

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PROGRAMA DE DOUTORADO INTEGRADO EM ZOOTECNIA**

**EXPRESSÃO GÊNICA DE TRANSPORTADORES DE NUTRIENTES E
INTERLEUCINAS NO INTESTINO DE PINTAINHOS SUPLEMENTADOS COM
TREONINA *IN OVO* E INOCULADOS COM *SALMONELLA ENTERITIDIS***

MARIA DE FÁTIMA DE SOUZA ANDRADE

**AREIA – PB
FEVEREIRO DE 2019**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PROGRAMA DE DOUTORADO INTEGRADO EM ZOOTECNIA**

**EXPRESSÃO GÊNICA DE TRANSPORTADORES DE NUTRIENTES E
INTERLEUCINAS NO INTESTINO DE PINTAINHOS SUPLEMENTADOS COM
TREONINA *IN OVO* E INOCULADOS COM *SALMONELLA ENTERITIDIS***

**MARIA DE FÁTIMA DE SOUZA ANDRADE
Zootecnista**

**AREIA - PB
FEVEREIRO DE 2019**

MARIA DE FÁTIMA DE SOUZA ANDRADE

**EXPRESSÃO GÊNICA DE TRANSPORTADORES DE NUTRIENTES E
INTERLEUCINAS NO INTESTINO DE PINTAINHOS SUPLEMENTADOS COM
TREONINA *IN OVO* E INOCULADOS COM *SALMONELLA ENTERITIDIS***

Tese apresentada 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: Nutrição Animal

Comitê de Orientação:

Prof^a. Dr^a. Patrícia Emília Naves Givisiez
Prof. Dr. José Humberto Vilar da Silva
Prof. Dr. Oliveira Caetano de Freitas Neto

**AREIA - PB
FEVEREIRO DE 2019**

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

A553e Andrade, Maria de Fátima de Souza.

Expressão gênica de transportadores de
nutrientes e
interleucinas no intestino de pintainhos suplementados
com treonina in ovo e inoculados com Salmonella
Enteritidis / Maria de Fátima de Souza Andrade. -
Areia, 2019.
67f. : il.

Orientação: Patrícia Emília Naves Givisiez.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCA.

1. aminoácidos. 2. ceco. 3. frangos. 4.
inoculação. 5. pró-inflamatórias. 6. transporte de
nutrientes. I.
Givisiez, Patrícia Emília Naves. II. Título.

UFPB/CCA-AREIA



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE DOUTORADO INTEGRADO EM ZOOTECNIA**

PARECER DE DEFESA DO TRABALHO DE TESE

TÍTULO: “EXPRESSÃO GÊNICA DE TRANSPORTADORES DE NUTRIENTES E INTERLEUCINAS NO INTESTINO DE PINTAINHOS SUPLEMENTADOS COM TREONINA *IN OVO* E INOCULADOS COM *SALMONELLA ENTERITIDIS*”

AUTOR: Maria de Fátima de Souza Andrade

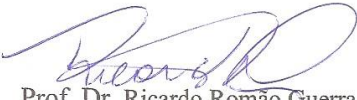
ORIENTADOR: Prof^a. Dra. Patrícia Emília Naves Givisiez

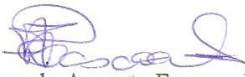
JULGAMENTO

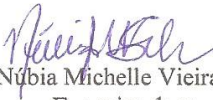
CONCEITO: APROVADO

EXAMINADORES:


Prof^a. Dra. Patrícia Emília Naves Givisiez
Presidente
Universidade Federal da Paraíba


Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra
Examinador
Universidade Federal da Paraíba


Prof. Dr. Leonardo Augusto Fonseca Pascoal
Examinador
Universidade Federal da Paraíba


Dra. Nubia Michelle Vieira da Silva
Examinadora
Universidade Federal da Paraíba/ PNPd


Prof^a. Dra. Tânia de Freitas Raso
Examinadora
Universidade de São Paulo

Areia, 22 de fevereiro de 2019

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MARIA DE FÁTIMA DE SOUZA ANDRADE iniciou o curso Técnico em Agropecuária da Universidade Estadual da Paraíba no ano de 2005. Ingressou no curso de Zootecnia da Universidade Federal da Paraíba no ano de 2008, foi bolsista de Iniciação Científica PIBIC/CNPq, durante três anos consecutivos. Diplomou-se Zootecnista no ano de 2013, sendo agraciada com o diploma de Láurea Acadêmica pelo excelente desempenho durante o curso de graduação. No ano de 2013, iniciou o curso de Mestrado em Zootecnia, pertencente a Universidade Federal da Paraíba no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (PPGZ), na Área de Produção Animal, obtendo o título de Mestre em Zootecnia no ano de 2015. No mesmo ano, iniciou o Doutorado em Zootecnia no Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia (PDIZ) da Universidade Federal da Paraíba, Universidade Federal Rural de Pernambuco e Universidade Federal do Ceará, na Área de Nutrição Animal, concluindo o referido curso em fevereiro de 2019, após defesa, julgamento e aprovação da tese, obtendo o título de Doutora em Zootecnia no ano de 2019.

EPÍGRAFE

“Em geral, o real sucesso profissional está mais relacionado com a sua vibração do que com a sua qualificação. Diplomas e certificados podem ser úteis, mas o mais relevante mesmo é a sua energia de amadurecimento para ir para a vida”.

Gisela Vallin

À Deus,
e a minha família,
meus pais,
Antônio Luis de Andrade e Sebastiana de Souza Andrade,
minha irmã **Patrícia de Souza Andrade Pimenta,**
meu cunhado **Francisco Fernandes Pimenta Neto,**
meu amado sobrinho **Pedro Henrique de Souza Pimenta**
e meus avós maternos, **Maria de Souza Santos e Inácio Pereira dos Santos** (*in memoriam*)

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** por estar sempre comigo.

À **Universidade Federal da Paraíba** (UFPB), através do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, pela oportunidade de realização deste curso.

Ao **Centro de Ciências Agrárias** (CCA), agradeço pelo acolhimento e pela possibilidade de crescimento pessoal e profissional.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** (CAPES), pelo auxílio financeiro concedido.

Ao **Centro de Atendimento Médico, Odontológico e Psicossocial** (CAMOPS) pertencente ao CCA/UFPB, seus funcionários em especial a psicóloga Tércia Pereira.

À Prof^a e orientadora, Dr^a. **Patrícia Emília Naves Givisiez**, pela sua generosidade, carinho, paciência, educação e atenção. Durante a minha jornada acadêmica, tive a satisfação de ser sua orientanda e poder aprender um pouco com o seu exemplo de ser humano e profissional ético.

Aos profissionais zootecnistas e médicos veterinários que fazem e fizeram parte da equipe do LAPOA, **Maylane, Priscylla, Núbia, Pavlos, Amanda, Ana Flávia, Mauro, Eudes Fernando** e a técnica de Laboratório **Juliana**.

Ao professor Dr. **Alexandre Lemos de Barros Moreira Filho**, que atualmente faz parte do quadro de professores da Universidade Federal de Rondônia, agradeço por todos os ensinamentos repassados durante sua permanência no LAPOA.

Aos meus amigos **Jonantan e Gildenia**, agradeço pela ótima receptividade em suas casas, pela amizade, generosidade e convívio.

A meu amigo **Eudes Fernando**, pela atenção e sempre disposto a ouvir meus problemas e me ajudar de alguma forma, obrigada meu amigo por estar presente durante esta fase da minha vida.

A minha amiga **Silvana**, minha conterrânea de esperança, agradeço pela sua amizade e pelos vários momentos de risadas, saiba que voce é um exemplo para mim de mulher guerreira e determinada, voce é uma pessoa que eu posso contar sempre.

Aos professores da banca examinadora do exame de qualificação e defesa de tese, meu muito obrigada pelas valiosas sugestões e contribuições, que abrilhantaram nosso trabalho.

Ao professor Dr. **Péricles de Farias Borges** (CCA-DCFS-UFPB), sempre disponível para auxiliar na parte da estatística.

A secretária do PDIZ, **Mayara Araújo** e a funcionária **Dona Carmen**, sempre muito atenciosas e prestativas.

Enfim, agradeço a todos os colegas, amigos e familiares que contribuíram de alguma forma e em algum momento para a realização e finalização deste trabalho.

SUMÁRIO	Páginas
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA E ABREVIACÕES	xiii
RESUMO GERAL	1
GENERAL ABSTRACT.....	3
CONSIDERAÇÕES INICIAIS	4
 CAPÍTULO I: Referencial Teórico	 5
1. Salmonelose na produção de frango de corte	6
2. Treonina e mucinas.....	8
3. Desenvolvimento embrionário	10
3.1 Fisiologia do embrião	10
3.2. Desenvolvimento intestinal embrionário.....	12
4. Resposta imune.....	15
5. Transporte de nutrientes	16
6. Nutrição aminoacídica <i>in ovo</i>	18
6.1 Estudos com suplementação de treonina <i>in ovo</i> e dietética e outros aminoácidos	20
7. Referências Bibliográficas.....	24
 CAPÍTULO II: Expressão gênica de transportadores de glicose, peptídeos e aminoácidos em frangos de corte suplementados com treonina <i>in ovo</i> e inoculados com <i>Salmonella</i> Enteritidis	 34
Resumo	35
Abstract.....	36
Introdução.....	37
Material e Métodos.....	39
Resultados	41
Discussão.....	43
Conclusão.....	46
Referências Bibliográficas.....	46
 CAPÍTULO III: Expressão gênica de interleucinas pró-inflamatórias no intestino de pintainhos suplementados com treonina <i>in ovo</i> e inoculados com <i>Salmonella</i> Enteritidis	 51
Resumo	52
Abstract.....	53
Introdução.....	54

Material e Métodos.....	55
Resultados.....	57
Discussão	59
Conclusão.	61
Referências Bibliográficas.....	61
CONSIDERAÇÕES FINAIS	66

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I	Páginas
Tabela 1. Estudos de suplementação de nutrientes <i>in ovo</i>	22
Tabela 2. Estudos de suplementação de aminoácidos e prebiótico.....	23
CAPÍTULO II	Páginas
Tabela 1. Genes em estudo, identificação da sequência de referência e sequência dos <i>primers</i> utilizados na qPCR.....	42
Tabela 2. Expressão relativa do mRNA de co-transportador de sódio e glicose (<i>Sglt1</i>), proteína transportadora de glicose 2 (<i>Glut2</i>), transportador de peptídeo 1 (<i>PepT1</i>) e transportador de aminoácido neutro de alanina, serina, cisteína e treonina (<i>ASCT1</i>) em frangos de corte suplementados com treonina <i>in ovo</i> às 168hpi com <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	43
Tabela 3. Desdobramento da expressão relativa do mRNA de transportador de peptídeo 1 (<i>PepT1</i>) e transportador de aminoácido neutro de alanina, serina, cisteína e treonina (<i>ASCT1</i>) em frangos de corte suplementados com treonina <i>in ovo</i> às 168 hpi com <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	44
CAPÍTULO III	Páginas
Tabela 1. Genes em estudo, identificação da sequência de referência e sequência dos <i>primers</i> utilizados na qPCR.....	58
Tabela 2. Expressão relativa do mRNA de interleucina 1 beta (<i>IL-1β</i>), interleucina 8 (<i>IL-8</i>), interleucina 17 (<i>IL-17</i>) e interleucina 22 (<i>IL-22</i>) em frangos de corte suplementados com treonina <i>in ovo</i> às 24 e 168hpi com <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	59
Tabela 3. Desdobramento da expressão relativa do mRNA de interleucina 1 beta (<i>IL-1β</i>), interleucina 8 (<i>IL-8</i>), interleucina 17 (<i>IL-17</i>) e interleucina 22 (<i>IL-22</i>) em frangos de corte suplementados com treonina <i>in ovo</i> às 168 hpi com <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	60

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Páginas

Figura 1. Compartimentos testados para a técnica de nutrição <i>in ovo</i> (Fonte: Ohta et al., 2001).....	14
---	----

CAPÍTULO II

Figura 1. Expressão relativa do mRNA de co-transportador de sódio e glicose (<i>Sglt1</i>), proteína transportadora de glicose 2 (<i>Glut2</i>), transportador de peptídeo 1 (<i>PepT1</i>) e transportador de aminoácido neutro (<i>ASCT1</i>) de frangos de corte na eclosão (a) e 2 dias de idade (b) em frangos de corte suplementados com treonina <i>in ovo</i> (NT: 0.0% Thr; T: 3.5% Thr).....	41
---	----

LISTA DE ABREVIACES

ASCT1 - Transportador de aminoácidos alanina, serina, cisteína e treonina um

Glut2 - Proteína transportadora de glicose dois

IFN- γ -Interferon gama

IL17 - Interleucina dezessete

IL1 β - Interleucina 1 beta

IL2 - Interleucina dois

IL22 - Interleucina vinte e dois

IL6 - Interleucina seis

IL8 - Interleucina oito

iNOS-óxido nítrico sintase

MUC2 - Mucina dois

PepT1 - Transportador de peptídeo um

Sgt1 - Co-transportador de sódio e glicose um

TGI - Trato gastrointestinal

Thr - Treonina

TNF α - Fator de Necrose Tumoral Alfa

TLR- receptores tipo Toll

EXPRESSÃO GÊNICA DE TRANSPORTADORES DE NUTRIENTES E INTERLEUCINAS NO INTESTINO DE PINTAINHOS SUPLEMENTADOS COM TREONINA *IN OVO* E INOCULADOS COM *SALMONELLA ENTERITIDIS*

RESUMO GERAL: Ao contrário dos mamíferos, o desenvolvimento embrionário das aves é restringido pelo conteúdo de nutrientes que estão presentes no ovo, o rápido crescimento das atuais linhagens de aves se depara em uma maior exigência metabólica, tornando o período pós-eclosão um ponto crítico na eficiência produtiva. A nutrição *in ovo* é uma prática que vem sendo alvo de recentes pesquisas, tem por finalidade fornecer nutrientes externos ao pintainho durante o desenvolvimento embrionário, aumentando o estado nutricional, além de permitir a introdução de nutrientes específicos em contato com as células do intestino delgado, antes mesmo da eclosão. Objetivou-se avaliar a suplementação com treonina (Thr) *in ovo* sobre a expressão gênica intestinal em pintainhos inoculados ou não com *Salmonella Enteritidis* pós-eclosão. Dessa forma, estudou-se o efeito da suplementação de Thr *in ovo* sobre a expressão de transportadores de glicose, peptídeos e aminoácidos no íleo de frangos de corte inoculados com *Salmonella Enteritidis*. A suplementação *in ovo* de Thr aumentou a expressão de *Sglt1* e *ASCT1* aos 2 dias de idade. Às 168 horas pós-inoculação, não houve interação entre os fatores (Treonina x *Salmonella*) para *Sglt1* e *Glut2*. A suplementação com Thr *in ovo*, aumentou a expressão de *Sglt1* e *Glut2*. A *Salmonella* diminuiu a expressão de *Glut2*. A suplementação com Thr *in ovo* aumentou a expressão de *PepT1* e *ASCT1*, independente da inoculação. Menor expressão de *Pept1* e *ASCT1* foi observada em aves inoculadas e suplementadas com Thr *in ovo*. Estudou-se o efeito da suplementação de Thr *in ovo* sobre a expressão relativa das interleucinas (*IL-1 β* , *IL-8*, *IL-17* e *IL-22*) no ceco de frangos de corte inoculados com *Salmonella Enteritidis*, considerando diferentes períodos pós-inoculação (24 e 168 horas). Para as aves 24 horas pós-inoculação, constatou-se que não houve interação entre os fatores, no entanto às 168 horas, houve interação para *IL-1 β* , *IL-8* e *IL-22*. A suplementação de Thr *in ovo*, diminuiu a expressão de *IL-1 β* às 24 horas pós-inoculação e *IL-8* às 168 horas pós-inoculação. Menor expressão de *IL-1 β* foi observada em aves suplementadas com Thr *in ovo*, e inoculadas ou não às 168 horas pós-inoculação. A expressão relativa dos genes às 24 horas pós-inoculação mostrou que há uma dinâmica igual entre as interleucinas. A *Salmonella* aumentou a expressão de *IL-8*, *IL-17* e *IL-22* em aves suplementadas com Thr *in ovo*. Os resultados obtidos no presente estudo indicam que a suplementação de Thr em embriões de frangos de corte promove aumento na expressão de genes de transportadores de glicose, peptídeos e aminoácidos após-eclosão, entretanto tal efeito não ocorre quando da inoculação

com *Salmonella* Enteritidis e aumenta a expressão de genes relacionados ao sistema imune em aves inoculadas com *Salmonella* Enteritidis.

Palavras-chave: aminoácidos, ceco, frangos, inoculação, pró-inflamatórias, transporte de nutrientes

GENE EXPRESSION OF NUTRIENT AND INTERLEUCIN TRANSPORTERS IN THE INTESTINE OF CHICKS SUPPLEMENTED WITH IN TREONINE AND INOCULATED WITH SALMONELLA ENTERITIDIS

GENERAL ABSTRACT: The presente study assessed the effects of threonine supplementation *in ovo* on the intestinal genic expression of chicks inoculated with *Salmonella* Enteritidis at 2 days of age. Glucose, peptide and amino acid transporter data are shown in Chapter II and cecum interleukin expression (*IL-1 β* , *IL-8*, *IL-17* and *IL-22*) data are shown in Chapter III. Threonine *in ovo* increased the expression of *Glut2* and *ASCT1* at hatch and the expression of all studied glucose transporters at two days of age, *Sglt1*, *Glut2*, *Pept1* and *ASCT1*. At 168 hours post inoculation (hpi), there was no interaction between the two factors (threonine x *Salmonella*) for para *Sglt1* and *Glut2*; Thr *in ovo* increased the expression of both genes and *Salmonella* decreased *Glut2*. Both expressions of *PepT1* and *ASCT1* were increased due to Thr *in ovo* independent of *Salmonella* inoculation status. For inoculated birds, *Pept1* and *ASCT1* expression was lower in birds supplemented *in ovo* with Thr. There was no interaction between the factors Threonine and *Salmonella* at 24 hpi, but there was interaction for *IL-1 β* , *IL-8* and *IL-22* at 168 hpi. Supplementation *in ovo* with Thr decreased the expression of *IL-1 β* at 24 hpi and *IL-8* at 168 hours post-inoculation. Lower *IL-1 β* expression was observed in birds supplemented with Thr *in ovo*, and inoculated or not, at 168 hours post-inoculation. The relative expression of all interleukins increased in birds inoculated with *Salmonella* after 24 hours, and *IL-17* increased at 168 hpi. *Salmonella* increased the expression of *IL-8*, *IL-17* e *IL-22* in the birds that had been supplemented with Thr *in ovo*. The results indicate that Threonine supplemented to embryos of broilers increased the post-hatch expression of glucose, peptide and amino acid transporters in the absence of *Salmonella* and increases the expression of genes related to the immune system in birds with or without *Salmonella* challenge.

Key words: amino acids, broilers, inoculation, nutriente transporters, pro-inflammatory, *Salmonella* Enteritidis

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

No segmento agropecuário, a avicultura é um dos setores mais dinâmicos e organizados do país, resultante de inovações tecnológicas que visam aumentar a produtividade e o faturamento da indústria. Destaca-se no mercado internacional de carnes, em volume de produção e qualidade de produtos, e a eficiência desta cadeia produtiva pode ser atribuída a diversos fatores como o desenvolvimento de novos conhecimentos em genética, manejo, nutrição, sanidade e ambiência.

Na avicultura industrial, é imprescindível a obtenção da segurança dos produtos avícolas, uma vez que produtos de origem animal são apontados como causadores de intoxicações alimentares em humanos. Entre os produtos, encontram-se carne de frango e ovos. Com isso, existe uma constante preocupação, por parte dos consumidores em relação ao controle da qualidade dos alimentos. A *Salmonella* é uma das principais bactérias responsáveis por intoxicações alimentares em todo o mundo, sendo considerada um grande problema de saúde pública. O consumo de alimentos contaminados por este agente patogênico pode causar quadros graves de salmonelose. Além do impacto na saúde pública, é também responsável por perdas econômicas no setor avícola.

Aves jovens são consideradas mais susceptíveis à contaminação por *Salmonella* quando comparadas as aves mais velhas. Após a infecção por microrganismos, ocorre ativação do sistema imune na tentativa de eliminar o agente patogênico, como também podem ser observadas injúrias na mucosa intestinal, prejudicando a integridade de vilosidades e criptas, havendo dessa forma comprometimento da saúde do trato gastrointestinal (TGI) e dos índices produtivos das aves. É primordial que o TGI apresente características estruturais funcionais favoráveis desde a ingestão até a absorção dos alimentos. Os nutrientes são absorvidos através dos enterócitos presentes no epitélio intestinal por meio de sistemas de transportadores de nutrientes localizados na membrana apical ou basolateral. A integridade da mucosa no trato gastrintestinal é primordial para que ocorram os processos de digestão e absorção dos nutrientes, e a treonina se destaca por ser um importante aminoácido que está envolvido nesta função biológica. Pesquisas envolvendo a expressão de genes relacionados aos processos de digestão e absorção de nutrientes fornecem importantes informações para melhorias na área de nutrição animal, possibilitando adequação na formulação de dietas e melhor utilização de diversos nutrientes.

