

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRARIAS

INCLUSÃO DE DIPEPTÍDEO DE METIONINA NA  
DIETA DE FRANGOS DE CORTE SUBMETIDOS AO  
ESTRESSE TÉRMICO AGUDO

Autora: Tainara Ciuffi Euzébio  
Orientadora: Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Eliane Gasparino

Maringá  
Estado do Paraná  
Fevereiro – 2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRARIAS

INCLUSÃO DE DIPEPTÍDEO DE METIONINA NA  
DIETA DE FRANGOS DE CORTE SUBMETIDOS AO  
ESTRESSE TÉRMICO AGUDO

Autora: Tainara Ciuffi Euzébio  
Orientadora: Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Eliane Gasparino

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá – Área de concentração Produção Animal.

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
Fevereiro – 2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

E91i Euzébio, Tainara Ciuffi  
Inclusão de dipeptídeo de metionina na dieta de frangos de corte submetidos ao estresse térmico agudo / Tainara Ciuffi Euzébio. -- Maringá, 2018. 46 f. : il., color., figs., tabs.

Orientador(a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliane Gasparino.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia - Área de Concentração: Melhoramento Genético Animal, 2018.

1. Aminoácido. 2. Ambiente térmico. 3. Citocina. 4. Nutrigenômica. 5. Transporte de peptídeo. I. Gasparino, Eliane, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação Zootecnia - Área de Concentração: Melhoramento Genético Animal. III. Título.

CDD 21.ed. 636.5

AHS-CRB-9/1065



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

INCLUSÃO DE DIPEPTÍDEO DE METIONINA  
NA DIETA DE FRANGOS DE CORTE SUBMETIDOS  
AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO

Autora: Tainara Ciuffi Euzébio  
Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Eliane Gasparino

TITULAÇÃO: Mestre em Zootecnia - Área de Concentração Produção  
Animal

APROVADA em 28 de fevereiro de 2018.

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Maria Amélia Menck  
Soares

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Ana Paula del Vesco

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Eliane Gasparino  
(Orientadora)

- Meu coração tem medo de sofrer – disse o rapaz ao Alquimista, numa noite em que olhavam o céu sem lua.

- Diga a ele que o medo de sofrer é pior do que o próprio sofrimento. E que nenhum coração jamais sofreu quando foi em busca de seus sonhos, porque cada momento de busca é um momento de encontro com Deus e com a Eternidade.

“Cada momento de busca é um momento de encontro” disse o rapaz ao seu coração. “Enquanto procurei meu tesouro, todos os dias foram dias luminosos, porque eu sabia que cada hora fazia parte do sonho de encontrar. Enquanto procurei esse meu tesouro, descobri no caminho coisas que jamais teria sonhado encontrar, se não tivesse tido a coragem de tentar coisas impossíveis...”

*O Alquimista – Paulo Coelho*

Aos meus avós,  
Idalina Ramos Euzébio e Saul Euzébio (*in memoriam*)  
e  
Natalina Ciuffi Faria (*in memoriam*) e José Braga de Faria (*in memoriam*)

“O homem de bem deixa uma herança aos filhos de seus filhos.”

Provérbios 13:22

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

A Deus, toda honra e toda glória.

Aos meus pais Luiza Ciuffi Faria Euzébio e Messiones Euzébio, pelo amor e esforço diário, para que eu chegasse até aqui. À minha irmã Natália Ciuffi Euzébio, pelo companheirismo. Amo vocês!

À Universidade Estadual de Maringá e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, em homenagem a todos seus docentes, pela excelência em ensino dando a possibilidade de realização desse projeto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

À Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Eliane Gasparino, toda gratidão por seu carinho, ensinamentos e respeito nesses anos, sempre pronta a estar ao nosso lado e nos entender em qualquer situação. À minha coorientadora Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Simara Márcia Marcato, pelo apoio incondicional.

Ao professor Dr. Paulo César Pozza, pelo auxílio com a realização do experimento e análises. À professora Dr.<sup>a</sup> Daiane de Oliveira Grieser, por seu companheirismo e por sempre acreditar em mim.

A todos os funcionários da Fazenda Experimental de Iguatemi e aos técnicos do LANA, pela disposição e ajuda com as análises. À secretária do PPZ, Solange e a secretária do DZO Elizabeth, pelas risadas e pelos cafés.

À banca examinadora que com certeza contribuirá positivamente para o enriquecimento de nossa pesquisa.

À Isabele Naemi Kaneko, por sua parceria, tornando os dias a campo mais leves. Ao grupo de pesquisa da Professora Dr.<sup>a</sup> Tatiana Carlesso dos Santos, por toda ajuda.

As doutorandas Angélica Souza Khatlab, Daniela Rodrigues Barcos, Fabiana Cristina Belchior de Souza e Kariny Moreira, por toda ajuda e amizade. Ao estagiário Matheus Hoffmeister Luz por todo auxílio. À D.<sup>ra</sup> Marcelise Fachinel, pelo auxílio com as análises.

Ao meu namorado Pedro Augusto Dornelas, que acompanhou de perto todas as conquistas e desafios de mais esse período, sempre com palavras de apoio e ânimo.

A todos os meus familiares e amigos que torcem pela minha felicidade e apoiam minhas escolhas. As amigas mestrandas Bruna Albino Bronharo e Lais Santana C. Mantovani, entramos juntas e compartilhamos todos os momentos nesses dois anos. A minha amiga Rafaella Nóbrega Corrêa, pelas palavras de ânimo e pelas aulas de inglês.

A todos que de alguma forma participaram dessa jornada.

## BIOGRAFIA

TAINARA CIUFFI EUZÉBIO, filha de Luiza Ciuffi Faria Euzébio e Missiones Euzébio, nasceu em Maringá, Paraná, em 07 de novembro de 1992.

Cursou graduação em Zootecnia, na Universidade Estadual de Maringá de 2010 a 2015.

Em março de 2016, ingressou no mestrado no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da mesma instituição, área de concentração Produção Animal, subárea de Melhoramento Genético Animal sob orientação da Professora Dr.<sup>a</sup> Eliane Gasparino.

Em fevereiro de 2018, submeteu-se a banca examinadora para a defesa da dissertação apresentada.

## ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
I. INTRODUÇÃO.....	1
<b>1.    Avicultura.....</b>	<b>2</b>
<b>2.    Nutrição de frangos de corte.....</b>	<b>3</b>
2.1    Metionina.....	4
<b>3.    Nutrigenômica.....</b>	<b>7</b>
3.1    Transportadores de aminoácidos e peptídeos.....	9
3.1.1    PepT1 (SLC15A1).....	9
3.1.2    y <sup>+</sup> LAT1 (SLC7A7).....	10
3.2    Fator de necrose tumoral alpha (TNF- $\alpha$ ).....	11
<b>4.    Importância do controle da temperatura na produção de frangos de corte.....</b>	<b>12</b>
REFERÊNCIAS.....	14
OBJETIVOS GERAIS.....	19
II. INCLUSÃO DE DIPEPTÍDEO DE METIONINA NA DIETA DE FRANGOS DE CORTE SUBMETIDOS AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO.....	20
<b>Resumo.....</b>	<b>20</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>21</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>22</b>

<b>Material e métodos.....</b>	<b>24</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>31</b>
<b>Discussão.....</b>	<b>35</b>
<b>Conclusão.....</b>	<b>40</b>
<b>Agradecimentos.....</b>	<b>40</b>
<b>Referências.....</b>	<b>41</b>

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1</b> Composição centesimal das dietas experimentais.....	26
<b>Tabela 2</b> Sequência de primers utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR em tempo real - qRT-PCR).....	30
<b>Tabela 3</b> Consumo de ração, ganho de peso, peso final e conversão alimentar em frangos de corte no período de 1 a 44 dias de idade.....	31
<b>Tabela 4</b> Expressão dos genes Pept1, $\gamma$ -LAT e TNF $\alpha$ no jejuno de frangos de corte aos 45 dias de idade.....	32
<b>Tabela 5</b> Análise da atividade enzimática de AST, ALT e do ácido úrico do plasma de frangos de corte.....	33
<b>Tabela 6</b> Análise do conteúdo de colesterol total, triglicérides LDL e HDL do plasma de frangos de corte de 45 dias de idade.....	34

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1</b> Síntese de metionina e S-adenosilmetionina em um ciclo de ativação do grupo metil .....	6

## I – INTRODUÇÃO

A alimentação animal consome cerca de 65% de todo o milho e 45% de todo farelo de soja produzido no País, sendo que grande parte dessa produção é destinado para a alimentação de aves de corte ou postura (Butolo, 2010), apesar dessa grande disponibilidade de matéria-prima, a composição aminoacídica desses produtos é baixa, e assim necessita da inclusão de aminoácidos sintéticos para que as exigências animais sejam atendidas.

A desnutrição proteica afeta diretamente a concentração de aminoácidos no corpo animal (Li et al., 2007), em espécies aviárias o aminoácido principal a metionina, é classificada como primeiro aminoácido limitante porque é limitada em fontes de proteínas vegetais que são a base da dieta, e porque existe forte requisito de suporte para crescimento das penas e síntese proteica (Bunchasak, 2009), sendo comprovado seu efeito em relação ao crescimento muscular (Wen et al., 2014).

A avicultura de corte deve muito de seu crescimento a constante evolução na nutrição, manejo, instalações e a genética (Butolo, 2010). Nos campos da pesquisa envolvendo a genética, a nutrigenômica busca esclarecer a maneira como a expressão gênica é afetada pela dieta e nutrientes disponibilizados aos animais.

Compreender os efeitos regulatórios da dieta nos sistemas de transporte de aminoácidos e peptídeos oferece uma visão mais profunda que ajudará os nutricionistas a melhorar a eficiência da utilização de proteínas alimentares em frangos de corte (Navidshad e Mirhoseini, 2011). O transportador de peptídeos 1, ou PepT1, é expresso principalmente no intestino delgado, e transporta mais de 400 dipeptídeos e 8000 tripeptídeos resultantes da digestão de proteínas, sendo sua expressão regulada pela dieta, estágio de desenvolvimento ou idade do organismo e também pela ação de hormônios (Navidshad e Mirhoseini, 2011; Thwaites e Anderson, 2010). O transportador de

aminoácidos  $\gamma^+$ LAT1, pertence a categoria de transportadores  $\gamma^+$  responsáveis pelo transporte dos aminoácidos neutros e catiônicos, sendo os únicos membros da categoria dos transportadores heteroméricos de aminoácidos independentes de sódio (Fotiadis et al., 2013). Atuando diretamente nos processos inflamatórios e na resposta imune do organismo, o fator de necrose tumoral  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , é secretado pelos macrófagos, linfócitos e monócitos, e o principal estímulo para que isso ocorra é a presença de lipopolissacarídeos bacterianos (Vitale e Ribeiro, 2007).

Sabe-se que os agentes estressores físicos, fisiológicos, nutricionais ou ambientais são diretamente envolvidos com o desenvolvimento do animal (Altan et al., 2003). Assim, o estresse térmico induz várias alterações metabólicas e fisiológicas em frangos de corte, podendo gerar grandes perdas no desempenho e na imunidade destas aves (Borges et al., 2003). Para tentar se manter em condições fisiológicas ideais as aves quando expostas ao calor, aumentam a taxa respiratória, tentam aumentar a área superficial, mantendo as asas afastadas do corpo, eriçando as penas e intensificando a circulação periférica (Borges et al., 2003). O estresse por calor pode levar os animais a reduzirem o consumo de alimento, refletindo diretamente no seu desempenho e deposição de tecido.

Apesar da diversidade de trabalhos tentando elucidar o efeito que o ambiente e a nutrição exercem sobre a expressão gênica, um longo caminho ainda precisa ser percorrido para se encontrar respostas conclusivas. Diante do exposto, no capítulo II deste trabalho, busca-se explorar os possíveis efeitos da suplementação de metionina e do estresse térmico agudo, em relação ao desempenho e expressão dos genes PepT1,  $\gamma^+$ LAT e TNF $\alpha$  em frangos de corte.

## **1. Avicultura**

O investimento despendido em pesquisas envolvendo a avicultura em conjunto com a organização produtiva do setor, vem concedendo ao frango produzido no Brasil, posição de destaque no cenário mundial e na mesa dos consumidores. Em 2016, o país produziu quase 13 milhões de toneladas de carne de frango, número esse que o consolidam como segundo maior produtor da carne no mundo, e mesmo com mais de 60% do produto ficando disponível para consumo interno, o Brasil é o maior exportador no mesmo ano, colocando no mercado mundial mais de 4 milhões de toneladas da carne de frango que responderam a receita de 6,848 milhões de dólares em negociações, sendo

os estados da região Sul do país responsáveis por mais de 70% da produção de frangos (ABPA, 2017). Todo esse sucesso não seria possível sem pesquisas envolvendo a nutrição e a genética das aves, somente assim conquistou-se animais com melhor relação ingestão de nutrientes/conversão em tecido muscular, com melhor acabamento em cortes nobres, como coxa e peito, mas com necessidades fisiológicas e nutricionais mais apuradas, demandando assim pesquisas para o conhecimento desses fenômenos.

## **2. Nutrição de frangos de corte**

A nutrição dos animais monogástricos vem sendo realizada com base no conceito de proteína ideal, proposto por H. H. Mitchell e H. M. Scott na Universidade de Illinois no início da década de 1960, sendo importante para atender às exigências dos animais e tornar mais eficiente os processos de manutenção e crescimento (Emmert e Baker, 1997) diminuindo assim a excreção indevida de nitrogênio. Esse conceito propõe, a redução do teor proteico das rações, mas com a inclusão dos aminoácidos essenciais dentro dos níveis recomendados às exigências das aves (Oliveira Neto e De Oliveira, 2009).

A nutrição corresponde a cerca de 70% do gasto com a criação animal, tornando a eficiência alimentar um dos aspectos mais valorizados nas pesquisas, desta porcentagem a proteína é o componente mais caro da ração animal, e a sua qualidade pode ser medida pela sua composição de aminoácidos, principalmente a proporção de aminoácidos essenciais (Costa et al., 2014; Lassiter et al., 2006). As proteínas são macromoléculas de alto peso molecular e as mais abundantes por ocorrerem em todas as células e em todas suas partes, e são formadas por uma sequência de 20 tipos de aminoácidos, esses que têm os mais variados papéis no metabolismo animal, sendo por exemplo, a forma de expressão da informação genética contida no DNA (Nelson e Cox, 2013). Todas as proteínas são formadas por aminoácidos unidos covalentemente em sequências caracterizadas por ligações peptídicas.

