, 2005). O consumo do líquido amniótico proporciona substratos para síntese de glicogênio, o que é fundamental para o processo de emergência e desenvolvimento do pintainho na fase pós-eclosão (Oliveira et al., 2008). Segundo Uni & Ferket (2004), ao injetar nutrientes no líquido amniótico, o embrião naturalmente vai consumi-los antes da eclosão e consequentemente haverá estímulo para maior desenvolvimento do trato gastrintestinal (TGI) e melhoria da capacidade do embrião em digerir e assimilar os nutrientes na fase pós-eclosão.

Em nosso estudo, a suplementação de treonina *in ovo* contribuiu para o maior desenvolvimento do TGI, tanto em termos de desenvolvimento morfológico, como também, desenvolvimento funcional, o que promoveu melhorias no desempenho em todos os tratamentos suplementados com treonina. Curiosamente, o tratamento com o nível de suplementação de 7.0%, que apresentou melhores resultados em termos de desempenho, reduziu a expressão do transportador peptídeo, como também, da enzima aminopeptidase. Chen et al. (2005) observaram que a restrição de proteína regulou de forma positiva a expressão de *PepT1*, no entanto, a restrição proteica mais intensa afeta negativamente a expressão do transportador de peptídeo; de igual maneira, o acesso livre à dieta equilibrada de proteína reduz a expressão de *PepT1*, de forma semelhante à restrição intensa no período de 1 a 14 dias. Portanto, é possível que ocorra auto regulação na atividade de transportadores e enzimas na mucosa intestinal, de acordo com a disponibilidade de nutrientes. De acordo com Gilbert et al. (2008), o transporte de nutrientes é regulado pela dieta e pela presença de substratos no lúmen intestinal.

De fato, em nosso estudo observa-se que, à medida que a expressão de aminopeptidase é aumentada, ocorre aumento concomitante da expressão de *PepT1*, da mesma forma, a redução da expressão aminopeptidase é acompanhada pela redução de *PepT1*. A atividade da aminopeptidase garante substratos (di e tripeptídeos) para atividade do transportador de peptídeos. Portanto, maior expressão de *AP* garantiria maior disponibilidade de substratos, levando ao aumento na expressão de *PepT1*. Ao mesmo tempo que a redução da expressão de AP reduziria a expressão de PepT1, pela baixa disponibilidade de substratos. Com isso, parece haver relação de dependência na regulação da enzima *AP* e do transportador de peptídeo, pois ambos apresentam o mesmo padrão de regulação. É possível que a suplementação de níveis elevados de treonina (5,25 e 7%) tenha ocasionado aumento demasiado de aminoácidos disponíveis (substrato) no lúmen intestinal, inibindo a atividade da AP e consequentemente do transportador de peptídeo.

A expressão de *PepT1* e *AP* quando avaliada aos 21 dias de idade não foi alterada com suplementação de treonina, exceto para aumento na expressão de AP com o nível 3,5% em relação ao grupo controle (0.0%). Apesar disso, os efeitos benéficos sobre o desempenho foram mantidos quando avaliados aos 21 dias de idade. Nossos resultados são semelhantes aos achados por Foye et al. (2009), que observaram que os efeitos da suplementação *in ovo* sobre a expressão dos genes *AP* e *PepT1* são mais evidenciados durante a primeira semana pós-eclosão, com manutenção de melhorias no desempenho. Percebe-se que o acesso dos pintainhos do grupo controle à dieta provavelmente garantiu a esses animais equivalência no que se refere a expressão dos genes *PepT1, AP* e *Muc2*. No entanto, os ganhos adquiridos pelos animais suplementados *in ovo* em termos desenvolvimento morfológico intestinal e desempenho foram persistentes até 21 dias de idade.

Baseado nos resultados apresentados neste estudo, é possível concluir que a suplementação de treonina *in ovo* atua de forma benéfica sobre o desenvolvimento morfológico e funcional da mucosa intestinal, o que garante melhoria no desempenho dos pintainhos na eclosão e aos 21 dias de idade, com melhores respostas para o nível de 7%. No entanto, a suplementação de treonina *in ovo* não promove quaisquer alterações na expressão dos genes *Muc2* e *PepT1* aos 21 dias idade. Faz-se necessário a realização de novos estudos para elucidar os mecanismos de regulação da treonina sobre a expressão dos genes responsáveis pelos processos de digestão, absorção e defesa na mucosa intestinal.

**5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

AZAM, M.M.M.; ZOU, X.T.; DONG, X.Y. et al. Effect of supplemental L-threonine on mucin 2 gene expression and intestine mucosal immune and digestive enzymes activities of laying hens in environments with high temperature and humidity. **Poultry Science**, v.90, p.2251-2256, 2011.

BHANJA, S.K.; SUDHAGAR, M.; GOEL, A. et al. Differential expression of growth and immunity related genes influenced by *in ovo* supplementation of amino acids in broiler chickens. **Journal of Animal Science**, v.9, p.399-408, 2014.

CHEN, H.; PAN, Y.X.; WONG, E.A. et al. Dietary protein level and stage of development affect expression of an intestinal peptide transporter (cPepT1) in chickens. **The Journal of Nutrition**, v.135, p.193–198, 2005.

CONLON, M.A.; KITA, K. Muscle protein synthesis rate is altered in response to a single injection of insulin-like growth factor-I in seven-day-old leghorn chicks. **Poultry Science**, v.81, p.1543–1547, 2002.

DE OLIVEIRA, J.; DRUYAN, S.; UNI, Z. et al. Prehatch intestinal maturation of turkey embryos demonstrated through gene expression patterns. **Poultry Science**, v.88, p.2600-2609, 2009.

DE OLIVEIRA, J.E.; DRUYAN, S.; UNI, Z. et al. Metabolic profiling of late-term turkey embryo microarrays. **Poultry Science**, v.92, p.1011-1028, 2013

DE OLIVEIRA, J.E.; UNI, Z.; FERKET, P.R. Important metabolic pathways in poultry embryos prior to hatch. **World’s Poultry Science Journal**, v.64, p.488-499, 2008.

DIBNER, J.J.; RICHARDS, J.D.; KITCHELL, M.L. et al. Metabolic challenges and early bone development. **Journal Applied Poultry Research**, v.16, p.126–137, 2007

FAURE, M.; METTRAUX, C.; MOENNOZ, D. et al. Specific amino acids increase mucin synthesis and microbiota in dextran sulfate sodium-treated rats. **The Journal of Nutrition**, v.136, p.1558-1564, 2006.

FAURE, M.; MOENNOZ, D.; MONTIGON, F. et al. Dietary threonine restriction specifically reduces intestinal mucin synthesis in rats. **The Journal of Nutrition**, v.135, p.486-491, 2005.

FOYE, O.T.; ASHWELL, C.; UNI, Z. et al. The effects of Intra-Amniotic feeding of Arginine and/or β-hyroxy-β-methylbutyrate on jejunal gene expression in the turkey embryo and hatchling. **International Journal of Poultry Science**, v.5, p.437-445, 2009.

FOYE, O.T.; UNI, Z.; FERKET, P.R. Effect of *in ovo* feeding egg white protein, β-hyroxy-β-methylbutyrate and carbohydrates on glycogen status and neonatal growth of turkeys. **Poultry Science**, v.85: p.1185-1192, 2006.

GEYRA A, UNI Z, SKLAN D. The effect of fasting at different ages on growth and tissue dynamics in the small intestine of the young chick. **British Journal of Nutrition**, v.86, p.53-61, 2001.

GILBERT, E.R.; LI H.; EMMERSON D.A. et al. Developmental regulation of nutrient transporter and enzyme mRNA abundance in the small intestine of broiler. **Poultry Science**, v.86, p.1739-1753, 2007.

GILBERT, E.R.; LI, H.; EMMERSON D.A. et al. Dietary protein quality and feed restriction influence abundance of nutrient transporter mRNA in the small intestine of broiler chicks. **The Journal of Nutrition**, v.138, p.262-271, 2008.

KADAM, M.M.; BAREKATAIN, M.R.; BHANJA, S.K. et al. Prospects of *in ovo* feeding and nutrient supplementation for poultry: the science and commercial applications – a review. **Journal Science Food Agriculture**, v.93, p.3654-3661, 2013.

KADAM, M.M.; BHANJA, S.K.; MANDAL, A.B. et al. Effect of *in ovo* threonine supplementation on early growth, immunological responses and digestive enzyme activities in broiler chickens. **British Poultry Science**. v.49, p.736-741, 2008.

KERMANSHAHI, H.; DANESHMAND, A.; KHODAMBASHI, E. et al. Effect of *in ovo* injection of threonine on Mucin2 gene expression and digestive enzyme activity in Japanese quail (Coturnix japonica). **Research in Veterinary Science**. v.10, p.257-262, 2015.

KORNASIO, R.; HALEVY, O.; KEDAR, O. et al. Effect of *in ovo* feeding and its interaction with timing of first feed on glycogen reserves, muscle growth, and body weight. **Poultry Science,** v.90, p.1467-1477, 2011.

LAW, G.K.; BERTOLO, R.F.; ADJIRI-AWERE, A. et al. Adequate oral threonine is critical for mucin production and gut function in neonatal piglets. **Am Journal Physiology Gastrointestinal Liver Physiology**, v.292, p.G1293–G1301, 2007.

LINDEN, S.K.; SUTTON, P.; KARLSSON, N.G. et al. Mucins in the mucosal barrier to infection. **Mucosa Immunology**, v.1, p.183-197, 2008.

LU, J.W.; MCMURTRY, J.P.; COON, C.N. Developmental changes of plasma insulin, glucagon, insulin-like growth factors, thyroid hormones, and glucose concentrations in chick embryos and hatched chicks. **Poultry Science**, v.86, p.673-683, 2007.

MAO, X.; ZENG, X.; QIAO, S. et al. Specific roles of threonine in intestinal mucosal integrity and barrier function. **Frontiers in Bioscience**, v.E3, p.1192-1200, 2011.

MOREIRA FILHO, A.L.B.; OLIVEIRA, C.J.B.; OLIVEIRA, H.B. et al. High incubation temperature and threonine dietary level improve ileum response against post-hatch *Salmonella* Enteritidis inoculation in broiler chickens. **PloSOne**, p.1-13, 2015.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Research .2001; 29: e45.

SANTOS, E.G.; COSTA, F.G.; SILVA, J.H. et al. Protective effect of mannan oligosaccharides against early colonization by *Salmonella* Enteritidis in chicks is improved by higher dietary threonine levels. **Journal Applyied Microbiology**, v.114, p.1158–1165, 2013.

SHAFEY, T.M.; ALODAN, M.A.; AL-RUQAIE, I.M. et al. *In ovo* feeding of carbohydrates and incubated at a high temperature on hatchability and glycogen status of chicks. South African **Journal of Animal Science**, v.42, p.210-220, 2012

SMIRNOV, A.; TAKO, E.; FERKET, P.R. Mucin gene expression and mucin content in the chicken intestinal goblet cells are affected by *in ovo* feeding of carbohydrates. **Poultry Science**, v.85 p.669-673, 2006.

SPEIER, J.S.; YADAGARY, L.; UNI Z. et al. Gene expression of nutrients transporters and digestive enzymes in the yolk sac membrane and small intestine of the developing embryonic chick. **Poultry Science**, v.91, p.1941-1949, 2012.

TAHMASEBI, S.; TOGHYANI M. Effect of arginine and threonine administered *in ovo* on digestive organ developments and subsequent growth performance of broiler chickens. **Animal Physiology and Animal Nutrition**. v.5, p.947-956, 2015.

TAKO, E.; FERKET, P.R.; UNI, Z. Effects of *in ovo* feeding of carbohydrates and betahydroxy-beta-methylbutyrate on the development of chicken intestine. **Poultry Science**. v.83, p.2023-2028, 2004.

UNI, Z.; FERKET, P.R.; TAKO, E. et al. *In ovo* improves energy status of late-term chickens embryo. **Poultry Science**. v.84, p.764-770, 2005.

UNI, Z.; FERKET, P.R. Enhancement of development of oviparous species by *in ovo* feeding. **United States Patent** (US6592878B2). 2003.

UNI, Z.; FERKET, P.R. Methods for early nutrition and their potential. **World’s Poultry Science Journal**. v.60, p.101-111, 2004.

UNI, Z.; TAKO, E.; GAL-GARBER, O. et al. Morphological, molecular, and functional changes in the chicken small intestine of the late-term embryo. **Poultry Science**. v.82, p.1747-1754, 2003.

WANG, X.; QIAO, S.; YIN, Y. et al. A deficiency or excess of dietary threonine reduces protein synthesis in jejunum and skeletal muscle of young pigs. **The Journal of Nutrition**. v.137, p.1442-1446, 2007.

**CAPÍTULO III**

**Suplementação de treonina *in ovo* afeta a morfofisiologia intestinal e a contagem cecal de *Salmonella* Enteritidis em frangos de corte desafiados**

**Suplementação de treonina *in ovo* afeta a morfofisiologia intestinal e a contagem cecal de *Salmonella* Enteritidis em frangos de corte desafiados**

**Resumo:** Objetivou-se com presente estudo avaliar o efeito da suplementação de treonina *in ovo* sobre a resposta de frangos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis na fase pós-eclosão, considerando a contagem bacteriana cecal, morfologia intestinal, o peso final e ganho de peso em diferentes períodos pós-desafio com *Salmonella.* Aos 17,5 dias de desenvolvimento embrionário (17,5DE), os ovos férteis foram inoculados no fluído amniótico com solução salina (controle) ou solução de treonina 3,5% (Thr). Na eclosão, todos os pintainhos foram pesados individual e o estado negativo de *Salmonella* foi averiguado através de suabe cloacal. Aos dois dias de idade, metade das aves de cada tratamento suplementado *in ovo* foram inoculadas com 0,5 mL de caldo nutriente e a outra metade foi inoculada com 0,5 mL *Salmonella* EnteritidisNal+ (8,3 x 107 UFC SENal+/mL). Os animais foram distribuídos em delineamento experimental inteiramente casualizado com quatro tratamentos experimentais após o desafio com *Salmonella:* solução salina *in ovo* sem desafio de *Salmonella* pós-eclosão (NT-SHAM); solução salina *in ovo* e desafio com *Salmonella* pós-eclosão (NT-SE); suplementação com treonina *in ovo* sem desafio pós-eclosão (T-SHAM); e suplementação com treonina in ovo e desafio com *Salmonella* pós-eclosão (T-SE). A suplementação de 3,5% de treonina *in ovo* reduziu a colonização de Salmonella Enteritidis no período de 168 horas pós-desafio e reduziu os efeitos negativos associados a infecção com *Salmonella* sobre a morfologia intestinal e desempenho. Assim, nossos resultados sugerem que o fornecimento de treonina *in ovo* promove melhorias na saúde intestinal de frangos de corte desafiado com *Salmonella* Enteritidis.

**Palavras chave:** aminoácidos, desenvolvimento embrionário, mucina, saúde intestinal

***In ovo* threonine supplementation affects intestinal morphophysiology and *Salmonella* Enteritidis cecal counts in challenged broiler chickens**

**Abstract:** This study assessed the effect of *in ovo* threonine supplementation on the response of broilers inoculated with *Salmonella* Enteritidis, considering bacterial counts in the cecal contents, intestinal morphology, body weight and weight gain. Fertile eggs were inoculated in the amniotic fluid with saline (control) or 3.5% threonine (Thr) solution at 17.5 days of incubation. At hatch, chicks were individually weighed and cloacal swabs were sampled for *Salmonella* screening. At 2 days of age (2d), half of the birds of each *in ovo* treatment were given either 0.5 mL of nutrient broth (sham-inoculated) or nalidixic-acid resistant *Salmonella* Enteritidis in nutrient broth (8.3 x 107 CFU SENal+/mL). The birds were distributed according to a completely randomized design with four treatments after challenge with *Salmonella*: no *in ovo* Thr supplementation and sham inoculated in the post-hatch challenge (NT-SHAM); *in ovo* Thr supplementation and sham-inoculated (T-SHAM); no *in ovo* Thr supplementation and SENal+ challenged (NT-SE); and *in ovo* Thr supplementation and SENal+ challenged (T-SE). *In ovo* threonine supplementation reduced colonization by *Salmonella* Enteritidis 168 hours post inoculation (dpi) and reduced the negative effects associated to *Salmonella* infection on intestinal morphology and performance, with results similar to sham-inoculated birds. Our results suggest that providing *in ovo* threonine promotes intestinal health in broilers challenged with *Salmonella* Enteritidis in the first days of life.

**Key words:** amino acid, embryonic development, intestinal health, mucin

1. **INTRODUÇÃO**

A fase logo após a eclosão é determinante na vida do pintainho, pois ocorrem grandes transformações para garantir sua sobrevivência; a principal delas constitui o rápido desenvolvimento do tratogastrintestinal para garantir a asssimilação de nutrientes. Na eclosão, o pintainho torna-se exposto a diversos tipos de microrganimos e seus mecanimos de defesa encontram-se pouco desenvolvidos. Desta forma, logo após a eclosão, o pintainho é dependente de dois mecanismos básicos de defesa, o sistema imune inato e os anticorpos de origem materna.

O trato gastrintestinal do pintainho é considerado estéril no período da eclosão, o que representa um nicho ecológico de fácil colonização tanto para microflora comensal, como para microrganismos patogênicos (Crhanova et al., 2011). A susceptibilidade a infecções por *Salmonella* é dependente da idade; animais mais jovens com até 3 dias de idade apresentam maior tendência a desenvolver reações inflamatórias e lesões intestinais, o que não ocorre com animais adultos, refletindo a importância do desenvolvimento da competência imunológica intestinal (Smith et al., 2014).