A suplementação com treonina *in ovo* melhorou parâmetros de incubação e o estado nutricional do pintainho, resultando em bons índices produtivos. Além disso, tem contribuído

para o aumento da atividade de enzimas digestivas, maturação intestinal e resposta imune. A treonina está diretamente relacionada com a produção de muco intestinal, o qual contém mucinas e possui importante papel na resposta imune intestinal, formando uma barreira de proteção contra os agentes patogênicos.

Neste contexto, a presente tese está dividida em três capítulos. No capítulo I é apresentada uma revisão sobre temas relacionados à importância da treonina, desenvolvimento embrionário, técnica de nutrição *in ovo*, transportadores intestinais de nutrientes, salmoneloses na produção de frangos de corte e resposta imune em aves.

O segundo e o terceiro capítulo estão em formato de artigos científicos e apresentam dados de um experimento no qual foi realizado no Laboratório de Fisiologia Animal e Biologia Molecular, pertencente ao CCA da UFPB. O primeiro artigo tem como objetivo avaliar o efeito da suplementação de treonina *in ovo* sobre a mudança na expressão dos genes do co-transportador de sódio e glicose (*Sglt1*), proteína transportadora de glicose 2 (*Glut2*), transportador de peptídeo (*PepT1*) e transportador de aminoácidos (*ASCT1*) no íleo de frangos de corte desafiados por *Salmonella* Enteritidis. O segundo artigo científico, objetivou avaliar o efeito do fornecimento de treonina *in ovo* sob a expressão gênica de interleucinas pró-inflamatórias no ceco de frangos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis.

CAPÍTULO I –

Referencial teórico

REFERENCIAL TEÓRICO

1. SALMONELOSES NA PRODUÇÃO DE FRANGOS DE CORTE

As salmoneloses são enfermidades de origem bacteriana, causadas por bactérias do gênero *Salmonella*, consideradas de grande importância para saúde animal, e também uma das principais zoonoses de importância para saúde pública (Guerin et al., 2005). A *Salmonella* é uma das principais causas de doenças que são transmitidas por alimentos de origem avícola ao homem (Chranova et al., 2011), a partir de ovos e carne de frango contaminados (Kao et al., 2010). Por outro lado, a *Salmonella* pode também ser considerada uma bactéria comensal comum da microflora intestinal de animais, incluindo mamíferos, aves, répteis, anfíbios, peixes, crustáceos e moluscos (Heinitz, 2000; Bailey, 2010).

As bactérias do gênero *Salmonella* pertencem à família das *Enterobacteriaceae* e se dividem em duas espécies: *Salmonella enterica*, que contém mais de 2.500 sorovares, e *Salmonella bongori*, com 18 sorovares. A espécie *Salmonella enterica* subdivide-se em seis subespécies, capazes de infectar o homem e animais (Popoff et al., 2004). Entre os diversos sorovares existentes da espécie *S. enterica*, o sorovar Enteritidis está entre os cinco principais associados a infecções alimentares em humanos (Foley et al., 2011). Devido à alta prevalência de *Salmonella* em aves, os produtos avícolas são as fontes mais comuns de infecção desta bactéria (Borsoi et al., 2011).

De acordo com o relatório sobre as atividades de monitorização das zoonoses realizadas em 2013, em 32 países europeus, foram comunicados 82.694 casos confirmados de salmonelose por 27 Estados Membros (EM) da União Europeia (EU), resultando numa taxa de notificação da UE de 20,4 casos por 100.000 habitantes. Como em relatórios apresentados em anos anteriores, os dois sorotipos de *Salmonella* mais comumente relatados no ano de 2013 foram *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium, representando 39,5% e 20,2%, respectivamente, de todos os sorotipos relatados em casos confirmados em humanos (EFSA, 2015). Dados do Ministério da Saúde Brasileiro mostram *Salmonella* spp como o agente etiológico mais associado a surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil, nos anos entre 2000 a 2014, representando 38,2% do total de agentes notificados (Brasil, 2014).

O controle das salmoneloses como zoonose representa um desafio em função da complexidade epidemiológica, nos quais a prevalência dos diferentes sorovares pode variar entre estados e países, sendo proposto estabelecer medidas de vigilância e identificação destes sorovares em aves de produção e humanos (Souza, 2012).

Em aves, a transmissão de *Salmonella* pode ser do tipo vertical ou horizontal. Na forma vertical, ocorre contaminação do tecido reprodutivo na matriz e, durante formação do folículo da gema ou formação do albúmen no oviduto, os ovos férteis são contaminados com a bactéria (Cox et al., 2000). A transmissão horizontal está relacionada com a contaminação do ambiente e rações, nesse caso a doença passa entre os animais (Sterzo et al., 2008). A contaminação por *Salmonella spp* poderá ocorrer desde o sistema de produção de frangos, nas matrizes, incubatórios, transportes, aves silvestres e roedores nos abatedouros, até mesmo pela localização de abate. No entanto, é necessária a identificação da presença ou ausência de *Salmonella* (Cardoso e Tessari, 2008; Bailey et al., 2001).

Os ovos podem ser contaminados durante a passagem pela cloaca através da postura por meio do contato com fezes contaminadas ou pelo do contato com as fezes na cama, material de ninho, mãos do tratador, água, bandejas, cama, piso ou 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 a mucosa intestinal, as tonsilas cecais e placas de Peyer, onde ocasiona significativas alterações na dinâmica celular (Chappell et al., 2009). Na mucosa intestinal, causa a ruptura e afastamento das microvilosidades, e depois segue para a corrente sanguínea, tecido linfático, fígado, baço e tecido reprodutivo. Esta disseminação provoca lesões no organismo do animal, afetando seu desempenho produtivo (Chadfield et al., 2003). As interações iniciais de *Salmonella* com as células do hospedeiro são conduzidas principalmente pela bactéria. A fixação inicial pelas fimbrias e adesinas não fimbriais são seguidas por ancoragem permanente de *Salmonella* na superfície das células epiteliais. Isto é alcançado pelo mecanismo de penetração do sistema de secreção tipo III (Rychlik et al., 2014). A adesão é essencial para a patogenicidade da bactéria. Estas estruturas reconhecem receptores presentes nas células do hospedeiro. As adesinas possuem capacidade de ativar linfócitos B e neutrófilos, que resulta em uma variedade de respostas biológicas incluindo proliferação celular e secreção de citocinas (Edwards e Puente, 1998).

As aves são mais susceptíveis à contaminação por *Salmonella* durante os primeiros dias de vida, quando a microbiota intestinal não está totalmente estabelecida, favorecendo a rápida colonização pelo agente patogênico. As populações bacterianas comensais do epitélio intestinal atuam protegendo o hospedeiro da colonização de agentes patogênicos, pois competem pelos sítios de ligação e nutrientes disponíveis no epitélio e também produzem

bacteriocinas, fortalecendo assim, a resposta imune intestinal (Sansonetti, 2004; MacDonald e Monteleone, 2005).

Durante anos os antimicrobianos foram adicionados às dietas de animais criados para a produção de carne em níveis subterapêuticos, obtendo-se bons índices na eficiência alimentar e justificando sua utilização (Barros et al., 2012). No entanto, o excesso de antibióticos usados na produção animal potencialmente pode contribuir para o surgimento de bactérias resistentes, sendo esta uma causa de preocupação mundial (Garcia Migura et al., 2014). Dessa forma, a utilização de aves mais resistentes poderia levar a menor utilização e dependência de antibióticos e outros medicamentos na avicultura industrial (Jie e Liu, 2011).

2. TREONINA E MUCINAS

A treonina é o terceiro aminoácido limitante, após metionina e lisina, em dietas para frangos de corte formuladas principalmente por milho e farelo de soja (Kidd e Kerr, 1996; Corzo et al., 2007). Este aminoácido apresenta quatro isômeros químicos, sendo D e L treonina e D e L alotreonina (Lewis, 2001), sendo considerado um aminoácido de menor peso molecular (119,11 g/mol) e sua estrutura contém dois átomos de carbono assimétricos e uma cadeia lateral polar neutra. Possui características hidrofílicas com um grupo hidroxila capaz de formar ligações com a água (Marzzoco e Torres, 1999).

Os nutrientes necessários para a embriogênese são fornecidos pela matriz. Caso ocorram deficiências nutricionais durante o período de formação do ovo, poderá se refletir no embrião, no qual se encontra em fase de desenvolvimento (Kidd, et al., 2005). As dietas ofertadas as galinha são compostas principalmente por milho e soja, que contêm baixos níveis de L-treonina. Portanto, os ovos contêm pouca ou nenhuma L-treonina (Moran, 2007). Ainda que o ovo seja considerado completo em termos nutricionais, os percentuais de aminoácidos, carboidratos, vitaminas, minerais e lipídeos, são suficientes no terço inicial da incubação, estando aquém dos níveis desejáveis no terço final e durante a eclosão (Gonçalves et al., 2013). Durante o período inicial do crescimento embrionário há necessidade de aminoácidos tais como glicina, prolina, lisina e arginina. A treonina é o único precursor de glicina, desempenhando um papel importante para o crescimento embrionário (Kadam et al., 2008).

De acordo com Fernandez et al. (1994), a exigência de treonina para manutenção é alta, em relação aos demais aminoácidos, devido à alta taxa relativa da abundância nas secreções intestinais endógenas. É classificado como aminoácido essencial, e é determinante para crescimento e desenvolvimento intestinal, desempenhando papel importante na manutenção

da integridade, barreira intestinal e síntese de mucinas (Law et al., 2007; Wang et al., 2010), sendo, portanto, o maior componente presente no intestino (Kim et al., 2007). A treonina desempenha um papel vital como precursor da L-lisina e da serina e adicionalmente fornece excelente resposta imunológica e gastrointestinal produção de mucina (Kidd et al., 1999). O muco do intestino protege o epitélio contra a ação de toxinas, bactérias, autodigestão e abrasão física (Law et al., 2007). As secreções endógenas (muco e enzimas), o *turnover* protéico e a utilização dos aminoácidos pelas bactérias podem influenciar a digestibilidade e o uso da treonina pelo trato gastrointestinal (Melchior et al., 2006).

A treonina dietética é absorvida no intestino delgado, principalmente no íleo. Após a absorção, boa parte da treonina digestível é utilizada pelo próprio trato gastrointestinal. Estima-se que mais da metade da treonina consumida seja utilizada pelo intestino, direcionada às funções de manutenção (Le Bellego et al., 2002; Myrie et al., 2003; Corzo et al., 2007).

Assim, boa parte da exigência de treonina não está associada com a deposição de proteína muscular, mas com funções relacionadas ao trato gastrointestinal. Considerando a importância das secreções digestórias para a saúde do intestino e para o processo digestório, um nível adequado de treonina dietética é essencial para permitir uma função digestória adequada (Le Bellego et al., 2002).

O desenvolvimento de células secretoras de mucina no trato gastrointestinal (TGI), ou células caliciformes, ocorre durante o período final da fase embrionária e imediatamente pós-eclosão (período peri-eclosão). Estas células estão disseminadas ao longo das vilosidades intestinais e são responsáveis pela secreção da camada gelatinosa de muco, o qual recobre a parede do trato gastrointestinal, protegendo contra as enzimas digestivas e dano físico provocado pela digesta (Le Bellego et al., 2002). A mucina é o principal componente da camada de muco protetor da mucosa do TGI (Uni et al., 2003b). De acordo com Burrin et al. (2001) a composição do muco é água (95%) e mucinas (5%), sendo que as mucinas são glicoproteínas de alto peso molecular, especialmente ricas em treonina.

De acordo com Corzo et al. (2007), o tipo e a quantidade de mucina produzida no TGI afeta as comunidades microbianas (a mucina serve como um substrato para a fermentação bacteriana e fixação), disponibilidade de nutrientes (perdas via endógena de mucina, bem como a absorção de nutrientes na luz intestinal), e a função imunológica (através da regulação de comunidades microbianas e disponibilidade de nutrientes). Segundo Oviedo-Rondón et al. (2006) as mucinas gastrointestinais são constituintes da proteção luminal, agindo como a primeira linha de defesa do hospedeiro contra patógenos. De acordo com Le Bellego et al. (2002), por volta de 40% a 50% da treonina consumida pelos animais é usada pelo intestino,

para síntese de mucina. No entanto, como a mucina é resistente a digestão, é fermentada por micro-organismos intestinais ou excretadas. A baixa quantidade de mucinas no organismo da ave pode acarretar prejuízos sobre a resistência a doenças e dificuldades do animal em adaptar-se a mudanças na dieta. Robertson e Wright (1997) relataram que as mucinas são resistentes a enzimas proteolíticas do TGI, e a microbiota desempenha um papel importante na degradação. Algumas bactérias possuem glicosidases e glicosulfatases degradantes de mucinas. Dessa forma, a produção de mucina está intimamente relacionada aos níveis de treonina (Santos et al. 2013).

Os componentes da dieta têm potencial para induzir mudanças na dinâmica das mucinas (Uni et al., 2003b). A alteração na produção de mucinas pode causar efeito sobre a espessura, viscosidade, e integridade da camada de muco. Tais alterações implicam no funcionamento da proteção intestinal e pode interferir na absorção de nutrientes intestinais (Horn et al., 2009). A treonina ainda está intimamente associada às enzimas digestivas e mucosas no trato gastrintestinal (Yang et al., 1989).

Diante disso, o uso da treonina *in ovo* irá proporcionar maior peso corporal em relação ao grupo controle e aumento de peso dos pintos recém-eclodidos (Salmanzadeh et al., 2011). Melhor relação entre o peso do pintinho e do ovo, conversão alimentar e respostas humorais de pintos de corte (Kada et al., 2008).

3. DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

3.1 Fisiologia do embrião

O rápido crescimento das linhagens modernas e a alta exigência metabólica tornaram o período pós-eclosão um ponto crítico na eficiência produtiva avícola. O crescimento e desenvolvimento embrionário dependem dos componentes de nutrientes presentes no ovo, pois o pintainho desenvolve-se de forma independente da ave na qual o produziu (Macari, 1999; Gonçalves et al., 2013). O teor de carboidratos presentes no ovo é baixo, com menos de 1% do total, e apenas 0,3% deste é glicose livre (Uni et al., 2003a). A gema é composta por lipídeos, carboidratos, hormônios e anticorpos e, durante o início do desenvolvimento embrionário, constitui um fator importante para a taxa de crescimento do embrião (Ho et al., 2011).

De acordo com Moran (2007), o metabolismo embrionário pode ser dividido em 3 diferentes fases: implantação do embrião, finalização do embrião e preparação para eclosão.

A primeira fase caracteriza-se pela formação dos anexos embionários, que apoiam a sobrevivência do embrião. O fornecimento de oxigênio é limitado, devido às células sanguíneas apresentarem-se imaturas e a membrana corioalantóide ser pouco desenvolvida, e o substrato energético para o metabolismo inicial do embrião é fornecido através da glicose disponível no ovo (Moran, 2007).

Durante a segunda fase, ocorre rápido crescimento embrionário. O sistema vascular encontra-se totalmente desenvolvido e a membrana corialantoide é capaz de assegurar a troca de O_2 e CO_2 (Moran, 2007). Nessa fase, o embrião passa pela primeira alteração no seu metabolismo, pois dependia anteriormente de carboidratos como principal substrato energético, e torna-se dependente da oxidação lipídica como fonte de energia (Christensen et al., 1996). A respiração corioalantóica ocorre a partir do 8º dia de desenvolvimento embrionário em pintainhos (Baumann e Meuer, 1992), assegurando o suprimento adequado de oxigênio para o desenvolvimento do embrião (Moran, 2007). A viragem do ovo é crucial durante esta etapa, permitindo a formação adequada dos anexos embionários. A camada interna das células da membrana amniótica secreta líquido amniótico, banhando o embrião e protegendo-o de choque. O córion envolve todas as estruturas embrionárias e serve como uma membrana protetora. O crescimento do alantoide ocorre à medida que o embrião cresce, através da fusão entre o alantoide e o córion, resultando na membrana corioalantóide, responsável pela troca de oxigênio e dióxido de carbono com o meio ambiente e para o armazenamento de resíduos (Smith, 2007). 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).

Próximo à eclosão, o processo de saída do ovo inicia-se com a bicagem da membrana interna da casca, próximo à câmara de ar e corialantoide, juntamente com a respiração pulmonar embrionária. Quaisquer alterações metabólica ou fisiológica que ocorrerem neste período podem prejudicar o embrião, comprometendo seu desempenho produtivo pós-eclosão. A limitação de oxigênio suprime o consumo de lipídios como principal substrato energético, alterando o metabolismo para catabolismo anaeróbico da glicose a partir de reservas de glicogênio, produzindo lactato. Ao ocorrer o total desenvolvimento do tecido esquelético embrionário, os nutrientes absorvidos são utilizados para maturação de órgãos viscerais, sendo a maior parte armazenada como glicogênio, depositado no fígado e músculos (Klasing, 1998; Christensen et al., 1999; Collin et al., 2007; Leksrisonpong et al., 2007; Moran, 2007).

A insuficiência de glicogênio forçará o embrião a mobilizar proteína muscular a fim de realizar gliconeogênese, reduzindo o crescimento embrionário no final da incubação (Vieira e

Moran, 1999). O músculo peitoral possui grande capacidade de armazenamento de glicogênio durante o desenvolvimento embrionário, representando a maior quantidade de glicogênio total armazenado (Christensen et al., 2001; Uni et al., 2005; Foye et al., 2006). O músculo peitoral também é a principal fonte de aminoácidos, fornecendo intermediários para a gliconeogênese (Donaldson, 1995; Keirs et al., 2002; Warner et al., 2006).

Dessa forma, as informações sobre o desenvolvimento embrionário de aves para incubação enfatizam várias vias que estão associadas ao metabolismo energético durante este período, incluindo glicólise, gliconeogênese, glicogênese, glicogenólise e β -oxidação de ácidos graxos. A maioria dos desafios que os embriões encontram na primeira e última fase de incubação está associada à baixa disponibilidade de oxigênio. Isso ocorre porque, durante essas fases, os embriões só podem utilizar glicose e outros carboidratos como sua principal fonte de energia, e as vias da glicólise e da gliconeogênese são muito ativas (De Oliveira et al., 2008; Moran, 2007).

3.2 Desenvolvimento intestinal embrionário

O intestino delgado é especializado na digestão e absorção de nutrientes, e constitui a barreira entre o ambiente externo e interno da ave (Sobolewska, et al., 2017). O período equivalente aos últimos dias antes da eclosão e os primeiros dias pós-eclosão são considerados críticos, porque ocorrem rápidas e importantes mudanças no desenvolvimento intestinal (Ferket, 2012; Iji et al., 2001). No entanto, a habilidade funcional inicia-se a partir do terço final da incubação (Uni et al., 2003a; 2006).

O embrião possui limitada capacidade em digerir e absorver nutrientes, fato este observado através dos baixos níveis de expressão de mRNA de enzimas sacarase-isomaltase (SI), aminopeptidase (APN) e ATPase e o co-transportador de sódio e glicose (*Sglt1*) na mucosa intestinal (Uni et al., 2003b; Tako et al., 2004). Durante o terço final da embriogênese, os enterócitos encontram-se imaturos. No entanto, após a eclosão, ocorre o processo de maturação dos enterócitos e as vilosidades intestinais encontram-se mais longas, a fim de aumentar a área de superfície de absorção de nutrientes (Geyra et al., 2001; Uni et al., 2003a).

A partir do 15º dia de desenvolvimento embrionário (15DE), ocorrem mudanças no peso intestinal, vilosidades e expressão de transportadores intestinais de nutrientes e atividade de enzimas de borda escova, preparando o embrião para ingestão de alimentos exógenos. Assim, quanto mais cedo o pintainho alcançar a sua capacidade funcional, mais

rápido poderá utilizar os nutrientes dietéticos para atingir seu potencial genético, e resistir a doenças infecciosas (Uni et al., 2003a).

Durante o terço final de incubação ocorre mudança no peso do intestino em relação ao peso corporal do embrião (1% de desenvolvimento embrionário e 3,5% na eclosão). A partir do décimo quinto dia de desenvolvimento embrionário (15DE) foram observadas vilosidades rudimentares e a partir do 17º dia desenvolvimento embrionário (17DE) foi possível observar vilosidades intestinais em diferentes fases de desenvolvimento, nos quais foram divididos em duas fases de desenvolvimento (V1 e V2), com diferentes tamanhos e formas. V1 representa vilosidades longas com formato digitiforme e V2 vilosidades curtas com forma pontiaguda (Uni et al., 2003a).

O embrião possui enzimas digestivas que tornam possível a nutrição na fase pré-eclosão (Sklan et al., 2003). De acordo com Uni et al. (2003a), ocorre aumento da atividade de enzimas da borda em escova, que atuam na digestão de dissacarídeos, dipeptídeos e tripeptídeos, como também aumento dos transportadores intestinais a partir do décimo sexto dia de desenvolvimento embrionário (16DE) e a partir do vigésimo dia de desenvolvimento embrionário (20DE) com aumento de 15 a 40 vezes.

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. A atividade de isomaltase, aminopeptidase, transportador de sódio-glicose (*Sglt1*) e ATPase aumentaram a partir do décimo nono dia desenvolvimento embrionário (19DE), apresentando maior aumento no dia da eclosão (Uni et al., 2003a).