O início da digestão das proteínas no organismo das aves se dá no proventrículo (Rutz, 2002) desses animais por intermédio da secreção do pepsinogênio forma inativada da pepsina (Silva et al., 2014) sendo posteriormente direcionado ao intestino delgado, em que se encontra o principal sítio de digestão e absorção dos aminoácidos e peptídeos (Bertechini, 2004). As proteínas sofrem ação das proteases pancreáticas e intestinais, secretadas como proenzimas, estas são ativadas inicialmente

por enteroquinases, enzimas presentes na membrana apical do enterócito. As endopeptidases (tripsina, quimiotripsina, elastase) e exopeptidases (carboxipeptidases A e B) são as responsáveis pela formação de aminoácidos livres, oligopeptídeos e di e tripeptídeos (Rutz, 2002). Os peptídeos compostos por mais de três resíduos de aminoácidos são hidrolisados extracelularmente por peptidases localizados principalmente na borda em escova dos enterócitos, e, em menor grau, no lúmen intestinal, para formar dipéptidos, tripéptidos e aminoácidos livres (Silva et al., 2014).

Os produtos finais da digestão de proteína são aminoácidos livres, di e tripeptídeos, tendo seu maior sítio de absorção no jejuno (Silva, 2014). O epitélio intestinal possui mecanismos de transporte eficiente para absorver não apenas aminoácidos livres, mas também di e tripeptídeos. Os aminoácidos livres são absorvidos através da membrana apical dos enterócitos por sistemas de transportes específicos para determinados grupos de aminoácidos. Os di e tripeptídeos são transportados intactos através da membrana apical dos enterócitos por sistemas de transportes específicos para peptídeos. Os transportadores de peptídeos podem transportar todos os 400 a 8000 tripeptídeos resultantes da combinação dos diferentes aminoácidos da dieta (Daniel, 2004).

Os aminoácidos são ainda divididos em essenciais e não essenciais, sendo os essenciais os que não são passíveis de síntese ou o são em pouca quantidade pelo animal, já os não essenciais podem ser sintetizados através de outros (Bertechini, 2004). Como não essenciais, pode-se citar a glutamina, cistina, serina, alanina, e como aminoácidos essenciais pode-se citar lisina, treonina, valina e como mais importante na nutrição de aves, a metionina (Costa et al., 2014).

## 2.1 Metionina

A metionina é um aminoácido sulfurado, que foi isolado em 1922 pelo patologista John Howard Mueller a partir dos produtos hidrolíticos da caseína, uma fração de um novo aminoácido contendo enxofre que era requerido pelas bactérias *Streptococcus* hemolítico para seu crescimento. Em 1928 o novo aminoácido teve sua fórmula química identificada como ácido metil-tiol  $\alpha$ -aminobutírico por George Barger, Frederick Philip Coyne que sugeriram a John Howard Mueller o nome mais curto de metionina em alusão ao agrupamento característico (Willke, 2014).

A metionina possui diversas funções no organismo animal, a principal é participar da síntese proteica (Niculescu e Zeisel, 2002). Também é precursora da cistina, então, desde que a suplementação de metionina esteja adequada a sua suplementação se faz desnecessária. A metionina pode ser uma fonte alternativa de cistina num processo não reversível, com função importante nas estruturas de várias proteínas (imunoglobulinas, insulina), com o papel de ligar várias cadeias polipeptídicas via pontes dissulfeto (Nelson e Cox, 2013). Também é utilizada para a síntese de proteína corporal e na formação da pele e penas, e explica a alta exigência desses aminoácidos pelas aves (Bunchasak, 2009).

A conversão da metionina dietética em S-adenosilmetionina é o ponto para a doação de grupos metil. Essa conversão ocorre através da ação da enzima metionina-adenosiltransferase (D'Mello, 2003). Após a conversão em S-adenosilmetionina, esse intermediário é doador de grupos metil, que são necessários para várias reações metabólicas tais como a síntese de colina e betaína, poliaminas e melatonina. A transferência do grupo metila da S-adenosilmetionina para um acceptor produz S-adenosilhomocisteína, posteriormente degradada em homo-cisteína e adenosina. A metionina é regenerada pela transferência de um grupo metila para a homocisteína, em reação catalisada pela metionina-sintase, e a metionina é novamente convertida em S-adenosilmetionina para completar um ciclo de ativação da metila (Nelson and Cox, 2013) (Figura 1).

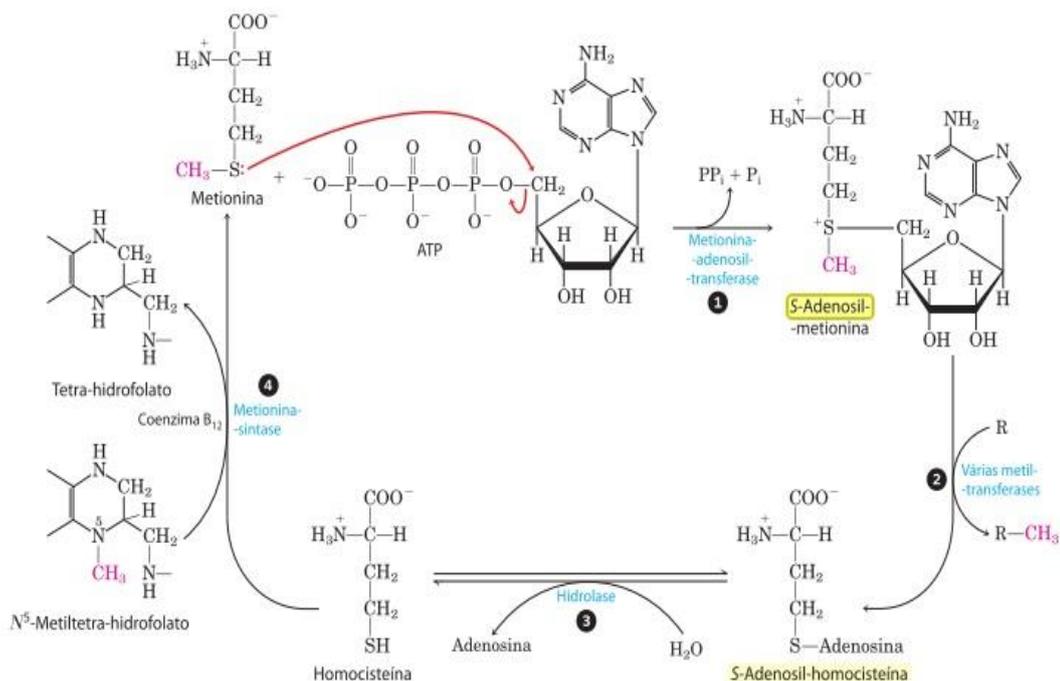


Figura 1. Síntese de metionina e de S-adenosilmetionina em um ciclo de ativação de grupo metila (Extraído de Nelson e Cox, 2013)

Como produto da desmetilação da S-adenosilmetionina se tem a S-adenosilhomocisteína, essa que pode então seguir duas vias: transulfuração ou remetilação. Na via de transulfuração, aproximadamente 50% da homocisteína é convertida irreversivelmente à cistationina, e essa reação é catalisada pela enzima cistationina  $\beta$ -sintetase, dependente da vitamina B6 como cofator, em que a homocisteína sofre uma condensação com a serina para formar a cistationina. A enzima seguinte na reação,  $\gamma$ -cistationase dependente também de vitamina B6, hidrolisa a cistationina gerando então cisteína e  $\alpha$ -cetobutirato. Quanto à via da remetilação, a homocisteína adquire um grupo metil para formar novamente metionina, em uma reação catalisada pela enzima metionina sintetase que depende da vitamina B12 como cofator (Bydlowski et al., 1998).

A metionina também é participante da biossíntese da glutatona, está intimamente relacionada com o mecanismo de defesa contra os radicais livres. Se há baixa quantidade de metionina no organismo animal, favorece-se a rota de remetilação, aumentando a quantidade disponível deste aminoácido. Já, se estão presentes altas quantidades de metionina, a rota de transulfuração, é ativada, e há maior produção de cisteína, e assim, maior produção de glutatona para combater as espécies reativas de oxigênio. Maior quantidade de metionina também está associada a maior quantidade de

glutationa peroxidase e de catalase, enzimas envolvidas nos combates ao estresse oxidativo (Finkelstein e Martin, 1984; Li et al., 2007; Romestaing et al., 2008).

Visto a grande importância da metionina no metabolismo, diversos autores buscam em suas pesquisas encontrar níveis adequados de suplementação (Morris e Fisher, 1970) e elucidar como a metionina interfere e quais as respostas do animal. Wen et al. (2014) avaliaram dois níveis de metionina para cada fase das aves (1-21 dias e 22-42 dias de idade, sendo os níveis 0,50 - 0,60% e 0,43% - 0,53% respectivamente) em relação ao crescimento muscular do peito, e a expressão dos genes da família dos fatores reguladores miogênicos, e obtiveram maior peso relativo do músculo do peito e maior expressão gênica nos animais do grupo que receberam maior porcentagem de metionina, mostrando que os níveis controle não foram adequados para o total crescimento muscular do animal. Existem referências que indicam os níveis adequados para suplementação dos animais, quanto aos aminoácidos, vitaminas, e outros nutrientes (NRC, 1994; Rostagno, et al., 2011), mas conforme os avanços no genótipo animal ocorrem é necessário pesquisas que comprovem que os valores ainda estão adequados.

### **3. Nutrigenômica**

Uma forma de conhecimento da maneira integrada de como os nutrientes atuam no organismo animal é molecularmente, assim a nutrigenômica se encarrega da explicação sobre a interação dos genes, da dieta, de fatores ambientais e dos microrganismos intestinais, e como essa associação pode atuar sobre a digestão, absorção e excreção de nutrientes, deposição de tecido e metabolismo animal (Oviedo-Rondon et al., 2014), sendo esta apenas mais uma das áreas das genômicas, envolvendo ainda metabolômica, proteômica e transcriptômica. (Dang et al., 2014). Desde o término do sequenciamento do genoma das aves, diversos estudos envolvendo a nutrição e seus efeitos na expressão gênica desses animais vêm sendo conduzidos.

Pesquisas envolvendo a nutrigenômica podem ser associadas aos mais diversos tipos de desafios, patologias e nutrientes variados. Na nutrição *in ovo* e como ela pode afetar as características no animal adulto, assim (Sławinska et al., 2014) avaliaram a injeção de três simbióticos no 12º dia de incubação, e a consequente expressão dos genes relacionados ao sistema imune das aves (6 citocinas (IL-4, IL-6, IL-12p40, IL18, IFN- $\beta$  e IFN- $\gamma$ ) e uma quimiocina (IL-8) 42 dias pós-eclosão, os autores encontraram uma regulação positiva para as interleucinas 4 e 6 no baço dos animais com injeção de dois

dos três simbióticos, assim sugerindo que ao se avaliar a expressão gênica pode-se selecionar os melhores simbióticos para a suplementação animal.

Para entender como o metabolismo animal se comporta em momentos de desafio pode-se utilizar de restrição alimentar, estresse por calor ou frio, entre outros. Após um período de restrição alimentar Madsen e Wong., (2011), encontraram um aumento de quase duas vezes na expressão do transportador de dipeptídeos PepT1 e do fator de transcrição PPAR $\alpha$  em frangos de corte jovem em relação a sua expressão antes do jejum. As aves restantes após esse período foram redistribuídas em três grupos referentes aos períodos de alimentação e restrição, e foram observadas por até 29 horas, e houve um pico de expressão do PPAR $\alpha$ , mas não para PepT1 que mostrou aumento lento, mas acompanhando a expressão do PPAR $\alpha$ . Esses resultados são confirmação para a ideia de que o PPAR $\alpha$  desempenha papel importante na regulação da expressão do PepT1 durante a restrição alimentar.

Os transportadores de nutrientes no intestino delgado são responsáveis pela assimilação de nutrientes alimentares, assim, alterações na expressão destes pelo estresse podem afetar a disponibilidade de nutrientes e energia para o animal para crescimento e desenvolvimento (Sun et al., 2014). Os autores estudaram os níveis de expressão de transportadores de açúcar, aminoácidos e ácidos graxos no jejuno de frangos de corte expostos a altas temperaturas ambientes. Mostrando que apesar de muito estudados, os mecanismos reguladores da expressão genica ainda necessitam de esclarecimentos. Del Vesco et al. (2015) avaliaram o efeito da deficiência de metionina, suplementação de metionina em nível recomendado e suplementação de metionina em excesso, em animais desafiados pelo calor agudo sob a resposta da expressão dos genes relacionados ao estresse oxidativo, os autores chegaram ao resultado que a suplementação de metionina comediou o efeito do estresse, já que os níveis dos genes relacionados ao sistema antioxidante foram mais altos.

Assim pode-se entender que existe verdadeiramente uma influência e associação entre nutrientes, condição alimentar, proteínas, minerais, vitaminas, entre outros fatores sobre a expressão genica do animal que reflete de forma importante sobre o desempenho do mesmo. Mostrando a importância de cada vez mais se conhecer o animal e seu metabolismo para que se obtenha resultados cada vez mais eficientes em relação ao seu desempenho.

## 3.1 Transportadores de aminoácidos e peptídeos

### 3.1.1 PepT1

Para Sanioto, (2016) em animais e em humanos as misturas de peptídeos se mostram nutricionalmente superiores as misturas contendo aminoácidos livres, por algumas razões como: a absorção de aminoácidos na forma de peptídeos ocorrer mais rapidamente do que na forma de aminoácidos livres; a absorção dessas moléculas evita problemas de competição com os transportadores, e pode ocorrer com os aminoácidos livres; a absorção de formas oligoméricas é energeticamente mais vantajosa para as células do que a de formas monoméricas; e pelo fato de os peptídeos serem mais resistentes do que os aminoácidos ao jejum, às carências proteico-calóricas, às carências vitamínicas e as doenças intestinais.