As infecções bacterianas causadas por bactéria do gênero *Salmonella ssp*. constituem uma das principais zoonoses de origem alimentar em todo mundo, sendo os produtos avícolas (ovos e carne) considerados as mais importantes fontes de *Salmonella* para os seres humanos, com isso, medidas que visem conter a prevalência desses microrganismos em aves são constantemente propostas e avaliadas (Crhanova et al., 2011). O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos estima que cerca de 1,2 milhões de americanos são acometidos anualmente com Salmonelose (CDC, 2011). Entre os diversos sorovares existentes da espécie *S. enterica*, o sorovar *Salmonella* Enteritidis (SE) está entre os cinco principais associados a infecções alimentares em humanos (Foley et al., 2011). Segundo os dados do Ministério da Saúde, no Brasil 42,5% dos surtos alimentares confirmados em laboratório entre os anos de 1999 e 2009 apresentaram como agente etiológico bactérias do gênero *Salmonella*, (Food Safety Brazil, 2012).

Durante décadas, a avicultura industrial fez uso dos antimicrobianos como a principal ferramenta no combate aos agentes patogênicos, o que contribuiu para obtenção de altos índices produtivos. No entanto, o uso de antimicrobianos é cada vez mais restrito no setor, pois o uso indiscriminado destes compostos pode supostamente levar ao aparecimento de cepas bacterianas resistentes (Gabriel et al., 2006). Com as proibições impostas pela União Europeia, os países exportadores tiveram que se adequar a tais exigências, assim é cada vez maior a busca por novas tecnologias que venham a substituir o uso de antimicrobianos na avicultura industrial.

A utilização de nutrientes que tenham envolvimento com resposta imune intestinal pode ser alternativa viável na melhoria da resposta de pintainhos a agentes patogênicos. A camada de muco constitui a primeira linha de defesa que as bactérias e outros organismos patogênicos encontram ao tentar atravessar a mucosa intestinal (McGuckin et al., 2011). A mucina é o principal componente da camada de muco protetor, que atua como uma camada de proteção do epitélio intestinal prevenindo contra o dano e infecção por bactérias patogênicas e como substrato de fixação para bactérias comensais. A produção de mucina está intimamente relacionada aos níveis de treonina na dieta, portanto, níveis dietéticos elevados de treonina aparentemente podem auxiliar na proteção do epitélio intestinal (Santos et al., 2013).

O fornecimento de treonina (Thr) em fases precoces da vida do pintainho, como por exemplo, durante a embriogênese, poderia promover a melhoria na resposta imune dos pintainhos ao desafio por *Salmonella* na fase pós-eclosão. Kermanshahi et al. (2015) observaram aumento na expressão do *MUC2* em codornas suplementadas com Thr durante a incubação, tendo sugerido que a maior expressão seria capaz de promover maior proteção da mucosa intestinal contra agentes patogênicos, melhorando os processos de digestão e absorção de nutrientes, sendo estes fatores importantes para pintainhos recém eclodidos.

Diversos estudos evidenciam efeitos benéficos da nutrição *in ovo* sobre o desenvolvimento intestinal (Uni & Ferket, 2004; Tako et al., 2005), expressão de transportadores intestinais de glicose e aminoácidos (Tako et al., 2005; Foye et al., 2009), aumento na síntese de mucinas no epitélio intestinal (Cheled-Shoval et al., 2011; Kermanshahi et al., 2015) e melhoria da resposta imune (Kadam et al., 2008). Assim, a hipótese é que o fornecimento de treonina *in ovo* irá promover melhor resposta de pintainhos na fase inicial quando desafiados com *Salmonella* Enteritidis aos dois dias de idade.

**2. MATERIAL E MÉTODOS**

Todas as práticas de manejo, bem como abate e procedimentos de amostragem da presente pesquisa, foram aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba. O experimento foi realizado no Laboratório de Fisiologia Animal e Biologia Molecular, pertencente ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), na cidade de Areia - PB.

***2.1 Incubação***

Foram utilizados 300 ovos com peso médio de 69,0 ± 2,95g, provenientes de matrizes da linhagem Cobb500 com 46 semanas. Os ovos foram distribuídos em três incubadoras artificiais (IP130, incubadoras Premium Ecológica Ltda, Belo Horizonte, MG, Brasil) com controle de temperatura e viragem automática, totalizando 100 ovos por incubadora. Os ovos foram mantidos em condições normais de incubação com temperatura de 37,7ºC e umidade relativa de 60% com viragem a cada duas horas. No décimo primeiro dia de incubação (DE11) procedeu-se à ovoscopia com o objetivo de descartar os embriões mortos e ovos claros.

***2.2 Suplementação* *in ovo***

A suplementação *in ovo* foi realizada aos 17,5 dias de desenvolvimento embrionário (17,5DE), utilizando-se solução salina estéril (NT) ou solução de treonina a 3,5% em salina (T). Todos os ovos foram previamente higienizados com solução de etanol a 70%, após a identificação do local da suplementação através do uso de ovoscopio (Tabela 1). A solução nutritiva foi aquecida a 30ºC e depositada (1,0 mL) no líquido aminiótico utilizando-se seringas de 1 mL e agulha estéreis de 21 G. Após a inoculação, o orifício foi vedado com fita micropore e os ovos devolvidos para incubadora e a temperatura foi ajustado para 36,7°C.

**Tabela 1:** Composição química da solução nutritiva

|  |  |
| --- | --- |
| **Tratamento** | **Composição** |
| Controle (salina 0,9%) | 9 gramas de NaCl/L |
| Treonina 3,5% | 35 gramas de treonina/L de solução salina |

NaCl: Cloreto de Sódio

***2.3 Variáveis de incubação***

As variáveis avaliadas foram peso do pinto à eclosão, eclodibilidade total (número de pintainhos nascidos como porcentagem do total de ovos incubados), eclodibilidade fértil (número de pintainhos nascidos como porcentagem do total de ovos férteis) e a mortalidade embrionária através da quebra dos ovos não eclodidos para definir a idade aproximada da morte embrionária.

**2.4 *Instalações e dieta***

Após a eclosão, os pintainhos foram pesados individualmente e o estado negativo de *Salmonella* Enteritidis foi confirmado por meio de análise microbiológica de *swab* cloacal, colhidos em vinte animais por incubadora. Os animais foram distribuídos em delineamento experimental inteiramente ao acaso com quatro tratamentos e 36 repetições, considerando cada ave uma repetição. Os animais foram alojados em caixas de madeira com tampas de nylon para evitar contaminação cruzada e contaminação do ambiente por meio de vetores, como moscas. As caixas foram equipadas com bebedouro e comedouro recomendados para fase inicial. Termohigômetros digitais foram instalados no ambiente (Oregon Scientific, Portland, EUA) para aferições de temperatura e umidade relativa.

A dieta experimental foi elaborada à base farelo de milho e farelo de soja para a fase inicial (1-10 dias) seguindo as recomendações de Rostagno et al. (2011). A ração fornecida aos animais foi a mesma para todos os tratamentos experimentais sendo composta de 22,20% de PB, 2.950 kcal/kg de energia metabolizável, 1,31% de lisina digestível, 0,94% de metionina + cistina digestível e 0,852% de treonina digestível.

**2.5 *Preparação do inóculo e inoculação***

O desafio por *Salmonella* EnteritidisNal+ foi realizado aos dois dias de idade. Para o preparo do inóculo, foi realizado o cultivo da estirpe bacteriana com resistência induzida ao ácido nalidíxico (*Salmonella* EnteritidisNal+) em caldo nutriente (Acumedia®, EUA) em estufa bacteriológica durante 24 horas a 37ºC, até que o meio se tornasse turvo, o que indica desenvolvimento satisfatório da bactéria. Em seguida, uma alíquota de 0,1 mL da cultura foi semeada em novo caldo nutriente e incubada a 37°C por quatro horas, em incubadora com agitação orbital. Para determinação da concentração do inóculo, foi realizada a semeadura das diluições decimais seriadas em ágar verde brilhante (Acumedia®, EUA) contendo ácido nalidíxico (100 μg/mL), com posterior incubação a 37ºC, sendo posteriormente realizada a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) de *Salmonella* EnteritidisNal+. Todos os pintainhos foram inoculados via intra-esofágica utilizando-se 0,5mL de cultura de *Salmonella* (8,3 x 107UFC/mL) ou caldo nutriente estéril. Os quatro tratamentos resultantes da inoculação *in ovo* e desafio após a eclosão foram: solução salina *in ovo* sem desafio de *Salmonella* pós-eclosão (NT-SHAM); solução salina *in ovo* e desafio com *Salmonella* pós-eclosão (NT-SE); suplementação com treonina *in ovo* sem desafio pós-eclosão (T-SHAM); e suplementação com treonina in ovo e desafio com *Salmonella* pós-eclosão (T-SE).

***2.6 Análise microbiológica***

As 24, 96 e 168 horas pós-desafio (dpi) ou 3, 6 e 9 dias de idade, seis animais por tratamento (n=24) foram pesados e eutanasiados por deslocamento cervical. Para realização das análises microbiológicas, procedeu-se à colheita do conteúdo cecal de todos os animais por tratamento (n=6). O conteúdo cecal foi pesado e em seguida realizou-se a diluição em série com solução de água peptonada (Acumedia®, EUA) em microtubos de 1,5mL. Alíquotas de 20μl foram cultivadas em ágar verde brilhante contendo ácido nalidíxico (100 μg/mL) e, após incubação a 37ºC por 24 horas, procedeu-se à contagem das colônias e os valores foram expressos em unidades formadoras de colônia por grama de conteúdo cecal (UFC/g).

***2.7 Análise histológica***

Para a análise histológica foi realizada a colheita de amostras de aproximadamente 3 cm da porção medial dos três segmentos do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) de quatro animais por tratamento, por idade de amostragem. As amostras foram lavadas com soro fisiológico NaCl 0,9% e fixadas em formol a 10% por 24 horas. Em seguida, foram desidratadas em série crescentes de álcoois (70, 80, 90 e 100%), diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Foi realizada a microtomia semi-seriada a uma espessura de 5 μm, sendo 5 a 7 cortes colocados em cada lâmina; para cada animal foram confeccionadas duas lâminas por segmento intestinal. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina e analisadas em microscopia de luz. O estudo morfométrico foi realizado utilizando-se o sistema analisador de imagens Image J (Abramoff et al., 2004). As variáveis estudadas foram altura de vilosidade, profundidade de cripta, relação vilosidade:cripta, largura de vilosidade e área de vilosidade. A altura de vilosidade foi determinada do ápice até a sua região basal que coincide com a superfície da cripta, a profundidade de cripta foi medida a partir da região de transição vilosidade cripta até sua base e a largura de vilosidade foi medida na região medial da vilosidade. Para cada animal foram realizadas 10 mensurações, totalizando 40 mensurações por tratamento para cada variável estudada. A partir dos resultados obtidos para altura de vilosidade e profundidade de cripta procedeu-se o cálculo da relação vilosidade:cripta. A área da vilosidade foi calculada a partir dos dados de largura de vilosidade (LV) e altura de vilosidade (AV), de acordo com a equação descrita por Sakamoto et al. (2000): (2π).(LV/2).(AV).

***2.8 Análise de desempenho***

Para avaliação do desempenho os animais foram pesados individualmente antes da inoculação e antes de cada colheita de amostras, obtendo-se assim, os valores de peso inicial (PI) e peso final (PF) e, através destes dados, procedeu-se o cálculo do ganho de peso (GP).

***2.9 Análise estatística***

As análises dos dados de microbiologia foram realizadas de acordo com delineamento experimental inteiramente casualizado com dois tratamentos, levando-se em consideração só os tratamentos T-SE e NT-SE com seis repetições por tratamento para cada idade de amostragem (24, 96 e 168 horas pós-desafio). Para o estudo morfométrico, os dados foram avaliados seguindo um delineamento experimental inteiramente casualizado com dois tratamentos para as amostragens pós-eclosão e dois dias de idade e com quatro tratamentos para as idades de amostragem 24, 96 e 168 horas pós-desafio com *Salmonella*, no qual cada animal (4) representou 10 repetições totalizando 40 repetições por tratamento para cada variável estudada. Os parâmetros avaliadores de desempenho (peso inicial, peso final e ganho de peso) foram avaliados seguindo o mesmo delineamento do estudo morfométrico, com 3 repetições de doze animais. Os dados foram submetidos à análise de variância no programa estatístico Assistat versão 7.6 beta (UFCG, 2012). Médias significativas foram comparadas pelo teste de Tukey e teste F a 5% de probabilidade. Os dados referentes aos parâmetros de incubação foram analisados através do aplicativo Microsoft Excel, empregando-se estatística descritiva simples.

**3. RESULTADOS**

A suplementação de treonina *in ovo* ocasionou uma pequena redução na eclodibilidade total e fértil, e aumentou a mortalidade total (Tabela 2). Para estes dados, exceto peso do pintainho, não se trabalhou com análise de variância, pois só havia duas repetições para cada nível de suplementação de treonina *in ovo*.

**Tabela 2.** Características de incubabilidade de ovos submetidos a suplementação de treonina

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Variáveis** | **(0% Treonina)** | **(3.5% Treonina)** |
| Ovos incubados | 150 | 150 |
| Ovos inoculados | 128 | 133 |
| Eclodibilidade total (%) | 56,6 (85/150) | 53,3 (80/150) |
| Eclodibilidade fértil (%) | 66,4 (85/128) | 60,1 (80/133) |
| Mortalidade total (%) | 33,5 (43/128) | 39,8 (53/133) |

A suplementação de treonina *in ovo* proporcionou maior peso do pintainho na eclosão (p≤0,05), no entanto, não foi observado efeito sobre o peso do pintainho aos 2 dias de idade e ganho de peso (p>0,05) (Tabela 3).

**Tabela 3.** Peso inicial, peso final e ganho de peso de pintainhos suplementados *in ovo* com treonina

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Tratamentos** | **2 dias de idade** | | |
| **Peso inicial** | **Peso final** | **Ganho de peso** |
| 0% Treonina | 51,19 ± 3,00 b | 72,50 ± 5,33 | 21,31 ± 5,31 |
| 3,5% Treonina | 53,36 ± 2,41 a | 73,67 ± 1,77 | 20,30 ± 1,79 |

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem pelo teste F a 5% de probabilidade.

Os resultados de altura de vilosidade, profundidade de cripta, relação vilo:cripta e área de vilosidade encontrados foram semelhantes no dia da eclosão e aos dois dias pós-eclosão (Tabela 4). No duodeno, os animais suplementados com treonina *in ovo* apresentaram maiores médias (p≤0,05) para todas as variáveis estudadas. No jejuno, observou-se comportamento semelhante ao duodeno, exceto para altura de vilosidade na eclosão e área de vilosidade nas duas idades, em que não foi observado diferença (p>0,05) entre os tratamentos estudados. No íleo, a suplementação de treonina *in ovo* influenciou (p≤0,05) de forma positiva a altura de vilosidade, relação vilo:cripta e área de vilosidade, no entanto, não se observou (p>0,05) diferença para profundidade de cripta.

**Tabela 4.** Altura de vilosidade (AV), profundidade de cripta (PC), relação vilo:cripta (V:C) e área de vilosidade (Área) de frangos de corte suplementados com treonina *in ovo*

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **Idade** | | | |
| **Variáveis** | **Eclosão** | | **Dia 2** | |
| Controle (NT) | Treonina (T) | Controle (NT) | Treonina (T) |
| AV (µm) | 475,32 ± 46,57 b | 492,03 ± 25,26 a | 869,86 ± 69,81 b | 977,90 ± 99,97 a |
| PC (µm) | 30,65 ± 3,04 a | 27,27 ± 2,95 b | 50,56 ± 5,43 a | 46,89 ± 4,33 b |
| V:C (µm/µm) | 15,55 ± 0,54 b | 18,19 ± 1,32 a | 17,31 ± 0,70 b | 20,84 ± 0,49 a |
| Área (mm2) | 0,123 ± 0,02 b | 0,143 ± 0,02 a | 0,355 ± 0,07 b | 0,462 ± 0,08 a |
| **Jejuno** | **Eclosão** | | **Dia 2** | |
| Controle | Treonina | Controle | Treonina |
| AV (µm) | 315.03 ± 21,03 a | 311,22 ± 22,35 a | 501,68 ± 29,52 b | 549,12 ± 18,46 a |
| PC (µm) | 25,00 ± 3,03 a | 20,86 ± 2,58 b | 44,96 ± 3,98 a | 41,78 ± 4,92 b |
| V:C (µm/µm) | 12,76 ± 0,84 b | 14,98 ± 0,78 a | 12,08 ± 0,52 b | 13,96 ± 0,97 a |
| Área (mm2) | 0,064 ± 0,01 a | 0,065 ± 0,01 a | 0,186 ± 0,03 a | 0,190 ± 0,02 a |
| **Íleo** | **Eclosão** | | **Dia 2** | |
| Controle | Treonina | Controle | Treonina |
| AV (µm) | 243,29 ± 15,55 b | 278,27 ± 11,23 a | 337,21 ± 26,84 b | 406,74 ± 25,44 a |
| PC (µm) | 19,28 ± 2,81 a | 20,57 ± 2,87 a | 35,42 ± 4,20 a | 34,72 ± 3,59 a |
| V:C (µm/µm) | 12,85 ± 1,04 b | 14,91 ± 1,48 a | 9,6 ± 0,49 b | 11,81 ± 0,60 a |
| Área (mm2) | 0,036 ± 0,006 b | 0,048 ± 0,007 a | 0,101 ± 0,01 b | 0,125 ± 0,02 a |

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem pelo teste F a 5% de probabilidade.