A altura das vilosidades intestinais aumenta aproximadamente 200-300% entre o 17º dia de desenvolvimento embrionário (17DE) e o momento da eclosão e o peso do intestino delgado aumenta mais rapidamente do que a massa corporal (Sell et al., 1991; Uni et al., 1999). No jejuno e íleo, o crescimento continua até o 14º dia (14DE), resultando em aumento no número de enterócitos por vilo (Noy e Sklan, 1997). O rápido crescimento observado na mucosa intestinal corresponde a aumento no número e tamanho de células, devido à proliferação e diferenciação acelerada de enterócitos, e à formação de criptas intestinais (Geyra et al., 2001).

Os enterócitos observados no intestino em embriões em desenvolvimento são pequenos, circulares e sem membrana de borda de escova definida. Os enterócitos ainda imaturos proliferam-se ao longo das vilosidades intestinais, uma vez que não existem células de cripta presentes no intestino delgado na fase final do desenvolvimento embrionário. Na

eclosão, as criptas são rudimentares e apenas uma única cripta por vilo observada (Geyra et al., 2001).

A quantidade de aminoácidos presente no ovo é apenas o suficiente para a eclosão. Durante o período inicial do crescimento embrionário, existe uma utilização elevada dos aminoácidos glicina, prolina, lisina e arginina. A proporção de glicina e arginina aumenta com o tempo de incubação. O aminoácido prolina é sintetizado a partir de vários aminoácidos, enquanto que os precursores da glicina são treonina e serina, glicina; sendo a glicina um aminoácido que é mais necessário na fase inicial de crescimento embrionário (Ohta et al., 1999). Al-Murrani (1982) mostrou que 55 mg de aminoácido administrado em ovo fértil, aumentou as reservas de proteína do embrião para 400 mg. Ohta et al. (1999) sugeriram que o efeito da suplementação de aminoácidos sobre o peso corporal e peso dos ovos em pintos recém-eclodidos, foi devido ao aumento das quantidades de aminoácidos na gema. Bhanja e Mandal (2005) documentou um aumento na ingestão de alimentos e taxa de conversão em pintos suplementados com aminoácidos em comparação com controle.

Na presença de nutrientes, a capacidade de absorção de determinado segmento intestinal será proporcional ao número, tamanho, área de superfície de vilos disponíveis para a absorção dos nutrientes (Macari, 1999).

4. RESPOSTA IMUNE

Os órgãos do sistema imune das aves classificam-se em primários e secundários, os primários por sua vez são constituídos pelo timo (local de desenvolvimento e amadurecimento dos linfócitos T) e bolsa cloacal (amadurecimento dos linfócitos B). Já os órgãos secundários são representados pela glândula de Harder, baço, tonsilas cecais, e placas de Peyer, e são aqueles encarregados pela migração ou agrupamento de células, formando sítos de amadurecimento/diferenciação e atuação (Yun et al., 2000; Mast e Goddeeris, 1999). Em aves, a defesa das mucosas do intestino, brônquios e conjuntiva, ocorre devido a tecidos linfoides altamente especializados, associados ao GALT, BALT e CALT, respectivamente (Santin et al., 2017).

A resposta imune das aves é dividida em inata e adaptativa e a maturidade funcional do sistema imune ocorre principalmente nas primeiras duas semanas de vida (Schokker et al., 2009; Bar-shira et al., 2003).

A microbiota intestinal é um dos componentes mais importantes da resistência do hospedeiro contra a infecção por *Salmonella*, visto que em frangos mais velhos são mais resistentes à infecção por *Salmonella* comparando-se a aves mais jovens (Beal et al., 2004; Withanage et al., 2005). Embora a infecção com *Salmonella* Enteritidis possa levar a doença sistêmica em pintainhos ou animais imunocomprometidos, em animais imunocompetentes de uma semana de idade ou mais, a infecção leva à ausência de sinais clínicos (Barrow e Freitas Neto, 2011).

A infecção por *Salmonella* no intestino de frangos é geralmente caracterizada pela indução de uma resposta inflamatória e aumento na expressão de genes específicos (Rychlik et al., 2014). Tal como nos modelos de infecção em mamíferos, *Salmonella* invade e persiste dentro de macrófagos e células dendríticas e, tal como em ratos, a progressão da infecção depende, em grande parte, da susceptibilidade do animal (Chappell et al., 2009). Quando o sistema imunológico está ativado, o organismo prioriza a proliferação de células de defesa, expressão de receptores para reconhecer antígenos, e produção de citocinas e anticorpos. Este aumento da atividade metabólica, devido à ativação do sistema imunológico, pode ser responsável pelo comprometimento do desempenho, fator este frequentemente observado durante períodos de desafio intestinal (Bortoluzzi et al., 2018).

A consequência da ativação da imunidade inata é um influxo de heterófilos (célula polimorfonuclear de aves e macrófagos no intestino. Embora estes possam levar a danos inflamatórios, eles também limitam largamente a doença invasiva (Kogut et al., 1994) No

estudo realizado por Van Immerseel et al. (2002), em frangos, foi observado aumento na quantidade de macrófagos, linfócitos T e linfócitos B3, as 24 e 48 horas respectivamente após desafio com *Salmonella* Enteritidis. Os heterófilos são as primeiras células imunes a migrarem para o sítio inflamatório. Além de realizarem fagocitose, são responsáveis pela secreção de interleucinas, tais como 1 *beta* (*IL-1 β*) e 8 (*IL-8*) (Fernandes et al., 2015; Khampeerathuch et al., 2018). Os receptores tipo Toll (TLR) bem como outros receptores celulares, ao reconhecerem a presença das estruturas padrões de antígenos, culminam uma série de modificações celulares com a produção de citocinas ou quimicocinas, que iniciam a resposta imunológica inata (Santin et al., 2017).

Alterações celulares também são acompanhadas por alterações na produção de citocinas, que são proteínas secretadas por células que possuem importante papel na ativação e regulação celular durante resposta imunológica e processos inflamatórios (Wigley e Kaiser, 2003). Aves desafiadas com *Salmonella* Enteritidis no primeiro dia de vida apresentaram aumento de *IL-1 β* , *IL-8*, *IL-17*, *IL-18*, *IL-22*, IFN- γ , e iNOS no ceco de 3 a 10 dias após inoculação (Crhanova et al., 2011). A interação entre o sistema imunológico do intestino e microbiota comensal em galinhas começa imediatamente após a eclosão e leva a um baixo nível de inflamação caracterizada pelo aumento da expressão de interleucina-8 (*IL-8*) (Bar-Shira e Friedman, 2006).

As células TH17 e TH22, por sua vez, irão participar do recrutamento de neutrófilos e da produção de citocinas, como a *IL-22*, a qual participa da manutenção da integridade epitelial (Santos et al., 2009). Estudos foram realizados por Crhanova et al. (2011), com a finalidade de avaliar o desenvolvimento de microflora do ceco e a maturação correspondente ao sistema imunológico do intestino, bem como a resposta frente a inoculação de *Salmonella* Enteritidis antes, durante e após a indução das interleucinas 8 e 17. Os autores observaram que galinhas responderam à colonização natural do ceco por um aumento da expressão de *IL-8* e *IL-17* na primeira semana de vida. Galinhas infectadas antes e durante a indução da microbiota através da expressão de *IL-8* e *IL-17* responderam à infecção por *Salmonella* Enteritidis através de Th1, enquanto as aves infectadas após este ponto de tempo, aos 16 dias de vida, responderam através da resposta imune com Th17.

5. TRANSPORTE DE NUTRIENTES

A absorção de nutrientes no intestino delgado é mediada por diferentes transportadores intestinais presentes na membrana apical ou basolateral dos enterócitos. Após transporte apical para o interior dos enterócitos, os produtos finais podem ser utilizados para o

metabolismo celular ou transportados para a corrente sanguínea através dos transportadores basolaterais (Gilbert et al., 2008; Taylor 2014).

Na membrana de borda em escova, o transportador de sódio-glicose *Sglt1* é responsável pelo transporte ativo de glicose (Wright, 2013). O transportador de glicose *Glut2* está localizado na membrana basolateral dos enterócitos e transporta monossacarídeos para fora das células epiteliais no intestino, em direção à corrente sanguínea (Su et al., 2014).

O transportador de peptídeo (*PepT1*), dependente de hidrogênio, é a proteína transportadora responsável pelo transporte das moléculas de di e tripeptídeos liberadas após o processo de digestão do conteúdo proteico (Speier et al., 2012). Gilbert et al. (2007) relataram que a expressão de mRNA de *PepT1* foi maior no duodeno comparando-se com os demais segmentos intestinais, na fase pós eclosão em frangos de corte. De acordo com Chen et al. (2005), a expressão do transportador *PepT1* depende de mudanças que ocorrem na dieta, na qualidade da alimentação e fase de desenvolvimento das aves, aumentando com a idade em todos os segmentos intestinais (Miska et al., 2015). A expressão de *PepT1* também aumentou à medida que embriões de pombos (*Columba livia*) aproximaram-se da eclosão (Dong et al., 2012). De acordo Zwarycz e Wang (2013), o aumento na expressão do gene *PepT1* pode ocorrer por meio de mudanças estruturais observadas no intestino delgado durante os estágios embrionários e pós-eclosão, como o aumento do número de enterócitos com a maturidade. Gilbert et al. (2007) observaram aumento linear dos níveis de mRNA de *Glut2*, *Sglt1* e *PepT1* e entre a eclosão e aos 14 dias de idade em pintainhos. Foye et al. (2009) observaram regulação positiva na expressão de *PepT1* no dia da eclosão, quando suplementaram arginina e beta-hidroxi beta-metilbutirato.

Os transportadores de aminoácidos *ASCT1* e *ASCT2* pertencem ao sistema de transporte de aminoácidos ASC. A expressão de mRNA do transportador de alanina, serina, cisteína, e treonina *ASCT1* aumentou em aves infectadas por *Eimeria maxima* e alimentados *ad libitum* (Miska e Fettere, 2018).

Vale lembrar que, enquanto a absorção de aminoácidos depende principalmente de seus transportadores presentes na membrana do enterócito (Wu et al., 2015), a abundância desses transportadores de aminoácidos depende também da presença de seus substratos no lúmen intestinal (Hatzoglou et al., 2004). Após absorção, os aminoácidos são utilizados em diversas vias metabólicas, incluindo a síntese proteica, e em variadas funções fisiológicas, incluindo crescimento, reprodução, sistema imunológico e formação de pele e penas (Moura et al., 2010).

O entendimento da capacidade do intestino em absorver nutrientes, tais como glicose e aminoácidos, entre outros, é imprescindível para adequação na formulação de dietas, de tal

forma que se adeque melhor tanto ao perfil enzimático quanto aos diversos mecanismos de transporte de nutrientes (Nir et al., 1993; Mahagna e Nir, 1996).

6. NUTRIÇÃO AMINOACÍDICA *IN OVO*

O fornecimento de nutrientes durante o desenvolvimento embrionário possibilita o contato de nutrientes específicos diretamente com as células da mucosa intestinal antes mesmo da eclosão, melhorando, dessa forma, a capacidade de digerir alimentos (Uni e Ferket, 2004). A técnica de suplementação de nutrientes *in ovo* deve ser realizada ao 17º dia de desenvolvimento embrionário (17DE), momento este que o embrião começa a ingerir oralmente o líquido amniótico e, conseqüentemente, as substâncias nele contidas (Pessoa et al., 2012). No entanto, as respostas favoráveis obtidas a partir desta técnica de suplementação de nutrientes não dependem apenas da composição da solução, mas de diversos outros fatores, tais como local específico de suplementação (Wakenell et al., 2002), volume e osmolaridade da solução (Ferket et al., 2005), entre outros.

Segundo Uni et al. (2001), quanto mais cedo à ave é alimentada, maior o desenvolvimento inicial do trato gastrointestinal e, portanto, melhor peso vivo. O rápido acesso ao alimento pode favorecer o desempenho do pintainho, por estimular as enzimas digestivas ocasionando em maior desenvolvimento das vilosidades intestinais. Visto que o acesso ao alimento é fundamental para o desenvolvimento precoce de pintos recém-eclodidos, a suplementação de nutrientes *in ovo* durante a fase embrionária mostra-se benéfica, melhorando o desenvolvimento do trato gastrointestinal, peso vivo e estado nutricional pós-eclosão (Geyra et al., 2001; Uni e Ferket, 2004).

Os primeiros estudos baseados no fornecimento de nutrientes *in ovo* foram reportados na década de 80. Al-Murrani (1982), injetou uma mistura de aminoácidos via saco vitelínico, semelhante ao perfil de aminoácidos do ovo. A suplementação *in ovo* foi realizada no sétimo dia de desenvolvimento embrionário. Como resultado, observaram-se melhorias no peso vivo na eclosão e aos 56 dias de idade, comparando-se ao tratamento controle. Em seguida, pesquisas também foram desenvolvidas a fim de aperfeiçoar a técnica de administração de vacinas *in ovo*, com efetividade contra a doença de Marek em exposição ao vírus (Sharma e Burmester, 1982).

Ohta et al. (1999) retomaram os trabalhos de Al-Murrani (1982), objetivando melhorar a eclodibilidade e o peso de pintinho na eclosão, através do efeito da suplementação de uma solução de aminoácidos *in ovo* em diferentes compartimentos, sendo o saco vitelino e na câmara de ar. A inoculação foi realizada nos dias 0 e 7 de desenvolvimento embrionário. A

administração de nutrientes na câmara de ar resultou em diminuição da eclodibilidade. O melhor compartimento para administrar nutrientes *in ovo*, observado nesse estudo foi o saco vitelínico, por garantir maior eclodibilidade e peso dos pintinhos. Portanto, Ohta et al. (1999) defendem que a suplementação de uma solução de aminoácidos, com um perfil de aminoácidos semelhante a de um ovo, no saco vitelino aos 7 de incubação pode efetivamente aumentar o peso dos pintinhos na eclosão.

Ohta et al. (2001) avaliaram o efeito dos diferentes locais de suplementação de aminoácido *in ovo*, sob a eclodibilidade e peso vivo de pintainhos. No primeiro experimento, uma solução de aminoácidos foi injetada *in ovo*, utilizando-se agulhas de calibres 19 mm e 13 mm e um grupo controle. Ao utilizar agulhas calibre 19 mm, houve redução na eclodibilidade. Houve aumento do peso vivo, no grupo injetado com agulhas calibre 13 mm. No segundo experimento, uma solução de tinta da Índia (0,5ml) foi injetada com agulhas calibres 19 mm e 13 mm. O local de injeção de tinta da Índia foi classificado em três grupos: cavidade amniótica, cavidade extra-embriônica e saco vitelino (Figura 1). A cavidade amniótica continha menos tinta da Índia em ovos injetados com a agulha de 13 mm em comparação com ovos injetados com a agulha de 19 mm. No entanto, os ovos injetados com a agulha de 13 mm apresentaram maior porcentagem de tinta da Índia no material extra-embriônico. No terceiro experimento, os ovos foram suplementados com aminoácidos na membrana corioalantóide, saco vitelino, celoma extra-embriônico, ou cavidade amniótica. Aminoácidos suplementados na membrana corioalantóide e cavidade amniótica resultaram em diminuição na eclodibilidade. Sugerindo que os melhores locais de injeção de aminoácidos *in ovo* são saco vitelino e o celoma extra-embriônico.

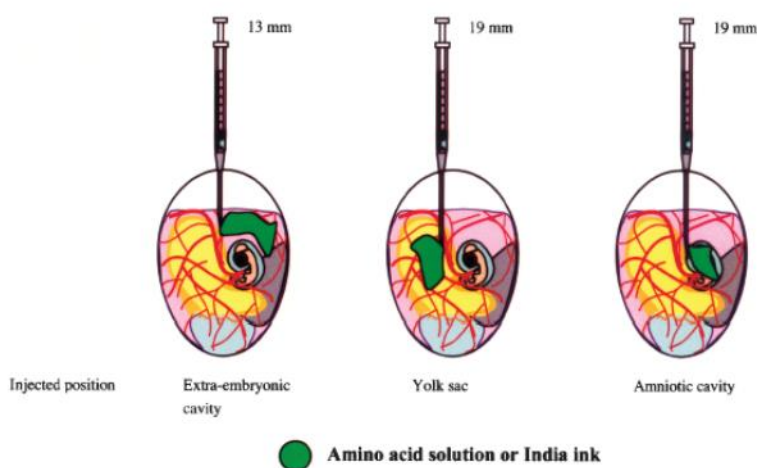


Figura 1. Compartimentos testados para a técnica de nutrição *in ovo* (Fonte: Ohta et al., 2001).

Estudos posteriores foram divulgados por Uni e Ferket (2003) com o objetivo de administrar soluções nutritivas no líquido amniótico, garantindo o consumo dos nutrientes pelo embrião. Assim, a técnica de administração *in ovo* de substâncias nutritivas de embriões de frangos e perus foi patenteada por Uni e Ferket (2003) (Patente EUA # 6.592.878 B2), discriminando o melhor local para a suplementação de nutrientes *in ovo* (via líquido amniótico) e considerando, ainda, 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.

O enriquecimento do líquido amniótico com carboidratos antes da eclosão, por exemplo, disponibilizaria energia para o embrião elevando a reserva de glicogênio e diminuindo o uso das proteínas musculares, contribuindo para melhor desempenho da ave (Uni et al., 2005).

Dessa forma, a administração de soluções nutritivas durante a fase embrionária afeta o estado fisiológico dos embriões antes e após-eclosão. A suplementação de nutrientes *in ovo* pode contribuir de forma benéfica ao estado nutricional de embriões na fase final de desenvolvimento, uma vez que contribui para melhorar as restrições de nutrientes limitados dos ovos e está associada a influências benéficas sobre a eclodibilidade, desenvolvimento e maturação da mucosa intestinal e peso vivo (Foye et al., 2006; Uni e Ferket, 2004). A partir da suplementação de uma solução de nutrientes no líquido amniótico, o embrião consome o conteúdo do líquido amniótico antes da eclosão, causando o contato de nutrientes suplementados ao tecido do trato gastrointestinal, ocasionando consequentemente o desenvolvimento mais rápido do trato digestivo e subsequente capacidade de absorção, dos nutrientes (Kadam et al., 2013).

Ao injetar aminoácidos *in ovo*, eles podem ser utilizados pelo embrião durante a fase de incubação dando suporte ao alto gasto energético da fase ou serem armazenados para serem utilizados posteriormente, quando o animal necessitar de reservas corporais (Tako et al., 2004). Na nutrição *in ovo*, os nutrientes entram em contato direto com a mucosa intestinal dias antes a eclosão via consumo do conteúdo amniótico. Dessa forma, é possível a obtenção de melhorias no estado nutricional dos embriões, acelerando o desenvolvimento intestinal, preparando-lhes para maior capacidade absorptiva e digestiva dos nutrientes. (Uni e Ferket, 2004). Tako et al. (2004) afirmam que o intestino de pintos suplementados *in ovo* é funcionalmente equivalente ao intestinos de aves com 2 dias de idade.

6.1 Estudos com suplementação de treonina *in ovo* e dietética e outros aminoácidos

Os resultados apresentados nas tabelas 1 e 2 são de trabalhos realizados com suplementação de treonina *in ovo* ou dietética. Sendo que, a partir destes, é possível observar que a treonina foi capaz de alterar de forma benéfica o desempenho, os parâmetros histológicos, aumento da atividade de enzimas e a expressão de MUC2, interleucinas e a população bacteriana benéfica no intestino em aves.

Treonina é um aminoácido essencial para o crescimento inicial do embrião (Bhanja e Mandal, 2005); a realização de suplementação *in ovo* no líquido amniótico transfere nutrientes para o intestino, estimulando o estado nutricional do embrião (Uni e Ferket, 2004).

MUC2 desempenha papel fundamental na manutenção das camadas de gel na superfície intestinal (Johansson et al., 2008). O aumento da expressão de mRNA do gene MUC2 pode levar a maior secreção mucinas no lúmen e subsequentemente melhorar a proteção contra patógenos e absorção de nutrientes no intestino delgado (Kermanshahi et al., 2015). A mucina é secretada pelas células caliciformes, portanto, um aumento na quantidade de mucina pode ser devido à maior taxa de secreção por células caliciformes ou devido ao maior número de células caliciformes por vilosidades (Kermanshahi et al., 2016). A redução da síntese de mucinas pode comprometer a camada de muco, reduzindo assim a utilização dos nutrientes (Smirnov et al., 2006). O desenvolvimento de células caliciformes inicia-se no período final do desenvolvimento embrionário; nesta fase, essas células contêm apenas mucinas ácidas (Uni et al., 2003b). Células caliciformes maduras contêm mucinas ácidas e neutras (Uni et al., 2003b).

Pesquisas anteriores indicaram que a suplementação de nutrientes *in ovo* melhorou a resposta imune (Kadam et al., 2013). Aves que receberam treonina e metionina+cistina *in ovo* apresentaram maior expressão dos genes *IL-2*, *IL-6* e *TNF- α* . Bhanja et al. (2014). A treonina é também requerida nas imunoglobulinas (Tenenhouse e Deutsch, 1966), e assim, a suplementação *in ovo* de treonina pode ocasionar em maior síntese de imunoglobulinas (Kermansashi et al., 2016).

Os aminoácidos, treonina e serina são precursores da síntese de glicina, como a utilização de glicina e prolina é alta durante o crescimento embrionário, a treonina *in ovo* poderia aumentar a conversão de treonina para glicina (Ohta et al., 1999). Altas doses de treonina *in ovo* (40 mg /ovo) resultava em tendência de menor peso do pintinho; a alta quantidade de treonina pode ter causado desequilíbrio dos aminoácidos (Kadam et al., 2008).