O transportador de peptídeos 1, ou PepT1 é a primeira isoforma da família 15 de carreadores de solutos, subfamília A, sendo assim codificado pelo gene SLC15A1, estando localizado no cromossomo 1 das aves (Frazier et al., 2008). Sabe-se que a sua maior atividade está concentrada no jejuno, e também ocorre a maior parte da absorção de peptídeos e aminoácidos livres (Adibi and Mercer, 1973; Broer, 2008). O PepT1 é o primeiro transportador responsável pela atividade de cotransporte H<sup>+</sup>/peptídeo estando presente na membrana apical e basolateral dos enterócitos, é um transportador eletrogênico, favorecido pelo microclima da membrana apical e pela atividade da bomba de H<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> da membrana, e sua expressão pode estar diretamente relacionada com o estado nutricional do animal (Duarte, 2009; Ogihara et al., 1999).

A caracterização do transportador tem sido amplamente estudada nas diversas espécies animais (Chen et al., 2002; Habashy et al., 2017; Verri et al., 2010), e nas adversas condições que possam acometê-los. Miska et al. (2015) ao submeter as aves ao estresse térmico, encontraram elevação nos níveis expressos de PepT1 no músculo peitoral de frangos de corte, associando essa questão a diminuição no consumo dos animais estressados, fator esse que pode ter demandado aumento da energia celular. Awad et al., (2014) ao avaliar animais sadios contra os que foram infectados por *Campylobacter jejuni*, encontraram diminuição da expressão para os animais infectados, os autores indicam que essa diminuição do transportador pode favorecer a proliferação de *Campylobacter* devido a maior presença de nutrientes não aproveitados que servirão como substrato para o microrganismo. Os mecanismos e a importância do transporte de peptídeos no embrião ainda não são bem esclarecidos, por isso Chen et al., (2005) ao

avaliar a expressão do PepT1 em embriões de frangos de corte, encontrou aumento de 50 vezes mais PepT1 do dia 18 para o dia da eclosão dos pintos, assim como Van et al., (2005) que ao avaliar a expressão do transportador durante o período de incubação em perus, encontraram aumento de 3 vezes do dia da eclosão em relação ao dia 5 pré-eclosão. Ambos autores sugerem que a atividade deste transportador parece ser induzida de forma evolutiva, podendo ser maximizada próximo ao período da eclosão para que ocorra a absorção dos substratos peptídicos tão logo a ingestão de alimentos comece, sendo assim fisiologicamente importante para a adaptação do animal ao novo ambiente.

### 3.1.2 $y^+$ LAT1 (SLC7A7)

Os transportadores de aminoácidos são divididos em famílias de acordo com suas propriedades funcionais, mecanismos de transporte, semelhança molecular e especificidade dos aminoácidos transportados (Wagner et al., 2001).

A família SLC7 de transportadores se divide em duas de acordo com sua especificidade de transporte. Os membros de SLC7A1 a SLC7A4 são parte do subgrupo de transportadores de aminoácidos catiônicos, enquanto a classe de SLC7A5 a SLC7A11, são os chamados transportadores heteroméricos de aminoácidos, também denominados HATs (Verrey et al., 2004). Dentro do subgrupo dos HATs estão duas isoformas que formam o sistema  $y^+L$ , sendo essas o  $y^+LAT1$  (SLC7A7) e o  $y^+LAT2$  (SLC7A6) (Wagner et al., 2001). O sistema  $y^+L$  foi primeiramente descoberto em eritrócitos, e especificamente o  $y^+LAT1$  é encontrado principalmente no intestino delgado e rins (Fotiadis et al., 2013).

Esses transportadores são os únicos membros de HATs dependentes de sódio, esse que auxilia no aumento da afinidade para os aminoácidos neutros sem alterar a velocidade de transporte, trocando aminoácidos neutros por aminoácidos catiônicos intracelulares (Kanai et al., 2000; Torrents et al., 1998). O transporte de aminoácidos neutros é independente de  $Na^+$ . O transportador  $y^+LAT1$  é uma subunidade leve, e está associado por pontes dissulfeto ao 4F2hc, uma das subunidades pesadas, sendo o efluxo basolateral de aminoácidos mediado por essa associação (Broer, 2008).

### 3.2 Fator de necrose tumoral alpha (TNF- $\alpha$ )

O TNF- $\alpha$ , faz parte do grupo das citocinas, que são proteínas de sinalização extracelular, formadas dentro da célula, mas ao serem liberadas interagem com seus receptores celulares (Chung, 2001), sendo ativadas como mediadores inflamatórios frente a diversos estímulos. O TNF- $\alpha$  é parte da família das citocinas pró-inflamatórias, que são em sua maioria secretados por macrófagos, linfócitos e monócitos, desempenhando um papel importante durante a inflamação, diferenciação, proliferação celular e apoptose (Chung, 2001; Zelová e Hošek, 2013).

O TNF- $\alpha$  pertence à superfamília do TNF sendo sintetizado toda vez que a célula é estimulada, não sendo portanto armazenado dentro da célula (Zelová e Hošek, 2013). Sua ação no organismo é capaz de induzir a produção da interleucina-8, a proteína C reativa, e também outras citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 $\beta$ , que atua em sinergismo. Essa ação de indução para expressão de outras citocinas é comum, sendo que algumas são mais eficazes quando atuam em sinergia com outras, podendo também acontecer de apresentarem efeito antagonista (Tizard, 2010).

Os efeitos biológicos do TNF- $\alpha$  são modulados por dois receptores, sendo estes o TNFR1 e o TNFR2. Os receptores do fator de necrose tumoral apresentam como seu mecanismo de sinalização intracelular a indução da apoptose ou estímulo da expressão gênica (Ware, 2005). O TNFR2 possui menor afinidade de ligação para o TNF- $\alpha$  e sua expressão é limitada a células do sistema imunológico, enquanto o TNFR1 pode se ligar ao TNF- $\alpha$  solúvel ou associado a célula sendo encontrado na maioria das células, e nele está o domínio de interação, denominado domínio da morte (Wajant et al., 2003). Essa interação que dá ao TNF- $\alpha$  a nomeação de citocina sentinela, pelo fato de iniciar a defesa em resposta a uma injúria local (Feldmann e Steinman, 2005). Grell et al., (1998) evidenciaram a alta afinidade do TNFR1 para o TNF- $\alpha$  solúvel e não para o TNFR2.

O mecanismo primário da ação do TNF (solúvel ou transmembrana), uma vez internalizado ao citoplasma celular pelos receptores de membrana, é a síntese do fator kappa B nuclear (NF- $\kappa$ B), uma família de fatores de transcrição que controla grande número de genes inflamatórios, promovendo apoptose programada, dependente da ação da caspase-8 e da caspase-3. Após internalizado ao citoplasma celular via seus receptores, o TNF- $\alpha$  vai estimular a transcrição e a produção da enzima I $\kappa$ B quinase, que irá produzir o fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). O NF- $\kappa$ B, quando ativado, irá agir no núcleo da célula,

induzindo a produção de diversas proteínas envolvidas nas respostas inflamatória, promovendo a apoptose programada (Ware, 2005).

#### **4. Importância do controle da temperatura na produção de frangos de corte**

Os genótipos atuais de frango de corte necessitam, para expressarem todo seu potencial produtivo, de condições ideais de produção. O ambiente que envolve os animais abrange os elementos químicos, biológicos e físicos como a taxa de metabolismo, sociais como taxa de lotação e densidade de criação, climáticos que infere sobre a temperatura, umidade e velocidade do ar, e assim que regulam diretamente o seu desenvolvimento e crescimento (Baêta e Souza, 2010; Ruas, 2001).

As aves, são animais homeotermos, e assim, possuem um sistema de controle do seu ambiente interno, localizado no hipotálamo, que atua auxiliado por termorreceptores, sendo o responsável pelo controle da temperatura corporal, da ingestão de alimentos e água, que quando ativado em momentos de estresse vão através de mecanismos fisiológicos e respostas comportamentais, encontrar maneiras de manter dentro da faixa de termoneutralidade a temperatura corporal normal (Baêta e Souza, 2010; Macari, Furlan e Maiorka, 2004), para que o animal consiga se adequar aos possíveis desafios é necessário que o ambiente a qual está sendo submetido esteja adequado as suas necessidades. Em modo geral, um ambiente é tido como confortável para aves adultas quando apresentam temperaturas de 15-18°C a 22-25°C e umidade relativa do ar de 50 a 70% (valores que podem variar de acordo com a linhagem que se trabalha). Esses valores, especialmente no que se diz respeito à temperatura, dificilmente são obtidos nas condições do clima brasileiro, sobretudo no verão (Tinôco, 2001), pois no Brasil, muitos produtores ainda possuem aviários pouco tecnificados.

Quando submetidas a estresse por calor, a ave expressa respostas fisiológicas compensatórias, incluindo-se a vasodilatação periférica, que resulta em aumento na perda de calor não evaporativo. Assim, na tentativa de aumentar a dissipação do calor, a ave consegue aumentar a área superficial, mantendo as asas afastadas do corpo, eriçando as penas e intensificando a circulação periférica. A perda de calor não evaporativo pode também ocorrer com o aumento da produção de urina, se esta perda de água for compensada pelo maior consumo de água fria (Borges et al., 2003) e também por outros mecanismos como aumento na frequência respiratória. Um dos efeitos do estresse térmico

sobre as aves que acarreta em perdas substanciais é a redução do consumo de ração, pois as aves tentam diminuir a produção de calor metabólico e aumentar a dissipação. Tanto a digestão quanto a absorção dos nutrientes geram energia, que é liberada na forma de calor sendo chamado “incremento calórico”, que reflete diretamente na sua eficiência produtiva (Valerio et al., 2003). Após exposição aguda dos frangos de corte a diferentes temperaturas (Tan et al., 2010) relataram mudanças comportamentais nos animais como tendo ficado mais ofegantes, apresentando penas eriçadas e incremento no consumo de água.

Ao submeter os animais a duas faixas de temperatura diariamente (31°C e 36°C), dos 35 aos 42 dias de idade, Quinteiro-Filho et al., (2010) encontraram menor ganho de peso corporal, menor consumo de ração, e maior conversão alimentar para os animais submetidos a temperatura de 36°C, para esse grupo ainda, houve alta taxa de mortalidade nos dois primeiros dias. Nos dois grupos, os níveis de corticosterona também foram aumentados em relação ao controle, com base em outras produções científicas, os autores associam o aumento da corticosterona como atuante nos núcleos de controle de alimentação hipotalâmicos que regulam a ingestão e satisfação de alimentos, permitindo diminuição no consumo de alimentos resultando assim em diminuição no ganho de peso corporal. Bonnet et al., (1997) concluíram que a redução no ganho de peso em aves submetidas ao estresse por calor foi de 50% em relação às aves mantidas em condições de termoneutralidade. Após duas semanas de exposição crônica ao calor, a ingestão de alimento diminuiu mais de 3% por cada aumento de um grau entre 22 e 32°C. Consequentemente, com a diminuição do consumo e perda de peso, os pesos absolutos de coxa, sobrecoxa e peito também são prejudicados, diminuindo o rendimento desse cortes que possuem maior valor agregado (Oliveira, et al., 2006).

Manter os animais em um ambiente favorável a sua criação para cada idade se mostra necessário, para seu máximo desempenho, e reflete diretamente no rendimento que será obtido pelo produtor. Com a crescente pressão da sociedade em relação ao bem estar animal esses estudos também são fundamentais para que se estabeleça o máximo conforto durante a produção do animal.

## Referências

- ABPA, 2017. Relatório Anual da ABPA 2017, Associação Brasileira de Proteína Animal.
- Adibi, S.A., Mercer, D.W., 1973. Protein Digestion in Human Intestine as Reflected in Luminal, Mucosal, and Plasma Amino Acid Concentrations after Meals. *J. Clin. Invest.* Volume: 52, Pages: 1586-1594. <https://doi.org/10.1172/JCI107335>
- Altan, Ö., Pabuçcuoğlu, A., Altan, A., Konyalıoğlu, S., Bayraktar, H., 2003. Effect of heat stress on oxidative stress, lipid peroxidation and some stress parameters in broilers. *Br. Poult. Sci.* 44, 545–550. <https://doi.org/10.1080/00071660310001618334>
- Awad, W.A., Aschenbach, J.R., Ghareeb, K., Khayal, B., Hess, C., Hess, M., 2014. *Campylobacter jejuni* influences the expression of nutrient transporter genes in the intestine of chickens. *Vet. Microbiol.* 172, 195–201. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.04.001>
- Baêta, F. da C., Souza, C. de F., 2010. *Ambiência em edificações rurais - Conforto animal*, 2ª edição. ed. Editora UFV, Viçosa, MG.
- Bertechini, A.G., 2004. *Nutrição de monogástricos*. Editora UFLA, Lavras.
- Bonnet, S., Geraert, P.A., Lessire, M., Carre, B., Guillaumin, S., 1997. Effect of High Ambient Temperature on Feed Digestibility in Broilers Birds and Management. *Poult. Sci.* 76, 857–863.
- Borges, S.A., Maiorka, A., Silva, A.V.F. da, 2003. Fisiologia do estresse calórico e a utilização de eletrólitos em frangos de corte. *Ciência Rural* 33, 975–981. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782003000500028>
- Broer, S., 2008. Amino Acid Transport Across Mammalian Intestinal and Renal Epithelia. *Physiol Rev* 88, 249–286. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2006>.
- Bunchasak, C., 2009. Role of Dietary Methionine in Poultry Production. *J. Poult. Sci.* 46, 169–179. <https://doi.org/10.2141/jpsa.46.169>
- Butolo, J.E., 2010. *Qualidade de ingredientes na alimentação animal*. 2ª edição. Campinas p.430.
- Bydlowski, S.P., Magnanelli, A.C., Chamone, D.A.F., 1998. Hiper-Homocisteinemia e Doenças Vaso-Oclusivas. *Arq. Bras. Cardiol.* 71, 69–76.
- Chen, H., Pan, Y., Wong, E.A., Bloomquist, J.R., Webb Jr., K.E., 2002. Molecular cloning and functional expression of a chicken intestinal peptide transporter (cPepT1) in *Xenopus* oocytes and Chinese hamster ovary cells. *J Nutr* 132, 387–393.
- Chen, H., Pan, Y., Wong, E. a, Webb, K.E., 2005. Dietary protein level and stage of development affect expression of an intestinal peptide transporter (cPepT1) in chickens. *J. Nutr.* 135, 193–198.
- Chung, K.F., 2001. Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur. Respir. J.* 18, 50–59. <https://doi.org/10.1183/09031936.01.00229701>
- Costa, F.G.P., da Silva, J.H.V., Goulart, C.C., Nogueira, E.T., Sá, L.M., 2014.