A suplementação de treonina *in ovo* não afetou (p≤0,05) a contagem cecal nos períodos de 24 e 96 horas pós-desafio, no entanto, 168 horas pós-desafio observou-se que a suplementação de treonina *in ovo* reduziu (p≤0,05) a contagem cecal de *Salmonela* (Tabela 5). O número de animais infectados foi semelhante em todos os abates para o grupo inoculado com treonina na incubação (83%) e variou entre 100% e 66,7% para os animais que não receberam treonina. É necessário ressaltar, que independente do número de animais que apresentaram contagem para *Salmonella* Enteritidis, os animais suplementados com treonina *in ovo* que apresentaram contagem obtiveram médias inferiores quando comparados aos animais dos demais tratamentos, sendo significativamente menor à 168 hpi (p≤0,05). Além disso, os animais que não apresentaram contagem não entraram nos cálculos das médias. Nenhum dos animais dos tratamentos controles apresentaram contagem para *Salmonella.*

**Tabela 5.** Contagem de bacteriana cecal (UFC/g) de frangos corte desafiados com *Salmonella* e suplementados *in ovo* com treonina.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **24 horas pós-desafio (3 dias)** | | | | |
| **Tratamentos** | **Infectados/Total de aves** | | **Valores médios (Log10)\*** | |
| NT – SE | 6/6 (100%/100%) | | 5.99 ± 0,59 | |
| T – SE | 5/6 (83%/100%) | | 5.13 ± 0,43 | |
| **96 horas pós-desafio (6 dias)** | | | | |
| NT – SE | 4/6 (66.7%/100%) | | 7.04 ± 0,12 | |
| T – SE | 5/6 (83%/ 100%) | | 6.56 ± 0,35 | |
| **168 horas pós-desafio (9 dias)** | | | | |
| NT – SE | | 6/6 (100%/100%) | | 5.39 ± 0,46 a |
| T – SE | | 5/6 (83%/100%) | | 4.25 ± 0,31 b |

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem a 5% de probabilidade pelo teste F

NT-SE: solução salina *in ovo* e desafio com *Salmonella* pós-eclosão; T-SE: suplementação com treonina in ovo e desafio com *Salmonella* pós-eclosão

De maneira geral, foi possível observar comportamento semelhante para as variáveis estudadas de altura de vilosidade, profundidade de cripta, relação vilo:cripta e área de vilosidade no período de 24 horas pós-desafio nos três segmentos intestinais (Tabela 6). O tratamento T-SHAM apresentou maior (p≤0,05) altura de vilosidade, relação vilo:cripta e área de vilosidade nos três segmentos intestinais. A profundidade de cripta (p≤0,05) foi maior no tratamento NT-SE nos três segmentos. Observa-se, ainda, que as menores (p≤0,05) médias para altura de vilosidade, relação vilo:cripta e área de vilosidade foram encontrados no tratamento NT-SE; houve semelhança entre este e o tratamento NT-SHAM somente para área de vilo do jejuno. Aves do grupo T-SE apresentaram valores semelhantes ou maiores do que o grupo NT-SHAM para as variáveis AV e Área em todos os segmentos, porém, maior PC e menor V:C.

**Tabela 6.** Altura de vilosidade (AV), profundidade de cripta (PC), relação vilo:cripta (V:C) e área de vilosidade (Área) de frangos de corte 24 horas pós-desafio com *Salmonella* Enteritidis (dpi).

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Tratamentos** | **AV (µm)** | **PC (µm)** | **V:C (µm/µm)** | **Área (mm2)** |
| NT-SHAM | 1210,18 ± 46,81 b | 61,92 ± 5,18 b | 19,57 ± 0,57 b | 0,574 ± 0,09 b |
| NT-SE | 1045,81 ± 55,03 c | 72,95 ± 7,12 a | 14,41 ± 0,64 d | 0,462 ± 0,06 c |
| T-SHAM | 1325,76 ± 67,13 a | 57,24 ± 5,94 c | 23,28 ± 0,66 a | 0,702 ± 0,07 a |
| T-SE | 1181,14 ± 57,81 b | 63,33 ± 5,09 b | 18,75 ± 0,69 c | 0,608 ± 0,05 b |
|  | **Jejuno** | | | |
| NT-SHAM | 577,58 ± 22,32 b | 52,89 ± 2,55 b | 11,01 ± 0,64 a | 0,215 ± 0,06 b |
| NT-SE | 541,81 ± 20,01 c | 60,86 ± 9,64 a | 9,15 ± 1,11 c | 0,203 ± 0,05 b |
| T-SHAM | 624,34 ± 31,07 a | 57,21 ± 6,90 ab | 10,93 ±0,60 ab | 0,267 ± 0,03 a |
| T-SE | 620,18 ± 27,07 a | 60,33 ± 5,32 a | 10,41 ± 0,52 b | 0,251 ± 0,03 a |
|  | **Íleo** | | | |
| NT-SHAM | 480,13 ± 27,23 ab | 43,94 ± 5,03 c | 10,22 ± 0,58 b | 0,184 ± 0,03 a |
| NT-SE | 434,78 ± 23,24 c | 61,32 ± 4,77 a | 7,11 ± 0,21 d | 0,140 ± 0,02 b |
| T-SHAM | 484,74 ± 29,71 a | 43,93 ± 4,43 c | 11,00 ± 0,53 a | 0,193 ± 0,03 a |
| T-SE | 463,76 ± 22,97 b | 47,83 ± 3,80 b | 10,63 ± 0,48 b | 0,183 ± 0,02 a |

Médias seguidas de mesma na coluna não diferem a 5% de probabilidade pelo teste tukey

Solução salina *in ovo* sem desafio de *Salmonella* pós-eclosão (NT-SHAM); solução salina *in ovo* e desafio com *Salmonella* pós-eclosão (NT-SE); suplementação com treonina *in ovo* sem desafio pós-eclosão (T-SHAM); e suplementação com treonina in ovo e desafio com *Salmonella* pós-eclosão (T-SE).

No período de 96 horas pós-desafio, observa-se no duodeno e jejuno que os tratamentos que não foram desafiados com *Salmonella* (NT-SHAM e T-SHAM) apresentaram as maiores (p≤0,05) médias para altura de vilosidade, relação vilo:cripta e área de vilosidade (Tabela 7). Vale ressaltar que nas variáveis altura de vilosidade e área de vilosidade o grupo suplementado com treonina *in ovo* e desafiado com *Salmonella* (T-SE) foi semelhante àquela dos tratamentos não desafiados. Para profundidade de cripta, em ambos os segmentos, observa-se que o tratamento desafiado com *Salmonella* e não suplementado *in ovo* com treonina apresentou as maiores (p≤0,05) médias.

No íleo, é possível observar que o grupo T-SHAM apresentou as maiores médias (p≤0,05) para altura de vilosidade, relação vilo:cripta e área de vilosidade. No entanto, na variável relação vilosidade:cripta houve semelhança com os tratamentos NT-SHAM e T-SE. Para profundidade de cripta houve semelhança entre os tratamentos, T-SHAM, T-SE e NT-SHAM.

**Tabela 7.** Altura de vilosidade (AV), profundidade de cripta (PC), relação vilo:cripta (V:C) e área de vilosidade (Área) de frangos de corte 96 horas pós-desafio com *Salmonella* Enteritidis (dpi).

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Tratamentos** | **AV (µm)** | **PC (µm)** | **V:C (µm/µm)** | **Área (mm2)** | |
| NT-SHAM | 1423,01 ± 64,69 a | 56,75 ± 7,78 c | 25,58 ± 2,15 a | 0,739 ± 0,09 a | |
| NT-SE | 1274,78 ± 80,16 b | 72,62 ± 8,93 b | 17,78 ± 1,05 d | 0,625 ± 0,09 b | |
| T-SHAM | 1440,31 ± 55,75 a | 69,47 ± 7,79 b | 21,82 ± 1,77 b | 0,741 ± 0,09 a | |
| T-SE | 1338,33 ± 87,76 a | 84,36 ± 7,81 a | 20,18 ± 1,15 c | 0,675 ± 0,08 ab | |
|  | **Jejuno** | | | |
| NT-SHAM | 840,36 ± 83,09 a | 56,96 ± 8,74 b | 14,55 ± 1,02 b | 0,392 ± 0,08 ab | |
| NT-SE | 816,92 ± 57,79 b | 62,52 ± 6,18 a | 13,53 ± 0,60 c | 0,363 ± 0,08 b | |
| T-SHAM | 864,03 ± 56,76 a | 52,24 ± 6,74 b | 16,44 ± 0,87 a | 0,430 ± 0,10 a | |
| T-SE | 822,87 ± 45,12 ab | 54,92 ± 5,73 b | 14,94 ± 1,25 b | 0,382 ± 0,09 ab | |
|  | **Íleo** | | | |
| NT-SHAM | 587,45 ± 32,34 b | 45,58 ± 6,64 b | 13,01 ± 1,17 b | 0,246 ± 0,03 b | |
| NT-SE | 577,45 ± 26,39 b | 54,58 ± 4,76 a | 10,84 ± 0,52 d | 0,244 ± 0,03 b | |
| T-SHAM | 698,50 ± 45,65 a | 50,33 ± 5,85 a | 13,92 ± 0,42 a | 0,318 ± 0,06 a | |
| T-SE | 592,86 ± 30,03 b | 52,00 ± 6,62 a | 11,56 ± 0,95 c | 0,250 ± 0,04 b | |

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem a 5% de probabilidade pelo teste tukey

Solução salina *in ovo* sem desafio de *Salmonella* pós-eclosão (NT-SHAM); solução salina *in ovo* e desafio com *Salmonella* pós-eclosão (NT-SE); suplementação com treonina *in ovo* sem desafio pós-eclosão (T-SHAM); e suplementação com treonina in ovo e desafio com *Salmonella* pós-eclosão (T-SE).

No período de 168 horas pós-desafio observou-se nos três segmentos intestinais que o grupo T-SHAM apresentou maiores (p≤0,05) altura de vilosidade, relação vilo:cripta e área de vilosidade. Da mesma forma, os tratamentos NT-SHAM e T-SE apresentaram altura de vilosidade e área de vilosidade semelhantes ao tratamento T-SHAM no duodeno e jejuno. Em todos os segmentos intestinais a maior profundidade de cripta (p≤0,05) foi apresentada pelo grupo NT-SE; observa-se também, que os animais pertencentes a este grupo apresentaram os menores valores (p≤0,05) para área de vilosidade e relação vilo:cripta em todos os segmentos intestinais. Os menores valores para profundidade de cripta foram apresentadas pelos animais dos grupos T-SHAM e T-SE, no duodeno, jejuno e íleo.

**Tabela 8.** Altura de vilosidade (AV), profundidade de cripta (PC), relação vilo:cripta (V:C) e área de vilosidade (Área) de frangos de corte 168 horas pós-desafio com *Salmonella* Enteritidis (dpi).

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Tratamentos** | **AV (µm)** | **PC (µm)** | **V:C (µm/µm)** | **Área (mm2)** | |
| NT-SHAM | 1600,14 ± 76,25 a | 94,26 ± 14,40 a | 16,48 ± 2,57 b | 0,999 ± 0,15 a | |
| NT-SE | 1442,26 ± 97,34 b | 98,54 ± 11,13 a | 15,73 ± 1,63 b | 0,755 ± 0,12 b | |
| T-SHAM | 1622,46 ± 79,82 a | 82,87 ± 5,75 b | 19,01 ± 1,33 a | 1,094 ± 0,12 a | |
| T-SE | 1556,54 ± 142,74 a | 86,20 ± 9,04 b | 18,94 ± 2,17 a | 1,042 ± 0,18 a | |
|  | **Jejuno** | | | |
| NT-SHAM | 995,85 ±79,13 a | 80,46 ± 2,82 a | 12,02 ± 1,00 bc | 0,549 ± 0,12 b | |
| NT-SE | 873,76 ± 125.44 b | 82,98 ± 5,13 a | 11,02 ± 1,53 c | 0,464 ± 0,10 c | |
| T-SHAM | 975,41 ± 44,81 a | 71,38 ± 9,64 b | 14,11 ± 2,49 a | 0,675 ± 0,07 a | |
| T-SE | 882,89 ± 72,45 b | 69,08 ± 11,40 b | 13,19 ± 1,99 ab | 0,529 ± 0,08 bc | |
|  | **Íleo** | | | |
| NT-SHAM | 623,99 ± 40,19 ab | 66,52 ± 11.94 b | 9,61 ± 1,09 b | 0,367 ± 0,06 a | |
| NT-SE | 596,14 ± 55,20 b | 76,92 ± 6,63 a | 7,74 ± 0,15 c | 0,291 ± 0,06 b | |
| T-SHAM | 656,08 ± 64,24 a | 62,29 ± 10,28 b | 10,58 ± 0,77 a | 0,358 ± 0,08 a | |
| T-SE | 626,57 ± 42,52 ab | 63,13 ± 6,29 b | 10,13 ± 0,56 ab | 0,349 ± 0,06 a | |

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem a 5% de probabilidade pelo teste tukey

Solução salina *in ovo* sem desafio de *Salmonella* pós-eclosão (NT-SHAM); solução salina *in ovo* e desafio com *Salmonella* pós-eclosão (NT-SE); suplementação com treonina *in ovo* sem desafio pós-eclosão (T-SHAM); e suplementação com treonina in ovo e desafio com *Salmonella* pós-eclosão (T-SE).

Os resultados de desempenho 24 horas pós-desafio com *Salmonella* (dpi) mostram que não houve diferença (p>0,05) no peso inicial entre os quatro tratamentos e que os animais do grupo T-SHAM apresentaram melhores resultados (p≤0,05) para peso final e ganho de peso, os quais não foram diferentes do tratamento NT-SHAM. O grupo NT-SE apresentou menores peso final e ganho de peso (p≤0,05).

Nos demais períodos, 96 e 168 horas pós-desafio (dpi) observou-se comportamento semelhante, os animais grupo T-SHAM apresentaram maiores (p≤0,05) médias para as variáveis peso final e ganho de peso. No entanto, 168 horas pós-desafio o NT-SHAM foi semelhante ao tratamento T-SHAM. Assim como, no período de 24 horas pós-desafio, os animais do NT-SE apresentaram os piores resultados para variáveis estudados nos períodos de 96 e 168 horas pós-desafio com *Salmonella.* Em todos os períodos foi possível observar que o grupo T-SE apresentou resultados semelhantes (p>0,05) ao grupo NT-SHAM para peso final e ganho de peso.

**Tabela 9.** Peso inicial (2d), peso final (3, 6 e 9d) e ganho de peso de frangos de corte suplementados com treonina *in ovo* e desafiados com *Salmonella* Enteritidis pós-eclosão

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | ***Peso inicial*** | | ***Peso final*** | ***Ganho de Peso*** |  |
| ***Tratamentos*** | ***24 horas pós-inoculação (2 – 3 dias)*** | | | | |
| NT-SHAM | 72,70 ± 5,30 a | 91,50 ± 3,00 ab | | 19,00 ± 5,90 ab | |
| NT-SE | 72,13 ± 5,08 a | 85,00 ± 2,66 c | | 12,83 ± 3,80 c | |
| T-SHAM | 73,85 ± 1,74 a | 94,75 ± 3,50 a | | 21,08 ± 3,81 a | |
| T-SE | 73,08 ± 1,63 a | 88,25 ± 4,58 bc | | 14,58 ± 3,07 bc | |
| ***Tratamentos*** | ***96 horas pós-inoculação (2 – 6 dias)*** | | | | |
| NT-SHAM | 72,70 ± 5,30 a | 155,00 ± 4,00 bc | | 82,30 ± 3,80 ab | |
| NT-SE | 72,13 ± 5,08 a | 149,50 ± 6,33 c | | 77,33 ± 5,80 b | |
| T-SHAM | 73,85 ± 1,74 a | 166,83 ± 6,8 a | | 92,97 ± 4,96 a | |
| T-SE | 73,08 ± 1,63 a | 157,60 ± 7,48 b | | 84,62 ± 6,54 ab | |
| ***Tratamentos*** | ***168 horas pós-inoculação (2 – 9 dias)*** | | | | |
| NT-SHAM | 72,70 ± 5,30 a | 286,66 ± 14,00 ab | | 213,97 ± 15,62 ab | |
| NT-SE | 72,13 ± 5,08 a | 270,16 ± 10,83 c | | 198,03 ± 11,80 b | |
| T-SHAM | 73,85 ± 1,74 a | 296,00 ± 4,00 a | | 222,15 ± 3,46 a | |
| T-SE | 73,08 ± 1,63 a | 283,50 ± 7,83 b | | 210,41 ± 8,95 ab | |

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem a 5% de probabilidade pelo teste tukey

Solução salina *in ovo* sem desafio de *Salmonella* pós-eclosão (NT-SHAM); solução salina *in ovo* e desafio com *Salmonella* pós-eclosão (NT-SE); suplementação com treonina *in ovo* sem desafio pós-eclosão (T-SHAM); e suplementação com treonina *in ovo* e desafio com *Salmonella* pós-eclosão (T-SE).