Aminoácido suplementado <i>in ovo</i> (dose)	Referência	Estágio de incubação	Local de suplementação	Resultado
Treonina (10, 20, 30 ou 40 mg)	Kadam et al. (2008)	Estágio final	Saco vitelino	Não houve efeito negativo da suplementação de treonina <i>in ovo</i> sobre a taxa de eclosão; efeitos benéficos da suplementação sobre o peso na eclosão. Melhorou o crescimento pós-eclosão e atividade das enzimas digestivas em frangos de corte; maior ganho de peso nos períodos de 14-21 e 21-28 dias, melhor conversão alimentar; maior consumo de ração, aumento na atividade da pepsina no proventrículo e da amilase no pâncreas, melhoria da resposta imune humoral.
Treonina (15, 20, 25, 30 e 35 mg)	Salmanzadeh et al (2011)	Estágio inicial	Albúmen	Redução na taxa de eclodibilidade e maior peso à eclosão.
Treonina (5 mg/ml)	Kermanshahi et al. (2015)	Estágio inicial	Câmara de ar	Aumento da expressão de mucina (MUC2); aumento na síntese de mucinas no epitélio intestinal em codornas.
Treonina (0.5 mg/ml)	Kermanshahi et al. (2016)	Estágio inicial	Câmara de ar	Maior altura de vilosidade, área de superfície de vilo, relação vilosidade/cripta e número de células de caliciformes no jejuno de codornas japonesas.
(Treonina 3.5%)	Moreira Filho et al. 2018	Estágio final	Líquido amniótico	Melhorou o desempenho, parâmetros histológicos, maior peso à eclosão, reduziu a colonização por <i>S. Enteritidis</i> , aumento da expressão de MUC2 e IgA.
Arginina (35 mg); treonina (25mg) ou arginina + treonina (35 mg + 25 mg)	Toghyani et al. (2012)	Estágio final	Âmnion	Eclodibilidade do ovo diminuiu com suplementação de Arg e Arg + Thr; o peso do íleo aumentou na injeção de Thr.
Lisina (55mg), arginina (62,5 mg), treonina (40 mg) e metionina+cistina (45mg)	Bhanja et al. (2014)	Estágio final	Líquido amniótico	Aumento da expressão de mucina (MUC2); aumento na síntese de mucinas no epitélio intestinal e aumento na expressão de interleucinas em frangos.
Arginina (35mg), treonina (25mg) e treonina+arginina (25 mg+35 mg)	Tahmasebi et al. (2015)	Estágio final	Cavidade amniótica	Não houve efeito negativo da suplementação de treonina <i>in ovo</i> sobre a taxa de eclosão. Maior consumo de ração e peso ao final do ciclo produtivo (42 dias), melhor rendimento de carcaça da eclosão até os 11 dias de idade, maior comprimento do jejuno e íleo nos animais suplementados <i>in ovo</i> com treonina, arginina e treonina+arginina, efeitos benéficos da suplementação sobre o peso na eclosão.

Tabela 2. Estudos de suplementação de aminoácidos e prebiótico

Aminoácidos suplementado na dieta e prebiótico	Referência	Idade	Resultado
Treonina	Azzam et al. (2011)	40 semanas	Aumento da expressão de MUC2 e IgA no íleo, a medida que aumentaram os níveis de treonina na dieta em galinhas poedeiras criadas em clima quente e úmido
Treonina	Moghaddam et al. (2011)	14 dias	Melhor desempenho e altura de vilosidade, profundidade de cripta e superfície das vilosidades quando a treonina dietética aumentou de 0,8% para 0,87%
Treonina	Azzam et al. (2012)	40 semanas	Aumento na produção de ovos e a concentração de IgG sérica, L-treonina maximizaram a concentração de superóxido dismutases
Treonin	Moreira Filho et al. (2015)	10 dias	Melhor integridade da mucosa intestinal e desempenho de pintainhos desafiados com <i>S. Enteritidis</i> ; incremento na produção de mucinas; pintainhos desafiados e suplementados com alto nível de treonina na dieta apresentaram redução no número de animais positivos para <i>Salmonella</i> e redução na contagem bacteriana cecal; incremento na produção de mucinas intestinais
Treonina	Bi et al. (2017)	21 dias	Melhor consumo de ração, peso vivo e peso relativo de peito e perna, peso do fígado, bursa de Fabricius, baço e timo; (IgA); aumento da expressão de mRNA MUC2 em patos
Treonina	Chen et al. (2017)	21 dias	Aumento do peso relativo do baço, timo redução da contagem bacteriana para colônias de <i>Salmonella</i> e <i>E. coli</i> , aumento das colônias de <i>Lactobacillus</i> no conteúdo cecal; aumento da altura das vilosidades, e a relação vilo:cripta em frangos
Mananoligossacarídeo (MOS) e treonina	Santos et al. (2013)	10 dias	Aves suplementadas com treonina e MOS apresentaram baixa contagem bacteriana cecal para <i>Salmonella Enteritidis</i>

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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 mucin2 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.
- AZZAM, M.M.M.; A.B.; DONG, X.Y.; XIE, A.P. et al. Zou a Influence of L–threonine supplementation on goblet cell numbers, histological structure and antioxidante enzyme activities of laying hens reared in a hot and humid climate British. **Poultry Science**, v.53, p. 640-645, 2012.
- BAILEY, J.S.; STERN, N.J.; FEDORKA-CRAY, P. et al. Sources and Movement of Salmonella through Integrated Poultry Operations: A Multistate Epidemiological Investigation. **Journal of Food Protection**, v.64, p.1690-1697, 2001.
- BAILEY, J.S.; RICHARDSON, L.J.; COX, N.A. et al. *Salmonella* in Pathogens and Toxins in Food: Challenges and Interventions. V. K., Juneja, and J. N. Sofos, eds. ASM, Washington, D.C, p.108–118, 2010.
- BARROS, R.; VIEIRA, S.L.; FAVERO, A. et al. Reassessing flavophospholipol effects on broiler performance. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.41, p.2458-2462, 2012.
- BARROW, P.; FREITAS NETO, O.C. Pullorum disease and fowl typhoid--new thoughts on old diseases: a review. **Avian Pathology**, v.40, p.1–13, 2011
- BAR-SHIRA, E.; SKLAN, D.; FRIEDMAN, A. Establishment of immune competence in the avian GALT during the immediate post-hatch period. **Developmental and Comparative Immunology**, v.27, p.147–57, 2003.
- BAUMANN, R.; MEUER, H.J. Blood oxygen transport in the early avian embryo. **Physiological Reviews**, v.72, p.941-964, 1992.
- BEAL, R.K.; POWERS, C.; WIGLEY, P. et al. Temporal dynamics of the cellular, humoral and cytokine responses in chickens during primary and secondary infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Avian Pathology**, v.33, p.25–33, 2004.
- BROER, S. Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. **Physiological Reviews**, v.88, p.249-286, 2008.
- BHANJA, S.K.; MANDAL, A.B. Effect of in ovo injection of critical amino acids on pre and post hatch growth, immunocompetence and development of digestive organs in broiler chickens. **Asian Australasian Journal of Animal Science**, v.18, p.524–531, 2005.
- 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.

BI, Y.; NAN, X. M.; ZHENG, S. S. Effects of dietary threonine and immune stress on growth performance, carcass trait, serum immune parameters, and intestinal muc2 and NF- κ b gene expression in Pekin ducks from hatch to 21 days. **Poultry Science**, v.0, p.1–11, 2017.

BORSOI, A.; RUSCHEL, S.L.; RODRIGUES, B.L. et al. Behavior of *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Enteritidis strains following broiler chick inoculation: evaluation of cecal morphometry, liver and cecum bacterial counts and fecal excretion patterns. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.42, p.266-273, 2011.

BORTOLUZZI, C.; ROCHELL, S.J.; APPELEGATE, T.J. Threonine, arginine, and glutamine: Influences on intestinal physiology, immunology, and microbiology in broilers. **Poultry Science**, v.0, p.1–9, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. (MS/SVS/DEVIT). **Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos – VE – DTA**. São Paulo, 2014.

BURRIN, D.G.; STOLL, B.; JIANG, R. et al. Minimal enteral nutrient requirements for intestinal growth in neonatal piglets: how much is enough? **American Journal Clinical Nutrition**, v.71, p.1603-1610, 2001.

CARDOSO, A.L.S.P.; TESSARI, E.N.C. *Salmonella* na Segurança dos Alimentos. **Biológico**, n.1, v.70, p.11-13, 2008.

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.

CHAPPELL, L.; KAISER, P.; BARROW, P.; et al. The immunobiology of avian systemic salmonellosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.128, n.1-3, p.53-59, 2009.

CHEN, Y. P.; CHENG, Y. F.; LI, X. H. et al. Effects of threonine supplementation on the growth performance, immunity, oxidative status, intestinal integrity, and barrier function of broilers at the early age. **Poultry Science**, v.96, p. 405–413, 2017.

CHRISTENSEN, V.L.; DONALDSON, W.E.; MCMURTRY, J.P. Physiological differences in late embryos from turkey breeders at different ages. **Poultry Science**, v.75, p.172-178, 1996.

CHRISTENSEN, V.L.; DONALDSON, W.E.; NESTOR, K.E. Length of the plateau and pipping stages of incubation affects the physiology and survival of turkeys. **British Poultry Science**, v.40, p.297-303, 1999.

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

COLLIN, A.; BERRI, C.; TESSERAUD, S. et al. Effects of thermal manipulation during early and late embryogenesis on thermotolerance and breast muscle characteristics in broiler chickens. **Poultry Science**, v.86, p.795-800, 2007.

CORZO, A.; KIDD, M.K.; DOZIER, W.A. et al. Dietary threonine need for growth and immunity of broilers raised under different litter conditions. **Journal Applied Poultry**

Research, v.16, p.574-582, 2007.

COX, N.A.; BERRANG, 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, n.7, p.2755–2763, 2011.

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.

DONG, X.Y.; WANG, Y.M.; YUAN, C. The ontogeny of nutrient transporter and digestive enzyme gene expression. in domestic pigeon (*Columba livia*) intestine and yolk sac membrane during pre- and posthatch development. **Poultry Science**, v.91, p.1974–1982, 2012.

DONALDSON, W.E. Carbohydrate, hatchery stressors affect poultry survival. **In Feedstuffs**, v.67, p.16-17, 1995.

EDWARDS, R.A.; PUENTE, J.L. Fimbrial expression in enteric bacteria: a critical step in intestinal pathogenesis. **Trends Microbiology**, v.6, n.7, p.282-287, 1998.

EFSA; ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2015. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2013. **EFSA Journal**, 13(1):3991, 162 p, 2015.

FERKET, P.; DE OLIVEIRA, J.; GHANE, A. et al. Effect of in ovo solution osmolality on hatching turkeys. In: INTERNATIONAL POULTRY SCIENTIFIC FORUM, 2005, Atlanta. **Abstracts...** Atlanta: Poultry Science Association, 118p, 2005.

FERKET, P.R. Embryo epigenomic response to breeder management and nutrition. In: **XXIV World's Poultry Congress**, Salvador-Bahia-Brazil, p.1-11, 2012.

FERNANDES, D.C.; ETO, S.F.; CLAUDIANO, G.S. et al. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v.17, p.131-40, 2015.

FERNANDEZ, S.F.; OYAGI, S.; HAN, Y. et al. Limiting Order of amino acids in corn and soybean meal for growth of the chick. **Poultry Science**, v.73, p.1887-1896, 1994.

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.; UNI, Z.; FERKET, P.R. Effect of *in ovo* feeding egg white protein, β hydroxy- β -methylbutyrate, and carbohydrates on glycogen status and neonatal growth of turkeys. **Poultry Science**, v.85, p.309-317, 2006.

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

GARCIA MIGURA, L.; HENDRIKSEN, R.S.; FRAILE, L. et al. Antimicrobial resistance of zoonotic and commensal bacteria in Europe: The missing link between consumption and resistance in veterinary medicine. **Veterinary Microbiology**, v.170, p.1-9, 2014.

GEYRA, A.; UNI, Z.; SKLAN, D. Enterocyte dynamics and mucosal development in the posthatch chick. **Poultry Science**, v.80, p.776-782, 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. Dietary and developmental regulation of nutrient transporter gene expression in the small intestine of two lines of broilers. **Dissertation** (PhD in Animal and Poultry Sciences) - Virginia Polytechnic Institute and State University, 254p, 2008.

GONÇALVES, F.M.; SANTOS, V.L.; CONTREIRA, C.L. et al. *In ovo* nutrition: strategy for precision nutrition in poultry industry. **Archivos de Zootecnia**, v.62, p.45-55, 2013.

GUERIN, P.J.; VOLD, L.; AAVITSLAND, P. Communicable disease control in a migrant seasonal workers population: a case study in Norway. **Euro Surveillance**, v.10, p.48-50, 2005.

HATZOGLU, M.; FERNANDEZ, J.; YAMAN, I. et al. Regulation of cationic amino acid transport: the story of the CAT-1 transporter. **Annual Review of Nutrition**, v.24, p.377-399, 2004.

HEINITZ, M.L.; RUBLE, R.D.; WAGNER, D.E. et al. Incidence of *Salmonella* in fish and seafood. **Journal of Food Protection**, v.63, p.579-592, 2000.

HO, D. H.; REED, W.L.; BURGGREN, W.W. Egg yolk environment differentially influences physiological and morphological development of broiler and layer chicken embryos. **The Journal of Experimental biology**, p.619-628, 2011.

HORN, N.L.; DONKIN, S.S.; APPLGATE, 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.

HUMPHREY, B.D.; STEPHENSEN, C.B.; CALVERT, C.C. et al. Glucose and cationic amino acid transporter expression in growing chickens (*Gallus gallus domesticus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, p.515-525, 2004.

IJI, P.A.; SAKI, A.; TIVEY, D.R. Body and intestinal growth of broiler chicks on a commercial starter diet. I. Intestinal weight and mucosal development. **British Poultry Science**, v.42, p.505-513, 2001.

JIE, H.; LIU, Y.P. Breeding for disease resistance in poultry: Opportunities with challenges. **World's Poultry Science Journal**, v.67, p.687-695, 2011.

JOHANSSON, M.E.; PHILLIPSON, M.; PETERSSON, J. et al. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. **Proceeding of National Academic of Science**, p.15064-15069, 2008.

- KAO, J. Y.; ZHANG, M.; MILLER, M. J. et al. *Helicobacter pylori* immune escape is mediated by dendritic cell-induced Treg skewing and Th17 suppression in mice. **Gastroenterology**, v.138, p.1046–1054, 2010.
- 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.
- 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.
- KEIRS, R.W.; PEEBLES, E.D.; HUBBARD, S.A. Effects of supportative gluconeogenic substrates on early performance of broilers under adequate brooding conditions. **Journal of Applied Poultry Research**, v.11, p.367-372, 2002.
- KERMANSHAHI, H.; DANESHMAND, A.; KHODAMBASHI, E.N. 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.100, p.257-262, 2015.
- KERMANSHAHI, H.; GOLIANA, A.; EMAMIA, N.K. Effects of *in ovo* injection of threonine on hatchability, intestinal morphology, and somatic attributes in Japanese quail (*Coturnix japonica*). **Journal of Applied animal Research**, v.45, p.437-444, 2016.
- KHAMPEERATHUCH, T.; MUDSAK, A.; SRIKOK, S. et al. Differential gene expression in heterophils isolated from commercial hybrid and Thai indigenous broiler chickens under quercetin supplementation. **Journal of Applied Animal Research**, v.46, p.804–812, 2018.
- KIDD, M.T.; KERR, B.J. L-threonine for poultry: A review. J. **The Journal of Applied Poultry Research**, v.5, p.358-367, 1996.
- KIDD, M. T.; LERNER, S. P.; ALLARD, J.P. et al. Threonine needs of finishing broilers, growth, carcass and economic response. **Journal of Applied Poultry Research**, v.8, p.160–169, 1999.
- KIDD, M.T.; MCDANIEL, C.D., PEEBLES, E.D. et al. **British Poultry Science**, v.46, p.97-103, 2005.
- KIM, S.W.; MATEO, R.D.; YIN, Y.L. Functional amino acids and fatty acids for enhancing production performance of sows and piglets. **Asian Australasian Journal Animal Sciences**, v.20, p.295-306, 2007.
- KLASING, K.C. Nutritional modulation of resistance to infectious diseases. **Poultry Science**, v.77, p.1119-1125, 1998.
- KOGUT, M.H.; TELLEZ, G.I.; MCGRUDER, E.D. et al. Heterophils are decisive components in the early responses of chick-ens to *Salmonella enteritidis* infections. **Microbial Pathogenesis**, v.16, p.141–51, 1994.
- 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 Liver Physiology**, v.292, p.1293-1301, 2007.

LE BELLEGO, L.; RELANDEAU, C.; VAN CAUWENBERGHE, S. Threonine: a key nutrient for the gut. **Ajinomoto Eurolysine Information**, n.26, p.14-17, 2002.

LEKSRISOMPONG, N.; ROMERO-SANCHEZ, H.; PLUMSTEAD, P.W. et al. Broiler incubation. 1. Effect of elevated temperature during late incubation on body weight and organs of chicks. **Poultry Science**, v.86, p.2685-2691, 2007.

LEWIS, A. J. Amino acids in swine nutrition. In: LEWIS, A. J. (Ed.) **Swine nutrition**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press. p.131-150, 2001.

MACARI, M. Fisiologia do sistema digestivo das aves (II). Aves e ovos. v.15, p.2-20, 1999.

MACDONALD, T.T.; MONTELEONE, G. Immunity, inflammation, and allergy in the gut. **Science**, v.307, p.1920-1925, 2005.

MARZZOCO, A.; TORRES, B.B. **Bioquímica Básica**. 2. ed., Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1999.

MAHAGNA, M.; NIR, I. Comparative development of digestive organs, intestinal disaccharidases and some blood metabolites in broiler and layer-type chicks after hatching. **British Poultry Science**, v.37, p.359-371, 1996.

MAST, J.; GODDEERIS, B.M. Development of immunocompetence of broiler chickens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.70, p.245-56, 1999.

MELCHIOR, D.; LE BELLEGO, L.; RELANDEAU, C. Impact of the withdrawal of antimicrobial growth promoters and health status on the amino acid requirement of the pig. **Ajinomoto Eurolysine S.A.S**, Technical Information, n.29, p.1-12, 2006.

MISKA, K.,R.; FETTERER, R.H. WONG, E.A. mRNA expression of amino acid transporters, aminopeptidase, and the di- and tri-peptide transporter PepT1 in the intestine and liver of posthatch broiler chicks **Poultry Science**, v. 94, p. 1323–1332, 2015.

MISKA, K. B.; FETTERER, R.H. The effect of *Eimeria maxima* infection on the expression of amino acid and sugar transporters aminopeptidase, as well as the di- and tri-peptide transporter PepT1, is not solely due to decreased feed intake. **Poultry Science**, v.97, p.1712–1721, 2018.

MORAN, E.T.J. Nutrition of the developing embryo and hatchling. **Poultry Science**, v.86, p. 1043-1049, 2007.

MOURA, A.M.A.; MELO, T.V.; MIRANDA, D.J. A utilização da DL metionina e metionina hidroxí-análoga na alimentação de ave. **Revista de Ciência da Produção Animal**, v.67, p.97-107, 2010.

MYRIE, S.B.; BERTOLO, R.S.; SAURER, W. C. et al. Threonine requirement and availability are affected by feed that stimulate gut mucin. **Advances in Pork Production**, v.12, 2001.

MYRIE, S.B.; BERTOLO, R.F.P.; SAUER, W.C. Threonine retention is reduced in diets that increase mucin production in pigs. In **Proc 9th Int Symp on Dig Physiol in Pigs (Ed RO Ball)**, p.250-252. University of Alberta, Banff, Canadá, 2003.

- MOGHADDAM, H.S.; MOGHADDAM, H.N.; KERMANSHAHI, H. The effect of threonine on mucin2 gene expression, intestinal histology and performance of broiler chicken. **Italian Journal of Animal Science**, v.10:e14, 2011.
- MOREIRA FILHO, A.L.B.; OLIVEIRA, C. J.B DE. et al. High incubation temperature and threonine dietary level improve ileum response against post-hatch *Salmonella* Enteritidis inoculation in broiler chicks. **PloS One**, 2015.
- MOREIRA FILHO, A.L.B.; OLIVEIRA, C. J.B DE.; FREITAS NETO, O. C. DE. et al. Intra-Amnionic Threonine Administered to Chicken Embryos Reduces *Salmonella* Enteritidis Cecal Counts and Improves Post hatch Intestinal Development, **Journal of Immunology Research**, v.2018, 9p, 2018.
- NIR, I.; NITSAN, Z.; MAHAGNA, M. et al. Comparative growth and development of the digestive organs and of some enzymes in broiler and egg type chicks after hatching. **British Poultry Science**, v.34, p.523-532, 1993.
- NOY, Y.; SKLAN, D. Posthatch development of poultry. **Journal of Applied Poultry Research**, v.6, p.344-354, 1997.
- NOY, Y.; SKLAN, D. Energy utilization in newly hatched chicks. **Poultry Science**, v.78, p.1750-1756, 1999.
- 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.
- OHTA, Y.; KIDD, M. Optimum site for *in ovo* amino acid injection in broiler breeder eggs. **Poultry Science**, v.80, p.1425-1429, 2001.
- PESSOA, G.B.S. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.13, p.755-774, 2012.
- POPOFF, M.Y.; BOCKEMÜHL, J.; GHEESLING, L.L. et al. Supplement to the Kauffmann-White scheme. **Research in Microbiology**, v.155, p.568-570, 2004.
- ROBERTSON, A.M. e WRIGHT, D.P. Bacterial glycosulphatases and sulphomucin degradation. **Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 11, p.361–366, 1997.
- SANSONETTI, P.J. War and peace at mucosal surfaces. **Nature Reviews**, v.4, p.953-964, 2004.
- SANTOS, R. L.; RAFFATELLU, M.; BEVINS, C. L.; et al. M.; BÄUMLER, A. J. Life in the inflamed intestine, *Salmonella* style. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v.17, n.11, p.498–506, 2009.
- 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.