- Exigências de aminoácidos para aves, in: Sakomura, N.K., Silva, J.H.V., Costa, F.G.P., Fernandes, J.B.K., Hauschild, L., Nutrição de não ruminantes. Editora Funep., Jaboticabal p. 678
- D’Mello, J.P., 2003. Absorption of Amino Acids and Peptides, Second. ed, Amino Acids in Animal Nutrition. Edinburgh, UK.  
<https://doi.org/10.1079/9780851996547.0000>
- Dang, T.S., Walker, M., Ford, D., Valentine, R.A., 2014. Nutrigenomics: The role of nutrients in gene expression. *Periodontol.* 2000 64, 154–160.  
<https://doi.org/10.1111/prd.12001>
- Daniel, H., 2004. Molecular and Integrative Physiology of Intestinal Peptide Transport. *Annu. Rev. Physiol.* 66, 361–384.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.66.032102.144149>
- De Oliveira Neto, A.R., De Oliveira, W.P., 2009. Aminoácidos para frangos de corte. *Rev. Bras. Zootec.* 38, 205–208. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982009001300021>
- Del Vesco, A.P., Gasparino, E., Grieser, D.O., Zancanela, V., Voltolini, D.M., Khatlab, A.S., Guimarães, S.E.F., Soares, M.A.M., Neto, A.R.O., 2015. Effects of methionine supplementation on the expression of protein deposition-related genes in acute heat stress-exposed broilers. *Br. J. Nutr.* 10, 549–559.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115821>
- Duarte, C.R., 2009. Flexibilidade fenotípica do trato digestório: efeitos da restrição alimentar e realimentação de frangos de corte. *Fac. Ciências Agrônômicas. Universidade Estadual Paulista.*
- Emmert, J.L., Baker, D.H., 1997. Use of the ideal protein concept for precision formulation of amino acid levels in broiler diets. *J. Appl. Poult. Res.* 6, 462–470.  
<https://doi.org/10.1093/japr/6.4.462>
- Feldmann, M., Steinman, L., 2005. Design of effective immunotherapy for human autoimmunity. *Nature* 435, 612–619. <https://doi.org/10.1038/nature03727>
- Finkelstein, J.D., Martin, J.J., 1984. Methionine Metabolism in Mammals *Ftz : J. Biol. Chem.* 259, 9508–9513.
- Fotiadis, D., Kanai, Y., Palacín, M., 2013. The SLC3 and SLC7 families of amino acid transporters. *Mol. Aspects Med.* 34, 139–158.  
<https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.10.007>
- Frazier, S., Ajiboye, K., Olds, A., Wyatt, T., Luetkemeier, E.S., Wong, E.A., 2008. Functional characterization of the chicken peptide transporter 1 (PepT1, SLC15A1) gene. *Anim. Biotechnol.* 19, 201–210.  
<https://doi.org/10.1080/10495390802240206>
- Grell, M., Wajant, H., Zimmermann, G., Scheurich, P., 1998. The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 570–575. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.2.570>
- Habashy, W.S., Milfort, M.C., Fuller, A.L., Attia, Y.A., Rekaya, R., Aggrey, S.E., 2017. Effect of heat stress on protein utilization and nutrient transporters in meat-type chickens. *Int. J. Biometeorol.* 61, 2111–2118. <https://doi.org/10.1007/s00484->

017-1414-1

- Kanai, Y., Fukasawa, Y., Cha, S.H., Segawa, H., Chairoungdua, A., Kim, D.K., Matsuo, H., Kim, J.Y., Miyamoto, K., Takeda, E., Endou, H., 2000. Transport Properties of a System y<sup>+</sup>L Neutral and Basic Amino Acid Transporter. *J. Biol. Chem.* 275, 20787–20793. <https://doi.org/10.1074/jbc.M000634200>
- Lassiter, K., Ojano-Dirain, C., Iqbal, M., Pumford, N.R., Tinsley, N., Lay, J., Liyanage, R., Wing, T., Cooper, M., Bottje, W., 2006. Differential expression of mitochondrial and extramitochondrial proteins in lymphocytes of male broilers with low and high feed efficiency. *Poult. Sci.* 85, 2251–9. <https://doi.org/10.1093/ps/85.12.2251>
- Li, P., Yin, Y.-L., Li, D., Woo Kim, S., Wu, G., 2007. Amino acids and immune function. *Br. J. Nutr.* 98, 237. <https://doi.org/10.1017/S000711450769936X>
- Macari, M., Furlan, R.L., Maiorka, A. Aspectos fisiológicos e de manejo para manutenção da homeostase térmico e controle de síndromes metabólicas, in: Macari M., Nääs, I.A., Mendes, A.A. *Produção de frangos de corte*. FACTA, Campinas, p. 356.
- Madsen, S.L., Wong, E. a., 2011. Expression of the chicken peptide transporter 1 and the peroxisome proliferator-activated receptor following feed restriction and subsequent refeeding. *Poult. Sci.* 90, 2295–2300. <https://doi.org/10.3382/ps.2010-01173>
- Miska, K.B., Fetterer, R.H., Wong, E.A., 2015. MRNA expression of amino acid transporters, aminopeptidase, and the di- and tri-peptide transporter PepT1 in the intestine and liver of posthatch broiler chicks. *Poult. Sci.* 94, 1323–1332. <https://doi.org/10.3382/ps/pev059>
- Morris, T.R., Fisher, C., 1970. The Determination Of The Methionine Requirement Of Laying Pullets By A Diet Dilution Technique. *Br. Poult. Sci.* 11, 67–82. <https://doi.org/10.1080/00071667008415793>
- National Research Council - NRC. Nutrient requirements of poultry. 9.rev.ed. Washington, D.C.: National Academy Press, 1994. 155p.
- Navidshad, B., Mirhoseini, S., 2011. Factors Influencing the Amino Acid and Peptide Transporter Proteins mRNA Expression in Avian Species. *Eukaryot. Gene Expr.* 26, 1–13.
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2013. *Lehninger Principles of Biochemistry* 6th ed., Book. <https://doi.org/10.1016/j.jse.2011.03.016>
- Niculescu, M.D., Zeisel, S.H., 2002. Diet, methyl donors and DNA methylation: interactions between dietary folate, methionine and choline. *J. Nutr.* 132, 2333S–2335S.
- Ogihara, H., Suzuki, T., Nagamachi, Y., Inui, K., Takata, K., 1999. Peptide transporter in the rat small intestine: ultrastructural localization and the effect of starvation and administration of amino acids. *Histochem. J.* 31, 169–74. <https://doi.org/10.1023/A:1003515413550>
- Oliveira, R.F.M, Donzele, J.L, Abreu, M.L.T, Ferreira, R.A, Vaz, R.G.M.V, Cella, P., 2006. Effects of temperature and relative humidity on performance and yield of

- noble cuts of broilers from 1 to 49 days old. *Rev. Bras. Zootec.* 30, 2021–2025.
- Oviedo-Rondón, E.O., Moraes, V.M.B., Malheiros, R.D., 2014. Nutrigênômica na nutrição animal, in: Sakomura, N.K., Silva, J.H.V., Costa, F.G.P., Fernandes, J.B.K., Hauschild, L., *Nutrição de não ruminantes*. Editora Funep., Jaboticabal p. 678
- Quinteiro-Filho, W.M., Ribeiro, A., Ferraz-de-Paula, V., Pinheiro, M.L., Sakai, M., Sá, L.R.M., Ferreira, A.J.P., Palermo-Neto, J., 2010. Heat stress impairs performance parameters, induces intestinal injury, and decreases macrophage activity in broiler chickens. *Poult. Sci.* 89, 1905–1914. <https://doi.org/10.3382/ps.2010-00812>
- Romestaing, C., Piquet, M.A., Letexier, D., Rey, B., Mourier, A., Servais, S., Belouze, M., Rouleau, V., Dautresme, M., Ollivier, I., Favier, R., Rigoulet, M., Duchamp, C., Sibille, B., 2008. Mitochondrial adaptations to steatohepatitis induced by a methionine- and choline-deficient diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294, E110-9. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00407.2007>
- Rostagno, H.S., Albino, L.F.T., Donzele, J.L., Gomes, P.C., Oliveira, R.F., Lopes, D.C., Ferreira, A.S., Barreto, S.L.T., Euclides, R.F., 2011. Tabelas brasileiras para aves e suínos in: Rostagno, H.S, 3ª edição, Viçosa, MG, UFV, DZO p. 252
- Ruas, Á.C., 2001. Avaliação de conforto térmico contribuição à aplicação prática das normas internacionais.
- Rutz, F., 2002. Proteínas: digestão e absorção, in: Macari, M., Furlan, R.L., Gonzales, 2ªed, *Fisiologia Aviária aplicada a frangos de corte*. Editora FUNEP/UNESP. p. 375.
- Sanioto, S.M.L., 2016. Digestão e absorção de nutrientes orgânicos, in: Oriá, Reinaldo Barreto, Brito, G.A. de C. (Ed.), *Sistema Digestório: Integração Básico-Clínica*. Editora Edgard Blucher, São Paulo, p. 838.
- Silva, J. H. V.; Costa, F. G. P.; Lima, R. B. Digestão e absorção das proteínas. In: Sakomura, N. K.; Silva, J. H. V; Costa, F. G. P.; Fernandes, J. B. K.; Hauschild, L (Ed.). *Nutrição de não ruminantes*, Funep/Jaboticabal, 2014, 1ed, cap. 8, p. 110 - 126.
- Sławinska, A., Siwek, M.Z., Bednarczyk, M.F., 2014. Effects of synbiotics injected in ovo on regulation of immune-related gene expression in adult chickens. *Am. J. Vet. Res.* 75, 997–1003. <https://doi.org/10.2460/ajvr.75.11.997>
- Sun, X., Zhang, H., Sheikahmadi, A., Wang, Y., Jiao, H., Lin, H., Song, Z., 2014. Effects of heat stress on the gene expression of nutrient transporters in the jejunum of broiler chickens (*Gallus gallus domesticus*). *Int. J. Biometeorol.* 59, 127–135. <https://doi.org/10.1007/s00484-014-0829-1>
- Tan, G.Y., Yang, L., Fu, Y.Q., Feng, J.H., Zhang, M.H., 2010. Effects of different acute high ambient temperatures on function of hepatic mitochondrial respiration, antioxidative enzymes, and oxidative injury in broiler chickens. *Poult. Sci.* 89, 115–122. <https://doi.org/10.3382/ps.2009-00318>
- Thwaites, D.T., Anderson, C.M.H., 2010. H<sup>+</sup>-coupled nutrient, micronutrient and drug transporters in the mammalian small intestine David. *Exp Physiol.* 92, 603–619. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2005.029959.H>

- Tinôco, I. F. F., 2001. Avicultura industrial: novos conceitos de materiais, concepções e técnicas construtivas disponíveis para galpões avícolas brasileiros. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, Campinas, v.3, n.1, p.1-26, 2001
- Tizard, I.R., 2008. Como se inicia a inflamação, in *imunologia veterinária 8 ed texas*, texas a&m university, p.22
- Torrents, D., Pineda, M., Ferna, E., Lloberas, J., Shi, Y., Zorzano, A., Palaci, M., 1998. Identification and Characterization of a Membrane Protein (  $\gamma$ +L Amino Acid Transporter-1 ) That Associates with 4F2hc to Encode the Amino Acid Transport Activity  $\gamma$ +L. *J. Biol. Chem.* 273, 32437–32445. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.49.32437>
- Valerio, S.R., Flávia, R., Oliveira, M. De, Donzele, J.L., Albino, L.F.T., Orlando, U.A.D., Vaz, R.G.M.V., 2003. Níveis de lisina digestível em rações , em que se manteve ou não a relação aminoacídica , para frangos de corte de 1 a 21 dias de idade, mantidos em estresse por calor. *Rev. Bras. Zootec.* 2, 361–371.
- Van, L., Pan, Y.X., Bloomquist, J.R., Webb, K.E., Wong, E.A., 2005. Developmental regulation of a Turkey intestinal peptide transporter (PepT1). *Poult. Sci.* 84, 75–82. <https://doi.org/10.1093/ps/84.1.75>
- Verrey, F., Closs, E.I., Wagner, C.A., Palacin, M., Endou, H., Kanai, Y., 2004. CATs and HATs: The SLC7 family of amino acid transporters. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 447, 532–542. <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1086-z>
- Verri, T., Romano, A., Barca, A., Kottra, G., Daniel, H., Storelli, C., 2010. Transport of di- and tripeptides in teleost fish intestine. *Aquac. Res.* 41, 641–653. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02270.x>
- Vitale, R.F., Ribeiro, F. de A.Q., 2007. The role of Tumor Necrosis Factor -Alpha (TNF- $\alpha$ ) in bone resorption present in middle ear cholesteatoma. *Braz. J. Otorhinolaryngol.* 73, 123–127. <https://doi.org/S0034-72992007000100020> [pii]
- Wagner, C.A., Lang, F., Broer, S., 2001. Function and structure of heterodimeric amino acid transporters. *Am J Physiol Cell physiol* 281, 1077–1093. <https://doi.org/10.1080/10715760410001727858>
- Wajant, H., Pfizenmaier, K., Scheurich, P., 2003. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ.* 10, 45–65. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401189>
- Ware, C.F., 2005. NETWORK COMMUNICATIONS: Lymphotoxins, LIGHT, and TNF. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 787–819. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115719>
- Wen, C., Chen, X., Chen, G.Y., Wu, P., Chen, Y.P., Zhou, Y.M., Wang, T., 2014. Methionine improves breast muscle growth and alters myogenic gene expression in broilers. *J. Anim. Sci.* 92, 1068–1073. <https://doi.org/10.2527/jas2013-6485>
- Willke, T., 2014. Methionine production—a critical review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 9893–9914. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6156-y>
- Zelová, H., Hošek, J., 2013. TNF- $\alpha$  signalling and inflammation: Interactions between old acquaintances. *Inflamm. Res.* 62, 641–651. <https://doi.org/10.1007/s00011-013-0633-0>

## OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o efeito da suplementação de dipeptídeo de metionina sobre o desempenho de frangos de corte no período de 1 a 44 dias de idade.

Avaliar o efeito da suplementação de dipeptídeo de metionina e do estresse térmico agudo sob a expressão dos genes transportadores de aminoácidos e peptídeos, PepT1 e y<sup>+</sup>LAT1, e do gene TNF- $\alpha$ .