**4. DISCUSSÃO**

Os resultados apresentados no presente estudo demonstraram que a suplementação de treonina *in ovo* foi capaz de alterar de forma benéfica os parâmetros histológicos, desempenho e reduzir a contagem de *Salmonella* EnteritidisNal+ (168 horas dpi). A suplementação de treonina (Thr) *in ovo* proporcionou pequena redução na taxa de eclosão quando comparado ao grupo controle (60,1% vs 66,4%). No entanto, os animais suplementados com Thr *in ovo* apresentaram maior peso à eclosão.

O efeito benéfico da suplementação *in ovo* sobre o peso vivo na eclosão pode estar relacionado com uso das reservas energéticas durante o período da embriogênese, de tal forma que o fornecimento de treonina *in ovo* pode ter amparado o status energético do embrião reduzindo a depleção da proteína muscular, melhorando o peso corporal à eclosão. Resultados semelhantes foram vistos quando o fornecimento de carboidratos *in ovo* aumentou as reservas de glicogênio no fígado e no músculo peitoral, reduziu a depleção da proteína muscular e promoveu aumento na população de células satélites, responsáveis pelo crescimento muscular, resultando em maior peso vivo à eclosão e também ao abate (Kornasio et al., 2011). A energia para o desenvolvimento embrionário inicial advém, primeiramente, dos carboidratos. Sua concentração é de aproximadamente 1% da composição total do ovo e eles se esgotam praticamente na primeira semana de desenvolvimento embrionário. Posteriormente, aminoácidos e lipídios constituem os principais nutrientes a serem utilizados para manutenção do metabolismo do embrião e, no terço final de incubação, os estoques de glicogênio são utilizados para o desenvolvimento final, quando nota-se aumento da taxa metabólica como preparação para o processo de eclosão (Lu et al., 2007). Com isso, os processos de gliconeogênese e beta-oxidação assumem papéis importantes no final do processo de incubação, constituindo os principais mecanismos para obtenção de energia no metabolismo embrionário (Yadgary & Uni, 2012). Segundo Uni e Ferket (2004), a gliconeogênese a partir do catabolismo protéico provavelmente constitui a única fonte de glicose para o embrião. Com isso, o aumento do catabolismo protéico no final da incubação afeta de forma negativa o crescimento e o desenvolvimento do pintainho, provavelmente levando a uma redução do peso corporal (Uni & Ferket, 2004), processo que pode ter sido atenuado quando do fornecimento da treonina *in ovo* no presente estudo.

Resultados semelhantes aos nossos foram encontrados por Salmanzadeh et al. (2011), que observaram pequena redução na taxa de eclodibilidade quando suplementaram diferentes níveis de treonina *in ovo.* Da mesma forma, houve maior peso na eclosão com a suplementação de 30 mg 35 mg de treonina. Kadam et al. (2008) e Tahmasebi et al. (2015) não observaram efeito negativo da suplementação de treonina *in ovo* sobre a taxa de eclosão. Em ambos os trabalhos, foram observados efeitos benéficos da suplementação de treonina sobre o peso na eclosão. Gaafar et al. (2013) e Shafey et al. (2014) avaliaram a suplementação de aminoácidos *in ovo* e não observaram efeito sobre a eclodibilidade, mas houve efeito positivo sobre o peso vivo na eclosão. Vários fatores relacionados à técnica de inoculação de nutrientes *in ovo* podem interferir na taxa de eclosão e outros resultados, incluindo o volume, a temperatura e a concentração do inóculo, o local da inoculação, a idade embrionária, e o manuseio dos ovos.

Nossos resultados também mostram efeito benéfico da suplementação de treonina *in ovo* sobre o desenvolvimento do trato gastrintestinal. Os animais suplementados apresentaram maior altura de vilosidade, maior relação vilo:cripta e maior área de vilosidade no dia da eclosão e aos dois dias de idade. Vários estudos apontam para uma melhoria no desenvolvimento intestinal com a suplementação de nutrientes *in ovo* (Tako et al., 2004; Tako et al., 2005; Sminorv et al., 2006). Tais efeitos estariam relacionados com o estímulo da presença de nutrientes na mucosa intestinal. Segundo Kadam et al. (2008), a suplementação *in ovo* garante nutrientes e co-fatores para sustentar e até mesmo acelerar o processo desenvolvimento entérico, que de outra forma poderia ser limitado devido à baixa disponibilidade de nutrientes no final da incubação.

Aos 17 dias de desenvolvimento embrionário (17DE) o embrião inicia o consumo oral do líquido amniótico, estimulando, assim, a atividade digestiva e o desenvolvimento do TGI. Segundo Uni et al. (2003), durante os últimos 3 dias de incubação, o peso do intestino aumenta de 1% em proporção ao peso do embrião (17 DE) para 3,5% no dia da eclosão. Tais mudanças estariam relacionadas com o maior desenvolvimento da mucosa intestinal, como também, à maior atividade das enzimas maltase, aminopeptidase e dos transportadores de glicose e da bomba de sódio e potássio (Uni et al., 2003).

Segundo Uni & Ferket (2004), ao injetar nutrientes no líquido amniótico, o embrião naturalmente vai consumi-los antes da eclosão e consequentemente haverá estímulo para maior desenvolvimento do trato gastrintestinal (TGI) e melhoria da capacidade do embrião em digerir e assimilar os nutrientes na fase pós-eclosão. Ademais, no período pós–eclosão os pintainhos dispõem de limitadas reservas para assegurar o rápido desenvolvimento físico e funcional do TGI. Assim, é provável que o fornecimento de treonina *in ovo*, melhorando o status energético do embrião, tenha assegurado o maior desenvolvimento do TGI durante a incubação e na fase pós-eclosão. Uni et al. (2003) relataram que a funcionalidade gastrointestinal era a mesma em pintainhos tratados *in ovo* à eclosão e pitainhos de 2 dias que tinham sido alimentados imediatamente após a eclosão.

Kadam et al. (2008), trabalhando com suplementação de níveis de treonina *in ovo* observaram tendência de aumento na atividade das enzimas pepsina e amilase em embriões suplementados com 20 e 30 mg de treonina, no entanto, tais aumentos não foram significativos. No mesmo estudo, observou-se maior consumo de ração em pintos suplementados com treonina, que poderia ser atribuído ao maior desenvolvimento funcional do TGI, uma vez que a treonina é elemento essencial componente de enzimas e mucina, como evidenciado pela maior população de células caliciformes no intestino de animais suplementados com treonina (Kadam et al., 2008).

Tahmasebi et al. (2015) observaram maior comprimento do jejuno e íleo nos animais suplementados *in ovo* com treonina, arginina (Arg) e treonina+arginina, quando comparados ao grupo não suplementado. Em relação aos parâmetros de morfologia intestinal, no mesmo estudo, observou-se aumento na altura de vilosidade nos animais suplementados com Thr e Arg no íleo, mas não no jejuno.

Aos dois dias de idade, dois grupos de animais foram desafiados com *Salmonella* Enteritidis, para avaliarmos os efeitos da administração *in ovo* de treonina sobre a resistência ao desafio. Como foi observado nos nossos resultados, a suplementação de treonina *in ovo* foi capaz de reduzir a contagem cecal de *Salmonella* no período de 168 horas pós-desafio (9 dias de idade). No entanto, o mesmo não foi observado aos 24 e 96 horas pós-desafio (3 e 6 dias de idade respectivamente).

Alguns fatores podem ter contribuído para a redução mais evidente na contagem cecal de *Salmonella* no período de 168 horas pós-desafio (9 dias de idade), mas não antes disso (24 e 96 hpi). O primeiro deles trata-se do desenvolvimento do sistema imune intestinal (GALT). Segundo Ito et al. (2007), até três semanas pós-eclosão, o GALT encontra-se imaturo, sendo toda proteção intestinal conferida pela imunidade inata e pelos anticorpos maternos que podem impedir ou controlar a translocação ou disseminação intestinal de microrganismos patogênicos. A susceptibilidade a infecções por *Salmonella* é dependente da idade, animais mais jovens com até 3 dias de idade apresentam maior tendência a desenvolver reações inflamatórias e lesões intestinais, o que não ocorre com animais adultos, refletindo a importância do desenvolvimento da competência imunológica intestinal (Smith et al., 2014).

O outro fator importante consiste no estabelecimento da microbiota comensal que ocorre por volta da segunda semana pós-eclosão, tornando-se semelhante à microbiota de um animal adulto. As populações bacterianas comensais do intestino atuam protegendo o hospedeiro da colonização de agentes patogênicos, pois competem pelos sítios de ligação no epitélio e nutrientes disponíveis, como também produzem bacteriocinas, fortalecendo, assim, a resposta imune intestinal (Gabriel et al., 2006). Segundo McGuckin et al. (2011), as bactérias intestinais comensais são capazes de inibir a aderência de bactérias patogênicas na mucosa intestinal, por meio de sua capacidade em aumentar a produção de mucinas intestinais. Além disso, Faure et al. (2006) demonstraram que alguns aminoácidos específicos, incluindo a treonina, são capazes de modular a microbiota intestinal, favorecendo o crescimento da microbiota comensal, e que provavelmente os mecanismos envolvidos no processo de modulação estariam relacionados com síntese de mucina.

Assim, a redução da contagem cecal de *Salmonella* apresentada no período de 168 horas pós-desafio, pode ter sido amparada por uma maior maturidade do GALT e maior desenvolvimento da microbiota comensal, somado a suplementação de treonina *in ovo.* O que não foi observado nos períodos de 24 e 96 horas pós-desafio, visto que, durante estes dois períodos o sistema imune intestinal encontra-se pouco desenvolvido e a microbiota comensal ainda está em processo de formação.

O papel da treonina sobre a proteção intestinal é bem relatado na literatura. A treonina atua principalmente sobre a síntese de mucinas intestinais e de anticorpos de mucosa (IgA). Segundo McGuckin et al. (2011), a camada de muco constitui a primeira linha de defesa que as bactérias e outros organismos patogênicos encontram ao tentar atravessar a mucosa intestinal. Processos infecciosos na superfície da mucosa intestinal podem resultar em rápida liberação de grânulos de mucinas armazenados, reforçando assim, a proteção da barreira intestinal (Davis e Dickey, 2008).

A mucina é o principal componente da camada de muco protetor, que atua como uma camada de proteção do epitélio intestinal prevenindo contra o dano e infecção por bactérias patogênicas e como substrato de fixação para bactérias comensais (Linden et al., 2008). Além disso, a camada de muco fornece nutrientes para o estabelecimento da microbiota comensal, fortalecendo a proteção intestinal pelo processo de exclusão competitiva (Pan et al., 2014). A camada de mucina fornece ambiente adequado para o funcionamento das enzimas da borda em escova, auxiliando a absorção de nutrientes (Sminorv et al., 2006).

A produção de mucina está intimamente relacionada aos níveis de treonina na dieta, portanto, níveis dietéticos elevados de treonina podem aparentemente auxiliar na proteção do epitélio intestinal (Santos et al., 2013). Ademais, as mucinas são ricas em treonina, sendo assim, o fornecimento de níveis limitados de treonina na dieta pode resultar na redução da biossíntese de mucina, alterando a cama de protetora de muco (McGuckin et al. 2011).

Kadam et al. (2008) observaram que a suplementação de treonina *in ovo* melhorou resposta imune humoral, sugerindo que a suplementação de treonina proporcionou incremento da síntese de imunoglobulinas. Azzam et al. (2011) verificaram que a expressão de mRNA *MUC2* e de anticorpos de mucosa (IgA) no íleo aumentaram linearmente com o aumento da treonina dietética, quando os animais foram submetidos a estresse térmico. Segundo Dalby et al. (2006), danos não-infecciosos a mucosa intestinal podem promover alterações nas populações microbianas comensais, facilitando infecções entéricas, pelo comprometimento da barreira de proteção da mucosa.

A treonina tem um importante papel na função intestinal. Santos et al. (2013) relataram que a suplementação de treonina associada a mananoligossacarídeo (MOS) foi capaz de reduzir os número de animais positivos para *Salmonella*, como também, a contagem bacteriana cecal. Da mesma forma, Moreira Filho et al. (2015) observaram que pintainhos desafiados com *Salmonella* suplementados com alto nível de treonina na dieta apresentaram redução no número de animais positivos para *Salmonella* e redução na contagem bacteriana cecal, no entanto, á redução não foi significativa.

Até o momento todos os trabalhos avaliaram o efeito da treonina na dieta sobre a resposta ao desafio com *Salmonella.* No entanto, o presente estudo foi avaliado o efeito da suplementação de treonina *in ovo* sobre a resposta ao desafio. Nossa hipótese foi que o fornecimento de treonina durante a embriogênese atuaria sobre a resposta imune intestinal e na manutenção da integridade da mucosa intestinal em animais desafiados. Em nosso estudo, observamos que a suplementação de treonina *in ovo*, além de ser benéfica na redução da contagem cecal de *Salmonella* (168 dpi)*,* mostrou-se eficaz na manutenção da integridade da mucosa intestinal, claramente observado quando os animais do grupo T-SE apresentaram resultados de morfometria semelhantes aos animais não desafiados (T-SHAM e NT-SHAM). De modo oposto, animais desafiados e não suplementados in ovo apresentaram comprometimento da integridade da mucosa. Uma das estratégias utilizadas por microrganismos patogênicos para aderir à superfície intestinal é secreção de toxinas que podem prejudicar as células epiteliais e, consequentemente, alterar a produção de mucinas e moléculas antimicrobianas. Essas toxinas podem provocar a lise, indução de apoptose, a inibição do crescimento e do ciclo celular, ruptura das junções intracelulares e alterações na sinalização inflamatória (McGuckin et al., 2011).

Segundo Smith et al. (2014), sinais clássicos de uma resposta imunitária em curso no intestino incluem aumento da infiltração de leucócitos da lâmina própria e mudanças na estrutura do intestino, tais como a atrofia das vilosidades e hiperplasia das criptas, levando a um encurtamento no tempo de vida dos enterócitos. A infiltração de heterófilos muitas vezes acompanha o fase precoce da infecção no intestino, estas células tanto podem matar os agentes invasores, como também, contribuir para o recrutamento de outros tipos de células imunitárias (Smith et al., 2014).

A presença de microrganismos patogênicos na superfície intestinal promove o aumento da degradação da camada de muco intestinal, alterando o padrão de produção das mucinas pelas células caliciformes. Segundo Faure et al. (2007), em situações patológicas, os processos de defesa e reparação da mucosa aumentam a demanda por aminoácidos, em especial a treonina. Assim, o fornecimento de níveis limitados de treonina pode prejudicar a síntese de mucina e altera a integridade da barreira de proteção do epitélio intestinal, prejudicando os processos de digestão e absorção de nutrientes (Horn et al., 2009).

Kermanshahi et al. (2015) sugeriram que a maior expressão de *MUC2* que ocorreu quando foi feita suplementação de Thr em ovos de codornas seria capaz de promover maior proteção da mucosa intestinal contra agentes patogênicos, melhorando os processos de digestão e absorção de nutrientes, sendo estes fatores importantes para pintainhos recém eclodidos. Da mesma forma, Bhanja et al. (2014) observaram que suplementação de treonina *in ovo* incrementou a síntese de mucina (*MUC2*) intestinal na fase pós-eclosão em pintainhos de corte.

Com isso, de acordo com os nossos resultados foi possível observar que provavelmente a suplementação *in ovo* de treonina supriu essa maior necessidade de treonina requerida durante o desafio com *Salmonella,* garantindo assim a manutenção da integridade da barreira de proteção intestinal. Segundo Moreira Filho et al. (2015), a suplementação de níveis elevados de treonina na dieta proporcionam incremento na produção de mucinas intestinais, o que assegura a manutenção da integridade intestinal em situações de desafio com *Salmonella.*

A manutenção da integridade da mucosa intestinal é essencial para os processos de digestão e absorção de nutrientes. Como foi visto, a suplementação de Thr *in ovo* garantiu aos animais do grupo T-SE a manutenção da integridade intestinal, o que resultou em melhoria no desempenho destes animais em todos os períodos avaliados (24, 96 e 168 horas dpi), apresentando resultados semelhantes aos grupos T-SHAM e NT-SHAM. Por outro lado, os animais pertencentes ao grupo NT-SE apresentaram desempenho comprometido em todos os períodos estudados.

Em conclusão, o fornecimento de treonina *in ovo* foi capaz de atenuar os efeitos deletérios da infecção de *Salmonella* Enteritis, reduziu a contagem bacteriana cecal (168 dpi) e manteve a integridade da mucosa intestinal, o que resultou em maior peso final e ganho de peso. Os processos pelos quais a treonina suplementada *in ovo* atua na melhoria da resposta dos pintainhos ao desafio por *Salmonella*, provavelmente envolvem o incremento na síntese de mucinas intestinais e de anticorpos de mucosa (IgA), como também, o amadurecimento precoce do trato gastrointestinal durante a embriogênese.

**5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

AZZAM, M.M.M.; ZOU, X.T.; DONG, X.Y. et al. Effect of supplemental L-threonine on mucin 2 gene expression and intestine mucosal immune and digestive enzymes activities of laying hens in environments with high temperature and humidity. **Poultry Science**, v.90, p.2251-2256, 2011.

BHANJA, S.K.; SUDHAGAR, M.; GOEL. A. et al. Differential expression of growth and immunity related genes influenced by *in ovo* supplementation of amino acids in broiler chickens. **Journal of Animal Science,** v.9, p.399-408, 2014.