SCHOKKER, D.; HOEKMAN, A.J.; SMITS, M.A. et al. Gene expression patterns associated with chicken jejunal development. **Developmental and Comparative Immunology**, v.33, p.1156–1164, 2009.

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.

SELL, J.L.; ANGEL, C.R.; PIQUER, F.J. et al. Developmental patterns of selected characteristics of the gastrointestinal tract of young turkeys. **Poultry Science**, v.70, p.1200–1205, 1991.

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.

SKLAN, D.; GEYRA, A.; TAKO, E. et al. Ontogeny of brush border carbohydrate digestion and uptake in the chick. **British Journal of Nutrition**, v.89, p.747–753, 2003.

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, T.W. Avian embryo: stages of embryonic development in Book Avian embryo: stages of embryonic development. Editor ed. Mississippi State University, City, 2007.

SOBOLEWSKA, A.; ELMINOWSKA-WENDA, G.; BOGUCKA, J. et al. The influence of *in ovo* injection with the prebiotic DiNovo® on the development of histomorphological parameters of the duodenum, body mass and productivity in large-scale poultry production conditions. **Journal Animal Science Biotechnology**, v.19, p.8–45, 2017.

SOUZA, A. Introduction to the special issue: *Salmonella* in foods: evolution, strategies and challenges. **Food Research Internacional**, v.45, p.451–454, 2012.

STERZO, E.V.; VARZONE, J.R.M. FERRARI, R. Salmoneloses aviárias. **Ensaio e Ciências: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v.12, n.2, p.129–138, 2008.

SPEIER, J. S.; YADGARY, L.; UNI, Z. et al. Gene expression of nutrient 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.

STOLL, B.; HENRY, J.; REEDS, P.J. et al. Catabolism dominates the first pass intestinal metabolism of dietary amino acid in milk protein fed piglet. **Journal of Nutrition**, v.128, p.606–614, 1998.

SANTIN, E.; MORAES, M.L. SANCHES, A.W.D. Imunologia aplicada. In: **Fisiologia de aves comerciais**. Macarai, M.; Maiorka, A. Jaboticabal: FUNEP, FAPESP, FACTA, 806p, 2017.

SU, Y.L.; WU, Z.; LI, W. et al. Dietary l-leucine supplementation enhances intestinal development in suckling piglets. **Amino Acids**, v.47, p.1517–1525, 2015.

TAHMASEB, I.S.; TOGHYANI, M. et al. Effect of arginine and threonine administered in ovo on digestive organ developments and subsequent growth performance of broiler chickens. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, 2015.

TAKO, E.; FERKET, P.; UNI, Z. et al. 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.

TENENHOUSE, H.S.; DEUTSCH, H.F. Some physical-chemical properties of chicken gamma-globulins and their pepsin and papain digestion products. **Immunochemistry**, v.3, p.11-20, 1966.

TOGHYANI, M.; TAHMASEBI, S.; ZAMANI, F. et al. Effect of *in ovo* feeding of arginine and threonine on growth performance and digestive organ development of broiler chicks. **World's Poultry Science Journal, Supplement 1**, Expanded Abstract - Chicken Breeder and Broiler Production, 2012.

UNI, Z. Early development of small intestine function. In: CAB International, editor, **Avian gut function in health and disease**. G.C.Perry, Oxon, UK. p.29-42, 2006.

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.; NOY, Y.; SKLAN, D. Posthatch development of small intestinal function in the poult. **Poultry Science**, v.78, p.215-222, 1999.

UNI, Z.; GAL-GARBER, O.; GEYRA, A. et al. Changes in growth and function of chick small intestine epithelium due to early conditioning. **Poultry Science**, v.80, n.4, p.438-445, 2001.

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. 1747-54, 2003a.

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

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

VAN IMMERSEEL, F.; CAUWERTS, K.; DEVRIESE, L.A. et al. Feed additives to control *Salmonella* in poultry. **World's Poultry Science Journal**, v.58, p. 501-513, 2002.

VIEIRA, S.L.; MORAN, E.T. Effects of egg origin and chick post-hatch nutrition on broiler live performance and meat yields. **World Poultry Science Journal**, v.56, p.125-42, 1999.

WAKENELL, P.S.; BRYAN, T.; SCHAEFFER, J. Effect of *in ovo* vaccine delivery route on HVT/SB-1 efficacy and viremia. **Avian Diseases**, v.46, p.274-280, 2002.

WANG, W.; ZENG, X.; MAO, X. Optimal dietary true ileal digestible threonine for supporting the mucosal barrier in small intestine of weanling pigs. **Journal Nutrition**, v.140, p.981-986. 2010.

WARNER, J.D.; FERKET, P.R.; CHRISTENSEN, V.L. et al. Effect of season, hatch time, and posthatch holding on glycogen status of turkey poults. **Poultry Science**, v.85, (Suppl.1), 117 (Abstr.), 2006.

WIGLEY, P.; KAISER, P. Avian Cytokines in Health and Disease. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.5, n.1, p.1 – 14, 2003.

WITHANAGE, G.S.; WIGLEY, P.; KAISER P. et al. Cytokine and chemokine responses associated with clearance of a primary Salmonella enterica serovar Typhimurium infection in the chicken and in protective immunity to rechallenge. **Infection and Immunology**, v.73, p.5173–5182, 2005.

WRIGHT, E. M. Glucose transport families SLC5 and SLC50. **Molecular Aspects Medicine**, v.34, p.183-196, 2013.

WU, L; LIAO, P.; HE, L. et al. Growth performance, serum biochemical profile, jejunal morphology, and the expression of nutrients transporter genes in deoxynivalenol (DON) - challenged growing pigs. **BMC Veterinary Research**, 11:144, 2015.

YANG, S.I.; MURAMATSU, T.; TASAKI, I. et al. Responses of pancreatic digestive enzyme secretion to amino acids, glucose and cholecystokinin in chicks. **Comparative Biochemistry and Physiology A**, v.92, p.319-322, 1989.

YUN, C.H.; LILLEHOJ, H.S.; LILLEHOJ, E.P. Intestinal immune responses to coccidiosis. **Developmental and Comparative Immunology**, v.24, p.303-324, 2000.

ZWARYCZ, B.; WONG, E. A. Expression of the peptide transporters PepT1, PepT2, and PHT1 in the embryonic and posthatch chick. **Poultry Science**, v. 92, p. 1314–1321, 2013.

CAPÍTULO II –

Expressão gênica de transportadores de glicose, peptídeos e aminoácidos de frangos de corte suplementados com treonina *in ovo* e inoculados com *Salmonella* Enteritidis

Expressão gênica de transportadores de glicose, peptídeos e aminoácidos de frangos de corte suplementados com treonina *in ovo* e inoculados com *Salmonella* Enteritidis

Andrade, M.F.S.*¹, Givisiez, P.E.N.*²

*Departamento de Zootecnia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Areia, PB 58397-000, Brazil

RESUMO: O objetivo deste estudo foi avaliar a suplementação de treonina (Thr) *in ovo* sobre a expressão de transportadores de glicose, peptídeos e aminoácidos no íleo de frangos de corte inoculados com *Salmonella* Enteritidis. Aos 17,5 dias de incubação, ovos férteis foram inoculados no líquido amniótico com solução salina (NT) ou 3.5% de treonina (T). Na eclosão, todos os pintainhos foram pesados individualmente 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* com treonina foram inoculadas com 0.5 mL de caldo nutriente ou *Salmonella* Enteritidis resistente ao ácido nalidíxico (SE Nal^R) em caldo nutriente (8.3×10^7 UFC SE Nal^R/ml). Após a eclosão, os pintainhos foram distribuídos em delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x2 com dois níveis de Thr (0% e 3.5%) x animais inoculados ou não com *Salmonella* Enteritidis. A expressão do gene ileal de transportador de sódio e glicose (*Sglt1*), proteína transportadora de glicose 2 (*Glut2*), transportador de peptídeos (*PepT1*) e transportador de aminoácidos alanina, serina, cisteína e treonina (*ASCT1*) foram avaliadas na eclosão, 2 e 9 dias de idade. Aos dois dias de idade, os genes *Sglt1* e *ASCT1* apresentaram maior expressão devido à suplementação de treonina *in ovo*. Às 168 horas pós-inoculação, não houve interação entre os fatores treonina e *Salmonella* para *Sglt1* e *Glut2*, exceto *PepT1* e *ASCT1*. A suplementação com Thr *in ovo* aumentou a expressão de *Sglt1*, *Glut2*, enquanto que a *Salmonella* diminuiu a expressão de *Glut2*. A suplementação *in ovo* com Thr aumentou a expressão de *Sglt1*, *Glut2*, em aves não inoculadas e a expressão de *ASCT1* em aves inoculadas. A *Salmonella* diminuiu a expressão de *PepT1* e *ASCT1* em aves suplementadas com Thr *in ovo* e aumentou a expressão de *PepT1* em aves não suplementadas. Nossos resultados sugerem que a administração intra-amniótica de treonina em embriões de frangos de corte, promove aumento na expressão de genes de transportadores de glicose, peptídeos e aminoácidos após-eclosão, na ausência de *Salmonella*.

Palavras-chave: aminoácido, embrião, intestino delgado, transportador de nutrientes

Gene expression of glucose, peptide and amino acid transporters from broilers *in ovo* threonine supplementation and inoculated with *Salmonella* Enteritidis

ABSTRACT: The supplementation *in ovo* of threonine on glucose, amino acid and peptide transporters in the small intestine of broiler chickens inoculated with *Salmonella* were assessed. At 17.5 days of embryo development, fertile eggs were inoculated in the amniotic liquid with saline or 3.5% of Threonine (Thr). All hatchlings were individually weighed, and the negative *Salmonella* status was confirmed. At two days of age, half of the birds of each incubation treatment was inoculated with sterile nutrient broth or nalidixic acid-resistant *Salmonella* Enteritidis in nutrient broth (8.3×10^7 UFC SE Nal^R/ml) and distributed according to a completely randomized design in a 2 x 2 factorial arrangement with two threonine levels (0 and 3.5%) and two inoculation status (without or with SE Nal^R). Ileal gene expression of the sodium and glucose transporter (*Sglt1*), glucose transporter 2 (*Glut2*), peptide transporter (*PepT1*) and threonine, serine, alanine and serine transporter (*ASCT1*) was determined at hatch (only incubation effect) and 168 hours after SE inoculation (factorial arrangement). At two days of age, *Sglt1* and *ASCT1* showed higher expression due to threonine supplementation *in ovo*. There was no interaction at 168 hours post-inoculation for *Sglt1* and *Glut2*, but both *PepT1* e *ASCT1* showed interaction. *In ovo* threonine supplementation increased *Sglt1* and *Glut2* at 24 and 168 hpi, whereas *Salmonella* challenge decreased *Glut2* expression, independent of the incubation treatment. On the other hand, *Salmonella* challenge decreased both *PepT1* and *ASCT1* expression in the ileum of birds that had been supplemented with *in ovo* threonine. The decreased expression of *ASCT1* that was seen in *Salmonella*-challenged groups of birds was more prominent in those non-supplemented with threonine during incubation. The intra-amniotic supplementation of threonine in broiler embryos improved glucose, peptide and amino acid transporter expression in the absence of *Salmonella*.

Key words: amino acid, embryo, genic expression, nutrient transporter, small intestine

1. INTRODUÇÃO

O processo de aproveitamento dos nutrientes pelo intestino pode ser acelerado ou se tornar mais eficiente utilizado através de técnicas tais como a nutrição *in ovo*. Esta ferramenta visa melhorar o estado nutricional do embrião, permitindo o contato dos nutrientes com a mucosa intestinal, a fim de melhorar a capacidade digestiva e absorptiva do embrião (Pessôa et al., 2012). É sabido que a suplementação de nutrientes na fase pré-eclosão possibilita melhoria do desenvolvimento embrionário, eclodibilidade, e desempenho pós-eclosão e, dentre os vários nutrientes testados pela sua eficácia, estão incluídos os aminoácidos (Kucharska-Gaca et al., 2017).

Entre os aminoácidos que podem ser utilizados na nutrição *in ovo*, destaca-se a treonina (Thr), um aminoácido essencial, envolvido na funcionalidade e manutenção da integridade intestinal (Law et al., 2007; Wang et al., 2010). A alta taxa de utilização intestinal de treonina pode estar associada com a síntese proteica (Le Floc'h e Seve, 2005) e com a síntese de mucinas (Wang et al., 2007). A composição destas pode incluir treonina entre 13% e 26% do total de aminoácidos (Lien et al., 1997; Piel et al., 2004). O principal componente do muco protetor que cobre o epitélio do trato gastrointestinal (Horn et al., 2009) são as mucinas, glicoproteínas sintetizadas e secretadas pelas células caliciformes que estão distribuídas ao longo das vilosidades intestinais (Uni et al., 2003a). O muco contribui para a lubrificação do epitélio intestinal, protege a mucosa de ácido e protease bacteriana, auxilia na resistência à colonização por agentes patogênicos e no reparo do epitélio (Montagne et al., 2004). Mudança no tipo de mucinas produzidas pelas células caliciformes podem alterar as propriedades da camada de muco, levando a variações nas funções de proteção intestinal, bem como digestão e absorção de nutrientes (Horn et al., 2009; Jiang et al., 2013). Além da produção de mucinas, a treonina é também um componente importante das imunoglobulinas (Ig), em especial IgA secretada pela mucosa intestinal (Brisbin et al., 2008).

O intestino delgado é o local onde ocorre a maior parte dos processos de digestão e praticamente toda a absorção de nutrientes, enquanto o ceco é o local de absorção de água e eletrólitos. Há evidências de que outras estruturas, como papo, proventrículo e moela, são locais onde pode ocorrer absorção de aminoácidos e peptídeos (Sturkie, 2015). A absorção de aminoácidos, peptídeos e monossacarídeos são mediados por transportadores de nutrientes, localizados nas células epiteliais intestinais (Paris e Wong, 2013). O mecanismo de transporte de glicose, em aves de produção, ocorre por meio de co-transportadores de sódio-glicose (SGLTs) na membrana apical e proteínas transportadoras de glicose (GLUTs) na membrana basolateral, semelhante aos mamíferos (Braun e Sweazee, 2008). Em relação ao transporte de

peptídeos e aminoácidos, a captação na borda em escova dos enterócitos é mediada pela ação do transportador de peptídeo 1 (*PepT1*) e diversos transportadores de aminoácidos que transportam aminoácidos aniônicos, neutros e catiônicos (Gilbert et al., 2007). O transportador de aminoácidos (*ASCT1*) em frangos é expresso no intestino, e é responsável pelo transporte dos aminoácidos neutros, alanina, serina, cisteína e treonina, mas sua localização em frangos ainda não está totalmente determinada (Paris e Wong, 2013; Su et al., 2013; Kaminski e Wong, 2018; Miska e Kanai, 2018).

Para avaliar as respostas que a treonina suplementada *in ovo* promove sob a fisiologia da mucosa intestinal, mais especificamente na ativação da expressão de genes em pintainhos inoculados ou não com *Salmonella*. Objetivou-se, avaliar o efeito da suplementação de treonina *in ovo* na expressão dos genes do co-transportador de sódio e glicose (*Sglt1*), proteína transportadora de glicose 2 (*Glut2*), transportador de peptídeo 1 (*PepT1*) e transportador de aminoácidos alanina, serina, cisteína e treonina (*ASCT1*) no íleo de frangos de corte inoculados com *Salmonella* Enteritidis.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A proposta experimental foi submetida e aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB), sob o número de protocolo CEUA 078/2017. O experimento foi conduzido no Departamento de Zootecnia, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba.

2.1 Incubação e suplementação *in ovo*

Foram obtidos trezentos ovos férteis de um incubatório comercial (Guaraves Alimentos Ltda, Guarabira, PB, Brasil), com peso médio de $67,0 \pm 1.56$ g, provenientes de matrizes linhagem Cobb500, com 44 semanas. Os ovos foram distribuídos em três incubadoras artificiais (IP130, Premium Ecológica Ltda, Belo Horizonte, MG, Brasil) com condições padrão de temperatura ($37,7^{\circ}\text{C}$) e umidade (60%) e viragem automática a cada duas horas. Os ovos permaneceram nessas condições de incubação por um período de um a dezessete dias de incubação (17DE). No décimo primeiro dia de incubação (11DE), procedeu-se à ovoscopia descartando os ovos inférteis.

Os ovos foram distribuídos aleatoriamente em dois tratamentos ($n = 150$ por grupo) com base na concentração de Thr a ser injetada *in ovo* (NT: 0.0% Thr; T: 3.5% Thr) no 17,5DE de acordo com Uni e Ferket (2003). Todos os ovos foram higienizados com etanol a 70% e perfurados no final da câmara de ar. A solução nutritiva (1,0 mL) foi aquecida a 30°C e depositada no líquido amniótico utilizando-se seringas de 1 mL e agulha estéreis de 21G. Os ovos suplementados com Thr foram devolvidos para incubadora e a temperatura foi ajustada para $36,7^{\circ}\text{C}$.

2.2 Tratamentos e manejo

Após a eclosão, os pintainhos foram identificados e pesados individualmente, e o estado negativo de *Salmonella* Enteritidis foi confirmado através de análise microbiológica de esfregaço de suabe cloacal colhido de vinte aves por incubadora. O delineamento experimental inteiramente ao acaso foi de acordo com esquema fatorial 2×2 , com ou sem suplementação de Thr *in ovo* e com ou sem inoculação com *Salmonella* Enteritidis. No total foram quatro tratamentos, com 36 aves (repetições), mantidas em caixas de madeira. Cada caixa foi equipada com bebedouro e comedouro e possuíam com tampas de nylon para evitar contaminação cruzada entre caixas por meio de vetores como moscas.

A dieta experimental foi elaborada principalmente por farelo de milho e farelo de soja para a fase inicial seguindo as recomendações de Rostagno et al. (2011). Os níveis

nutricionais foram 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.

2.3 Inoculação

O desafio por *Salmonella* Enteritidis foi realizado aos dois dias de idade. O inóculo foi preparado usando uma colônia de *Salmonella* Enteritidis resistente a ácido nalidíxico (SE Nal^R) em caldo nutriente (Acumedia, EUA), contendo ácido nalidíxico (100 µg/mL) por 24 horas a 37°C, e em seguida, uma alíquota (0.1 mL) foi novamente cultivada a 37°C por quatro horas. A concentração do inóculo foi determinada pelo plaqueamento de uma diluição serial (10^{-1} até 10^{-6}) em placas de ágar verde brilhante (Acumedia, EUA) contendo ácido nalidíxico (100 µg/mL), e incubação a 37°C. Foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) de *Salmonella* após 24 horas. Todos os pintainhos em cada caixa foram inoculados com 0.5 mL de cultura de *Salmonella* Enteritidis (SE Nal^R) (8.3×10^7 UFC/mL), exceto as aves do grupo controle, que receberam apenas caldo nutriente estéril.

2.4 Coletas de amostras ileais

Foram realizados abates na eclosão, aos 2 e 9 dias de idade. Foram colhidas amostras de íleo de quatro animais por tratamento, identificadas e congeladas imediatamente em nitrogênio líquido, sendo posteriormente armazenados a -80°C até o processo de extração ser iniciado.

2.5 Expressão de mRNA *Sglt1*, *Glut2*, *PepT1* e *ASCT1*

Quatro amostras de íleo por tratamento (500 µg), foram destinadas ao isolamento de RNA, utilizando o kit Qiagen RNeasy[®] Mini (Qiagen, Valencia, CA, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante e a concentração e pureza foi avaliado em espectrofotômetro de microvolume (Colibri, Titertek Berthold, Alemanha), utilizando as relações de absorbância de 260/280 e 260/230. A síntese do cDNA foi realizada utilizando o kit cDNA AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante.

A expressão gênica relativa foi determinada através reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), utilizando o Brilliant III Ultra-fast SYBR QPC Master Mix (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA). Os ciclos da qPCR foram realizados no termociclador StratageneMx3005P (Agilent Technologies).