II. Inclusão de dipeptídeo de metionina na dieta de frangos de corte submetidos ao estresse térmico agudo  
(*Livestock Science*)

**Resumo**

Objetivou-se avaliar a suplementação de metionina na forma de dipeptídeo e o efeito do estresse térmico agudo sobre o desempenho e a expressão dos genes PepT1, TNF- $\alpha$  e y<sup>+</sup>LAT1 no jejuno de frangos de corte. Assim, foram utilizados 90 frangos de corte, machos, de 1 dia de idade divididos em 3 grupos de acordo com a suplementação de metionina: sem suplementação de metionina, com suplementação de DL-Metionina e com a suplementação de metionina na forma de dipeptídeo (DL-MMet), sendo cada tratamento composto por 6 repetições com 5 animais por repetição. Os animais foram criados até os 44 dias em ambiente de conforto térmico recebendo as três dietas e aos 44 dias de idade, metade dos animais foram expostos ao estresse térmico de 38°C por 24 horas. Observou-se que as aves que foram suplementadas com DL-Met e DL-MMet apresentaram ganho de peso e peso final superior e menor valor para conversão alimentar em relação as não suplementadas. A expressão do gene PepT1 não foi influenciada pela temperatura nem pela dieta. Para o gene TNF- $\alpha$  observou-se maior expressão para animais consumindo a dieta sem suplementação. O gene y<sup>+</sup>LAT1 teve sua expressão aumentada no jejuno de animais submetidos ao estresse, em relação a dieta sua expressão foi maior nos animais suplementados com ambas as fontes. Os resultados sugerem que a suplementação de metionina influencia no desenvolvimento animal independente de sua forma, e que o DL-MMet não alterou a expressão do transportador de dipeptídeos PepT1.

**Palavras-chave:** aminoácido; ambiente térmico; citocina; nutrigenômica; transporte de peptídeo;

## **Inclusion of methionine dipeptide in the diet of broilers submitted to acute heat stress**

### **Abstract**

There were investigate the methionine supplementation in the dipeptide form and the effect of acute heat stress on the performance and expression of genes PepT1, TNF- $\alpha$  and  $\gamma^+$ LAT1 in jejunum of broilers chickens. Thus, 90 male broiler chickens, 45 days old, were allocated into 3 groups according to methionine supplementation: without methionine supplementation, DL-Methionine supplementation at the recommended level and methionine supplementation in the form of dipeptide (DL-MMet), each treatment consisting in 6 replicates. The animals were raised up to 44 days in a controlled environment receiving the three diets and at 44 days of age, half of the animals were exposed to heat stress of 38°C for 24 hours. The diet influenced the weight gain, final weight and feed conversion. It was observed that birds supplemented with both forms of methionine had better values for these variables. PepT1 gene expression was not influenced by temperature or diet. For the TNF- $\alpha$  gene there was higher expression for animals consuming the diet without supplementation. The  $\gamma^+$ LAT gene showed differences in its expression regarding diet and also temperature. Animals supplemented with DL-Methionine showed higher expression of  $\gamma^+$ LAT gene, as did animals supplemented with DL-MMet. The birds under heat stress presented higher expression of this gene. The results suggest that methionine supplementation influences animal development independently of its form, and that DL-MMet did not alter the expression of the peptide transporter PepT1.

**Key words:** amino acid; thermal environment; cytokine; nutrigenomic; peptide transport;

## 1. Introdução

Nos países de clima tropical, um grande entrave é o controle da temperatura dentro dos galpões de criação de frangos de corte, principalmente no verão. Embora as aves sejam animais homeotermos, a temperatura ambiente na zona de termoneutralidade direciona o uso da energia metabolizada para os processos produtivos, reduzindo o desperdício de nutrientes (Takahashi et al., 2009). A eficiência da utilização dos alimentos é oriunda da integridade do sistema digestório, em especial do intestino delgado, tendo em vista que parte dos processos digestivos ocorrem nos enterócitos (Smith et al., 1990). O estresse térmico influencia negativamente o desenvolvimento do intestino das aves de produção, e assim modula a sua capacidade de absorção, digestão e até mesmo a atividade de enzimas e transportadores presentes neste tecido (Marchini et al., 2011; Uni et al., 2001).

A composição da dieta pode auxiliar os animais a superar os desafios ambientais impostos diariamente, e por serem constituídas em maior proporção de milho e farelo de soja (Baker, 2009) faz-se necessária a suplementação dos aminoácidos na ração. Sabe-se que a metionina é o primeiro aminoácido limitante e um dos aminoácidos essenciais para frangos de corte, sendo obtido por síntese química e possuindo diversas funções no organismo, atuando diretamente no sistema imunológico (Agostini et al., 2016; Jankowski et al., 2014; Wen et al., 2014), na deposição de músculo e penas, e também sendo precursor de outros aminoácidos e de enzimas envolvidas na saúde celular como glutatona e coenzima A (Nelson e Cox, 2013). As formas de metionina disponíveis como fontes comerciais sintéticas mais usadas na alimentação animal são a DL-metionina (DL-Met) em pó ou líquida como sal de sódio (DL-metionina-Na), a metionina hidroxianáloga (MHA) em pó, como sal de cálcio (MHA-Ca) ou líquida como ácido livre (MHA-FA) (Leite et al., 2009). O uso de metionina na forma de dipeptídeo é recente, e vem

sendo administrado em organismos aquáticos, visto sua menor lixiviação em água (Façanha et al., 2016; Niu et al., 2018).

As proteínas fornecidas na dieta para os animais são hidrolisadas no trato digestório, sendo quebradas em aminoácidos livres, dipeptídeos, tripeptídeos, e outros polipeptídeos, A utilização de di, tri e tetrapeptídeos tem sido recomendada para organismos aquáticos visando menor perda em decorrência do meio aquoso, uma vez que os dipeptídeos podem ter menor lixiviação em água (Lopez-Alvarado and Kanazawa, 1994; Mamauag et al., 2012; Niu et al., 2018), já na nutrição humana esta é indicada por várias razões, destacando-se (1) a absorção de aminoácidos na forma de di ou tripeptídeos pode evitar problemas de competição por transportadores na membrana dos enterócitos, (2) pelo fato de sua absorção ocorrer mais rapidamente do que na forma de aminoácidos livres (Adibi, 1997; Crampton et al., 1971). Sabe-se que em patologias em que o transporte de aminoácidos é reduzido decorrente dos danos ao intestino delgado, como a doença ciliaca, o sistema de transporte de peptídeos continua normal (Maebuchi et al., 2007; Tanaka et al., 1998). Na literatura consultada, não foram encontrados relatos de pesquisas utilizando a metionina na forma de dipeptídeos para frangos de corte.

O transporte de dipeptídeos e tripeptídeos é realizado pelo transportador de peptídeos, PepT1, ele está incorporado em rede complexa que regula a homeostase intestinal dos aminoácidos celulares, funcionando como sistemas de absorção acoplados a prótons, tendo sua maior expressão, principalmente no intestino delgado (Benner et al., 2011; Chen et al., 2002). O fator de necrose tumoral alfa, comumente conhecido como TNF- $\alpha$  é um dos marcadores bioquímicos relacionado as respostas inflamatórias juntamente com as interleucinas, e é responsável pela sinalização para início da apoptose celular (Nelson and Cox, 2013). O transportador y<sup>+</sup>LAT, pertence a categoria do sistema y<sup>+</sup>L de transporte de aminoácidos (Wagner et al., 2001) sendo encontrado principalmente

nos rins e intestino, sendo um transportador heterodimérico de aminoácidos (Fotiadis et al., 2013).

Considerando a importância da metionina para o desempenho geral e a homeostase dos processos metabólicos das aves, o experimento foi realizado para testar a hipótese de que os efeitos negativos provocados por altas temperaturas durante a fase final de criação de frangos de corte, podem ser amenizados pela suplementação de metionina na forma de dipeptídeo através da modulação da expressão gênica, dessa forma foi avaliado o desempenho das aves e a expressão dos genes transportadores de peptídeos  $\gamma^+$ LAT1 e PepT1 e do gene TNF- $\alpha$  em frangos de corte de 45 dias submetidos a 24 horas de estresse térmico em 38°C.

## **2. Material e métodos**

Esta pesquisa foi conduzida de acordo com as especificações do comitê de ética da Universidade Estadual de Maringá, e aprovada sob o proc n° 4000170615.

### *2.1. Animais e desenho experimental*

90 frangos de corte de um dia de idade foram utilizados (Cobb 500) (*Gallus gallus*). O experimento foi dividido em um esquema fatorial 3x2 sendo três dietas e dois ambientes. As aves foram alojadas em gaiolas coletivas com 5 animais por gaiola, com seis repetições por tratamento, sendo as gaiolas as unidades experimentais.

Durante o período experimental, os animais tiveram livre acesso à água e ração. A dieta foi balanceada para atender suas exigências nutricionais (Rostagno et al., 2011), consistindo em uma dieta sem a suplementação de metionina (SM), uma dieta controle suplementada com DL-Metionina (DL-Met) e a terceira dieta com a suplementação de metionina na forma de dipeptídeo (DL-MMet) (Tabela 1).

Os animais foram criados em sala climatizada em temperatura de conforto térmico (de acordo com o manual da linhagem) até os 44 dias de idade, quando um grupo foi submetido ao estresse térmico agudo de 38°C por 24 horas e o outro permaneceu em conforto térmico. Todos os animais foram abatidos por deslocamento cervical aos 45 dias.

**Tabela 1** Composição centesimal das dietas experimentais

Ingredientes	1-21 dias			22-45 dias		
	SM	DL-Met	DL-MMet	SM	DL-Met	DL-MMet
Milho PR 7,8% PB	65,00	65,00	65,00	89,70	89,70	89,70
Óleo Soja	4,56	4,56	4,56	6,75	6,75	6,75
Farelo de soja 46% PB	44,76	44,76	44,76	48,6	48,6	48,6
Sal comum	0,54	0,54	0,54	0,64	0,64	0,64
Calcáreo calcítico 38% Ca	1,39	1,39	1,39	1,39	1,39	1,39
Fosfato bicálcico 20%	1,83	1,83	1,83	1,60	1,60	1,60
DL-Metionil-Metionina 97%	-	-	0,354	-	-	0,420
DL - Metionina 99%	-	0,336	-	-	0,405	-
L-Treonina 98,5%	0,042	0,042	0,042	0,003	0,003	0,003
L-Lisina-78%	0,18	0,18	0,18	0,23	0,23	0,23
PREMIX	0,48	0,48	0,48	0,6	0,6	0,6
Inerte	0,36	0,04	0,006	0,435	0,030	0,015
Peso Total	120	120	120	150	150	150
<b>Nutrientes (%)</b>						
PB	22	22	22	20	20	20
Energia (kcal/kg)	3053	3053	3053	3169	3169	3169
M+C Dig	0,585	0,856	0,856	0,543	0,810	0,810
Lis Dig	1,199	1,199	1,199	1,080	1,080	1,080
TripDig	0,244	0,244	0,244	0,218	0,218	0,218
Treo Dig	0,779	0,779	0,779	0,700	0,700	0,700
IsolDig	0,855	0,855	0,855	0,772	0,772	0,772
ValinDig	0,923	0,923	0,923	0,842	0,842	0,842
ArgDig	1,384	1,384	1,384	1,243	1,243	1,243
Sódio	0,200	0,200	0,200	0,19	0,19	0,19
Cálcio	0,876	0,876	0,876	0,68	0,68	0,68
Pdisp	0,450	0,450	0,450	0,35	0,35	0,35
<b>Análise da composição (%)</b>						
Proteína bruta	21,25	22,16	21,55	19,36	19,53	19,37
Lisina digestível	1,283	1,091	1,268	1,146	1,139	1,13
Metionina+Cistina	0,651	0,891	0,934	0,594	0,891	0,879
Treonina	0,851	0,726	0,837	0,746	0,756	0,743
Valina	1,036	0,900	1,019	0,927	0,939	0,928
Isoleucina	0,953	0,813	0,934	0,845	0,853	0,839
Arginina	1,447	1,225	1,414	1,277	1,272	1,263

Conteúdo/kg Inicial: Vit. A – 2.270,000 UI; Vit. E – 8.330 UI; Vit. B1 – 591 mg; Vit B2 – 1.490 ng; Vit. B6 – 858 mg; Vit. B12 3.500 mg; Vit. K3 – 450 mg; Pantotenato cálcio – 2.970 mg; Niacina – 8.820 mg; Ácido fólico – 200 mg; Biotina – 20 mg; Colina – 88 mg; Zinco – 19 mg; Ferro - 14 mg; Manganês – 20 mg; Cobre – 3.040 mg; Iodo – 290 mg; Cobalto – 50 mg; Selênio – 88 mg; Etoxiqum – 25 mg; B.H.A – 20 mg. Crescimento: Vit. A – 2.250,000 UI; Vit. D3 - 500.000 UI; Vit. E – 7.000 UI; Vit. B1 – 450 mg; Vit B2 – 1.000 ng; Vit. B6 – 450 mg; Vit. B12 3.500 mg; Vit. K3 – 420 mg; Pantotenato cálcio - 2.500 mg; Niacina – 7.000 mg; Ácido fólico – 180 mg; Biotina – 15 mg; Colina – 55 g; Zinco – 12 g; Ferro - 12 g; Manganês – 15 g; Cobre – 3.000 mg; Iodo – 250 mg; Cobalto – 50 mg; Selênio – 72 mg; Etoxiqum – 40 mg; B.H.A – 40 mg

## 2.2. *Desempenho*

O desempenho para o período de 1 a 44 dias de idade assim como nas 24 horas de estresse, foi avaliado por meio da determinação do ganho de peso (g), peso final (g), consumo de ração (g) e conversão alimentar (g/g). O ganho de peso médio foi determinado pela diferença entre os pesos final e inicial de cada unidade experimental. O consumo de ração pela diferença entre a ração fornecida e as sobras. A conversão alimentar foi calculada pela relação entre o consumo de ração e o ganho de peso das aves. Os parâmetros de desempenho foram corrigidos para a mortalidade.