CHELED-SHOVAL, S.L.; AMIT-ROMACH, E.; BARBAKOV, M. The effect of *in ovo* administration of mannan oligosaccharide on small intestine development during the pre-and posthatch periods in chickens. **Poultry Science**, v.90, p.2301-2310, 2011.

CRHANOVA, M.; HRADECKA, H.; FALDYNOVA, M. et al. Immune response of chicken gut to natural colonization by gut microﬂora and to *Salmonella* enterica Serovar Enteritidis infection. **Infection and Immunity**, v.79, p.2755-2763, 2011.

DAVIS, C.W.; DICKEY, B.F. Regulated globet cell mucin secretion. **Annual Review of Physiolgy**. v.70, p.487-512, 2008.

FAURE, M.; CHONE, F.; METTRAUX, C. et al. Threonine utilization for synthesis of acute phase proteins, intestinal proteins, and mucins is increased during sepsis in rats. **The Journal of Nutrition**, v.137, p.1802-1807, 2007.

FAURE, M.; METTRAUX, C.; MOENNOZ, D. et al. Specific amino acids increase mucin synthesis and microbiota in dextran sulfate sodium-treated rats. **The Journal of Nutrition**. 136:1558-1564, 2006.

FOLEY, S.L.; NAYAK, R.; HANNING, I.B et al. Population dynamics of Salmonella enterica serotypes in commercial egg and poultry production. **Applyied Environmental Microbiology**, v.77, p. 4273–4279, 2011.

FOYE, O.T.; ASHWELL, C.; UNI Z. et al. The effects of Intra-Amniotic feeding of Arginine and/or β-hyroxy-β-methylbutyrate on jejunal gene expression in the turkey embryo and hatchling. **International Journal of Poultry Science**. v.5, p.437-445, 2009.

GAAFAR KM, SELIM SA, EL-BALLAL SS. Effect of *in-ovo* administration with two levels of amino acids mixture on the performance of Muscovy ducks. **Emirates Journal of Food and Agriculture**. 2013; 25: 58-65.

GABRIEL, I.; LESSIRE, M.; MALLET, S. et al. Microflora of the digestive tract: critical factors and consequences for poultry. **World’s Poultry Science Journal**, v.62, p.499–511, 2006.

HORN, N.L.; DONKIN, S.S.; APPLEGATE T.J. et al. Intestinal mucin dynamics: response of broiler chicks and White Pekin ducklings to dietary threonine. **Poultry Science**, v.88, p.1906-1914, 2009.

ITO, N.M.K.; MIYA, J.I.C.I.; OKABAYASHI, S.M. Saúde intestinal em frangos de corte. **Circular Técnica**: Avigen Brasil, 2007.

KADAM, M.M.; BHANJA, S.K.; MANDAL, A.B. Effect of *in ovo* threonine supplementation on early growth, immunological responses and digestive enzyme activities in broiler chickens. **British Poultry Science**, v.49, p.736-741, 2008.

KERMANSHAHI, H.; DANESHMAND, A.; KHODAMBASHI, E. et al. Effect of *in ovo* injection of threonine on Mucin2 gene expression and digestive enzyme activity in Japanese quail (Coturnix japonica). **Research in Veterinary Science**, v.10, p.257-262, 2015.

KORNASIO, R.; HALEVY, O.; KEDAR, O. et al. Effect of *in ovo* feeding and its interaction with timing of first feed on glycogen reserves, muscle growth, and body weight. **Poultry Science**, v.90, p.1467-1477, 2011.

LINDEN, S.K.; SUTTON, P.; KARLSSON N.G. et al. Mucins in the mucosal barrier to infection. **Mucosal Immunology**, v.1, p.183–197, 2008.

LU, J.W.; MCMURTRY, J.P.; COON, C.N. Developmental changes of plasma insulin, glucagon, insulin-like growth factors, thyroid hormones, and glucose concentrations in chick embryos and hatched chicks. **Poultry Science**. v.86, p.673-683, 2007.

MCGUCKIN, M.A.; LINDÉN, S.K.; SUTTON, P. et al. Mucin dynamics and enteric pathogens. **Nature Review Microbiology**, v.9, p.265-278, 2011.

MOREIRA FILHO, A.L.B.; OLIVEIRA, C.J.B.; OLIVEIRA, H.B. et al. High incubation temperature and threonine dietary level improve ileum response against post-hatch *Salmonella* Enteritidis inoculation in broiler chickens. **PloSOne**, p.1-13, 2015.

PAN, D.; YU, Z. Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet. **Gut Microbes**. v.5, p.108-119, 2014.

ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L. et al. Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos: **Composição de alimentos e exigências nutricionais**. 3rd ed. Viçosa: UFV; 2011.

SAKAMOTO, K.; HIROSE, H.; ONIZUKA, A. et al. Quantitative study of changes in intestinal morphology and mucus gel on total parenteral nutrition in rats. **Journal Surgical Research**. v.94, p.99–106, 2000.

SALMANZADEH, M.; EBRAHIMNEZHAD, Y.; SHAHRYAR H.A. et al. The effects of *in ovo* injection of L-threonine in broiler breeder eggs on characters of hatching and growth performance broiler chickens. **European Journal of Experimental Biology**, v.1, p.147–151, 2011.

SANTOS, E.G.; COSTA, F.G.; SILVA, J.H. et al. Protective effect of mannan oligosaccharides against early colonization by *Salmonella* Enteritidis in chicks is improved by higher dietary threonine levels. **Journal Appliyed Microbiology**, v.114, p.1158–1165, 2013.

SCALLAN, E.; HOEKSTRA, R.M.; ANGULO, F.J. et al. Foodborne IIIness Acquired in the United States-Major Pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v.17, p.7-15, 2011.

SHAFEY, T.M.; MAHMOUD, A.H.; ALSOBAYEL, A.A. et al. Effects of *in ovo* administration of amino acids on hatchability and performance of meat chickens. **South African Journal of Animal Science**, v.44, p.123-130, 2014.

SMIRNOV, A.; TAKO, E.; FERKET, P.R. et al.Mucin gene expression and mucin content in the chicken intestinal goblet cells are affected by *in ovo* feeding of carbohydrates. **Poultry Science**. v.85, p.669-673, 2006.

SMITH, A.L.; POWERS, C.; BEAL. R. The avian enteric immune system in health and disease. In: Schat KA, Kaspers B, Kaise P. editors. **Avian Immunology**. London: Academic Press; 2014. p 227–250.

TAHMASEBI S, TOGHYANI M. Effect of arginine and threonine administered *in ovo* on digestive organ developments and subsequent growth performance of broiler chickens. **Animal Physiology and Animal Nutrition**. v.5, p.947-956, 2015.

TAKO, E.; FERKET, P.R.; UNI, Z. Changes in chicken intestinal zinc exporter mRNA expression and small intestine functionality following intra-amniotic zinc-methionine administration. **Journal Nutritional Biochemistry**. v.15, p.339-346, 2005.

TAKO, E.; FERKET, P.R.; UNI, Z. Effects of *in ovo* feeding of carbohydrates and betahydroxy-beta-methylbutyrate on the development of chicken intestine. **Poultry Science**, v.83, p.2023-2028, 2004.

UNI, Z.; FERKET, P.R. Methods for early nutrition and their potential. **World’s Poultry Science Journal**, v.60, p.101-111, 2004.

UNI, Z.; TAKO, E.; GAL-GARBER, O. et al. Morphological, molecular, and functional changes in the chicken small intestine of the late-term embryo. **Poultry Science**. v.82, p.1747-1754, 2003.

YADGARY, L.; UNI, Z. Yolk sac carbohydrate levels and gene expression of key gluconeogenic and glycogenic enzymes during chick embryonic development. **Poultry Science**. v.91, p.44-53, 2012.

**CAPÍTULO IV**

**Caracterização da microbiota cecal de frangos de corte suplementados com treonina *in ovo* e desafiados com *Salmonella* Enteritidis na fase pós-eclosão**

**Caracterização da microbiota cecal de frangos de corte suplementados com treonina *in ovo* e desafiados com *Salmonella* Enteritidis na fase pós-eclosão**

**Resumo:** A microbiota intestinal das aves desempenha importantes funções dentro do ambiente intestinal e pode ser afetada por diferentes fatores internos e externos ao organismo animal. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da inoculação de treonina *in ovo* sobre a diversidade e composição da microbiota cecal em diferentes períodos de pintainhos submetidos ao desafio com *Salmonella* Enteritidis*.* No 17,5º dia de desenvolvimento embrionário (17,5DE), dois grupos de ovos foram inoculados com solução salina (0,9%) ou solução nutritiva de treonina na concentração de 3,5%. Após a eclosão, os pintainhos foram pesados e estado negativo de *Salmonella* foi detectado através de suabes cloacais. Aos dois dias de idade, os pintainhos foram desafiados com *Salmonella* Enteritidis e divididos em quatro grupos: solução salina *in ovo* sem desafio de *Salmonella* pós-eclosão (NT-Sh); solução salina *in ovo* e desafio com *Salmonella* pós-eclosão (NT-Sal); suplementação com treonina *in ovo* sem desafio pós-eclosão (T-Sh); e suplementação com treonina in ovo e desafio com *Salmonella* pós-eclosão (T-Sal). Na eclosão, a microbiota é pouco diversa e formada principalmente por bactérias do filo Proteobactéria, com o avançar da idade, a microbiota torna-se mais diversa e sua composição é alterada, tornando-se composta principalmente por bactéria pertencentes a filo Firmicutes. O desafio com *Salmonella* não promoveu nenhuma alteração na diversidade e composição microbiota cecal. A suplementação de treonina *in ovo* alterou a diversidade e composição da microbiota no período de 96 horas após o desafio, favorecendo o estabelecimento de bactérias da família Lachnospiraceae. Em conclusão, treonina suplementada *in ovo* promove alterações na microbiota intestinal, o que favorece o estabelecimento da microbiota intestinal, o que pode ser benéfico na redução dos efeitos deletérios da colonização por *Salmonella.*

**Palavras-chave:** diversidade bacteriana, gene 16S rRNA, saúde intestinal

**Characterization of the cecal microbiota of broilers supplemented with threonine *in ovo* and challenged with *Salmonella* Enteritidis in the post-hatching**

**Abstract:** The intestinal microbiota of poultry plays important roles within the intestinal environment and can be affected by different factors internal and external to the animal organism. The objective of the present study was to evaluate the effect of the *in ovo* inoculation of threonine on the diversity and composition of the cecal microbiota in different periods of chicks submitted to challenge with *Salmonella* Enteritidis. At the 17.5 embryonic development day (17.5DE), two egg groups were inoculated with saline solution (0.9%) or nutrient solution of threonine at a concentration of 3.5%. After hatching, the chicks were weighed and cloacal swabs were sampled for *Salmonella* screening. At two days of age, the chicks were challenged with *Salmonella* Enteritidis and divided into four groups: saline solution *in ovo* without *Salmonella* challenge after hatching (NT-Sh); Saline solution *in ovo* and challenge with *Salmonella* after hatching (NT-Sal); Supplementation with *in ovo* threonine without post-hatch challenge (T-Sh); and *in ovo* threonine supplementation and challenge with *Salmonella* post-hatch (T-Sal). In the hatching, the microbiota is little diverse and consists mainly of bacteria of the phylum Proteobacteria, with the advancing age, the microbiota becomes more diverse and its composition is altered, making it composed mainly by bacteria belonging to Firmutes filo. The challenge with *Salmonella* did not promote any change in cecal microbiota diversity and composition. *In ovo* supplementation of threonine altered the diversity and composition of the microbiota in the period of 96 hours after the challenge, favoring the establishment of bacteria of the family Lachnospiraceae. In conclusion, *in ovo* supplemental threonine promoted changes in the intestinal microbiota, favoring the establishment of the intestinal microbiota, which may be beneficial in reducing the deleterious effects of *Salmonella* colonization.

**Key words:** bacterial diversity, 16S rRNA gene, intestinal health

1. **INTRODUÇÃO**

A microbiota intestinal nas aves interfere em importantes funções no organismo do animal, estando envolvida no desenvolvimento da competência imunológica, nos processos de utilização e produção de nutrientes, no desenvolvimento estrutural do trato gastrintestinal (Gabriel et al., 2006) e na proteção do hospedeiro, impedindo a colonização de bactérias com potencial patogênico via exclusão competitiva e produção de bacteriocinas (Lan et al., 2005; Chambers e Gong, 2011). A estrutura e função das comunidades microbianas em aves têm recebido especial atenção devido à sua importância para esses processos e de sua relação com segurança alimentar, nutrição e saúde dos animais (Qu et al., 2008).

O desenvolvimento da microbiota intestinal no pintainho é iniciado logo após a eclosão e vários fatores podem influenciar na formação da comunidade microbiana, tais como o ambiente, a alimentação e a manipulação dos animais (Stanley et al., 2013). O trato gastrintestinal do pintainho é inicialmente colonizado por bactérias gram-negativas pertencentes principalmente à família *Enterobacteriacea*; na primeira semana de vida a microbiota intestinal passa por diversas transformações e torna-se mais diversa, passando a ser composta por ampla variedade de bactérias gram-positivas (Ballou et al., 2016).

O trato gastrintestinal do pintainho encontra-se colonizado por poucas espécies de microrganimos no momento da eclosão (Pedroso et al., 2012), representando um nicho ecológico vazio e de fácil colonização por microrganismos patogênicos (Juricova et al., 2013). A *Salmonella* é um dos principais microrganismos patogênicos que acometem os pintainhos nos primeiros dias de vida e pode persistir de forma assintomática durante todo ciclo produtivo, o que torna o controle e erradicação do patógeno muito mais desafiador (Mon et al., 2015). As bactérias pertencentes o gênero *Salmonella* têm sido consideradas os principais agentes causadores de doenças de origem alimentar no mundo (Cosby et al., 2015), sendo os produtos avícolas (ovos e carne) as fontes mais comuns de infecção em humanos (Van Immerseel et al., 2009). Assim, estratégias que visem controlar ou erradicar a ação destes patógeno são cada vez mais estudadas.

Após a eclosão, o pintainho é mantido em jejum até que tenha acesso à primeira alimentação. Foi demonstrado que pintainhos submetidos a longos períodos de jejum na fase pós-eclosão (48 horas) apresentam retardo no desenvolvimento intestinal e comprometimento da barreira de proteção de muco, o que pode torná-lo mais sensível a colonização por microrganismos patogênicos (Uni et al., 2003a). A camada de muco constitui o principal mecanismo de defesa contra microrganismos patogênicos para o pintainho logo após a eclosão. O fornecimento de nutrientes *in ovo* favorece o rápido desenvolvimento da mucosa intestinal e estimula o desenvolvimento do sistema imune, garantindo ao pintainho maior proteção no período pós eclosão (Uni e Ferket, 2004).

Alguns aminoácidos específicos, incluindo a treonina, são capazes de modular a microbiota intestinal de modo que o crescimento da microbiota benéfica é favorecido; os mecanismos envolvidos no processo de modulação estão provavelmente relacionados com síntese de mucina (Faure et al., 2006). A mucina é o principal componente da camada de muco protetor, constituindo a primeira linha de defesa que as bactérias e outros organismos patogênicos encontram ao tentar atravessar a mucosa intestinal (McGuckin et al., 2011). O muco favorece o estabelecimento e manutenção da microbiota comensal equilibrada que antagoniza o crescimento de bactérias com potencial patogênico (Faure et al., 2006).

A partir dessas considerações, testamos a hipótese de que a treonina fornecida *in ovo* atuará como modulador da microbiota cecal, atenuado os efeitos deletérios da *Salmonella* Enteritidis sobre a diversidade e composição da microbiotal cecal em diferentes períodos após o desafio.

**2. MATERIAL E MÉTODOS**

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Fisiologia Animal e Biologia Molecular, pertencente ao Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba. Foram utilizados 300 ovos com peso médio de 69,0 ± 2,95g, provenientes de matrizes da linhagem Cobb500 com 46 semanas. Os ovos foram distribuídos em três incubadoras artificiais (IP130, incubadoras Premium Ecológica Ltda, Belo Horizonte, MG, Brasil) com controle de temperatura e virador automático, totalizando 100 ovos por incubadora. Os ovos foram mantidos em condições normais de incubação com temperatura de 37,7ºC e umidade relativa de 60%, com viragem a cada duas horas.

***2.1 Suplementação in ovo e instalações***

Aos 17,5 dias de desenvolvimento embrionário (17,5DE), foi realizada a suplementação *in ovo,* utilizando-se solução salina estéril (NT) ou solução de treonina a 3,5% em salina (T). Os ovos foram previamente higienizados com solução de etanol a 70%, após a identificação do local da suplementação através do uso de ovoscópio. A solução nutritiva foi aquecida a 30ºC e depositada (1,0 mL) no líquido aminiótico utilizando-se seringas de 1 mL e agulha estéreis de 21 G. Após a inoculação, o orifício foi vedado com fita micropore, os ovos foram devolvidos para incubadora e as temperaturas foram ajustadas para 36,7°C.

Ao nascimento, os pintainhos foram pesados individualmente e o estado negativo de *Salmonella* Enteritidis foi confirmado por meio de análise microbiológica de suabecloacal, colhidos em vinte animais por incubadora. Os animais foram distribuídos em delineamento experimental inteiramente ao acaso com quatro tratamentos e 36 repetições/tratamento, considerando cada ave uma repetição. Os pintainhos foram alojados em caixas de madeiras com tampas de nylon para evitar contaminação cruzada e contaminação do ambiente por meio de vetores, como moscas e receberam água e ração *ad libitum,* sem presença de antibiótico.