Tabela 1. Genes em estudo, identificação da sequência de referência e sequência dos *primers* utilizados na qPCR

Gene (nome) ¹	Iniciador Direto/ Reverso	Referência
Beta-actina F	ACCACTGGCATTGTCATGGACTCT	Moreira Filho et al. (2015)
Beta-actina R	TCC TTG ATG TCA CGG ACG ATT TCC	Moreira Filho et al. (2015)
<i>Sglt1</i> F	GCCATGGCCAGGGCTTA	Barri et al. (2011)
<i>Sglt1</i> R	CAATAACCTGATCTGTGCACCAGTA	Barri et al. (2011)
<i>Glut2</i> F	CACACTATGGGCGCATGCT	Barri et al. (2011)
<i>Glut2</i> R	ATTGTCCCTGGAGGTGTTGGTG	Barri et al. (2011)
<i>PepT1</i> F	CCG CTG AGG AGG ATC ACT GTT	Beacon Designer
<i>PepT1</i> R	CAA AAG AGC AGC AGC AAT GA	Beacon Designer
<i>ASCT1</i> F	TTGGCCGGGAAGGAGAAG	Paris et al.(2013)
<i>ASCT1</i> R	AGACCATAGTTGCCTCATTGAATG	Paris et al. (2013)

¹F: Direto; R: Reverso; *Sglt1*: co-transportador de sódio e glicose 1; *Glut2*: proteína transportadora de glicose 2; *PepT1*: transportador de peptídeos 1; *ASCT1*: transportador de aminoácidos alanina, serina, cisteína e treonina

A abundância relativa de mRNA de *Sglt1*, *Glut2*, *PepT1* e *ASCT1* foi determinada usando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, descrito por Pfaffl (2001). Valores de Ct para cada amostra foram padronizados para o RNA de gene de referência (Beta-actina).

2.5 Análise estatística

Os dados de expressão gênica foram analisados de acordo com o delineamento inteiramente casualizado considerando dois tratamentos (NT: 0.0% Thr; T: 3.5% Thr). Para amostragem na eclosão e dois dias de idade, e quatro tratamentos para amostragem às 168 horas pós-inoculação (9 dias de idade) com *Salmonella*. Médias significativas foram comparadas pelo teste F a 5% de probabilidade. As análises foram calculadas utilizando o software R (2008).

3. RESULTADOS

A suplementação com treonina *in ovo* não influenciou a expressão relativa dos genes no dia da eclosão (Figura 1a). Não houve efeito ($p > 0.05$) da suplementação de treonina *in ovo* sobre a expressão dos genes avaliados (Figura 1a). Aos dois dias de idade, a expressão gênica de *Sglt1* e *ASCT1* foram maiores com a suplementação de Thr, comparando-se com o grupo controle ($p \leq 0.05$) (Figura 1b).

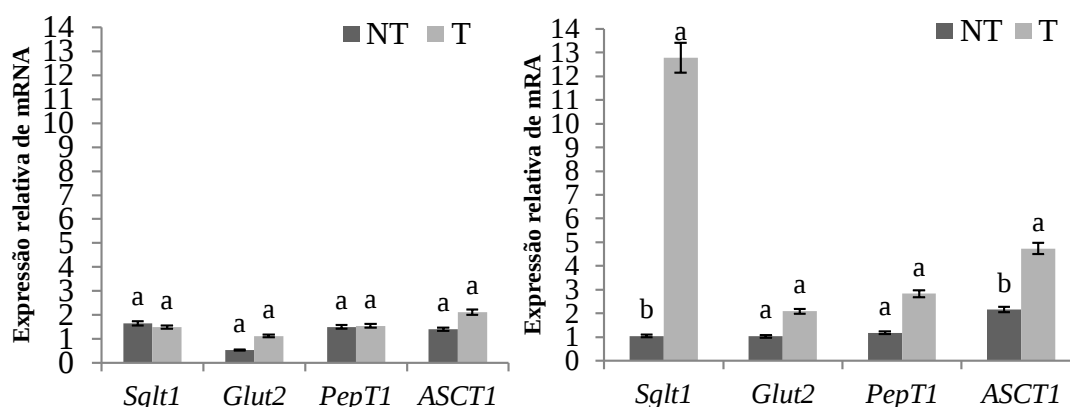


Figura 1. Expressão relativa do mRNA de co-transportador de sódio e glicose (*Sglt1*), proteína transportadora de glicose 2 (*Glut2*), transportador de peptídeo 1 (*PepT1*) e transportador de aminoácidos alanina, serina, cisteína e treonina (*ASCT1*) na eclosão (a) e 2 dias de idade (b) em frangos de corte suplementados com treonina *in ovo* (NT: 0.0% Thr; T: 3.5% Thr).

Não houve interação significativa ($p > 0.05$) entre os fatores treonina e *Salmonella*, na expressão de *Sglt1* e *Glut2* no íleo em 168hpi, portanto, os dados apresentados representam as médias para os fatores principais (Tabela 1). No fator treonina, verifica-se que as aves suplementadas com treonina *in ovo* obtiveram maior ($p \leq 0.05$) expressão dos genes *Sglt1* e *Glut2*, quando comparadas as aves não suplementadas. Em relação ao fator *Salmonella*, a expressão de *Sglt1* não foi afetada após a inoculação de *Salmonella*, enquanto que a expressão de *Glut2* é menor ($p \geq 0.05$) em aves inoculadas.

Tabela 2. Expressão relativa do mRNA de co-transportador de sódio e glicose (*Sglt1*), proteína transportadora de glicose 2 (*Glut2*), transportador de peptídeo 1 (*PepT1*) e transportador de aminoácido neutro de alanina, serina, cisteína e treonina (*ASCT1*) em frangos de corte suplementados com treonina *in ovo* as 168hpi com *Salmonella* Enteritidis

Tratamentos	168hpi			
	Genes			
	<i>Sglt1</i>	<i>Glut2</i>	<i>PepT1</i>	<i>ASCT1</i>
Treonina (0.0%)	2.32 b	0.28 b	2.30	1.89
Treonina (3.5%)	4.05 a	0.65 a	5.90	7.74
Sem <i>Salmonella</i>	2.93 a	0.65 a	5.09	5.47
Com <i>Salmonella</i>	3.43 a	0.28 b	3.11	4.16
Treonina (A)	*	*	*	*
<i>Salmonella</i> (B)	NS	*	*	*
Interação (A x B)	NS	NS	*	*

Dados de expressão foram normalizados utilizando o gene β -actina como gene de referência. Médias seguidas de mesmas letras, minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

NS, não significativo; * $p, \leq 0.05$

168 horas pós-inoculação (168hpi)

¹Interações significativas foram desdobradas e os resultados estão apresentados na Tabela 2.

Houve interação significativa ($p \leq 0.05$) entre os fatores treonina e *Salmonella* para *Pept1* e *ASCT1* às 168hpi, e os desdobramentos estão apresentados na tabela 2.

No fator treonina, houve aumento ($p \leq 0.05$) na expressão de *Pept1* em aves não inoculadas com *Salmonella*. No entanto, não foi observada diferença significativa ($p \geq 0.05$) entre as médias dos animais inoculados com *Salmonella*. Houve maior expressão de *ASCT1*, independente da inoculação ou não com *Salmonella*. No fator *Salmonella*, a expressão de *Pept1* foi menor ($p \leq 0.05$) em aves suplementadas com treonina, por outro lado, maior ($p \geq 0.05$) expressão foi observada em aves não suplementadas com treonina. Menor expressão de *ASCT1* foi no grupo de aves suplementadas com Thr *in ovo*.

Tabela 3. Desdobramento da expressão relativa do mRNA de transportador de peptídeo 1 (*Pept1*) e transportador de aminoácido neutro de alanina, serina, cisteína e treonina (*ASCT1*) em frangos de corte suplementados com treonina *in ovo* as 168hpi com *Salmonella* Enteritidis

Genes	168hpi	
	Sem <i>Salmonella</i>	Com <i>Salmonella</i>
<i>Pept1</i>		
Treonina (0.0%)	1.69 bB	2.91 aA
Treonina (3.5%)	8.50 aA	3.30 aB
<i>ASCT1</i>		
Treonina (0.0%)	1.74 bA	2.04 bA
Treonina (3.5%)	9.21 aA	6.27 aB

Médias seguidas de mesmas letras, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade
168 horas pós-inoculação (168hpi)

4. DISCUSSÃO

É sabido que a capacidade absorptiva do intestino delgado em aves suplementadas *in ovo* pode ser avaliada através do estudo da mudança do padrão de expressão de genes de transportadores intestinais de nutrientes. O referido estudo avaliou o perfil de expressão gênica de 4 importantes transportadores intestinais, expressos na membrana em borda e escova ou basolateral, presentes nas células epiteliais intestinais de pintainhos.

Diversos fatores podem estar envolvidos na regulação da expressão de genes de transportadores. Particularmente, componentes dietéticos específicos podem afetar a expressão gênica de transportadores. No referido estudo, provavelmente o aumento na expressão dos genes estudados em aves suplementadas com treonina favoreceu o melhor desenvolvimento do intestino delgado, integridade do epitélio da mucosa intestinal, a maturação dos enterócitos, além do efeito sobre a atividade de enzimas, que proporcionaria um fornecimento constante de substratos para os transportadores de monossacarídeos, peptídeos e aminoácidos.

Os dados do presente estudo sugerem que a treonina suplementada *in ovo* seja um

potencial estimulante absorção de glicose, através do aumento na expressão do transportador de hexoses. O aumento de transportador de monossacarídeo causada pela suplementação *in ovo* de Thr na idade avaliada é intrigante, já que nenhum substrato específico foi fornecido para os transportadores durante o procedimento de suplementação *in ovo*.

É sabido que a Thr participa da síntese de proteínas e seu catabolismo gera muitos produtos importantes para metabolismo, como glicina, acetil-CoA e piruvato (Kidd e Kerr, 1996), e ela também possui importante papel no desenvolvimento intestinal e na manutenção da integridade do epitélio intestinal (Moreira Filho et al., 2015) por ser o constituinte principal do muco intestinal, que auxilia nos processos de digestão e absorção de nutrientes e consiste principalmente de mucinas (Smirnov et al., 2006).

Alguns estudos foram realizados avaliando efeito de suplementação de nutrientes *in ovo* sobre o desenvolvimento do intestino delgado. Segundo Uni e Ferket, (2004), ao injetar uma solução de nutrientes via líquido amniótico, é possível seu consumo antes da eclosão, podendo ser suplementada no período final de incubação, possibilitando estimular o desenvolvimento do TGI e melhorar sua capacidade em digerir e assimilar os nutrientes pós-eclosão. Moreira Filho et al. (2018) relataram que aves suplementadas com Thr *in ovo* apresentaram maior altura das vilosidades e relação vilosidade:cripta, sendo a treonina benéfica para o trato gastrointestinal (TGI). Tahmasebi e Toghyani (2016) relataram aumento na altura de vilosidade em aves suplementadas *in ovo* com treonina e arginina no íleo. Segundo Kadam et al. (2008) houve tendência de aumento na atividade das enzimas digestiva (pepsina e amilase) em embriões suplementados com 20 e 30 mg de Thr. A inoculação de zinco-metionina *in ovo* aumentou as expressões de mRNA da sacarase-isomaltase sucrase-isomaltase e *Sglt1* e o transportador de zinco (Tako et al., 2005), enquanto a administração de uma solução de arginina *in ovo* aumentou a expressão de *Sglt1* no jejuno de perus 7 dias pós-eclosão (Foye et al., 2009).

A suplementação de treonina aumentou a expressão de *Pept1* aos 2 dias e 168 horas pós-inoculação. Osmanyany et al. (2017) relataram que a expressão de *PepT1* foi maior em frangos alimentados com uma dieta com 114% de aminoácidos digestíveis, comparando-se a dieta com 100 e 107% de aminoácidos digestíveis. Tais resultados demonstraram que o conteúdo proteína e aminoácidos digestíveis da dieta, afetaram diferencialmente a expressão de transportador de peptídeos intestinais e transportadores de aminoácidos para modular a absorção de peptídeos e aminoácidos em frangos de corte. Segundo Gilbert et al. (2010), maior disponibilidade de aminoácidos no enterócito tem efeito sobre metabolismo celular e poderia levar a uma indução de maior expressão de *PepT1*. A dieta e a concentração de substrato no lumen intestinal pode modular o transporte de nutrientes (Gilbert et al., 2008; Zhi

et al., 2010). A restrição alimentar também aumentou a expressão de *PepT1* em frangos (Masden e Wong, 2011). Diante do exposto é possível que o conteúdo da dieta afete a regulação da expressão de transportadores intestinais de nutrientes. É possível que mudanças na expressão de *PepT1*, esteja correlacionada à atividade da enzima aminopeptidase (APN), responsável pela digestão proteica.

Foye et al. (2009) observaram maior expressão relativa de mRNA de *PepT1*, e APN em aves suplementadas com arginina *in ovo*, avaliadas na primeira semana de vida, com desempenho melhorado em período subsequente. Moreira Filho et al. (2018) observaram que a suplementação de diferentes níveis de treonina *in ovo* (0; 1.75; 3.5; 5.25; 7%), aumentou a expressão de *PepT1*, na eclosão, menos ao nível de 7%, comparando-se ao grupo controle, bem como a expressão de APN, exceto nos níveis treonina (1.75 e 7%) em frangos de corte.

No presente estudo, houve maior expressão gênica do transportador relacionado ao aminoácido Thr, *ASCT1*, em aves suplementadas, na eclosão, dois e 9 dias de idade ou 168 horas pós-inoculação. O aumento do transportador indica possivelmente maior transporte do aminoácido. Os transportadores intestinais de aminoácidos em frangos são regulados por uma variedade de fatores, incluindo o desenvolvimento intestinal, seleção genética e a quantidade e qualidade de proteína na dieta (Gilbert et al., 2010). As 168 horas pós-inoculação, provavelmente, uma maior produção de mucinas no íleo auxiliou na proteção do epitélio intestinal frente a inoculação por *Salmonella*, inibindo o patógeno e evitando mudanças na expressão gênica. A expressão de *ASCT1* tende a aumentar com a deficiência de Thr com infecção por coccidiose, em frangos de corte (Zhang et al., 2016). Na eclosão, níveis de Thr suplementada *in ovo* aumentaram a expressão de *MUC2* em comparação (0; 1.75; 3.5; 5.25; 7%), com aves controle, em pintainhos (Moreira Filho et al., 2018).

Os dados do presente estudo indicam que a administração intra-amniótica de treonina, pode proporcionar amadurecimento precoce da funcionalidade dos transportadores intestinais de nutrientes comparados ao grupo controle que persistem após a eclosão. O aumento da expressão relativa de mRNA dos transportadores de *Sglt1*, *Glut2*, *PepT1* e *ASCT1* em pintainhos suplementados com Thr *in ovo*, pode levar a uma maior absorção de monossacarídeos, peptídeos e aminoácidos neutros pelos enterócitos intestinais.

A presença de *Salmonella* no TGI, também influenciou a expressão dos transportadores intestinais *Glut2*, *PepT1* e *ASCT1* no íleo de pintainhos. Transportadores de nutrientes desempenham um papel essencial na absorção de nutrientes do lúmen intestinal. Assim, a capacidade intestinal para absorver glicose, peptídeos e aminoácidos torna-se limitante quando aves são submetidas a inoculação por *Salmonella*.

A *Salmonella* penetra nas células epiteliais intestinais presentes nas vilosidades e

provocam diminuição da expressão do transportador de glicose *Glut2* na membrana basolateral dos enterócitos em pintainhos às 168hpi. O transportador de glicose *Glut2* está localizado na membrana basolateral dos enterócitos e transporta monossacarídeos para fora das células epiteliais no intestino, em direção à corrente sanguínea (Su et al., 2014). É sabido que, bactérias como *Salmonella* podem invadir a célula epitelial intestinal, os enterócitos, multiplicando-se dentro da mucosa (Van Asten et al., 2005) provavelmente, a diminuição na expressão de *Glut2* pode representar uma resposta para manter as concentrações de glicose intracelular, o que pode ser benéfica para o próprio enterócito, como fonte de energia.

Alterações que ocorrem na expressão de genes relacionados a transportadores de nutrientes podem ser parte de um mecanismo pelo qual um animal utiliza para combater uma infecção por micro-organismos patogênicos.

Pesquisas anteriores, investigaram a influência do desafio por *Eimeria*, na expressão de transportadores intestinais de nutrientes. Embora a *Eimeria* seja um protozoário intestinal, infecta o enterócito intracelularmente, semelhante a *Salmonella*. Foi relatado em alguns estudos anteriormente que desafio por *Eimeria* afeta a expressão de transportadores de nutrientes, entre eles os de glicose, causando diminuição significativa na expressão de mRNA do transportador *Glut2* em frangos de corte (Miska e Fetterer, 2017; Su et al., 2014, 2015, 2018; Yin et al., 2015). Para o mRNA de *PepT1*, há diminuição na expressão no íleo (Yin et al., 2015) e no jejuno (Su et al., 2014). Há aumento na expressão relativa de *ASCT1* no jejuno de frangos de corte desafiados com *Eimeria maxima* (Paris e Wong, 2013; Miska e Fetterer., 2018). Por outro lado, menor expressão de *ASCT1* é observado no íleo de frangos de corte desafiados com *Eimeria praecox* (Yin et al., 2015). Menor expressão de *ASCT1*, resulta numa diminuição da absorção de aminoácidos importantes, tal como alanina, serina, cisteína e treonina.

5. CONCLUSÃO

A administração intra-amniótica de treonina em embriões de frangos de corte, promove aumento na expressão de genes intestinais relacionados a absorção de nutrientes, a partir dos 2 dias de idade, entretanto tal efeito não ocorre quando da inoculação com *Salmonella* Enteritidis.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARRI, A.; HONAKER, C.F.; SOTTOSANTI, J.R. et al. Effect of incubation temperature on nutrient transporters and small intestine morphology of broiler chickens. **Poultry Science**, v. 90, p.118-125, 2011.

BRAUN, E.J. AND SWEAZEA, K.L. Glucose regulation in birds. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.151B, p.1-9, 2008.

BRISBIN, J.T.; GONG, J.; SHARIF, S. Interactions between commensal bacteria and the gut-associated immune system of the chicken. **Animal Health Research Reviews**, v.9, v.101-110, 2008.

DONG, X.Y.; WANG, Y.M.; YUAN, C. et al. The ontogeny of nutrient transporter and digestive enzyme gene expression in domestic pigeon (*Columba livia*) intestine and yolk sac membrane during pre- and posthatch development. **Poultry Science**, v.91, p.1974–1982, 2012.

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

FOYE, O.T.; ASHWELL, C, UNI, Z et al. The effects of intra-amnionic feeding of arginine and/or β -hydroxy- β -methylbutyrate on jejunal gene expression in the turkey embryo and hatchling. **International Journal of Poultry Science**, v.8, n5, p.437–445, 2009.

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.

GILBERT, E.R.; LI, H.; EMMERSON, D.A. et al. Dietary protein composition influences abundance of peptide and amino acid transporter messenger ribonucleic acid in the small intestine of 2 lines of broiler chicks. **Poultry Science**, v.89, p.1663–1676, 2010.

HORN, N.L.; DONKIN, S.S.; APPELEGATE, 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.

JIANG, Z.; APPELEGATE, T.J.; LOSSIE, A.C. Cloning, annotation and developmental expression of the chicken intestinal *MUC2* gene. **Plos One**, v.8, p.e53781, 2013.

KAMINSKI E. N.A. AND WONG, E.A. Differential mRNA expression of nutrient transporters in male and female chickens. **Poultry Science**, v.97, p.313–318, 2018.

KUCHARSKA-GACA, J.; KOWALSKA, E.; EBOWSKA, M. *In ovo* feeding-technology of the future-a review. **Annals Animal Science**, v.17, p.979-992, 2017.

KIDD, M.T. AND KERR, B.J. L-threonine for poultry: a review. **Journal. Applied Poultry Research**, v.5, p.358–367, 1996.

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 of Physiology. Gastrointestinal and liver Physiology**, v.292, p.293–301, 2007.

LE FLOCH, N. AND SÈVE, B. Catabolism through the threonine dehydrogenase pathway does not account for the high first-pass extraction rate of dietary threonine by the portal drained viscera in pigs. **British Journal Nutrition**, v.93, p.447–56, 2005.

LIEN, K.A.; SAUER, W.C.; FENTON, M. Mucin output in ileal digesta of pigs fed a protein free diet. **Zeitschrift für Ernährungswissenschaft**, v.36, p.182–90, 1997.

MASDEN, S.L. AND WONG, E.A. Expression of the chicken peptide transporter 1 and the peroxisome proliferator-activated receptor α following feed restriction and subsequent refeeding. **Poultry Science**, v.90, p.2295-2300, 2011.

MISKA, K. B. AND FETTERER, R.H. The effect of *Eimeria maxima* infection on the expression of amino acid and sugar transporters aminopeptidase, as well as the di- and tri-peptide transporter PepT1, is not solely due to decreased feed intake. **Poultry Science**, v.97, p.1712–1721, 2018

MONTAGNE, L.; PIEL, C.; LALLES, J.P. et al. Effect of diet on mucin kinetics and composition: Nutrition and health implications. **Nutrition Revision**, v.62, p.105-114, 2004.

MOREIRA FILHO, A.L.B. Enriquecimento do âmnio com treonina em embriões de frangos de corte: 1. Desempenho e morfofisiologia intestinal e 2. Efeito sobre a contagem de *Salmonella* Enteritidis e microbiota cecal. 2017. 138p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal da Paraíba – UFPB. Paraíba, 2017.

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. **PloS One**, v.10, n.7, article e0131474 p.1-13, 2015.