## 2.3. *Análises plasmáticas*

Para realizar as análises das concentrações séricas de ácido úrico (MS 80022230065), de colesterol total (MS 80022230064), lipoproteínas de baixa densidade (LDL), lipoproteínas de alta densidade ((HDL) MS 80022230071) e triglicérides (MS 80022230062), bem como a atividade das enzimas alanina aminotransferase (MS 80022230086) e aspartato aminotransferase (MS 80022230083), foram selecionadas pelo peso médio da repetição ( $\pm 10\%$ ) dez frangos, permanecendo seis horas em jejum sendo então procedida a coleta. O sangue foi coletado a partir da veia jugular, em tubos heparinizados e foram mantidos em gelo. As amostras de sangue foram então submetidas à centrifugação ( $3,024 \times g$ , 10 minutos,  $4^{\circ}\text{C}$ ), e o plasma foi coletado e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento das análises, as análises foram realizadas por meio de kits comerciais (Gold Analisa, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil), com exceção do LDL que foi obtido através da fórmula de Friedewald (Friedewald et al., 1972).

#### 2.4. *Expressão gênica*

Para as análises de expressão gênica, amostras de jejuno foram coletadas (n=6) de cada tratamento aos 45 dias de idade. Essas amostras foram conservadas em nitrogênio líquido, e subsequentemente armazenadas em freezer a -80°C até o momento da extração de RNA.

O RNA foi extraído com uso do reagente Trizol® (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) de acordo com as normas do fabricante, na proporção de 1 mL para cada 100 mg de tecido. Previamente todo o material utilizado foi tratado com inibidor de RNase - RNase AWAY® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Para triturar o tecido foi utilizado homogenizador elétrico Polytron (tecido + Trizol) até a sua completa dissociação. Após, serem incubadas a temperatura ambiente por cinco minutos, adicionamos 200 µL de clorofórmio foram nas amostras, sendo estas homogeneizadas manualmente por 1 minuto. As amostras foram então centrifugadas por 15 minutos a 12000 x g, a 4°C. O sobrenadante foi coletado e transferido para um tubo limpo, adicionando em seguida 500 µL de isopropanol por tubo, e foi incubada a temperatura ambiente (25°C), por 10 minutos. Logo após, as amostras foram suavemente homogeneizadas por inversão, e centrifugadas por 10 minutos a 12000 x g, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 75%. Procedeu-se mais uma centrifugação do material, desta vez a 7500 x g por 5 minutos, e logo após a centrifugação o sobrenadante foi descartado. Por fim, deixou-se o pelete secando por 15 minutos e em seguida ressuspendeu-o em água ultrapura livre de RNase.

A concentração do RNA total foi mensurada via espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), no comprimento de onda de 260 nm. E a integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose a 1%, corado com SYBR® Safe DNA Gel Stain e visualizado em luz ultravioleta. As amostras de RNA total foram tratadas com DNase I (Invitrogen,

Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Em um tubo estéril RNA free acomodado sobre o gelo, foram adicionados 1 µg de RNA total, 1 µL de 10 X DNase I reaction buffer e 1 µL DNase I amplification grade (1 U/µL). A reação foi então incubada à temperatura ambiente, por 15 minutos. Em seguida, a inativação da DNase I foi realizada adicionando 1 µL de EDTA a 25 mM, e a reação foi aquecida a 65°C por 10 minutos. Essa etapa tem o objetivo de remover possíveis contaminações com DNA genômico. Para a síntese do DNA complementar (cDNA), utilizou-se o kit SuperScript™ III First Strand Syntesis Super Mix (Invitrogen Corporation, Brasil) e as reações foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante. Logo após a síntese de cDNA, as amostras foram armazenadas a -20°C até o momento do uso. As reações de PCR (reação em cadeia da polimerase) em tempo real foram realizadas utilizando o composto fluorescente SYBR GREEN (SYBR® GREEN PCR Master Mix, Applied Biosystems, USA). Esse composto quando em solução apresenta pouca fluorescência, mas durante os ciclos da PCR o acúmulo do corante nas regiões específicas de ligação na dupla hélice faz com que a fluorescência aumente a cada ciclo da reação, em razão direta a formação dos amplicons, podendo desta forma ser detectada e quantificada.

O primer utilizado na reação de amplificação do gene TNF- $\alpha$  foi desenhado de acordo com Du et al., (2016), com as sequências dos genes transportador de dipeptídeos (PepT1), SLC7A7 ( $y^+$ LAT1) e fator de necrose tumoral alpha (TNF- $\alpha$ ) depositados no site [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) (número de acesso KF366603.1, XM\_418326 e NM\_204267.1, respectivamente) (Tabela 1). Foram testados dois controles endógenos, os genes da  $\beta$ -actina e do *GAPDH*, sendo utilizado o gene da  $\beta$ -actina (número de acesso L08165), por ter apresentado melhor eficiência na reação. Todas as análises foram realizadas em um volume de 25 µL e em duplicatas.

**Tabela 2** Sequência de primers utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR em tempo real - qRT-PCR)

Gene	Tamanho do amplicom (pb)	Sequência do primer (5'-3')	Autor
<i>Pept1</i>	66	F-CCCCTGAGGAGGATCACTGTT R-CAAAAGAGCAGCAACGA	KF366603.1
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	64	F-GAGCGTTGACTTGGCTGTC R-AAGCAACAACCAGCTATGCAC	Du et al, 2016
<i>y<sup>+</sup>LAT</i>	118	F-TGTTGGAGCCAGAGAAGGA R-CACAAGGAGATAAAGCAAAGTC	XM_418326
<i><math>\beta</math>-actina</i>	130	F-GCCAACAGAGAGAAGATGAC R-CACCAGAGTCCATCACAATAC	AY765397.1

Os primers analisados foram adequados para as reações de PCR em tempo real. As eficiências de amplificação foram semelhantes para todos os genes de interesse, com 90% a 110% de eficiência. As análises da curva de dissociação não revelaram qualquer produto inespecífico ou formação de dímeros de primers, e demonstra a confiabilidade dos dados estimados nas expressões de mRNA dos genes avaliados. A  $\beta$ -actina utilizada como controle endógeno não mostrou nenhuma diferença significativa entre as variáveis analisadas, conferindo eficiência a  $\beta$ -actina como controle endógeno.

## 2.5. Análise estatística

O método  $2^{-\Delta ct}$  foi utilizado para as análises de expressão relativa, sendo seus resultados expressos em unidade arbitrária (UA). Os resultados foram apresentados como média e desvio padrão. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente ao acaso em esquema fatorial 3x2, tendo sido avaliado três dietas (sem suplementação de metionina, DL-Met e DI-MMet) e dois ambientes aos 45 dias de idade, conforto e estresse por calor. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA).

### 3. Resultados

#### 3.1. Desempenho

Na Tabela 3, são apresentados os efeitos dos tratamentos sobre consumo de ração, ganho de peso, peso final e conversão alimentar no período de 1 a 44 dias de idade, considerando apenas o período em que os animais foram mantidos em conforto térmico.

O consumo de ração (CR) não diferiu entre os planos nutricionais, mas observou-se que os animais que foram suplementados com DL-Met ou DL-MMet, apresentaram maior ganho de peso (GP) e peso final (PF), assim como menor conversão alimentar (CA).

**Tabela 3** Consumo de ração (g), ganho de peso (g), peso final (g) e conversão alimentar de frangos de corte no período de 1 a 44 dias de idade

Tratamento	CR		GP		PF		CA	
	Média	SD	Média	SD	Média	SD	Média	SD
DL-MMet <sup>1</sup>	5259,01	362,53	2995,20 <sup>a</sup>	87,06	3041,91 <sup>a</sup>	87,14	1,73 <sup>b</sup>	0,12
DL-Met <sup>2</sup>	5294,45	414,50	2982,65 <sup>a</sup>	229,10	3029,00 <sup>a</sup>	229,20	1,78 <sup>b</sup>	0,16
SM <sup>3</sup>	5197,78	712,82	2487,83 <sup>b</sup>	70,70	2534,36 <sup>b</sup>	70,74	2,08 <sup>a</sup>	0,27
Probabilidade								
Dieta	0,948		< 0,0001		< 0,0001		0,0165	

<sup>a,b</sup> Valores médios em uma mesma coluna com letras sobrescritas diferentes são significativamente diferentes pelo Teste de Tukey (P<0,05).

<sup>1</sup> DL-MMet= dieta com suplementação de dipeptídeo de metionina

<sup>2</sup> DL-Met= dieta suplementada com nível recomendado de metionina

<sup>3</sup> SM= dieta sem suplementação de metionina

#### 3.2. Expressão gênica

Os resultados de expressão dos genes,  $y^+$ LAT1, PepT1 e TNF- $\alpha$  no jejuno de frangos de corte estão apresentados na Tabela 5. Não se encontraram efeitos de interação entre dieta e ambiente para nenhum dos genes estudados (P>0,05). A expressão do

transportador PepT1 não foi influenciada nem pela dieta e nem pelo ambiente, diferentemente da resposta que se obteve para o TNF- $\alpha$  e y<sup>+</sup>LAT1. Observou-se efeito significativo da dieta (P<0,0001), e do ambiente na expressão do transportador y<sup>+</sup>LAT1. A expressão do TNF- $\alpha$  foi maior nos animais sem suplementação (P<0,0001).

**Tabela 4** Expressão dos genes PepT1, TNF $\alpha$  e y<sup>+</sup>LAT1 no jejuno de frangos de corte aos 45 dias de idade

		PepT1 <sup>1</sup>		y <sup>+</sup> LAT1		TNF- $\alpha$ <sup>2</sup>	
		Média	SD	Média	SD	Média	SD
Conforto	DI-MMet <sup>4</sup>	0,067	0,015	0,868	0,307	0,058	0,010
	DL-Met <sup>5</sup>	0,145	0,077	0,417	0,085	0,053	0,016
	SM <sup>6</sup>	0,103	0,107	0,462	0,131	0,064	0,001
Estresse	DI-MMet	0,051	0,024	1,520	0,292	0,012	0,001
	DL-Met	0,098	0,051	1,562	0,780	0,016	0,003
	SM	0,105	0,069	0,905	0,147	0,015	0,004
<b>Efeito principal</b>							
Ambiente	Conforto	0,105	0,077	0,582 <sup>b</sup>	0,278	0,058	0,011
	Estresse	0,084	0,053	1,330 <sup>a</sup>	0,542	0,014	0,003
Dieta	DI-MMet	0,121	0,020	1,194 <sup>a</sup>	0,445	0,035 <sup>b</sup>	0,025
	DL-Met	0,059	0,065	0,989 <sup>ab</sup>	0,799	0,034 <sup>b</sup>	0,022
	SM	0,104	0,084	0,689 <sup>b</sup>	0,269	0,040 <sup>a</sup>	0,026
<b>Probabilidade</b>							
Ambiente		0,175		0,042		0,446	
Dieta		0,455		0,0001		< 0,0001	
Interação		0,747		0,183		0,354	

<sup>a,b</sup> Valores médios em uma mesma coluna com letras sobrescritas diferentes são significativamente diferentes pelo Teste de Tukey (P<0,05)

<sup>1</sup>PepT1= transportador de peptídeo <sup>2</sup>TNF- $\alpha$ = fator de necrose tumoral; <sup>3</sup>y<sup>+</sup>LAT1 = transportador de aminoácidos

<sup>4</sup> DL-MMet= dieta com suplementação de dipeptídeo de metionina

<sup>5</sup> DL-Met= dieta suplementada com nível recomendado de metionina

<sup>6</sup> SM= dieta sem suplementação de metionina

### 3.3. Análises plasmáticas

O efeito da suplementação e a alta temperatura nas análises de plasma de frango de corte estão apresentados na Tabela 6, no qual observou-se que houve interação na atividade da enzima aspartato transaminase (AST) (P< 0,0001). A atividade da alanina aminotransferase (ALT), foi influenciada pelo ambiente (P=0,003) e dieta (P=0,007) separadamente, com maiores concentrações nos animais que estavam na dieta com

suplementação de ambas as fontes e em temperatura de conforto térmico. Encontrando efeito de ambiente ( $P=0,024$ ) na concentração de ácido úrico nas aves, apresentando maior valor nos animais que foram submetidos ao estresse por calor.

**Tabela 5** Análise da atividade enzimática de AST, ALT e do ácido úrico do plasma de frangos de corte

		AST <sup>1</sup> (UI/L)		ALT <sup>2</sup> (UI/L)		Ácido Úrico (mg/dL <sup>-1</sup> )	
		Média	SD	Média	SD	Média	SD
Conforto	DI-MMet <sup>3</sup>	437,750 <sup>a</sup>	33,895	26,750	4,924	2,650	0,057
	DL-Met <sup>4</sup>	266,500 <sup>b</sup>	20,207	26,750	0,500	2,625	0,095
	SM <sup>5</sup>	251,500 <sup>b</sup>	9,949	23,500	1,732	2,900	0,346
Estresse	DI-MMet	290,250 <sup>b</sup>	6,448	23,750	4,349	3,425	1,645
	DL-Met	450,250 <sup>a</sup>	59,567	23,500	3,511	3,000	0,522
	SM	270,250 <sup>b</sup>	30,685	17,000	0,000	3,925	0,095
<b>Efeito principal</b>							
Ambiente	Conforto	318,583	90,765	25,666 <sup>a</sup>	3,171	2,725 <sup>b</sup>	0,230
	Estresse	336,916	91,184	21,416 <sup>b</sup>	4,378	3,450 <sup>a</sup>	0,985
Dieta	DI-MMet	364,000	82,013	25,250 <sup>a</sup>	4,590	3,037	1,155
	DL-Met	358,375	106,501	25,125 <sup>a</sup>	2,900	2,812	0,401
	SM	260,875	23,375	20,250 <sup>b</sup>	3,654	3,412	0,596
<b>Probabilidade</b>							
Ambiente		0,179		0,003		0,024	
Dieta		<0,0001		0,007		0,270	
Interação		< 0,0001		0,474		0,667	

<sup>a,b</sup> Valores médios em uma mesma coluna com letras sobrescritas diferentes são significativamente diferentes pelo Teste de Tukey ( $P<0,05$ )

<sup>1</sup>ALT= aspartato transaminase

<sup>2</sup>AST= alanina aminotransferase

<sup>3</sup>DL-Met= dieta com suplementação de dipeptídeo de metionina

<sup>4</sup>DL-MMet= dieta suplementada com nível recomendado de metionina

<sup>5</sup>SM= dieta sem suplementação de metionina

Pode ser observado efeito da interação ambiente x dieta, em todas as análises envolvendo o perfil lipídico: conteúdo de colesterol total ( $P=0,004$ ), triglicerídeos ( $P=0,022$ ), LDL ( $P=0,016$ ) e HDL ( $P=0,035$ ) (Tabela 7).