***2.2 Preparação do inóculo e inoculação***

As aves foram desafiadas com *Salmonella* EnteritidisNal+ aos dois dias de idade. O inóculo foi preparado a partir do cultivo da estirpe bacteriana com resistência induzida ao ácido nalidíxico (*Salmonella* EnteritidisNal+)em caldo nutriente (Acumedia®, EUA), mantido em estufa bacteriológica durante 24 horas a 37ºC. Em seguida, uma alíquota de 0,1 mL da cultura foi semeada em novo caldo nutriente e incubada a 37°C por quatro horas, em incubadora com agitação orbital. Para determinação da concentração do inóculo, foi realizada a semeadura das diluições decimais seriadas em ágar verde brilhante (Acumedia®, EUA) contendo ácido nalidíxico (100 μg/mL), com posterior incubação a 37ºC, sendo posteriormente realizada a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) de *Salmonella* EnteritidisNal+. Todos os pintainhos foram inoculados via intra-esofágica utilizando-se 0,5mL de cultura de *Salmonella* (8,3 x 107UFC/mL) ou caldo nutriente estéril. Os quatro tratamentos resultantes da suplementação *in ovo* e desafio após a eclosão foram: solução salina *in ovo* sem desafio de *Salmonella* pós-eclosão (NT-Sh); solução salina *in ovo* e desafio com *Salmonella* pós-eclosão (NT-Sal); suplementação com treonina *in ovo* sem desafio pós-eclosão (T-Sh); e suplementação com treonina in ovo e desafio com *Salmonella* pós-eclosão (T-Sal).

***2.3 Extração de DNA genômico***

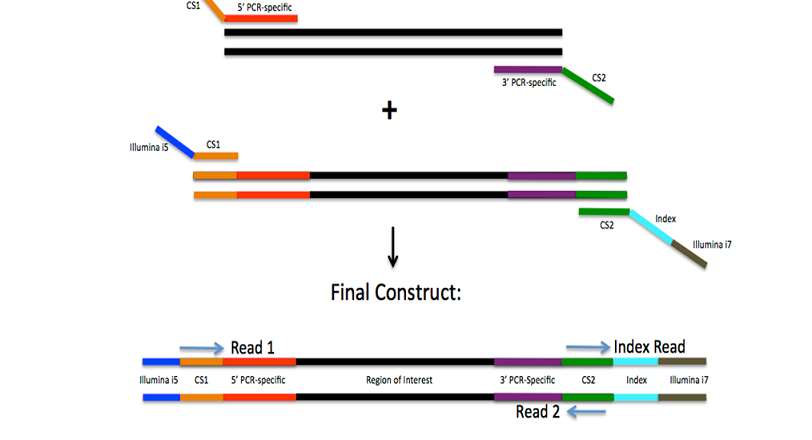
Amostras de ceco de seis animais por tratamento foram colhidas no dia da eclosão (DOH), aos dois dias de idade e 24, 96 e 168 horas após o desafio com *Salmonella* EnteritidisNal+ ou 2, 3, 6 e 9 dias de idade, totalizando 96 amostras. As amostras foram acondicionadas em nitrogênio líquido e posteriormente foram transferidas para ultra freezer (-80ºC). Para extração do DNA genômico foram pesados de 30-40 mg de raspado de mucosa e conteúdo cecal e o isolamento foi realizado utilizando-se o kit comercial (PowersoilTM DNA Isolation, MoBio Laboratories Inc, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Após a extração, a concentração e pureza do material extraído foram avaliadas em espectrofotômetro (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Wilmington, DE). As amostras de DNA foram então estocadas no kit de armazenamento de DNA (GenTegra, cat. nº GTD0001, Pleasanton, CA, EUA) e enviadas para análise no Departamento de Ciência Animal, University of Illinois at Urbana-Champaign, IL, EUA.

***2.4 Sequenciamento do gene 16S rRNA***

As amostras para sequenciamento por 16S foram quantificadas através de método fluorométrico (Qubit 2.0, Life Technologies) para garantir a integridade e, na sequência, foram preparadas as bibliotecas do 16S RNAr e sequenciamento junto à Unidade de Sequenciamento de Larga Escala [High-Throughput Sequencing and Genotyping Unit] do Centro de Biotecnologia Roy J. Carver da Universidade de Illinois at Urbana-Champaign (UIUC), EUA. Foi realizada amplificação dos segmentos V3-V5 hipervariáveis do gene rRNA 16S utilizando-se os iniciadores V3 F357 (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG) e V5 R926 (5'-CCGTCAATTCMTTTRAGT), utilizando-se o sistema IFC Access array (Fluidigm, South San Francisco, CA, USA). A reação de amplificação foi realizada no sistema FC1 Cycler (Fluidigm). A Figura 1 apresenta o esquema do construto final, contendo as sequências de ligação (linkers) CS1 (5'-ACACTGACGACATGGTTCTACA) e Cs2 (5'- TACGGTAGCAGAGACTTGGTCT) do Fluidigm e o par de adaptadores Illumina i5 (5'- AATGATACGGCGACCACCGAGATCT) e i7 contendo o index (barcode) de identificação das amostras (5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT-XXXXXXX).

As bibliotecas foram purificadas utilizando-se kit comercial (AMPure XP beads, Illumina, San Diego, CA, EUA), quantificadas por qPCR e sua qualidade avaliada com o kit High density DNA Assay no equipamento Fragment Analyzer (Advanced Analytical Technologies Inc, Ankeny, Iowa, USA). O DNA de PhiX foi inoculado (spiked) nas amostras como controle para as corridas MiSeq (kit PhiX, Illumina), na concentração mínima de 5%. O sequenciamento foi realizado em uma flowcell de MiSeq para 301 ciclos de cada extremidade dos fragmentos, utilizando-se kit de sequenciamento de 600 ciclos para MiSeq V3 (Illumina), de acordo com recomendações do fabricante. As sequências produzidas tinham 300 pb de comprimento. Os arquivos fastq foram gerados e demultiplexados com o software de conversão bcl2fastq v1.8.4 da Illumina, utilizando um offset ASCII de 33 (score Sanger). As sequências PhiX foram removidas usando a pipeline de processamento Casava 1.8 (Illumina).

Os dados foram depositados no servidor Biocluster do Instituto de Biologia Genômica da Universidade de Illinois em Urbana-Champaign (http://biocluster.igb.illinois.edu/), divididos em 4 arquivos compactados. O primeiro arquivo, “dados não ordenados” (Unsorted data), compreende o total de sequências produzidas na corrida, sem nenhum tipo de processamento como limpeza, ordenação e demultiplexação. O arquivo “dados demultiplexados” (demultiplexed data) inclui as sequências ordenadas por index (barcode/identificador da amostra), mas nenhum outro tipo de processamento. Essa métrica permite identificar se alguma amostra não produziu sequências, o que é bastante útil quando diversos pares de primers são utilizados. O arquivo “dados ordenados por primer” (primer sorted data) apresenta as sequências ordenadas de acordo com os diversos primers utilizados (V3-V5, V4, etc). Ele permite visualizar quantas sequências foram produzidas por todas as amostras quando cada primer foi utilizado na amplificação. O arquivo “dados primer-ordenados e demultiplexados” (primer sorted and demultiplexed data) é organizado de acordo com a amostra e o par de primer utilizado. Ele contém vários arquivos menores com a extensão fastq, apresentando dois arquivos fastq por par de primers e por amostra - read 1 (sequência 5’) e read 2 (sequência 3’).



**Figura 1.**Construto final para sequenciamento em plataforma Illumina, incluindo os iniciadores específicos para as regiões hipervariáveis do gene 16S RNAr (primers 5’ e 3’ específicos), as sequências de ligação CS1 e CS2 do sistema Fluidigm e os adaptadores Illumina i5 e i7.

***2.5 Processamento das sequências 16S rRNA***

O processamento dos dados foi realizado utilizando-se o Biocluster da Universidade de Illinois at Champaign-Urbana. O primeiro passo realizado foi a retirada da sequência específica do primer utilizado na PCR. Para tanto, as sequências demultiplexadas em formato fastq foram cortadas (trimmed) utilizando-se o software Trimmomatic (Bolger et al., 2014), utilizando-se o parâmetro HEADCROP:17 e HEADCROP:19 para R1 e R2, respectivamente.

A classificação taxonômica das sequências foi realizada por meio da pipeline Illinois Mayo Taxon Organization from RNA Dataset Operations (IM-TORNADO, Jeraldo et al., 2014), disponível no endereço http://sourceforge.net/projects/imtornado, utilizando-se paired-end reads não sobrepostas (Cole et al., 2013).

Em resumo, o primeiro passo da pipeline inclui filtragem da qualidade das amostras usando o Trimmomatic 0.33 (Bolger et al., 2014), utilizando um cutoff de PHRED score Q3 para as extremidades 5’e 3’ das sequências (LEADING:3 e TRAILING: 3), corte da extremidade 3’com um score médio móvel de Q15 e uma janela de 4 bases (SLIDINGWINDOW: 4:15) e remoção de quaisquer sequências mais curtas do que 112 pb. Ademais, sequências contendo bases ambíguas são descartadas. As sequências sobreviventes são agrupadas em arquivos para R1 e R2 e depois dereplicadas, criando clusters com 100% de similaridade usando o Mothur (Schloss et al., 2009). Esse passo elimina sequências com comprimentos menores que o cutoff definido no arquivo de parâmetros, além das sequências que aparecem apenas uma vez. As unidades taxonômicas operacionais (OTUs) representativas foram encontradas usando USEARCH do algoritmo UPARSE (Edgar, 2013), que também remove sequências putativas quiméricas. Posteriormente, a designação de taxonomia foi realizada usado o classificador Bayesiano naïve do RDP (Wang et al., 2007) a partir da implementação do software Mothur (Schloss et al., 2009) para classificar as sequências comparando-as com o banco de dados Greengenes 13\_5. Sequências que não são classificadas são retiradas das OTUs representativas, sendo que a maioria delas representam sequências phiX do sequenciamento que sobraram. Para alinhamento das sequências, foi utilizada a versão 14 (release 11) da base de dados Ribosomal Database Project (RDP) (<https://rdp.cme.msu.edu/)> e o software Infernal (Nawrocki et al., 2009). As OTUs representativas são mapeadas usando USEARCH a 97% de identidade e é gerada uma tabela no format BIOM (McDonald et al., 2012) contendo o número de contagens para cada OTU por amostra, a informação taxonômica e outros metadados. Finalmente, os alinhamentos são usados para gerar árvores filogenéticas usando FastTree 2.1.7 (Price et al., 2010). A pipeline IM-TORNADO gera uma série de arquivos para R1, R2 e R1-R2 pareados, incluindo os formatos fasta compactado, biom e tree, que podem ser utilizados em processamentos posteriores.

***2.6 Análise de diversidade microbiana***

O processamento exploratório dos dados, as análises de alfa e beta diversidade e as matrizes de dissimilaridade foram realizadas com o intuito de avaliar a riqueza e composição da microbiota cecal, utilizando-se o software QUIIME (Caporaso et al., 2010). Os passos utilizados para a análise estão demonstrados na Figura 2. Para tanto, a tabela Biom gerada pelo IM-Tornado (Jeraldo et al., 2014) foi filtrada para separar amostras com baixo número de sequências e eliminar OTUs que não possuíam sequências. A abundância relativa das OTUs foi demonstrada a partir de gráficos de barra (summarize\_taxa\_through\_plots.py), agrupando-se as amostras de acordo com os tratamentos.

Tabela BIOM

Gráficos de taxonomia

Alfa diversidade

Beta diversidade

Métricas de distância

Gráficos PCoA

Análise descritiva

Análise estatística

Interpretação

**Figura 2.** Análises realizadas com a tabela Biom gerada pelo IM-TORNADO.

Curvas de rarefação foram produzidas para quantificar a cobertura proporcionada pelo sequenciamento e sua adequação em evidenciar a diversidade presente nas amostras (alpha\_rarefaction.py). A mesma pipeline permite avaliar a alfa-diversidade da comunidade, e foram utilizados os índices de Shannon e Chao1. O índice de Shannon leva em consideração a riqueza e a abundância das espécies presentes na comunidade. O índice de Chao 1 considera apenas a riqueza de espécies dentro da comunidade.

A análise de diversidade beta foi realizada para observar as diferenças em relação à composição da microbiota ou distanciamento entre as comunidades bacterianas dos diferentes grupos (beta\_diversity\_through\_plots.py). As estimativas de diversidade beta foram realizadas utilizando o método da distância Unifrac não ponderada e ponderada (Lozupone e Knight, 2005), seguido por análise de coordenadas principais (PCoA) no QIIME para avaliar as diferenças na composição da microbiota. Foram confeccionados gráficos Emperor (Vazques-Baez et al., 2013), que permitem visualizer gráficos PCoA tridimensionais (beta\_diversity\_through\_plots.py).

***2.7 Análise Estatística***

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software QUIIME (Caporaso et al., 2010) ou R version 3.2.4 "Very Secure Dishes" (R Core Team, 2016). A análise estatística foi realizada considerando os níveis de treonina *in ovo* (Thr e Controle), nas diferentes idades (DOH, 2, 3 6 e 9 dias), considerando animais desafiados com *Salmonella* e não desafiados (Sal e Control), nos diferentes períodos pós-desafio (24, 96 e 168 horas). Além disso, realizou-se as análises considerando o efeito da idade e o efeito conjunto da suplementação de treonina *in ovo* e do desafio com *Salmonella*.

**3. RESULTADOS**

O sequenciamento das bibliotecas genômicas da região V3-V5 do 16S rRNA da microbiota cecal de frangos de corte gerou um total de 7.866.384 sequências (R1 e R2), a partir de um universo de 96 amostras, com número médio de 82 mil sequências por amostra. Após o filtro de qualidade padrão do IM-TORNADO, o número de sequências R1 válidas foi 2.613.016, representando 66,4% do total de sequências R1, com comprimento médio de 150 pb. A partir das sequências foram identificados o total de 578 OTUs. Duas amostras foram excluídas das análises pelo baixo número de sequências geradas (filter\_samples\_from\_otu\_table.py). Depois desse passo, restaram 94 amostras, 2.561.925 sequências R1 e 578 OTUs.

O filo Proteobacteria é dominante no dia da eclosão (DOH) e aos dois dias de idade, seguido pelo filo Firmicutes, encontrado em menor proporção do dia da eclosão. Aos três dias idade observa-se inversão na dominância, com domínio do filo Firmicutes. Nas idades 6 e 9 dias observa-se total dominância do filo Firmicutes, com quase 90%, seguido pelo filo Proteobacteria. Observa-se o aparecimento do filo Bacteroidetes aos 9 dias de idade (Figura 3).

**Figura 3.** Distribuição de filos bacterianos no dia da eclosão (DOH), 2, 3, 6 e 9 dias de idade, no ceco de frangos de corte. Foi utilizado o sequenciamento da região V3-V5 do gene 16s rRNA.

No dia da eclosão, é possível observar que a família dominante é a *Aurantimonadaceae,* pertencente ao filo Proteobacteria, observa-se também a presença da família *Staphylococcaceae*, que pertence ao filo Firmicutes (Figura 4). Aos 2 e 3 dias de idade observa-se domínio da família *Enterobacteriaceae*, seguido pela família *Clostridiaceae* 1. Aos 2 dias observa-se o aparecimento da família *Erysipelotrichaceae*, encontrada em pequena proporção nas idades posteriores. Aos 3 dias de idade, pode ser observado o aparecimento da família *Lachnospiraceae*, que se torna dominante nos períodos posteriores (6 e 9 dias), com maior presença aos 9 dias (>50%). No terceiro dia, verifica-se o crescimento da *Clostrdiaceae 1* também observado no sexto dia. A família *Ruminococcaceae* encontra-se presente a partir do sexto dia com maior representação aos 9 dias. Ocorre brusca redução da família *Enterobacteriaceae* aos 6 e 9 dias. Aos nove dias é verificado o desaparecimento da família *Clostridiaceae 1* (Figura 4).

**Figura 4.** Distribuição das famílias bacterianas com representatividade superior a 5% no dia da eclosão (DOH), 2, 3, 6 e 9 dias de idade. Foi utilizado sequenciamento da região V3-V5 do gene 16S rRNA do conteúdo e raspado de mucosa do ceco de frangos de corte.

A análise de alfa diversidade através dos índices de Shannon e Chao 1 revelou que houve influência da idade sobre a diversidade da microbiota cecal (Figura 5). Os resultados foram semelhantes entre os dois índices utilizados, a diversidade foi significativamente maior aos nove dias de idade, sendo semelhante a diversidade encontrada aos 6 dias (Figura 5A e B). No índice de Shannon, a diversidade da microbiota é semelhante no terceiro e sexto dia (Fig. 5A), no entanto, no índice de Chao 1, a diversidade é significativamente maior aos 6 dias de idade em relação aos 3 dias (Figura 5B). Observa-se que existe pouca diversidade na microbiota cecal no dia da eclosão e aos dois dias de idade, de acordo com os índices de Shannon e Chao 1, havendo maior distância dessas duas idades com as demais (Figura 5A e B). É ainda possível notar, através dos gráficos de rarefação apresentados, que a profundidade de sequenciamento foi suficiente para atingir um platô a partir de 2500 sequências por amostra. Isso indica que a análise da diversidade utilizando uma quantidade de sequências acima desse valor é capaz de representar toda a comunidade microbiana presente na amostra.

C:\Users\usuario\Desktop\Gráficos Alfa\Slide1.TIF

**Figura 5.** Análise de alfa diversidade da comunidade bacteriana cecal de frangos de corte, em diferentes períodos de tempo (0, 2, 3 6 e 9 dias de idade), através do índice de Shannon (A) e Chao 1 (B).

Através da análise de beta diversidade, utilizando o índice UNIFRAC (não ponderado e ponderado), observou-se diferença na composição da microbiota cecal de frangos de corte (Figura 6). As principais diferenças na composição da microbiota cecal foram observadas entre as amostras aos 2 dias de idade e aos 9 dias, sendo observado maior distanciamento entre estes grupos (Fig. 6 A e B), como também, entre as amostras coletadas aos 3 dias de idade e aos 9 dias, de acordo com a análise ponderada (Figura 6 B).

A composição da microbiota cecal foi similar entre amostras nos períodos de 2 e 3 dias de idade; a similaridade entre os dois grupos é melhor observada na análise ponderada (Fig. 6B), em que observa-se maior agrupamento das amostras, não sendo tão evidente na análise não-ponderada (Figura 6A). De forma semelhante, observa-se maior similaridade entre a composição da microbiota cecal nos períodos de 6 e 9 dias de idade, com maior agrupamento das amostras na análise ponderada (Figura 6B). As amostras coletadas aos 3 dias de idades e aos 6 dias também apresentam similaridade na composição da microbiota, para análises não ponderada e ponderada (Figura 6A e B).

C:\Users\usuario\Desktop\Beta 96h.tif

**Figura 6.** Análise de componentes principais baseada medida de distância Unifrac não-ponderada (A) e ponderada (B), mostrando o agrupamento dos grupos bacterianos em diferentes períodos de tempo (0, 2, 3 6 e 9 dias de idade).

No período de 24 horas pós-desafio (dpi), é possível observar comportamento diferenciado entre o grupo de animais suplementados com treonina *in ovo* (T-Sal e T-Sh) e os animais não suplementados (NT-Sal e NT-Sh), independente do desafio com *Salmonella* (Figura 7). Nos grupos NT-Sal e NT-Sh observa-se maior presença do filo Firmicutes e, em menor proporção, do filo Proteobacteria. Comportamento oposto é observado nos animais dos grupos T-Sal e T-Sh, em que observa-se maior proporção do filo Protebacteria e menor proporção do filo Firmicutes; no entanto, a diferença entre as proporções não é tão discrepante, sendo mais equilibrada (Figura 7).

Nos períodos de 96 e 168 horas pós-desafio, é possível observar comportamento semelhante entre os tratamentos nos dois períodos. O filo Firmicutes foi dominante em todos os tratamentos, e em menor proporção é encontrado o filo Proteobacteria. No período de 168 horas pós-desafio, verifica-se o aparecimento mais pronunciado do filo Bacteroidetes (NT-Sh e T-Sal), não observado nos períodos anteriores (Figura 7).

**Figura 7.** Distribuição de filos bacterianos com representatividade superior à 5%, em três períodos de tempo (24, 96 e 168 horas), após o desafio com *Salmonella* Enteritidis (dpi) no ceco de frangos de corte suplementados com treonina *in ovo*. Foi utilizado sequenciamento da região V3-V5 do gene 16s rRNA. Para cada ponto de tempo, NT-Sal: solução salina *in ovo* e desafio com *Salmonella* pós-eclosão; NT-Sh: Solução salina *in ovo* sem desafio de *Salmonella* pós-eclosão; T-Sal: suplementação com treonina in ovo e desafio com *Salmonella* pós-eclosão; T-Sh: suplementação com treonina *in ovo* sem desafio pós-eclosão

No período de 24 horas pós-desafio, é observado comportamento semelhante entre os tratamentos NT-Sal e NT-Sh e entre os tramentos T-Sal e T-Sh (Figura 8). Os tratamentos NT-Sal e NT-Sh observa-se dominância das famílias *Enterobacteriaceae* e *Clostridiaceae 1*. Em menor proporção nos grupos NT-Sal e NT-Sh, observa-se a presença de bactérias pertencentes às famílias *Erysipelotrichaceae* e *Lachnospiraceae*, ambas do filo Firmicutes. Em relação aos grupos T-Sal e T-Sh, é possível observar dominância da família *Enterobacteriaceae*, representando 55,90 e 58% respectivamente, e, em menor proporção, as famílias *Clostridiaceae 1* e *Lachnospiraceae* (Figura 8).

No período de 96 horas pós-inoculação (hpi) observa-se crescimento da família *Clostridiaceae 1* nos tratamentos NT-Sal e NT-Sh e redução das famílias *Enterobacteriaceae* e *Erysipelotrichaceae*. Para os tratamentos T-Sal e T-Sh, há grande redução da família *Enterobacteriaceae* e aumento pronunciado na presença da família *Lachnospiraceae*. Em todos os quatro tratamentos é observado o aparecimento da família *Ruminococcaceae*. A família *Lachnospiraceae* encontra-se em maior proporção em todos os tratamentos no período de 168 hpi, a presença da família *Ruminococcaceae* aumenta proporcionalmente neste período, comparado com o período anterior. Entre os tratamentos NT-Sal e NT-Sh observa-se o aparecimento da família *Lactobacillaceae* (Figura 8).

**Figura 8.** Distribuição das famílias bacterianas, com representatividade superior à 5%, em três períodos de tempo (24, 96 e 168 horas), após o desafio com *Salmonella* Enteritidis (dpi) no ceco de frangos de corte suplementados com treonina *in ovo*. Foi utilizado o sequenciamento da região V3-V5 do gene 16S rRNA. Para cada ponto de tempo, NT-Sal: solução salina *in ovo* e desafio com *Salmonella* pós-eclosão; NT-Sh: Solução salina *in ovo* sem desafio de *Salmonella* pós-eclosão; T-Sal: suplementação com treonina in ovo e desafio com *Salmonella* pós-eclosão; T-Sh: suplementação com treonina *in ovo* sem desafio pós-eclosão

Os resultados da análise de alfa diversidade considerando os efeitos da suplementação de treonina *in ovo* e do desafio com *Salmonella* Enteridis estão apresentados na figura 9. De acordo com os índices Shannon e Chao 1, só foram observadas alterações significativas na diversidade da microbiota cecal no período de 96 horas após desafio com *Salmonella,* nos outros períodos observou-se tendência de maior diversidade nos tratamentos com suplementação de treonina *in ovo* (T-Sh e T-Sal)*.* Os tratamentos T-Sh e T-Sal apresentaram maior diversidade, de acordo com o índice de Shannon o tratamento NT-Sh é semelhante ao tratamento T-Sal (Fig. 9A), o mesmo não é observado para o índice de Chao 1, em que a diversidade do tratamento T-Sal é superior ao tratamento NT-Sh (Figura 9B). Para os dois índices é observado que o NT-Sal apresenta a menor diversidade entre os tratamentos (Figura 9).

**C:\Users\usuario\Desktop\9 horas.tif**

**Figura 9.** Análise de diversidade alfa da comunidade bacteriana cecal de frangos de corte, suplementados com treonina *in ovo* e desafiados com *Salmonella* Enteritidis no período de 96 horas pós-desafio, através do índice de Shannon (A) e Chao 1 (B).

Em relação à composição da microbiota cecal, só foram observadas alterações significativas no período de 96 horas pós-desafio (Figura 10). De acordo com índice Unifrac não ponderado, há distanciamento maior entre os tratamentos T-Sal e NT-Sal e maior agrupamento entre os tratamentos T-Sh e NT-Sh (Figura 10A). Comportamento diferente é observado para o índice Unifrac ponderado, em que se observa agrupamento dos tratamentos T-Sh e T-Sal, e variação muito grande entre as amostras dos grupos NT-Sh e NT-Sal (Figura 10B).

C:\Users\usuario\Desktop\Apresentação1\Slide1.TIF

**Figura 10.** Análise de componentes principais baseada medida de distância Unifrac não-ponderada (A) e ponderada (B), mostrando o agrupamento dos grupos bacterianos no período de 96 horas pós-desafio com *Salmonella* Enteritidis.

**4. DISCUSSÃO**

A colonização do trato gastrointestinal (TGI) dos pintainhos é iniciada imediatamente após a eclosão e, à medida que o pintainho se desenvolve, a microbiota torna-se diversificada e complexa, até se tornar relativamente estável (Pan e Yu, 2014). Diferente dos mamíferos, em que a principal fonte de microrganismos para os animais recém-nascidos é o contato com os animais adultos, na produção comercial de frangos de corte o pintainho recém-eclodido não tem contato com aves adultas, sendo assim, a microbiota do pintainho é formada principalmente por microrganismos presentes no ambiente do incubatório e criação, como também, por microrganismos oriundos da dieta (Dibner et al., 2008; Polansky et al., 2016). No presente estudo foi possível observar que a idade do pintainho constitui o principal fator que interfere na riqueza e na composição da microbiota intestinal. De acordo com os índices de riqueza bacteriana (Chao1 e Shannon) e com os índices que avaliaram a composição da comunidade bacteriana no ceco (Unifrac) é observado maior diversificação da microbiota cecal com avançar da idade, como também, completa alteração na composição da comunidade bacteriana entre os primeiros dias (dia da eclosão e dois dias de idade) e demais idades estudadas. Nossos resultados estão de acordo com estudos anteriores, que observaram a idade como fator de grande influência sobre o desenvolvimento da microbiota (Ballou et al., 2013; Mon et al., 2015; Mond Shaufi et al., 2015; Ranjitkar et al., 2016).

Alterações na riqueza e composição da microbiota do TGI decorrentes da idade podem ser relacionadas ao desenvolvimento funcional do TGI. Na eclosão, o sistema digestivo das aves está anatomicamente completo, mas sua capacidade funcional de digestão e absorção de nutrientes é limitada (Uni e Ferket, 2004). Sendo assim, ocorre limitação no fornecimento de substratos (aminoácidos, glicose e etc.) para assimilação tanto pelo pintainho como pelos microrganismos, o que afeta o desenvolvimento de ambos. Os microrganismos competem com o hospedeiro pelos nutrientes disponíveis no lúmen e na camada de muco que recobre a mucosa intestinal, sendo a disponibilidade de nutrientes essencial para o crescimento da microbiota (Lam et al., 2005; Gabriel et al., 2006). À medida que o pintainho se desenvolve, ocorre amadurecimento funcional do TGI e, consequentemente, maior disponibilidade de substratos ou nutrientes, o que favorece o crescimento da microbiota comensal (Pan e Yu, 2014).

Isso é consistente se levarmos em consideração que a microbiota está estabelecida a partir da segunda semana de vida do pintainho (Pedroso et al., 2005; Gabriel et al., 2006), coincidindo com o desenvolvimento quase que completo da capacidade funcional do trato gastrintestinal (Uni et al., 2003b). Segundo Polansky et al. (2016), a disponibilidade de carboidratos reduzida nos primeiros dias pós-eclosão limita o desenvolvimento de determinadas espécies bacterianas pertencentes a filo Firmicutes, que utilizam principalmente carboidratos para manutenção do metabolismo. No presente estudo, observamos que, no dia da eclosão e aos dois dias de idades, a microbiota é basicamente composta por microrganismo do filo Proteobacteria (58 e 68% respectivamente), com maior representatividade da família *Enterobacteriaceae*, compreendendo a 67% da microbiota cecal aos dois dias de idade e 45% aos três dias, e baixa presença do filo Firmicutes no dia da eclosão e aos 2 dias de idade, representado principalmente pelas famílias *Clostriaceae 1* e *Lachnospiraceae*. É possível que o maior domínio da família *Enterobacteriacea* no início da vida do pintainho seja decorrente da baixa capacidade de colonização das bactérias pertencentes a esta família, sendo consideradas bactérias oportunistas.

Aos três dias de idade a inversão de domínio, passando o filo Firmicutes a dominar a composição da microbiota cecal, representado pelas famílias *Clostriaceae 1*, *Lachnospiraceae* e *Erysipelotrichaceae*, é semelhante ao que foi relatado anterioremente por outros autores (Lu et al., 2003; Ballou et al., 2013; Videnska et al., 2013; Mon et al., 2015; Polansky et al., 2016). No estudo realizado por Ballou et al. (2013), foi observado que a microbiota cecal de pintos recém-eclodidos apresenta baixa diversidade bacteriana, sendo constituída basicamente por bactérias gram-negativas, pertencentes à família das *Enterobacteriaceae*. A microbiota torna-se mais diversificada e com maior presença de bactérias gram-positivas com o passar dos dias, principalmente da ordem Clostridiales, composta por bactérias das famílias *Clostriaceae 1*, *Lachnospiraceae* e *Ruminococaceae.*

A produção cecal de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (acetato, propionato e butirato) é mínima e quase não existente nos pintainhos com 1 dia de idade, no entanto, com o estabelecimento da microbiota, por volta da segunda semana (14 d), a produção de AGCC pode atingir altas concentrações e depois permanecem estáveis (Pan e Yu, 2014). Além de auxiliar no controle de bactérias com potencial patogênico, os AGCC são importantes estimuladores do desenvolvimento da mucosa intestinal, contribuindo com a energia para o processo de proliferação das células que compõem a mucosa (Chambers et al., 2011). De fato, entre as idades 6 e 9 dias houve domínio da família *Lachnospiraceae*, com grande redução dos membros da família *Enterobacteriacea*. As bactérias pertencentes à família *Lachnospiraceae* são bactérias associadas a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), especialmente o ácido butírico, sendo estes importantes para manutenção da saúde intestinal (Rinttila e Apajalahti, 2013). A produção de AGCC decorrente da fermentação anaeróbia dos carboidratos reduz o pH do ambiente intestinal, inibindo o crescimento de bactérias potencialmente patogênica, que são sensíveis a ambientes ácidos, tais como os membros da família *Enterobacteriaceae* (Rinttila e Apajalahti, 2013). Semelhante aos nossos resultados, Mon et al. (2015) observaram correlação inversa entre os membros das famílias *Enterobacteriacea* e *Lachnospiraceae*, sugerindo haver relação antagônica entre as famílias.

Diferente da hipótese proposta, o desafio com *Salmonella* não promoveu quaisquer alterações na diversidade e composição da microbiota cecal (24, 96 e 168 hpi), de acordo com os índices de alfa e beta diversidade. Semelhante aos nossos resultados, Videnska et al. (2013) não observaram alterações sobre a diversidade e composição da microbiota em pintainhos desafiados com *Salmonella,* apenas mudanças numéricas nas OTUs, com aumento dos membros da família *Enterobacteriaceae* e redução dos membros da família *Ruminococcaceae*, porém essas alterações não foram significativas. Da mesma forma, nenhuma alteração significativa foi observada na microbiota cecal de poedeiras criadas em diferentes sistemas de criação após o desafio com *Salmonella* Enteritidis(Nordentf et al., 2011). No estudo realizado por Mon et al. (2015), a diversidade bacteriana reduziu significativamente 48 horas pós-desafio com *Salmonella* (3 dias de idade), sendo a redução atribuída ao domínio da família *Enterobacteriaceae,* em contraste com a brusca redução dos membros das famílias *Lachnospiraceae* e *Ruminococcaceae* nos animais desafiados. No entanto, as alterações na diversidade não foram persistentes quando avaliadas aos 7 dias pós-desafio (7dpi) de acordo com os índices de diversidade Chao 1, Shannon e Simpson. No mesmo estudo, só houve efeito do desafio com *Salmonella* sobre a composição da microbiota cecal aos 7 dpi, sendo observado o enriquecimento dos animais desafiados com bactérias pertencentes ao filo Proteobacteria e, em contraste, os animais não desafiados apresentaram suas comunidades bacterianas enriquecidas com bactérias do filo Firmicutes. Resultado semelhante foi encontrado por Juricova et al. (2013) que observaram retardo no desenvolvimento da microbiota cecal (48 hpi) de pintainhos desafiados com *Salmonella* no dia da eclosão, com aumento da população de bactérias pertencentes à ordem Enterobacteriales e redução nas populações de bactérias das ordens Clostridiales, Lactobacillales e Bifidobacteriales. No entanto, quando o desfiado com *Salmonella* foi realizado aos 4 dias de idade, não foram observadas alterações na microbiota (Juricova et al., 2013).

Nos estudos realizados por Mon et al. (2015) e Juricova et al. (2013), o desafio com *Salmonella* foi realizado no dia da eclosão, provocando alterações na microbiota cecal, no entanto, em nosso estudo realizamos o desafio aos 2 dias de idade e no estudo Videnska et al. (2013) o desafio foi realizado aos 4, 7, 10, 13 e 16 dias de idade, sem causar alterações em termos de diversidade na microbiota cecal. O trato gastrintestinal do pintainho na eclosão é considerado estéril, representando um nicho ecológico de fácil colonização por patógenos como a *Salmonella* e apresentando poucas restrições para seu estabelecimento (Crhonova et al., 2011). Sendo assim, é possível que as diferenças apresentadas entre os estudos sejam decorrentes da idade em que foi realizado o desafio. Aos dois dias de idade, quando as aves foram desafiadas com *Salmonella* Enteritidis, a microbiota cecal dos pintainhos já estava colonizada por membros das famílias *Enterobacteriacea*, *Clostrideaceae 1* e *Erysipelotrichaceae* (Fig. 4), apresentando diversidade superior aos animais no dia da eclosão (de acordo com o índice de Chao 1). Alterações temporais na microbiota do trato gastrintestinal com o avançar da idade do pintainho podem influenciar a susceptibilidade a infecções com patógenos (Mon et al., 2015). A microbiota comensal desempenha importante papel protegendo o hospedeiro da colonização de agentes patogênicos, pois competem pelos sítios de ligação no epitélio e nutrientes disponíveis, como também produzem bacteriocinas, fortalecendo, assim, a resposta imune intestinal (Gabriel et al., 2006).

Apesar de não ter promovido alterações na diversidade e composição da microbiota cecal, o desafio com *Salmonella* promoveu alterações na integridade da mucosa intestinal e comprometeu o desempenho dos pintainhos (dados não apresentados). Segundo Smith et al. (2014), sinais clássicos de uma resposta imunitária em curso no intestino incluem aumento da infiltração de células fagocitárias na lâmina própria e mudanças na estrutura do intestino, tais como a atrofia das vilosidades e hiperplasia das criptas, levando a um encurtamento no tempo de vida dos enterócitos. A infiltração de heterófilos muitas vezes acompanha a fase precoce da infecção no intestino, estas células tanto podem matar os agentes invasores, como também, contribuir para o recrutamento de outros tipos de células imunitárias (Smith et al., 2014).

A suplementação de treonina *in ovo* proporcionou ganhos na riqueza da microbiota cecal em todos os períodos pós-desafio (24, 96 e 168 horas), no entanto, as modificações proporcionadas pela treonina foram mais evidentes no período de 96 horas pós-desafio. Ao nível de família, observou-se que os tratamentos com suplementação de treonina favoreceram o crescimento das populações de bactérias pertencentes a família *Lachnospiraceae* e reduziram as populações de bactérias pertencente à família *Enterobacteriacea* (96 hpi). No período de 168 hpi foi observado que todos os tratamentos apresentavam maior presença de bactérias pertencentes a família *Lachnospiraceae* e reduzida presença dos membros da família *Enterobacteriaceae*, sendo assim, é visível que a treonina antecipou o estabelecimento dos membros da família *Lachnospiraceae* na microbiota cecal.

As bactérias pertencentes a família *Lachonospiraceae* estão associados a produção de ácido butírico, que tem se mostrado como um excelente modulador de microbiota intestinal, reduzindo o crescimento de bactérias patogênicas (Rinttila e Apajalahti, 2013). A utilização de ácido butírico na dieta de frangos de corte tem se mostrado potente inibidor da colonização de *Salmonella* no trato gastrintestinal, como também, estimulador da mucosa intestinal (Van Immerseel et al., 2005). A antecipação do estabelecimento dos membros desta família pode garantir vantagens ao pintainho na melhoria saúde intestinal e no desenvolvimento precoce da mucosa intestinal na fase inicial (Panda et al., 2009).

É possível que o fornecimento de treonina *in ovo* possa ter favorecido maior produção de muco e consequentemente ter contribuído para colonização antecipada de determinados grupos bacterianos, como também, para o aumento da diversidade. Vale ressaltar que a colonização precoce por bactérias da microbiota comensal pode contribuir para melhoria da resposta dos pintainhos frente a desafios por microrganismos patogênicos. Em nosso estudo, observamos que a treonina contribuiu para redução da contagem cecal de *Salmonella* (168 hpi) e assegurou a manutenção da integridade intestinal (dados não apresentados).

Segundo Faure et al. (2006), alguns aminoácidos específicos, incluindo a treonina, são capazes de modular a microbiota intestinal, favorecendo o crescimento da microbiota comensal, e que provavelmente os mecanismos envolvidos no processo de modulação estejam relacionados com síntese de mucina. A mucina é o principal componente da camada de muco protetor, constituindo a primeira linha de defesa que as bactérias e outros organismos patogênicos encontram ao tentar atravessar a mucosa intestinal (McGuckin et al., 2011). Além disso, o muco é importante como substrato de fixação para bactérias comensais (Linden et al., 2008). O muco oferta grandes quantidades de substratos que contribuem para o estabelecimento da microbiota, sendo fonte de carboidratos, proteínas e nutrientes exógenos que estão fixados no muco, incluindo aminoácidos açúcares simples, vitaminas e minerais (Depanckle e Gaskins, 2001), favorecendo o estabelecimento e manutenção da microbiota comensal equilibrada que antagoniza o crescimento de bactérias com potencial patogênico (Faure et al., 2006).

O uso de treonina suplementada *in ovo* tem se mostrado benéfico na melhoria da resposta imune dos pintainhos e codornas na fase pós-eclosão, através do estímulo a síntese de mucina *(MUC2)* (Bhanja et al., 2014; Kermanshahi et al., 2015), melhoria na resposta imune humoral (Kadam et al., 2008) e maturidade antecipada da mucosa intestinal (Tahmasebi et al., 2015). Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que a suplementação de níveis elevados treonina na dieta proporcionaram melhorias na integridade da mucosa intestinal e no desempenho de pintainhos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis (Santos et al., 2013; Moreira Filho et al., 2015).

Em conclusão, a comunidade bacteriana logo após eclosão é pouco diversa e, com o avançar do desenvolvimento do pintainho, a comunidade é totalmente alterada tornando-se mais complexa. Diferente do que esperávamos, o desafio com *Salmonella* não proporcionou quaisquer alterações na microbiota cecal, demonstrando que a idade ao desafio pode interferir na resposta do animal. A treonina fornecida *in ovo* atua como modulador da microbiota cecal, aumentando a riqueza da comunidade bacteriana e altera a composição da microbiota cecal de forma benéfica. Mais estudos são necessários para compreensão dos fatores envolvidos na modulação da microbiota cecal através do uso de treonina *in ovo*, como também, das alterações na diversidade e composição da microbiota de pintainhos recém eclodidos desafiados com *Salmonella*.

**5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

BALLOU, A.N.; ALI, R.A.; MENDOZA, M.A. et al. Development of the chick microbiome: How early exposure influences future microbial diversity. **Frontiers in Veterinary Science**, v.3, p.1-12, 2016.

BHANJA, S.K.; SUDHAGAR, M.; GOEL, A. et al. Differential expression of growth and immunity related genes influenced by in ovo supplementation of amino acids in broiler chickens. **Journal of Animal Science**, v.9, p.399-408, 2014.

BOLGER, A.M.; LOHSE M.; USADEL, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for illumina sequence data. **Bioinformatics**, v.170, p.1-7, 2014.

CAPORASO, J.G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J. QIIME allows analysis of high-through put community sequencing data. **Nature Methods**. v.7, p.335-336, 2009.

CHAMBERS, J.R.; GONG, J. The intestinal microbiota and its modulation for *Salmonella* control in chickens. **Food Research International**. v.44, p.3149-3159, 2011.

COLE, J.R.; WANG, Q.; FISH, J.A. et al. Ribosomal database project: data and tools for high throughput rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, v.1244, p.1-10, 2013.

COSBY, D.E.; COX, N.A.; HARRISON, M.A. et al. *Salmonella* and antimicrobial resitance in broleirs: A review. **Journal Applied Poultry Research**. v.24, p.408-426, 2015.

CRHANOVA, M.; HRADECKA, H.; FALDYNOVA, M. et al. Immune response of chicken gut to natural colonization by gut microﬂora and to *Salmonella* enterica Serovar Enteritidis infection. **Infection and Immunity**.v.79, p.2755-2763, 2011.

DEPLANCKE B.; GASKINS, H.R. Microbial modulation of innate defense: globet cells and the intestinal mucus layer. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v.73, p.1131S-1141S, 2001.

DIBNER, J.J.; RICHARDS, J.D.; KNIGHT, C.D. Microbial imprinting in gut development and health. **Journal Applied Poultry Research**. v.17, p.174-188, 2008.

FAURE, M.; METTRAUX, C.; MOENNOZ, D. et al. Specific amino acids increase mucin synthesis and microbiota in dextran sulfate sodium-treated rats. **The Journal of Nutrition**. v.136, p.1558-1564, 2006.

GABRIEL, I.; LESSIRE, M.; MALLET, S. et al. Microflora of the digestive tract: critical factors and consequences for poultry. **World’s Poultry Science Journal**. v. 62, p.499–511, 2006.

JERALDO, P.; KALARI, K.; CHEN, X. et al. IM TORNADO: A tool for comparison of 16S reads from paired-end libraries. **PloSOne**. v.9, p.1-19, 2014.

JURICOVA, H.; VIDENSKA, P.; LUKAC, M. et al. Influence of *Salmonella* enterica sorovar Enteritidis infection on the development of the cecum microbiota in newly hatched chicks. **Applied and Environmental Microbiology**, v.79, p.745-747, 2013.

KADAM, M.M.; BHANJA, S.K.; MANDAL, A.B. et al. Effect of *in ovo* threonine supplementation on early growth, immunological responses and digestive enzyme activities in broiler chickens. **British Poultry Science**. v.49, p.736-741, 2008.

KERMANSHAHI, H.; DANESHMAND, A.; KHODAMBASHI, E. et al. Effect of *in ovo* injection of threonine on Mucin2 gene expression and digestive enzyme activity in Japanese quail (Coturnix japonica). **Research in Veterinary Science**, v.10, p.257-262, 2015.

LAN, Y.; VERSTEGEN, M.W.A.; TAMMINGA, S. et al. The role of the commensal gut microbial community in broiler chicken. **World’s Poultry Science Journal**. v.61, p.95-104, 2005.

LINDEN, S.K.; SUTTON, P.; KARLSSON, N.G. et al. Mucins in the mucosal barrier to infection. **Mucosal Immunology**. v.1, p.183–197, 2008.

LOZUPONE, C.; KNIGHT, R. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**. v.71, p.8228-8235, 2005.

LU, J.; IDRIS, U.; HARMON, B. et al. Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. **Applied Environmental Microbiology**, v.69, p.6816-6824, 2003.

MCDONALD, D.; CLEMENTE, J.C.; KUCZYNSKI, J. et al. The biological observation matrix (BIOM) format or: how I learned to stop worrying and love ome-ome. **GigaScience**, v.1, p.7, 2012.

MCGUCKIN, M.A.; LINDÉN, S.K.; SUTTON, P. et al. Mucin dynamics and enteric pathogens. **Focus on Mucosal Microbiolgy**, v.9, p.265-278, 2011.

MON, K.K.Z.; SAELAO, P.; HALSTEAD, M.M. et al. *Salmonella* enterica Serovars Enteritidis infection alters the indigenous microbiota diversity in young layer chicks. **Frontiers in Veterinary Science**. v.2, p.1-16, 2015.

MOND SHAUFI, M.A.; SIEO, C.C.; CHONG, C.W. et al. Deciphering chicken gut microbial dynamics based on high –throughput 16S rRNA metagenomics analyses. **Gut Pathogens**, v.7, p.1-12, 2015.

MOREIRA FILHO, A.L.B.; OLIVEIRA, C.J.B.; OLIVEIRA, H.B. et al. High incubation temperature and threonine dietary level improve ileum response against post-hatch *Salmonella* Enteritidis inoculation in broiler chickens. **PloSOne**, p.1-13, 2015.

NAWROCKI, E.P.; KOLBE, D.L.; EDDY, S.R. Infernal 1.0: Inference of RNA alignments. **Bioinformatics.**  v.25, p.1335-1337, 2009.

NORDENTOFT, S.; MOLBAK, L.; BJERRUM, L. et al. The influence of the cage system and colonization of *Salmonella* Enteritidis on the microbial gut flora of laying hens studied by T-RFLP and 454 pyrosequencing. **BMC Microbiology**. v.11, p.1-11, 2011.

PAN, D.; YU, Z. Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet. **Gut Microbes**. v.5, p.108-119, 2014.

PANDA, A.K.; RAMA RAO, S.V.; RAJU, M.V.L.N. et al. Effect of butyric acid on performance, gastrointestinal tract health and carcass characteristics in broiler chicken. **Asian-Austrian Journal Animal Science**, v.22 p.1026-1031, 2009.

PEDROSO, A.A.; MENTEN, J.F.M.; LAMBAIS, M.R. The structure of bacterial community in the intestines of newly hatched chicken. **Journal Applied Poultry Research**, v.14, p.232-237, 2005.

POLANSKY, O.; SEKELOVA, Z.; FALDYNOVA, M. et al. Important metabolic pathways and biological processes expressed by chicken cecal microbiota. **Applied and Environmental Microbiolgy**. v.82, p.1569-1576, 2016.

PRICE, M.N.; DEHAL, P.S.; ARKIN, A.P. FastTree 2 – approximately maximum-likelihood trees for large alignments. **PloSOne**. v.5, p.e9490, 2010.

QU, A.; BRULC, J.M.; WILSON, M.K. et al. Comparative metagenomics reveals host specific metavirulomes and horizontal gene transfer elements in the chicken cecum microbiome. **PloSOne**. v.3 p.e2945, 2008.

R CORE TEAM (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>

RANJITKAR, S.; LAWLEY, B.; TANNOCK, G. et al. Bacterial sucession in the broiler gastrointestinal tract. **Applied and Environmental Microbiology**. v.82, p.2399-2410, 2016.

RINTTILA, T.; APAJALAHTI, J. Intestinal microbiota and metabolites – Implications for broiler chicken health and performance. **Journal Applied Poultry Research**. v.22, p.647-658, 2013.

SANTOS, E.G.; COSTA, F.G.; SILVA, J.H. et al. Protective effect of mannan oligosaccharides against early colonization by *Salmonella* Enteritidis in chicks is improved by higher dietary threonine levels. **Journal Applied Microbiology**. v.114, p.1158–1165, 2013.

SCHLOSS, P.D.; WESTCOTT, S.L.; RYABIN, T. et al. Introducing mothur: open- source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied Environmental Microbiology**.v.75, p.7537–7541, 2009.

SMITH, A.L.; POWERS, C.; BEAL, R. The avian enteric immune system in health and disease. In: Schat KA, Kaspers B, Kaise P. editors. **Avian Immunology**. London:Academic Press; 2014. p 227–250.

STANLEY, D.; GEIER, M.S.; HUGHES, R.J. et al. Highly variable microbiota development in the chicken gastrointestinal tract. **PloSOne**. v.8, p.e84290, 2013.

TAHMASEBI, S.; TOGHYANI, M. Effect of arginine and threonine administered *in ovo* on digestive organ developments and subsequent growth performance of broiler chickens. **Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.5, p.947-956, 2015.

UNI, Z.; FERKET, P.R. Methods for early nutrition and their potential. **World’s Poultry Science Journal**. v.60, p.101-111, 2004.

UNI, Z.; SMIRNOV, A.; SKLAN, D. Pre- and posthatch development of globet cells in the broiler small intestine: effect of delayed access to feed. **Poultry Science**, v.82, p.320 -327, 2003a.

UNI, Z.; TAKO, E.; GAL-GARBER, O. Morphological, molecular, and functional changes in the chicken small intestine of the late-term embryo. **Poultry Science**. v.82, p.1747-1754, 2003b

VAN IMMERSEEL, F.; BOYEN, F.; GANTOIS, L. et al. Supplementation of coated butyric acid in the feed reduces colonization and shedding of *Salmonella* in Poultry. **Poultry Science**, v.84, p.1851-1856, 2005.

VAN IMMERSEEL, F.; DE ZUTTER, L.; HOUF, K. et al. Strategies to control Salmonella in the broiler production chain. **World’s Poultry Science Journal**. v.65, p.367-392, 2009.

VIDENSKA, P.; SISAK, F.; HAVLICKOVA, H. et al. Influence of Salmonella enterica serovar Enteritidis infection on the composition of chicken cecal microbiota. **BMC Veterinary Research**. v.9, p.1-8, 2013.

**CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Historicamente, a indústria avícola tem voltado os programas de melhoramento para obtenção de animais cada vez mais precoces, com alta taxa de crescimento, eficiência de conversão alimentar e rendimento de carne. No entanto, tem sido observado que animais altamente melhorados, com altas taxas de crescimento, tendem a uma diminuição da imunocompetência, tornando-se mais sensíveis a infecções por agentes patogênicos. Associado a isso, é cada vez maior a preocupação com segurança dos produtos avícolas, visto que, nos últimos anos, é crescente o número de intoxicações alimentares causadas pela ingestão de produtos de origem animal, entre estes, destacam-se os ovos e a carne de frango. Como consequência, os consumidores são cada vez mais exigentes, buscando produtos com qualidade e que ofereçam segurança para sua saúde.

Dessa forma, a *Salmonella* continua sendo uma das principais zoonoses associadas ao consumo de produtos avícolas no mundo, e a redução do agente em sistemas de produção de aves é uma das principais preocupações dos países exportadores de carne de frango. Assim, o presente estudo propôs avaliar o efeito da suplementação de treonina *in ovo* como alternativa de melhorar o status imunológico do pintainho, frente ao desafio com *Salmonella*. Os resultados obtidos no estudo demonstraram que a suplementação de treonina *in ovo* mostrou-se eficiente, permitindo a redução da contagem bacteriana total de *Salmonella* (168 dpi), o que resultou em melhorias no desenvolvimento inicial do pintinho, com a manutenção da integridade intestinal, resultando em ganhos no desempenho.

Portanto, a compreensão dos mecanismos de ação da treonina sobre as alterações na dinâmica da microbiota intestinal é de grande importância para o entendimento do fatores que podem alterar a microbiota residente. Com isso, a presente pesquisa abre uma porta para futuros estudos que visem avaliar o efeito da nutrição durante a embriogênese, sobre as alterações no desenvolvimento e estabelecimento da microbiota residente, como forma de manipular a microbiota de forma benéfica, para garantir melhorias na saúde intestinal dos pintainhos e assegurar resultados produtivos semelhantes aos que são observados com o uso de antibióticos como promotores de crescimento.