MOREIRA FILHO, A.L.B.; OLIVEIRA, C.J.B.; FREITAS NETO, O. et al. Intra-Amnionic Threonine Administered to Chicken Embryos Reduces *Salmonella* Enteritidis Cecal Counts and Improves Posthatch Intestinal Development. **Journal of Immunology Research**, v. 2018, Article ID 9795829, 9 p, 2018.

OSMANYAN, A.K.; HARSINI, S.G.; MAHDAVI, R. et al. Intestinal amino acid and peptide transporters in broiler are modulated by dietary amino acids and protein. **Amino Acids**, v.50, p.353–357, 2017.

PARIS, N.E. AND WONG, E.A. Expression of digestive enzymes and nutrient transporters in the intestine of *Eimeria maxima*-infected chickens. **Poultry Science**, v.92, p.1331–1335, 2013.

PESSÔA, G.B.S.; TAVERNARI, F.C.; VIEIRA, R.A. et al. Novos conceitos em nutrição de aves. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.13, p.755-774, 2012.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v.29, n.9, p.45e-445, 2001.

PIEL, C.; MONTAGNE, L.; SALGADO, P. et al. Estimation of ileal output of gastrointestinal glycoprotein in weaned piglets using three different methods. **Reproduction Nutrition Development**, v.44, p.419–435, 2004.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. ISBN 3-900051-07-0. <http://www.r-project.org>, 2008. Acesso em 13/11/2018.

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

SPEIER, J.S.; YADGARY, L.; UNI, Z. et al. Gene expression of nutrient 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.

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.

STURKIE, P.D. **Avian Physiology**. 6^a ed. Springer-Verlag. New York. 1056p. 2015

SU, S.C. Expression of digestive enzymes and nutrient transporters in *Eimeria*-challenged broilers. 2013. Master Thesis, Virginia Polytechnic Institute and State University. 2013. 74p. Thesis (Master of Science In Animal and Poultry Sciences) - Virginia Polytechnic Institute and State University, 2013.

SU, S.; MISKA, K.B.; FETTERER, R.H. et al. Expression of digestive enzymes and nutrient transporters in *Eimeria acervulina*-challenged layers and broilers. **Poultry Science**, v.93, 1217-1226, 2014.

SU, S.; MISKA, K. B.; FETTERER, R.H. et al. Expression of digestive enzymes and nutrient transporters in *Eimeria*-challenged broilers. **Experimental Parasitology**, v. 150, p. 13-21, 2015.

SU, S.; MISKA, K. B.; FETTERER, R.H. et al. Differential expression of intestinal nutrient transporters and host defense peptides in *Eimeria maxima*-infected Fayoumi and Ross chickens. **Poultry Science**, v.0, p.1–9, 2018.

TAHMASEBI, S. AND TOGHYANI, M. Effect of arginine and threonine administered in ovo on digestive organ developments and subsequent growth performance of broiler chickens, **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.100, n.5, p.947–956, 2016.

TAKO, E.; FERKET, P.R.; UNI, Z. Changes in chicken intestinal zinc exporter mRNA expression and small intestinal functionality following intra-amniotic zinc-methionine administration. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.16, p.339–346, 2005.

UNI, Z. AND FERKET, P. Enhancement of development of oviparous species by *in ovo* feeding. US Patent No. 6592,878, 2003.

UNI, Z. AND FERKET, P.R. Methods for early nutrition and their potential. **World's Poultry Science Journal**, v.60, n.1, p.101-111, 2004.

UNI, Z.; SMIRNOV, A; SKLAN, D. Pre- and posthatch development of goblet cells in the broiler small intestine: Effect of delayed access to feed. **Poultry Science**, v.82, p.320-333, 2003a.

VAN ASTEN, A.J.; A.M.; KONINKX, J.F; VAN DIJK, J.E. Salmonella entry: M cells versus

absorptive enterocytes. **Veterinary Microbiology**, v.108, p.149-152, 2005.

WANG, W.; ZENG, X.; MAO, X. G. et al. Optimal dietary true ileal digestible threonine for supporting the mucosal barrier in small intestine of weanling pigs. **Journal Nutrition**, v.140, p.981–986, 2010.

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. **Journal Nutrition**, v.137, p.1442-1446, 2007.

YIN, H.; SUMNERS, L.H.; DALLOUL, R. A. Changes in expression of an antimicrobial peptide, digestive enzymes, and nutrient transporters in the intestine of *E. praecox*-infected chickens. **Poultry Science**, v.94, p.1521–1526, 2015.

ZHI, A.M.; ZUO, J.J.; ZHOU, X.Y. The Influence of different lysine concentration on the cationic amino acid transporter mRNA expression of porcine IEC. **Chinese Agricultural Science Bulletin**, v.26, p.6–11, 2010.

CAPÍTULO III –

**Expressão gênica de interleucinas no intestino de pintainhos
suplementados com treonina *in ovo* e inoculados com *Salmonella* Enteritidis**

Expressão gênica de interleucinas pró-inflamatórias no intestino de pintainhos suplementados com treonina *in ovo* e inoculados com *Salmonella* Enteritidis

Andrade, M.F.S.*¹, Givisiez, P.E.N.*²

*Departamento de Zootecnia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Areia, PB 58397-000, Brazil

RESUMO: O objetivo deste estudo foi avaliar a suplementação de treonina (Thr) *in ovo* sobre a expressão de interleucinas pró-inflamatórias no ceco de frangos de corte inoculados com *Salmonella* Enteritidis. Aos 17,5 dias de incubação, ovos férteis foram inoculados no líquido amniótico com solução salina (NT) ou 3.5% de treonina (T). Na eclosão, todos os pintainhos foram pesados individualmente 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* com treonina foram inoculadas com 0.5 mL de caldo nutriente ou *Salmonella* Enteritidis resistente ao ácido nalidíxico (SE Nal^R) em caldo nutriente (8.3×10^7 UFC SE Nal^R/mL). Após a eclosão, os pintainhos foram distribuídos em delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x2 com dois níveis de Thr (0% e 3.5%) x animais inoculados ou não com *Salmonella* Enteritidis. Não houve interação entre os fatores avaliados (Treonina x *Salmonella*) às 24 horas pós-inoculação, porém houve interação para as interleucinas *1β*, *8* e *22* às 168 horas pós-inoculação. A suplementação com Thr *in ovo*, diminuiu a expressão de *IL-1β* às 24 horas pós-inoculação e a expressão de *IL-8* às 168 horas pós-inoculação. Às 24 horas pós-inoculação, todos os genes apresentaram maior expressão, devido à inoculação com *Salmonella* Enteritidis. Menor expressão de *IL-1β* foi observada em aves suplementadas com Thr *in ovo*, e inoculadas ou não com *Salmonella* Enteritidis, às 168 horas pós-inoculação. Aves suplementadas com treonina *in ovo* obtiveram um aumento significativo da resposta inflamatória induzida por *Salmonella* Enteritidis, como indicado por maiores níveis de expressão de *IL-1β*, *IL-8* e *IL-22*. A suplementação com treonina *in ovo* aumenta a expressão de genes relacionados ao sistema imune em aves inoculadas com *Salmonella* Enteritidis.

Palavras-chave: aminoácido, ceco, citocinas, frangos, *Salmonella* Enteritidis

Gene expression of proinflammatory interleukins from broilers *in ovo* threonine supplementation and inoculated with *Salmonella* Enteritidis

ABSTRACT: The objective of this study was to evaluate the effect of threonine (Thr) *in ovo* supplementation on the expression of proinflammatory interleukins in the cecum of broiler chickens inoculated with *Salmonella* Enteritidis. At 17.5 incubation, fertile eggs were inoculated into the amniotic fluid with saline (NT) or 3.5% threonine (Thr). At hatching, all chicks were weighed individually and the negative *Salmonella* status was verified through cloacal. At two days of age, half of the birds of each *in vitro* treatment with threonine were inoculated with 0.5 mL of nutrient broth or *Salmonella* Enteritidis resistant to nalidixic acid (SE Nal^R) in nutrient broth (8.3×10^7 CFU SE Nal^R / mL). After hatching, the chicks were distributed in a completely randomized 2 x 2 factorial design with two levels of Thr (0% and 3.5%) x animals inoculated or not with *Salmonella* Enteritidis. There was no interaction between the factors evaluated (Threonine x *Salmonella*) at 24 hours post-inoculation, but there was interaction for interleukins *1 β* , *8* and *22* at 168 hours post-inoculation. Thr *in ovo* supplementation decreased *IL-1 β* expression at 24 hours post-inoculation and IL-8 expression at 168 hours post-inoculation. At 24 hours post-inoculation, all genes showed higher expression, due to inoculation with *Salmonella* Enteritidis. Lower *IL-1 β* expression was observed in birds supplemented with Thr *in ovo*, and inoculated or not with *Salmonella* Enteritidis, at 168 hours after inoculation. Broiler supplemented with inhaled threonine obtained a significant increase in the inflammatory response induced by *Salmonella* Enteritidis, as indicated by higher levels of expression of *IL-1 β* , *IL-8* and IL-22. Our results suggest that *in vitro* supplementation with threonine increases the expression of genes related to the immune system in birds inoculated with *Salmonella* Enteritidis.

Key words: amino acid, broilers, cecum, citocine, *Salmonella* Enteritidis

1. INTRODUÇÃO

As aves podem ser infectadas por *Salmonella* enterica a qualquer idade, porém durante os primeiros dias de vida encontram-se mais susceptíveis à infecção (Beal et al., 2005). Aves recém-eclodidas são sensíveis a infecções por bactérias entéricas, por possuírem o sistema imune intestinal pouco desenvolvido e sua microbiota não está totalmente estabelecida. O tempo necessário para maturação intestinal ocorre por volta de duas semanas (Lee et al., 2010; Kim et al., 2011).

A invasão do epitélio e posterior contato da *Salmonella* com macrófagos e heterófilos desencadeiam a resposta imune do hospedeiro (Van der Heijden et al., 2012). Quando ocorre ativação do sistema imunológico, o organismo prioriza a proliferação de células de defesa, expressão de receptores capazes de reconhecer antígenos, e produção de citocinas e anticorpos (Bortoluzzi et al., 2018). As citocinas são uma classe de proteínas ou pequenos peptídeos pertencentes a uma categoria de moléculas sinalizadoras, que auxiliam a comunicação entre células durante uma resposta imune (Guo et al., 2015; Uematsu e Akira, 2006). A rede complexa de citocinas possui propriedade pleiotrópicas, e podem ter atividade autócrina, parácrina e endócrina (Klasing, 1998).

As práticas operacionais realizadas nos incubatórios, tais como sexagem, vacinação, seleção e transporte das aves, nas quais proporcionam acesso tardio à alimentação dos pintainhos recém-eclodidos, que pode variar em torno de 24-72 horas (Batal et al., 2002; Willemsen et al., 2010; Gonçalves et al., 2013). Atraso no acesso à alimentação pode prejudicar a função, maturação e desenvolvimento do trato gastrointestinal (TGI), deposição de proteína muscular e desenvolvimento corporal (Potturi et al., 2005; Yang et al., 2009; Kadam et al., 2013), redução do peso vivo (Noy e Sklan, 1999), diminuição da resposta imune a patógenos (Dibner et al., 1998) e aumento da mortalidade em até 5% (Willemsen et al., 2010). Assim, nas espécies aviárias neonatais, o sistema imunológico é funcionalmente imaturo, e aves recém-nascidas são extremamente suscetíveis a riscos infecciosos do ambiente (Cox et al., 2010).

A técnica de nutrição *in ovo* permite a administração de diversos nutrientes exógenos no líquido amniótico durante o desenvolvimento do embrião, geralmente no final do processo da incubação (Uni e Ferket, 2003). Dessa forma, através desta técnica, é possível compensar o período de acesso tardio a alimentação e facilitar também o estabelecimento precoce da microbiota do TGI, pois possibilita o acesso de nutrientes pelo embrião (Ferket, 2012). Vários pesquisadores relataram efeitos positivos da suplementação de nutrientes *in ovo* para o crescimento e desenvolvimento do embrião, maturação precoce do TGI, e melhoria na

resposta imune intestinal na fase pós-eclosão (Ohta e Kidd, 2001; Tako et al., 2005; Uni e Ferket, 2004).

A nutrição *in ovo* pode ajudar a superar a restrição de nutrientes limitados do ovo (Foye et al., 2006). Em tais situações, suplementação exógena de L-treonina poderia ser vantajosa (Uni e Ferket, 2003). A treonina (Thr) é um aminoácido que contribui particularmente para integridade da barreira intestinal e seu sistema imunológico associado (Sandberg et al., 2007; Nichols e Bertolo, 2008). Sendo assim, o presente estudo avaliou o efeito da suplementação de treonina *in ovo* sobre a expressão gênica de interleucinas pró-inflamatórias em frangos de corte inoculados com *Salmonella* Enteritidis.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A proposta experimental foi submetida e aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB), sob o número de protocolo CEUA 078/2017. O experimento foi conduzido no Departamento de Zootecnia, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba.

2.1 Incubação e suplementação *in ovo*

Foram obtidos trezentos ovos férteis de um incubatório comercial (Guaraves Alimentos Ltda, Guarabira, PB, Brasil), com peso médio de $67,0 \pm 1,56$ g, provenientes de matrizes linhagem Cobb500, com 44 semanas. Os ovos foram distribuídos em três incubadoras artificiais (IP130, Premium Ecológica Ltda, Belo Horizonte, MG, Brasil) com condições padrão de temperatura (37,7 °C) e umidade (60%) de um a dezessete dias de incubação (17DE), e viragem automática a cada duas horas. No décimo primeiro dia de incubação (11DE), procedeu-se à ovoscopia descartando os ovos inférteis.

Os ovos foram distribuídos aleatoriamente em dois tratamentos (n = 150 por grupo) com base na concentração de Thr a ser injetada *in ovo* ((NT: 0,0% Thr; T: 3,5% Thr) no 17,5DE de acordo com Uni e Ferket (2003). Todos os ovos foram higienizados com etanol a 70% e perfurados no final da câmara de ar. A solução nutritiva (1.0 mL) foi aquecida a 30°C e depositada no líquido amniótico utilizando-se seringas de 1 mL e agulha estéreis de 21G. Os ovos suplementados com Thr foram devolvidos para incubadora e a temperatura foi ajustada para 36.7°C.

2.2 Tratamentos e manejo

Após a eclosão, os pintainhos foram identificados e pesados individualmente, e o estado negativo de *Salmonella* Enteritidis foi confirmado através de análise microbiológica de esfregaço de suabe cloacal colhido de vinte aves por incubadora. O delineamento

experimental inteiramente ao acaso foi de acordo com o esquema fatorial 2x2, com ou sem suplementação de Thr *in ovo* e com ou sem inoculação com *Salmonella* Enteritidis. No total foram quatro tratamentos, com 36 aves (repetições), mantidas em caixas de madeira. Cada caixa foi equipada com bebedouro e comedouro e possuíam com tampas de nylon para evitar contaminação cruzada entre caixas por meio de vetores como moscas.

A dieta experimental foi elaborada principalmente por farelo de milho e farelo de soja para a fase inicial seguindo as recomendações de Rostagno et al. (2011). Os níveis foram 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.

2.3 Inoculação

O desafio por *Salmonella* Enteritidis foi realizado aos dois dias de idade. O inóculo foi preparado usando uma colônia de *Salmonella* Enteritidis resistente a ácido nalidíxico (SE Nal^R) em caldo nutriente (Acumedia, EUA), contendo ácido nalidíxico (100 µg/mL) por 24 horas a 37°C, e em seguida, uma alíquota (0.1 mL) foi novamente cultivada a 37°C por quatro horas. A concentração do inóculo foi determinada pelo plaqueamento de uma diluição serial (10^{-1} até 10^{-6}) em placas de ágar verde brilhante (Acumedia, EUA) contendo ácido nalidíxico (100 µg/mL), e incubação a 37°C. Foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) de *Salmonella* *Salmonella* Enteritidis (SE Nal^R) após 24 horas. Todos os pintainhos em cada caixa foram inoculados com 0.5 mL de cultura de *Salmonella* Enteritidis (SE Nal^R) (8.3×10^7 UFC/mL), exceto as aves do grupo controle, que receberam apenas caldo nutriente estéril.

2.4 Coletas de amostras cecais

Foram realizados abates aos 3 e 9 dias de idade das aves (24 horas pós-inoculação e 168 hora pós-inoculação, respectivamente). Foram colhidas amostras de cecais de quatro animais por tratamento, identificadas e congeladas imediatamente em nitrogênio líquido, sendo posteriormente armazenados a -80°C até o processo de extração ser iniciado.

2.4 Expressão de mRNA *IL-1β*, *IL-8*, *IL-17* e *IL-22*

Quatro amostras de ceco por tratamento foram coletadas para isolamento de RNA, utilizando o kit Qiagen RNeasy[®] Mini (Qiagen, Valencia, CA, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. A concentração e pureza do RNA foi avaliado em espectrofotômetro de microvolume (Colibri, Titertek Berthold, Alemanha), utilizando as relações de absorbância de 260/280 e 260/230. A síntese do cDNA foi realizada utilizando o

kit cDNA AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante.

A expressão gênica relativa foi determinada através reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), utilizando o Brilliant III Ultra-fast SYBR QPC Master Mix (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA). Os ciclos da qPCR foram realizados no termociclador StratageneMx3005P (Agilent Technologies).

Tabela 1. Genes em estudo, identificação da sequência de referência e sequência dos *primers* utilizados na qPCR

Gene (Nome) ¹	Iniciador Direto/ Reverso	Referência
Beta-actina F	CCA CTG GCA TTG TCA TGG ACT CT	Moreira Filho et al. (2015)
Beta-actina R	TCC TTG ATG TCA CGG ACG ATT TCC	Moreira Filho et al. (2015)
<i>IL-1</i> Beta F	CAC ACT ATG GGC GCA TGC T	Crhanova et al. (2011)
<i>IL-1</i> Beta R	ATT GTC CCT GGA GGT GTT GGT G	Crhanova et al. (2011)
<i>IL-8</i> F	CAA GCC AAA CAC TCC TAA CCA T	Varmuzova et al. (2016)
<i>IL-8</i> R	AGC TCA TTC CCC ATC TTT ACC	Varmuzova et al. (2016)
<i>IL-17</i> F	TAT CAG CAA ACG CTC AGT GG	Crhanova et al. (2011)
<i>IL-17</i> R	AGT TCA CGC ACC TGG AAT G	Crhanova et al. (2011)
<i>IL-22</i> F	CAG ACT CAT CGG GTC AGC AAA	Crhanova et al. (2011)
<i>IL-22</i> R	GGT ACC TCT CCT TGG CCT CT	Crhanova et al. (2011)

1F: Direto; R: Reverso; IL: Interleucina

A abundância relativa de mRNA de *IL-1 β* , *IL-8*, *IL-17* e *IL-22* foi determinada usando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, descrito por Pfaffl (2001). Valores de C_t para cada amostra foram padronizados para o RNA de gene de referência (Beta-actina).

2.5 Análise estatística

Os dados de expressão gênica foram analisados segundo um delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial (animais suplementados ou não com Thr) x animais inoculados ou não com *Salmonella*, considerando quatro tratamentos para amostragem às 24 e 168 horas pós-inoculação (3 e 9 dias de idade) com *Salmonella*. Médias significativas foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises foram calculadas utilizando o software R (2008).

3. RESULTADOS

Às 24 horas pós-inoculação não houve interação significativa ($p>0.05$) entre os fatores Treonina x *Salmonella* para as interleucinas *IL-1 β* , *IL-8*, *IL-17* e *IL-22*, portanto, os dados apresentados representam as médias para fatores principais (Tabela 2). A suplementação com treonina *in ovo* diminuiu ($p>0.05$) a expressão de *IL-1 β* comparando-se ao grupo controle. A

inoculação por *Salmonella* Enteritidis aumentou significativamente o nível de expressão de *IL-1 β* , *IL-8*, *IL-17* e *IL-22*.

Houve interação significativa ($p \leq 0.05$) entre os fatores para os genes estudados às 168 horas pós-inoculação, exceto para *IL-17* ($p > 0.05$) (Tabela 2).

Tabela 2. Expressão relativa do mRNA de interleucina 1 beta (*IL-1 β*), interleucina 8 (*IL-8*), interleucina 17 (*IL-17*) e interleucina 22 (*IL-22*) em frangos de corte suplementados com treonina *in ovo* às 24 e 168 hpi com *Salmonella* Enteritidis

Tratamentos	24 hpi			
	Genes			
	<i>IL1</i>	<i>IL8</i>	<i>IL17</i>	<i>IL22</i>
Treonina 0.0%	2.33 a	3.12 a	2.88 a	2.73 a
Treonina 3.5%	0.83 b	2.00 a	2.52 a	1.90 a
Sem <i>Salmonella</i>	0.66 b	1.49 b	1.04 b	0.84 b
Com <i>Salmonella</i>	2.50 a	3.63 a	4.36 a	3.79 a
Treonina (A)	*	NS	NS	NS
<i>Salmonella</i> (B)	*	*	*	*
Interação (AxB)	NS	NS	NS	NS
Tratamentos	168 hpi			
	Genes			
	<i>IL1</i>	<i>IL8</i>	<i>IL17</i>	<i>IL22</i>
Treonina 0.0%	4.07	2.27	5.75 a	2.28
Treonina 3.5%	0.62	3.89	5.05 a	5.44
Sem <i>Salmonella</i>	3.10	1.90	1.99 b	1.84
Com <i>Salmonella</i>	1.59	4.25	8.81 a	5.89
Treonina (A)	*	*	NS	*
<i>Salmonella</i> (B)	*	*	*	*
Interação (AxB) ¹	*	*	NS	*

Dentro de cada fator, médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem a 5% de probabilidade pelo teste Tukey. Os resultados foram expressos como médias de 8 valores

24 hpi (24 horas pós- inoculação)

168 hpi (168 horas pós-inoculação);

NS, não significativo; * $p \leq 0.05$

¹Interações significativas foram desdobradas e os resultados estão apresentados na Tabela 2.