**Tabela 7** Análise do conteúdo de colesterol total, triglicérides LDL e HDL do plasma de frangos de corte de 45 dias de idade

		Colesterol Total (mg/dL <sup>-1</sup> )		Triglicérides (mg/dL <sup>-1</sup> )		LDL <sup>1</sup> (mg/dL <sup>-1</sup> )		HDL <sup>2</sup> (mg/dL <sup>-1</sup> )	
		Média	SD	Média	SD	Média	SD	Média	SD
Conforto	DI-MMet <sup>3</sup>	135,666 <sup>b</sup>	4,457	133,000 <sup>bc</sup>	1,414	60,600 <sup>b</sup>	8,136	76,000 <sup>ab</sup>	1,632
	DL-Met <sup>4</sup>	115,666 <sup>b</sup>	34,098	135,500 <sup>b</sup>	19,070	52,033 <sup>bc</sup>	20,685	66,500 <sup>bc</sup>	7,549
	SM <sup>5</sup>	120,000 <sup>b</sup>	9,591	130,750 <sup>bc</sup>	9,069	41,033 <sup>c</sup>	18,511	71,500 <sup>ab</sup>	1,291
Estresse	DI-MMet	142,250 <sup>b</sup>	11,926	142,250 <sup>ab</sup>	11,926	57,250 <sup>bc</sup>	2,867	80,250 <sup>a</sup>	10,144
	DL-Met	176,333 <sup>a</sup>	31,658	158,000 <sup>a</sup>	18,055	92,200 <sup>a</sup>	23,528	71,750 <sup>ab</sup>	4,991
	SM	114,000 <sup>b</sup>	9,591	114,000 <sup>c</sup>	9,591	53,600 <sup>bc</sup>	4,966	57,000 <sup>c</sup>	13,291
Efeito principal									
Ambiente	Conforto	123,777	22,848	133,083	22,677	51,222	24,067	71,333	5,757
	Estresse	148,785	34,282	138,083	11,236	71,185	17,720	69,666	13,553
Dieta	DI-MMet	138,300	44,585	137,625	9,288	59,260	6,520	78,125	7,100
	DI-Met	146,000	8,367	146,750	20,981	72,116	29,768	69,125	6,556
	SM	117,600	14,893	122,375	12,443	46,060	15,514	64,250	11,683
Probabilidade									
Ambiente		0,018		0,357		0,010		0,607	
Dieta		0,020		0,005		0,006		0,007	
Interação		0,004		0,022		0,016		0,035	

<sup>a,b</sup> Valores médios em uma mesma coluna com letras sobrescritas diferentes são significativamente diferentes pelo Teste de Tukey (P<0,05)

<sup>1</sup>LDL= *low density lipoproteins*

<sup>2</sup>HDL= *high density lipoproteins*

<sup>3</sup>DL-Met= dieta com suplementação de dipeptídeo de metionina

<sup>4</sup>DL-MMet= dieta suplementada com nível recomendado de metionina

<sup>5</sup>SM= dieta sem suplementação de metionina

#### 4. Discussão

Os parâmetros relacionados ao desempenho são uma forma de acompanhamento da resposta do animal ao ambiente e dieta a que este está sendo submetido. A associação correta entre esses dois fatores é a responsável por um adequado crescimento animal.

Trabalhos envolvendo a suplementação de metionina na nutrição de frangos de corte são desenvolvidos há muitos anos (Daenner e Bessei, 2003; Del Vesco et al., 2015; Oliveira Neto et al., 2007; Schutte et al., 1995) devido a sua importância para o desenvolvimento eficiente das aves. Em dietas à base de milho e soja, a suplementação de metionina desempenha um papel essencial, pela sua participação na deposição muscular e de penas (Oliveira Neto, 2014). Associado ao fato de os novos genótipos de frango de corte possuírem acelerada taxa de crescimento e deposição de tecido, as aves necessitam de alta demanda desse aminoácido (Jankowski et al., 2014), que deve estar rapidamente disponível e em níveis adequados a fim de diminuir perdas financeiras ligadas a excreção indevida de nitrogênio. Além de ser fundamental para o metabolismo de proteínas, a metionina é doador de grupos metil que são necessários para várias reações metabólicas, assim como no processo de amenização do efeito de estresse e do status inflamatório do organismo animal (Corzo et al., 2006; Tesseraud et al., 2009).

O uso de diferentes fontes de metionina relacionados aos parâmetros de desempenho geralmente não fornecem diferenças significativas (Leite et al., 2009; Visentini et al., 2005), fato esse que se deve provavelmente aos adequados níveis suplementados. Em nosso trabalho, também não se verificou diferenças significativas nas características estudadas com relação as fontes de metionina (DL-Met e DL-MMet). Sabe-se que deficientes em metionina reduzem o ganho de peso, consumo de ração, contribuindo assim com energia adicional e acréscimo na deposição de gordura corporal (Rodrigueiro et al., 2000). Em nosso estudo, os animais que receberam a dieta sem

suplementação (SM) ao final dos 44 dias, apresentaram menor ganho de peso, peso final e maior conversão no período de 1 a 44 dias em condição termoneutra (Tabela 3).

A proteína dietética é necessária para fornecer os aminoácidos essenciais, que o organismo não é capaz de sintetizar, assim após a ingestão e degradação, o transporte desses nutrientes para fora das células epiteliais é mediado por transportadores localizados na membrana basolateral. Os aminoácidos são absorvidos como aminoácidos ou peptídeos livres por uma variedade de transportadores com especificidade para aminoácidos ácidos, básicos e neutros e pequenos peptídeos (Paris e Wong, 2013).

O uso do dipeptídeo de metionina vem mostrando resultados satisfatórios com maior biodisponibilidade do que as fontes convencionais de metionina para organismos aquáticos (Niu et al., 2018), e para que sejam corretamente utilizados pelo organismo transportadores específicos são necessários para carregá-los do lúmen intestinal para os enterócitos para que ocorra sua liberação na circulação (Chen et al., 2002). Dentre os transportadores de peptídeos, o transportador de peptídeos, PepT1, realiza o transporte dos dipeptídeos impulsionando pela membrana interna-negativa através do potencial da célula e dependente do pH celular (Fei et al., 1994). Neste trabalho, sua expressão no jejuno dos frangos de corte, não foi alterada em função da dieta e nem pelo estresse por calor, resultados esses que corroboram com (Sun et al., 2014) em que frangos de corte foram expostos ao calor (32°C) por dez horas diárias por um período de sete dias, os autores não encontraram modulação na expressão dos transportadores de aminoácidos, concluindo que essa categoria de transportadores pode não ser modulada por esse tipo de perturbação. Os referidos autores ainda citam a escassez de referências sobre os transportadores de aminoácidos no jejuno de frangos de corte, não tendo assim grande esclarecimento sobre os mecanismos que são envolvidos na expressão destes.

Os macrófagos são importantes para assegurar normal funcionamento do hospedeiro através de controle dos processos inflamatórios (Epelman et al., 2014), sendo ativada por intermédio de citocinas. As citocinas são um grupo de proteínas de baixo peso molecular, que atuam na intercomunicação celular, sendo liberadas em decorrência de diferentes estímulos e interagem com os seus receptores regulando a função celular (Vitale and Ribeiro, 2007). O fator de necrose tumoral, está relacionado com a apoptose celular pelo fato de interagir com as células por meio de receptores específicos para TNF, esses receptores têm sítios de ligação específicos na superfície externa da membrana plasmática e um domínio que transmite o sinal de autodestruição (Nelson e Cox, 2013).

Por estar ligado a respostas inflamatórias habitualmente encontra-se maior expressão de TNF- $\alpha$  nas mais variadas patologias (Sevimli et al., 2008), assim como em situações de toxicidade por excesso de nutrientes na dieta (Wang et al., 2018). Sabe-se também que animais doentes ingerem menor quantidade de alimento, e este comportamento é relacionado a liberação de citocinas pelo sistema imune, que vão atuar nos centros responsáveis pelo controle do apetite no sistema nervoso central, produzindo assim a redução da alimentação (Johnson, 1998). Desse modo em nosso estudo, a maior atividade encontrada do fator de necrose tumoral alpha, na dieta isenta de suplementação de metionina pode ser indicativo de algum tipo de dano decorrente da falta do aminoácido, sabido que a dieta tem influência no funcionamento adequado do sistema imune, e a subnutrição resultante da falta de um balanço ideal de aminoácidos pode ser desencadeador de citocinas (Raqib and Cravioto, 2009).

O transporte da metionina do intestino delgado para o resto do corpo se faz necessário para que este nutriente possa ser devidamente utilizado no metabolismo animal (Rodrigueiro et al., 2000). Porém, em condições de estresse, no qual pode ser definido como sendo uma condição ou estado em que a homeostase do organismo é perturbada o

que provoca alterações hormonais e metabólicas (Kioukia-Fougia et al., 2002) o sistema neuroendócrino é ativado, e as catecolaminas, epinefrina e norepinefrina, são sintetizadas em maior quantidade (Sapolsky et al., 2000). Provendo alterações no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas. Em resposta do organismo a essas perturbações, o principal resultado é a ativação enzimática das proteínas quinases que sinalizam ao organismo para implantar glicogenólise e gluconeogênese (Charmandari et al., 2015).

Dentro da família de transportadores do tipo  $y^+L$ , o transportador  $y^+LAT1$  (codificado pelo gene SLC7A7) é um transportador sódio independente, que se encontra principalmente no intestino delgado, e atua facilitando a saída de aminoácidos catiônicos da célula para a matriz extracelular, e nos rins, leucócitos e células epiteliais, sendo parte do complexo heterodimérico de aminoácidos catiônicos (Fotiadis et al., 2013). Este transportador medeia a absorção de aminoácidos neutros, trocando esses aminoácidos por aminoácidos catiônicos intracelulares (principalmente L-leucina, L-glutamina e L-metionina). Assim, a metionina que foi absorvida nos enterócitos é transportada pelo  $y^+LAT1$  que medeia o transporte via corrente sanguínea podendo chegar ao fígado e irá ocorrer gluconeogênese. A maior expressão deste transportador que visualizamos no ambiente de estresse térmico (Tabela 5) pode ser pela necessidade de um incremento na via da gluconeogênese pela baixa disponibilidade de substrato no organismo. Em consequência, há a necessidade de aumentar a quantidade de transportadores de aminoácidos que atuam nas vias glicogênicas, como é o caso da metionina, para que esses aminoácidos se tornem disponíveis, para assim promover a formação de glicose o mais rápido possível. A suplementação de metionina também inferiu em aumento na sua expressão, que pode ter relação com a necessidade de um incremento na entrada de aminoácidos do lúmen do intestino delgado para o enterócito (Yin et al., 2014).

O estudo do perfil bioquímico tem a capacidade de informar sobre o estado nutricional e metabólico do organismo e suas respostas, auxiliando no desenvolvimento de novas ferramentas para melhores índices zootécnicos, visto que em momentos de perturbação da homeostase as primeiras alterações fisiológicas passíveis de análises são as bioquímicas (Schmidt et al., 2007; Silva et al., 2015). A utilização da atividade de enzimas plasmáticas e de metabólitos são amplamente utilizadas como indicativo do estado de funcionamento de diversos órgãos. O fato de os animais em estresse terem apresentado maior síntese de ácido úrico (Tabela 6) reforça o uso deste parâmetro como possível indicador da resposta animal ao calor (Azad et al., 2010), podendo estar associado ao seu aumento, devendo-se possivelmente pela necessidade de um incremento na via da gliconeogênese no fígado desses animais, para compensar o aumento da demanda de energia (Sun et al., 2014). Em geral, considera-se que valores de AST de a partir de 800 UI/L, mostram-se como elevações marcadas, sendo indicativas de dano hepatocelular grave (Capitelli and Crosta, 2013), para nossos animais os valores enzimáticos encontrados estavam dentro da faixa de normalidade.

Ao encontrarem os menores valores nas análises do perfil lipídico para os animais que não receberam suplementação (Tabela 7), infere-se que dietas deficientes em metionina para frangos de corte podem estar relacionadas ao metabolismo dos ácidos graxos não esterificados, e triglicérides. Devendo-se ao fato de que os aminoácidos sulfurados parecem agir inibindo a enzima hidroximetilglutaril-CoA redutase, responsável pela síntese de colesterol, diminuindo a concentração plasmática de colesterol no organismo (Carvalho, 2017). A maior oferta de energia na dieta dos animais aos 42 dias de idade também pode ser um fator considerável para maior aumento nas concentrações do perfil lipídico encontrado nos animais recebendo suplementação, pois a metionina apresenta um papel importante no metabolismo lipídico de aves (Borsa, et

al., 2011; Kalbande et al., 2009). Observando assim, que a condição alimentar pode ser resposta para os resultados que se encontrou envolvendo o perfil sérico dos animais, visto que a suplementação ou a limitação de metionina é a responsável pela disponibilidade do aminoácido para o metabolismo do animal, demandando maior ou menor gasto energético. Dessa forma, o maior nível de triglicerídeos e outros compostos lipídicos sanguíneos nas aves suplementadas pode ser explicado por um incremento nas vias do metabolismo lipídico devido uma maior presença de metionina.

## **5. Conclusão**

A suplementação de metionina independente de sua forma, faz-se essencial para o melhor desenvolvimento animal.

São raras as pesquisas envolvendo a suplementação do dipeptídeo de metionina na nutrição de frangos de corte. O desafio térmico e a dieta não foram suficientes para modular a expressão do PepT1.

## **Agradecimentos**

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

## Referências

- Adibi, S.A., 1997. The oligopeptide transporter (Pept-1) in human intestine: biology and function. *Gastroenterology* 113, 332–340.  
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.01.058>
- Agostini, P.S., Dalibard, P., Mercier, Y., Van Der Aar, P., Van Der Klis, J.D., 2016. Comparison of methionine sources around requirement levels using a methionine efficacy method in 0 to 28 day old broilers. *Poult. Sci.* 95, 560–569.  
<https://doi.org/10.3382/ps/pev340>
- Azad, M.A.K., Kikusato, M., Maekawa, T., Shirakawa, H., Toyomizu, M., 2010. Metabolic characteristics and oxidative damage to skeletal muscle in broiler chickens exposed to chronic heat stress. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 155, 401–406. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.12.011>
- Baker, D.H., 2009. Advances in protein-amino acid nutrition of poultry. *Amino Acids* 37, 29–41. <https://doi.org/10.1007/s00726-008-0198-3>
- Benner, J., Daniel, H., Spanier, B., 2011. A glutathione peroxidase, intracellular peptidases and the tor complexes regulate peptide transporter PEPT-1 in *C. elegans*. *PLoS One* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025624>
- Borsa, A.; Kohayagawa A.; Boretti, L. P.; Saito, M. E. Efeitos da interação entre aflatoxicoses e doença infecciosa bursal sobre níveis de enzimas de função hepática, colesterol e triglicérides em frangos de corte. *Veterinária em Foco*, v.8, n.2, p.132-142, 2011. <[http://www.ulbra.br/medicina-veterinaria/files/revista\\_v8\\_n2.pdf#page=29](http://www.ulbra.br/medicina-veterinaria/files/revista_v8_n2.pdf#page=29)>.
- Capitelli, R., Crosta, L., 2013. Overview of Psittacine Blood Analysis and Comparative Retrospective Study of Clinical Diagnosis, Hematology and Blood Chemistry in Selected Psittacine Species. *Vet. Clin. North Am. - Exot. Anim. Pract.* 16, 71–120. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2012.10.002>
- Carvalho, G.B. De, 2017. Níveis e fontes de metionina na nutrição de frangos de corte. Universidade Federal de Goiás.
- Charmandari, E., Tsigos, C., Chrousos, G., 2015. Endocrinology of the stress response. *Annu. Rev. Physiol.* 76, 115–118.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.67.040403.120816>
- Chen, H., Pan, Y., Wong, E.A., Bloomquist, J.R., Webb Jr., K.E., 2002. Molecular

- cloning and functional expression of a chicken intestinal peptide transporter (cPepT1) in *Xenopus* oocytes and Chinese hamster ovary cells. *J Nutr* 132, 387–393.
- Corzo, A., Kidd, M.T., Dozier, W.A., Shack, L.A., Burgess, S.C., 2006. Protein expression of pectoralis major muscle in chickens in response to dietary methionine status. *Br. J. Nutr.* 95, 703–708. <https://doi.org/10.1079/BJN20051716>
- Crampton, R.F., Gangolli, S.D., Simson, P., Matthews, D.M., 1971. Rates of absorption by rat intestine of pancreatic hydrolysates of proteins and their corresponding amino acid mixtures. *Clin. Sci.* 41, 409–17.
- Daenner, E., Bessei, W., 2003. Influence of Supplementation with Liquid DL - Methionine Hydroxy Analogue-Free Acid ( Alimet ) or DL -Methionine on Performance of Broilers. *J. Appl. Poult. Res.* 12, 101–105.
- Del Vesco, A.P., Gasparino, E., Grieser, D.O., Zancanela, V., Voltolini, D.M., Khatlab, A.S., Guimarães, S.E.F., Soares, M.A.M., Neto, A.R.O., 2015. Effects of methionine supplementation on the expression of protein deposition-related genes in acute heat stress-exposed broilers. *Br. J. Nutr.* 10, 549–559. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115821>
- Epelman, S., Lavine, K.J., Randolph, G.J., 2014. Origin and Functions of Tissue Macrophages. *Immunity* 41, 21–35. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.013>
- Façanha, F.N., Oliveira-Neto, A.R., Figueiredo-Silva, C., Nunes, A.J.P., 2016. Effect of shrimp stocking density and graded levels of dietary methionine over the growth performance of *Litopenaeus vannamei* reared in a green-water system. *Aquaculture* 463, 16–21. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.05.024>
- Fei, Y.J., Kanai, Y., Nussberger, S., Ganapathy, V., Leibach, F.H., Romero, M.F., Singh, S.K., Boron, W.F., Hediger, M.A., 1994. Expression cloning of a mammalian proton-coupled oligopeptide transporter. *Nature* 368, 563–566. <https://doi.org/10.1038/368563a0>
- Fotiadis, D., Kanai, Y., Palacín, M., 2013. The SLC3 and SLC7 families of amino acid transporters. *Mol. Aspects Med.* 34, 139–158. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.10.007>
- Friedewald, W.T., Levy, R.I., Fredrickson, D.S., 1972. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.* 18, 499–502. <https://doi.org/10.1177/107424840501000106>

- Jankowski, J., Kubińska, M., Zduńczyk, Z., 2014. Nutritional and immunomodulatory function of methionine in poultry diets – a review. *Ann. Anim. Sci.* 14, 17–31. <https://doi.org/10.2478/aoas-2013-0081>
- Johnson, R.W., 1998. Immune and endocrine regulation of food intake in sick animals. *Domest. Anim. Endocrinol.* 15, 309–319. [https://doi.org/10.1016/S0739-7240\(98\)00031-9](https://doi.org/10.1016/S0739-7240(98)00031-9)
- Kalbande, V.H., Ravikanth, K., Maini, S., Rekhe, D.S., 2009. Methionine supplementation options in poultry. *Int. J. Poult. Sci.* 8, 588–591. <https://doi.org/10.3923/ijps.2009.588.591>
- Kioukia-Fougia, N., Antoniou, K., Bekris, S., Liapis, C., Christofidis, I., Papadopoulou-Daifoti, Z., 2002. The effects of stress exposure on the hypothalamic–pituitary–adrenal axis, thymus, thyroid hormones and glucose levels. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* 26, 823–830. [https://doi.org/10.1016/S0278-5846\(01\)00297-4](https://doi.org/10.1016/S0278-5846(01)00297-4)
- Leite, R.S., Rocha, J.S.R., Michel, B.C., Lara, L.J.C., Ornelas, E.A., Cançado, S. V., Baião, N.C., 2009. Efeitos de planos nutricionais e de fontes de metionina sobre o desempenho, rendimento e composição de carcaças de frangos de corte. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.* 61, 1120–1127. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352009000500015>
- Lopez-Alvarado, J., Kanazawa, A., 1994. Effect of Dietary Arginine Levels on Growth Supplemented with Crystalline Amino Acids. *Fish. Sci.* 60, 435–439.
- Maebuchi, M., Samoto, M., Kohno, M., Ito, R., Koikeda, T., Hirotsuka, M., Nakabou, Y., 2007. Improvement in the intestinal absorption of soy protein by enzymatic digestion to oligopeptide in healthy adult men. *Food Sci. Technol. Res.* 13, 45–53. <https://doi.org/10.3136/fstr.13.45>
- Mamauag, R.E.P., Gao, J., Nguyen, B.T., Ragaza, J.A., 2012. Supplementations of DL - Methionine and Methionine Dipeptide in Diets are Effective for the Development and Growth of Larvae and Juvenile Red Sea Bream, *Pagrus major*. *J. World Aquac. Sci.* 43, 362–374.
- Marchini, C.F.P., Silva, P., De Mattos Nascimento, M.R.B., Beletti, M., Silva, N., Guimarães, E.C., 2011. Body Weight , Intestinal Morphometry and Cell Proliferation of Broiler Chickens Submitted to Cyclic Heat Stress. *Int. J. Poult. Sci.* 10, 455–460. <https://doi.org/10.3923/ijps.2011.455.460>
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2013. *Lehninger Principles of Biochemistry* 6th ed., Book.

- <https://doi.org/10.1016/j.jse.2011.03.016>
- Niu, J., Lemme, A., He, J.Y., Li, H.Y., Xie, S.W., Liu, Y.J., Yang, H.J., Figueiredo-Silva, C., Tian, L.X., 2018. Assessing the bioavailability of the Novel Met-Met product (AQUAVI® Met-Met) compared to DL-methionine (DL-Met) in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture* 484, 322–332.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.08.021>
- Olivera Neto, A.R., 2014. Metabolismo e exigência de metionina, in: Sakomura, N.K., Silva, J.H.V., Costa, F.G.P., Fernandes, J.B.K., Hauschild, L., *Nutrição de não ruminantes*. Editora Funep., Jaboticabal p. 678
- Oliveira Neto, A.R. De, De Oliveira, R.F.M., Donzele, J.L., Barreto, S.L.D.T., Vaz, R.G.M.V., Gasparino, E., 2007. Níveis de metionina + cistina total para frangos de corte de 22 a 42 dias de idade mantidos em ambiente termoneutro. *Rev. Bras. Zootec.* 36, 1359–1364.
- Paris, N.E., Wong, E.A., 2013. Expression of digestive enzymes and nutrient transporters in the intestine of *Eimeria maxima*-infected chickens. *Poult. Sci.* 92, 1331–1335. <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02966>
- Raqib, R., Cravioto, A., 2009. Nutrition, immunology, and genetics: Future perspectives. *Nutr. Rev.* 67, 227–236. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2009.00244.x>
- Rodrigueiro, R.J.B., Albino, L.F.T., Rostagno, H.S., Gomes, P.C., Pozza, P.C., Neme, R., 2000. Exigência de Metionina + Cistina para Frangos de Corte na Fase de Crescimento e Methionine + Cystine Requirement for Broilers at the Growing and Finishing Phases. *Rev. Bras. Zootec.* 29, 507–517.
- Rostagno, H.S., Albino, L.F.T., Donzele, J.L., Gomes, P.C., Oliveira, R.F., Lopes, D.C., Ferreira, A.S., Barreto, S.L.T., Euclides, R.F., 2011. Tabelas brasileiras para aves e suínos in: Rostagno, H.S, 3ª edição, Viçosa, MG, UFV, DZO p. 252
- Sapolsky, R.M., Romero, L.M., Munck, a. U., 2000. How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses ? Preparative Actions \*. *Endocr. Rev.* 21, 55–89.  
<https://doi.org/10.1210/er.21.1.55>
- Schmidt, E.M.S., Locatelli-Dittrich, R., Santin, E., Paulillo, A.C., 2007. Patologia clínica em aves de produção - Uma ferramenta para monitorar a sanidade avícola - Revisão. *Arch. Vet. Sci.* 12, 9–20. <https://doi.org/10.5380/avs.v12i3.10906>
- Schutte, J.B., de Jong, J., Pack, M., 1995. Replacement value of betain for methionine in broiler chicks. *Proc.10th Eur. Poult. Nutr. Antalya, Turkey* 0–4.

- Sevimli, A., Misirliođolu, D., Yađci, A., Bülbül, A., Yilmaztepe, A., Altunbas, K., 2008. The role of chicken IL-1??, IL-6 and TNF-?? in the occurrence of amyloid arthropathy. *Vet. Res. Commun.* 32, 499–508. <https://doi.org/10.1007/s11259-007-9034-6>
- Silva, G.C., Nascimento, M.R.B. de M., Penha-Silva, N., Fernandes, E. de A., Vilela, D.R., Souto, M.M., 2015. Suplementação com zinco e selênio em frangos de corte submetidos a estresse cíclico de calor. *Rev. Ceres* 62, 372–378. <https://doi.org/10.1590/0034-737X201562040006>
- Smith, M.W., M.A. Mitchell and M.A. Peacock, 1990. Effects of genetic selection on growth rate and intestinal structure in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 97A: 57-63
- Sun, X., Zhang, H., Sheikahmadi, A., Wang, Y., Jiao, H., Lin, H., Song, Z., 2014. Effects of heat stress on the gene expression of nutrient transporters in the jejunum of broiler chickens (*Gallus gallus domesticus*). *Int. J. Biometeorol.* 59, 127–135. <https://doi.org/10.1007/s00484-014-0829-1>
- Takahashi, L.S., Jaqueline Dalbello Biller, Biller, D., Takahashi, K.M., 2009. *Bioclimatologia Zootécnica* 91.
- Tanaka, H., Miyamoto, K.I., Morita, K., Haga, H., Segawa, H., Shiraga, T., Fujioka, A., Kouda, T., Taketani, Y., Hisano, S., Fukui, Y., Kitagawa, K., Takeda, E., 1998. Regulation of the PepT1 peptide transporter in the rat small intestine in response to 5-fluorouracil-induced injury. *Gastroenterology* 114, 714–723. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(98\)70585-2](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(98)70585-2)
- Tesseraud, S., Métayer Coustard, S., Collin, A., Seiliez, I., 2009. Role of sulfur amino acids in controlling nutrient metabolism and cell functions: Implications for nutrition. *Br. J. Nutr.* 101, 1132–1139. <https://doi.org/10.1017/S0007114508159025>
- Uni, Z., Gal-Garber, O., Geyra, A., Sklan, D., Yahav, S., 2001. Changes in growth and function of chick small intestine epithelium due to early thermal conditioning. *Poult. Sci.* 80, 438–445. <https://doi.org/10.1093/ps/80.4.438>
- Visentini, P., Lopes, J., Toledo, G.S. De, Costa, P.T., 2005. Níveis de substituição da DL-metionina pela metionina hidróxi análoga em base equimolar , em dietas para frangos de corte. *Ciência Rural* 35, 1400–1405.
- Vitale, R.F., Ribeiro, F. de A.Q., 2007. The role of Tumor Necrosis Factor -Alpha (TNF-á) in bone resorption present in middle ear cholesteatoma. *Braz. J.*

- Otorhinolaryngol. 73, 123–127. <https://doi.org/S0034-72992007000100020> [pii]
- Wagner, C.A., Lang, F., Broer, S., 2001. Function and structure of heterodimeric amino acid transporters. *Am J Physiol Cell physiol* 281, 1077–1093.  
<https://doi.org/10.1080/10715760410001727858>
- Wang, Y., Jiang, L., He, J., Hu, M., Zeng, F., Li, Y., Tian, H., Luo, X., 2018. The Adverse Effects of Se Toxicity on Inflammatory and Immune Responses in Chicken Spleens.
- Wen, C., Chen, X., Chen, G.Y., Wu, P., Chen, Y.P., Zhou, Y.M., Wang, T., 2014. Methionine improves breast muscle growth and alters myogenic gene expression in broilers. *J. Anim. Sci.* 92, 1068–1073. <https://doi.org/10.2527/jas2013-6485>
- Yin, J., Ren, W., Duan, J., Wu, L., Chen, S., Li, T., Yin, Y., Wu, G., 2014. Dietary arginine supplementation enhances intestinal expression of SLC7A7 and SLC7A1 and ameliorates growth depression in mycotoxin-challenged pigs. *Amino Acids* 46, 883–892. <https://doi.org/10.1007/s00726-013-1643-5>