Às 168 hpi a *Salmonella* aumentou ($p \leq 0.05$) a expressão de *IL-17* (Tabela 2). A suplementação com Thr *in ovo* diminuiu a expressão de *IL-1 β* independente da inoculação e diminuiu ($p \leq 0.05$) a expressão de *IL-8* (Tabela 3). Houve aumento de *IL-22* em aves suplementadas com Thr *in ovo*, independente da inoculação. A *Salmonella* diminuiu a expressão de *IL-1 β* , *IL-8* por outro lado aumentou a expressão de *IL-1 β* , *IL-8* e *IL-22* em aves suplementadas com treonina *in ovo*.

Tabela 3. Desdobramento da expressão relativa do mRNA de interleucina 1 beta (*IL1 β*), interleucina 8 (*IL8*), e interleucina 22 (*IL22*) em frangos de corte suplementados com treonina *in ovo*, as 168 hpi com *Salmonella* Enteritidis

Genes	168 hpi	
	Sem <i>Salmonella</i>	Com <i>Salmonella</i>
<i>IL1β</i>		
Treonina 0.0%	6.01 aA	2.13 aB
Treonina 3.5%	0.19 bB	1.05 bA
<i>IL8</i>		
Treonina 0.0%	3.39 aA	1.15 bB
Treonina 3.5%	0.41 bB	7.36 aA
<i>IL22</i>		
Treonina 0.0%	0.71 bB	3.86 bA
Treonina 3.5%	2.96 aB	7.91 aA

Médias seguidas de mesmas letras, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os resultados foram expressos como médias 168hpi (168 horas pós-inoculação)

4. DISCUSSÃO

A expressão gênica de quatro citocinas no ceco de pintainhos foram analisadas para avaliar os efeitos da treonina suplementada *in ovo* e/ou inoculação por *Salmonella* Enteritidis isoladamente ou em conjunto. Às 24 horas pós-inoculação (hpi), foi observada diminuição de *IL-1 β* em aves suplementadas com Thr *in ovo* nesse estudo. De forma similar, a suplementação dietética de maior nível de Thr (3g/ kg), diminui a expressão de *IL-1 β* no íleo em frangos (Chen et al., 2017) e em galinhas poedeiras (Azzam et al., 2016). Bhanja et al. (2014) observaram que a expressão do gene *IL-12* diminuiu em aves suplementadas *in ovo* com aminoácidos (Lys, Thr, Arg, e Met+Cys) em comparação com o grupo controle não suplementado. Segundo Chen et al. (2017), a diminuição da expressão relativa de mRNA de citocinas pró-inflamatórias é reflexo da saúde intestinal e pode estar correlacionado com o aumento da síntese de mucinas em frangos. De acordo com Santos et al. (2013), o muco intestinal, constituído de mucinas, tem importante papel na resposta imune intestinal, formando uma barreira de proteção contra bactérias patogênicas. A partir dos resultados do presente estudo, pode-se sugerir que a suplementação de treonina *in ovo* foi capaz de atenuar a resposta inflamatória, através da resposta de diminuição da síntese de citocinas pró-inflamatórias.

A *IL-1 β* , produzida por heterófilos, macrófagos, células dendríticas e células T, provoca inflamação em células endoteliais, podendo inibir a invasão do epitélio por *Salmonella* através de mecanismos como o recrutamento de neutrófilos para sítios inflamatórios, ativação de moléculas de adesão endoteliais, indução de quimiocinas e outras citocinas e estimulação da resposta TH17 (Sahoo, et al 2011).

A expressão de *IL-22* foi maior em aves suplementadas com Thr *in ovo*. Isso sugere que a Thr pode ter um efeito sobre a imunidade no intestino. Bhanja e Mandal (2005) relataram diferença significativa na imunidade mediada por células com suplementação *in ovo* das combinações dos seguintes aminoácidos (Lys+Met+Cys), (Thr+Gly+Ser) e (Ile+Leu+Val) em frangos de corte. Bhanja et al. (2014) relataram maior expressão de *IL-4*, *IL-6* e *TNF- α* , em aves suplementadas *in ovo* com os aminoácidos treonina ou Met+Cys, comparando-se ao grupo controle não suplementado. O aumento observado na expressão da interleucina, possivelmente pode estar relacionado aos efeitos do substrato treonina na imunidade mediada por células.

No presente estudo observou-se, alterações significativas nos níveis de expressão de genes responsáveis por *IL1 β* , *IL8*, *IL17* e *IL22* às 24 horas pós-inoculação e *IL22* às 168hpi no ceco, sugerindo que a presença do patógeno e sua ação no hospedeiro foi suficiente para desencadear mudança na expressão gênica, como observado através do aumento de citocinas pró-inflamatórias, contribuindo para a defesa do hospedeiro. Crhanova et al. (2011) relataram aumento na expressão de interleucinas no ceco em galinhas poedeiras, incluindo *IL1 β* , *IL8*, *IL17*, *IL22* quando induzida pela infecção por *Salmonella* Enteritidis três dias pós-inoculação. Rychlik et al. (2014), após ocorrer a sensibilização inicial por células epiteliais, linfócitos, macrófagos e heterofilos residentes, é desencadeado um processo orquestrado na tentativa de limitar a disseminação por *Salmonella* para os tecidos de órgãos mais profundos, através da indução de importantes citocinas e proteínas imunes tais como *IL1 β* , *IL6*, *IL8*, *IL12*, *IL18*, *IL22*, *IL23*, IFN γ , LITAF ou iNOS. A *IL-8* é responsável pelo recrutamento de heterófilos aos tecidos acometidos pela bactéria (Wigley e Kaiser, 2003; Sahoo et al., 2011).

Matulova et al. (2013), caracterizaram a resposta da galinhas frente à infecção por *Salmonella* Enteritidis em diferentes períodos pós-inoculação. A presença da *Salmonella* Enteritidis no ceco de galinhas poedeiras desencadeou a sinalização por *IL-8* e *IL-17* com pico até 2 dias pós-inoculação e aumento da expressão de genes característicos de heterófilos e macrófagos, entre eles a *IL-1 β* , com pico até os 4 dias pós-inoculação. Aves inoculadas apresentaram comportamento de menor indução das citocinas pró-inflamatórias *IL-1 β* , *IL-8* aos 7 dias pós-inoculação ou 168hpi, indicando provavelmente diminuição da produção das citocinas gradualmente.

Aves inoculadas com *Salmonella* e suplementadas com treonina *in ovo*, apresentam maior expressão para *IL-1 β* e *IL-8* e *IL-22*. Wils-Plotz et al. (2013) observaram aumento de *IL-1 β* em tonsilas cecais em frangos de corte inoculados com *Eimeria* maxima, e suplementadas com dieta com baixo valor de Thr (1.8g de Thr/kg na dieta) comparadas com dietas de alto valor de Thr (5.3g de Thr/kg na dieta). Os autores também relataram que não

houve efeito de infecção em aves alimentadas com alto valor de Thr. Zhang et al. (2017) relataram maior expressão de *IL-8 in vivo* em aves suplementadas com Thr dietética em níveis deficientes, bem como em explantes de íleo de aves alimentadas com dieta com níveis adequados de Thr dietética e desafiados com lipopolissacarídeos (LPS). Assim, possivelmente maior recrutamento de células inflamatórias, ocasionado pelo aumento na expressão de citocinas, pode estar associado à ação da treonina como substrato para proliferação celular.

Os resultados indicam que a produção de interleucinas varia em função dos períodos avaliados e da suplementação com treonina *in ovo* em aves inoculadas com *Salmonella* ou não, já que a expressão de interleucinas pró-inflamatórias apresentaram efeitos adversos diante dos tratamentos no período desde 3 dias (3d, 24hpi) até os 9 dias de idade (9d, 168hpi). Essa diferença pode estar associada ao estabelecimento da microbiota de interesse, pois a mesma influencia e estimula o desenvolvimento do sistema imunológico; quaisquer alterações que ocorram em nível da composição da microbiota poderá afetar o sistema imune.

5. CONCLUSÃO

A suplementação de treonina *in ovo* promove aumento da expressão de genes relacionados ao sistema imune (*IL-1beta*, *IL8* e *IL22*) em frangos de corte aos 9 dias de idade ou 168 horas pós-inoculação na presença de *Salmonella* Enteritidis.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

AZZAM, M.M.M.; DONG, X.Y.; ZOU, X.T. et al. Effect of dietary threonine on laying performance and intestinal immunity of laying hens fed low-crude-protein diets during the peak production period. **Journal of Animal Physiology and animal nutrition**, v.101, p.e55-e66, 2016.

BARROW P. A. *Salmonella*: present, past and future. **Avian Pathology**, v.22, p.651-669, 1993.

BATAL, A.; PARSONS, C. Effect of fasting versus feeding oasis after hatching on nutriente utilization in chicks. **Poultry Science**, v.81, p.853-859, 2002.

BEAL, R.K.; POWERS, C.; WIGLEY, P. et al. A Strong antigen-specific T-cell response is associated with age and genetically dependent resistance to avian enteric salmonellosis. **Infection Immunity**, v.73, p.7509–7516, 2005.

BHANJA, SK.; MANDAL, A.B.; GOSWAMI, T.K. Effect of *in ovo* injection of amino acids on growth, immune response, development of digestive organs and carcass yields of broiler. **Indian Journal Poultry Science**, v.39, p.212–218, 2004.

BHANJA, S. K.; MANDAL, A. B. Effect of *in ovo* injection of critical amino acids on pre and post hatch growth, immunocompetence and development of digestive organs in broiler chickens. **Asian- Australian Journal of Animal Science**, v.18, p.524–531, 2005.

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.

BORTOLUZZI, C.; ROCHELL, S.J.; APPLGATE, T.J. et al. Threonine, arginine, and glutamine: Influences on intestinal physiology, immunology, and microbiology in broilers. **Poultry Science**, v.97, p.937-945, 2018.

CHEN, Y.P.; CHENG, Y. F.; LI, X.H. et al. Effects of threonine supplementation on the growth performance, immunity, oxidative status, intestinal integrity, and barrier function of broilers at the early age. **Poultry Science**, v.96, p.405-413, 2017.

COX, C.M.; SUMNERS, L.H.; KIM, S. Immune responses to dietary β -glucan in broiler chicks during an *Eimeria* challenge. **Poultry Science**, v.89, p.2597–2607, 2010.

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.

DIBNER, J.; KNIGHT, C.; KITCHELL, M. Early feeding and development of the immune system in neonatal poultry. **Journal of Applied Poultry Research**, v.7, p.425-436, 1998.

FERKET, P. R. Embryo epigenomic response to breeder management and nutrition, **XXIV World's Poultry Congress**. p.1-11, Salvador, Bahia, Brazil, 2012.

GAO, TIAN.; ZHAO, MINMENG.; ZHANG, LIN. et al., *In ovo* feeding of L-arginine regulates intestinal barrier functions of posthatch broilers by activating the mTOR signaling pathway. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2017.

GAL-MOR, O.; VALINSKY, L.E.A.; WEINBERGER, M. et al. Multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Infantis, Israel. **Emerging Infections Diseases Journal**, v.16, p. 1754-1757, 2010.

GUO, Y.; SHI, B.; YAN, S. et al. Effects of arginine on cytokines and nitric oxide synthesis in broilers. **The Journal of Animal and Plant Sciences**, v.25, p.366-371, 2015.

GONÇALVES, F.M.; SANTOS, V.L.; CONTREIRA, C.L. et al. *In ovo* nutrition: strategy for precision nutrition in poultry industry. **Archivos de Zootecnia**, v.62, p.45-55, 2013.

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.

KIM, G.B.; SEO, Y.M.; KIM, C.H. et al. Effect of dietary prebiotic supplementation on the performance, intestinal microflora, and immune response of broilers. **Poultry Science**, v.90, p.75-82, 2011.

KLASING, K.C. Nutritional modulation of resistance to infectious diseases. **Poultry Science**, v.77, p.1119-1125, 1998.

LEE, K.W.; LEE, S.H.; LILLEHOJ, H.S. Effects of direct-fed microbials on growth performance, gut morphometry, and immune characteristics in broiler chickens. **Poultry Science**, v.89, p.203-216, 2010.

MOREIRA FILHO, A.L. DE B.; OLIVEIRA, C.J.B. DE.; OLIVEIRA, H.B. DE. et al. High incubation temperature and threonine dietary level improve ileum response against post-hatch *Salmonella* Enteritidis inoculation in broiler chicks. **PloS one**, v.10, p. e0131474, 2015.

MOREIRA FILHO, A.L.B.; OLIVEIRA, C.J.B.; FREITAS NETO, O. et al. Intra-Amnionic Threonine Administered to Chicken Embryos Reduces *Salmonella* Enteritidis Cecal Counts and Improves Posthatch Intestinal Development. **Journal of Immunology Research**, v.2018, Article ID 9795829, 9 p, 2018.

NOY, Y.; SKLAN, D. Energy utilization in newly hatched chicks. **Poultry Science**, v.78, p. 1750-1756, 1999.

NICHOLS, N.L.; BERTOLO, R.F. Luminal threonine concentration acutely affects intestinal mucosal protein and mucin synthesis in piglets. **Journal Nutrition**, v.138, p.1298–1303, 2008.

OHTA, Y.; KIDD, M.T.; ISHIBASHI, T. Embryo growth and amino acid concentration profiles of broiler breeder eggs, embryos and chicks after *in ovo* administration of amino acids. **Poultry Science**, v.80, p.1430-1436, 2001.

OHTA, Y.; KIDD, M. Optimum site for *in ovo* amino acid injection in broiler breeder eggs. **Poultry Science**, v.80, p.1425-1429, 2001.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v.29, n.9, p.45e-445, 2001.

POTTURI, P.; PATTERSON, J.; APPLGATE, T.J. et al. Effects of delayed placement on intestinal characteristics in Turkey poults. **Poultry Science**, v.84, p.816-824, 2005.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. ISBN 3-900051-07-0. <http://www.r-project.org>, 2008. Acesso em 13/11/2018.

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

RYCHLIK, I.; ELSHEIMER-MATULOVA, M.; KYROVA, K. Gene expression in the chicken caecum in response to infections with non-typhoid *Salmonella*. **Veterinary Research**, v.45, p.119, 2014.

SANDBERG, F.B.; EMMANS, G.C.; KYRIAZAKIS, I. The effects of pathogen challenges on the performance of naïve and immune animals: the problem of prediction. **Animal**, v.1, p.67–86, 2007.

SAHOO, M.; CEBALLOS-OLVERA, I.; BARRIO, L. et al. Role of the inflammasome, IL-1 β , and IL-18 in bacterial infection. **The Scientific World Journal**, v.11, p.2037-2050, 2011.

SANTOS, R.L.; RAFFATELLU, M.; BEVINS, C.L. Life in the inflamed intestine,

Salmonella style. **Trends in Microbiology**, v.17, p.498–506, 2009.

SANTOS, E.G.; COSTA, F.G.P., SILVA J.H.V. 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.

TAHA-ABDELAZIZ, K.; HODGINS, D. C.; LAMMERS, A. et al. Effects of early feeding and dietary interventions on development of lymphoid organs and immune competence in neonatal chickens: A review. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.201, p.1-11, 2018.

TAKO, E.; FERKET, P.R.; UNI, Z. Changes in chicken intestinal zinc exporter mRNA expression and small intestinal functionality following intra-amniotic zinc-methionine administration. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.16, p.339–346, 2005.

UEMATSU, S.; AKIRA, S. The role of Toll-like receptors in immune disorders. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v.6, p.203–214, 2006.

UNI, Z.; FERKET, P.R. Methods for early nutrition and their potential. **World's Poultry Science Journal**, v.60, n°1, p.101-111, 2004.

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

VAN DER HEIJDEN, J.; FINLAY, B.B.Type III effector-mediated processes in *Salmonella* infection. **Future Microbiol**, v.7, p.685-703, 2012.

VANDEPLAS, S.; DUBOIS DAUPHIN, R.; BECKERS, Y. et al. *Salmonella* in chicken: Current and developing strategies to reduce contamination at farm level. **Journal of Food Protection**, v.73, p.774-785, 2010.

VARMUZOVA, K.; FALDYNNOVA, M.; ELSHEIMER-MATULOVA, M. et al. Immune protection of chickens conferred by a vaccine consisting of attenuated strains of *Salmonella* Enteritidis, Typhimurium and Infantis. **Veterinary Research**, v.47, 2016.

WIGLEY, P.; KAISER, P. Avian Cytokines in Health and Disease. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.5, n.1, p.1-14, 2003.

WILS-PLOTZ, E.L.; JENKINS, M.C.; DILGER, R.N. Modulation of the intestinal environment, innate immune response, and barrier function by dietary threonine and purified fiber during a coccidiosis challenge in broiler chicks. **Poultry Science**, v.92, p.735–745, 2013.

WILLEMSSEN, H.; DEBONNE, M.; SWENNEN, Q. Delay in feed access and spread of hatch: importance of early nutrition. **World Poultry Science Journal**, v.66, p.177–188, 2010.

YANG, H.; WANG, Z.; SHI, S. et al. Effects of starter feeding time on body growth and viscera development of newly hatched chicks. **Italian Journal of Animal Science**, v.8, p. 585–593, 2009.

ZHANG, Q.; CHEN, X.; EICHER, S. D. et al. Effect of threonine on secretory immune system using a chicken intestinal ex vivo model with lipopolysaccharide challenge. **Poultry Science**, v.96, p.3043–3051, 2017

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O setor agropecuário em questão encontra-se em constante expansão no país, com grandes perspectivas voltadas para as exportações, requerendo-se constante busca por diferentes tecnologias e soluções para aumento da sua produção. Ao longo dos anos, a intensa seleção genética de frangos de corte, possibilitou aumento expressivo nos índices de produtividade, por meio do aperfeiçoamento das características de desempenho, que são economicamente importantes na indústria avícola. Porém, 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 bactérias patogênicas. Correlacionado a isto, contaminações responsáveis por doenças de origem alimentar continuam sendo a maior causa de morbidez e mortalidade, e entre os produtos destinados ao consumo humano, incluem-se carne e ovos. Em decorrência, os atuais consumidores são extremamente exigentes, estes buscam por melhor qualidade de vida e por isso estão cada vez mais atentos as características dos produtos, que atendam por padrões ligados à segurança alimentar.

Diante do exposto, a *Salmonella* é considerada uma das principais zoonoses associadas ao consumo de produtos avícolas no mundo, sendo, portanto um grave problema de saúde pública. Além da importância das medidas preventivas para evitar o risco de infecção da salmonelose em humanos, é fundamental a busca por alternativas viáveis que promovam redução de patógenos relacionados a grandes prejuízos econômicos do setor avícola.

Esta pesquisa apresentou como sugestão avaliar o efeito da suplementação de treonina *in ovo* na expressão de genes relacionados a absorção de nutrientes e imunidade em frangos de corte nos primeiros dias de vida. Na qual foi relatado que a suplementação de treonina *in ovo* aumentou a expressão de importantes transportadores intestinais de nutrientes e aumento de genes relacionados ao sistema imune.

Nesse contexto a treonina é um interessante aminoácido a ser estudado, devido a sua estreita relação com a integridade e funcionalidade do sistema do trato gastrointestinal e imunológico. Pesquisas com base molecular fornecem importantes informações sobre expressão de genes que possam respaldar pesquisas e compreender melhor os resultados gerados de outras técnicas. Especificamente o estudo de genes relacionados aos processos de digestão e absorção de nutrientes, trazem importantes informações para melhorias na área de nutrição animal, possibilitando adequação na formulação de dietas e melhor utilização de diversos nutrientes. Enquanto que genes relacionados a imunidade podem levar a melhor compreensão dos mecanismos de ação do sistema imune em aves.

Além disso, estudos que envolvem a interação entre nutrição, microbiota e sistema imune em aves de produção, em condição de desafio ou não por *Salmonella* ou outros patógenos, ainda não foram totalmente elucidados. Entender as extensas interações que ocorrem a nível celular e molecular entre *Salmonella* e ceco de frango de corte são fundamentais e podem ser usadas para intervenções que visem a redução da prevalência de *Salmonella* em aves.

Sugere-se, a continuidade de pesquisas futuras que investiguem o efeito da nutrição *in ovo* com treonina, sobre alterações na expressão de genes relacionados a digestão e absorção de hexoses, peptídeos e aminoácidos, como também à resposta inflamatória em aves de produção, inoculadas por *Salmonella* Enteritidis, em diferentes períodos pós-inoculação nos primeiros dias de vida, abrangendo contagem bacterianas no conteúdo cecal, morfologia intestinal, peso corporal e ganho de peso e incubação, resposta imunológica mediada por células e diferentes tipos de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias.