

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

EXPRESSÃO GÊNICA, PRODUÇÃO DE ROS E ATIVIDADE
ENZIMÁTICA EM FUNÇÃO DE SUPLEMENTAÇÃO DE
METIONINA E ESTRESSE TÉRMICO EM AVES

Autor: Ana Paula Del Vesco
Orientador: Prof. Dra. Eliane Gasparino

MARINGÁ
Estado do Paraná
março - 2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

EXPRESSÃO GÊNICA, PRODUÇÃO DE ROS E ATIVIDADE
ENZIMÁTICA EM FUNÇÃO DE SUPLEMENTAÇÃO DE
METIONINA E ESTRESSE TÉRMICO EM AVES

Autor: Ana Paula Del Vesco
Orientador: Prof. Dra. 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
março - 2012

“É muito melhor arriscar coisas grandiosas, alcançar triunfos e glórias, mesmo se expondo ao fracasso, do que formar fila com os pobres de espírito, que nem gozam muito, nem sofrem muito, porque vivem nessa penumbra cinzenta que não conhece vitória nem derrota”

Franklin Delano Roosevelt

Aos meus pais, Mario Del Vesco e Dirce Martins Del Vesco. Meu pai, esperançoso e sonhador, o homem que me ama e me incentiva a todo o momento. Minha mãe, mulher forte, batalhadora, que tem os filhos sempre em primeiro lugar. Quisera eu me parecer um pouco mais com ela.

Aos meus irmãos, Jorge Paulo Del Vesco e Silvia Del Vesco, com os quais, sei que posso contar em qualquer momento.

Ao meu querido José Almides Antoneto, desde minha infância, meu segundo pai.

Ao meu namorado, Pablo Augusto Guerra: meu companheiro, amigo e grande amor.

À grande amiga Eliane, e seus queridos filhos, Júlia e Eduardo. Nem se eu fosse a mais habilidosa poetisa, conseguiria expressar o quão importante é o papel desta querida família na realização deste sonho e na minha vida.

DEDICO ESTE TRABALHO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir todas as coisas.

Aos meus pais, por serem incansáveis, pelo esforço em enfrentar todas as dificuldades, pela compreensão e por todo amor destinado a mim.

Ao meu namorado e grande amor, Pablo Augusto Guerra, por fazer da minha vida cada dia mais feliz, desde o primeiro momento.

À professora Eliane Gasparino, por toda ajuda, ensinamentos e orientação, pela paciência e compreensão infinita, e principalmente, por acreditar e apostar em mim.

À minha grande amiga Larissa Zetouni, por ter-me feito e ter me ajudado a continuar a cada momento de dificuldade. Presente da Universidade!

Às minhas queridas, Andréa Bolognese, Alessandra Hara, Aline Guastala e Ingrid Fernandes, por fazerem parte da minha vida há tantos anos e ainda serem minhas melhores amigas.

À professora Simara Márcia Marcato, por ter-me acolhido como sua, e me ajudado tanto.

À Débora Marques Voltolini, pela generosidade, e por todos os ensinamentos transmitidos desde sempre. Não serão esquecidos.

Às meninas do grupo, Stefânia Caroline da Silva e Liegie Alher Marques. Stefs, muito obrigada pela paciência, e pelo companheirismo.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Zootecnia da UEM, pelos ensinamentos.

Aos integrantes da banca de defesa, pelas valiosas sugestões que certamente irão enriquecer o presente trabalho.

À Universidade Estadual de Maringá e ao Programa de Pós Graduação em Zootecnia, por ter tornado possível a realização dos meus estudos e deste projeto.

BIOGRAFIA

ANA PAULA DEL VESCO, filha de Mario Del Vesco e Dirce Martins Del Vesco, nasceu em Cianorte, Estado do Paraná, no dia 07 de setembro de 1986.

Cursou graduação em Zootecnia na Universidade Estadual de Maringá, no período de 2005 a 2009.

Em março de 2010, iniciou o mestrado no Programa de Pós Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, área de concentração Produção Animal- Melhoramento Genético Animal, sob orientação da Professora Dra. Eliane Gasparino.

Em março de 2012, submeteu-se à banca examinadora para defesa da Dissertação de mestrado.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	Xiii
I. INTRODUÇÃO.....	15
1.0 Avicultura	16
1.1 Nutrição	16
1.1.1 Proteína ideal e metionina.....	16
1.1.2 Fontes industriais de metionina.....	18
1.2 Genética	21
1.2.1 Genes mitocondriais.....	21
1.2.1 Genes do crescimento.....	24
1.3 Nutrigenômica	27
1.3.1 Expressão gênica - qRT-PCR.....	28
1.3.2 Influência da metionina na expressão gênica.....	30
1.4 Coturnicultura	32
1.4.1 Estresse térmico.....	32
1.4.2 Espécies reativas de oxigênio.....	34
1.4.3 Sistema antioxidante da glutatona.....	35
LITERATURA CITADA	38
II. OBJETIVOS GERAIS.....	46
III. METIONINA NA DIETA DE FRANGOS DE CORTE SOBRE A EXPRESSÃO DE mRNA IGF-I E mRNA GHR.....	47
RESUMO	47
Introdução	48
Materiais e Métodos	49
Resultados	53
Discussão	58
Conclusões	62
Referências	62
IV. EXPRESSÃO DE GENES MITOCONDRIAIS EM RESPOSTA À SUPLEMENTAÇÃO DE METIONINA NA DIETA DE FRANGOS DE	

CORTE.....	65
RESUMO	65
Introdução	66
Materiais e Métodos	67
Resultados	71
Discussão	77
Conclusões	82
Referências	82
V. PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA GLUTATIONA PEROXIDASE EM CODORNAS SUBMETIDAS AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO.....	85
RESUMO	85
Introdução	86
Materiais e Métodos	87
Resultados	89
Discussão	91
Conclusões	94
Referências	94
VI. CONCLUSÕES GERAIS.....	97
APÊNDICES.....	98

LISTA DE TABELAS

	Página
III. METIONINA NA DIETA DE FRANGOS DE CORTE SOBRE A EXPRESSÃO DE mRNA IGF-I E mRNA GHR.....	47
Tabela 1 - Composição centesimal das rações experimentais.....	50
Tabela 2 - Primers para qRT-PCR.....	52
Tabela 3 - Sumário <i>a posteriori</i> para os tratamentos avaliados sobre o ganho de peso, conversão alimentar e expressão dos genes GHR e IGF-I no fígado e músculo.....	54
Tabela 4 - Estimativas <i>a posteriori</i> das distribuições dos contrastes entre os tratamentos avaliados sobre a expressão dos genes GHR e IGF-I no fígado....	55
IV. EXPRESSÃO DE GENES MITOCONDRIAIS EM RESPOSTA A SUPLEMENTAÇÃO DE METIONINA NA DIETA DE FRANGOS DE CORTE.....	65
Tabela 1 - Composição centesimal das rações experimentais.....	68
Tabela 2 - Primers para qRT-PCR.....	70
Tabela 3 - Sumário <i>a posteriori</i> para os tratamentos avaliados sobre a expressão dos genes UCP, COX III e ANT no fígado e músculo de aves de 22-42 dias.....	73
Tabela 4 - Estimativas <i>a posteriori</i> das distribuições dos contrastes entre os tratamentos avaliados sobre a expressão de mRNA UCP no músculo, do ganho de peso e da conversão alimentar.....	75

LISTA DE FIGURAS

	Página
I. INTRODUÇÃO.....	15
Figura 1 - Biotransformação da Metionina.....	18
Figura 2 - Possíveis rotas de sinalização para o GHR.....	25
Figura 3 - Principais etapas do início da tradução. (A) Formação do complexo de iniciação 43S. (B) Ligação do mRNA ao complexo de iniciação.....	31
Figura 4 - Síntese da glutatona a partir dos aminoácidos glutâmico e cisteína (A); Sistema de defesa antioxidante da glutatona contra o peróxido de hidrogênio (B).....	37
III. METIONINA NA DIETA DE FRANGOS DE CORTE SOBRE A EXPRESSÃO DE mRNA IGF-I E mRNA GHR.....	47
Figura 1- Curva de <i>melting</i> para o gene da β -actina.....	53
Figura 2- Resultados de ganho de peso (A) e conversão alimentar (B) de frangos de corte recebendo dieta basal ou com suplementação de duas fontes e dois níveis de metionina.....	56
Figura 3- Expressão de mRNA IGF-I (A) e mRNA GHR (B) no fígado e músculo de frangos de corte recebendo dieta basal ou com suplementação de duas fontes e dois níveis de metionina.....	57
IV. EXPRESSÃO DE GENES MITOCONDRIAIS EM RESPOSTA A SUPLEMENTAÇÃO DE METIONINA NA DIETA DE FRANGOS DE CORTE.....	66
Figura 1- Resultados de ganho de peso (A) e conversão alimentar (B) de frangos de corte recebendo dieta basal ou com suplementação de duas fontes e dois níveis de metionina.....	72
Figura 2 - Expressão de mRNA UCP no fígado e músculo de frangos de corte recebendo dieta basal ou com suplementação de duas fontes e dois níveis de metionina.....	76
Figura 3 - Expressão de mRNA COX III (A) e mRNA ANT (B) no fígado e músculo de frangos de corte recebendo dieta basal ou com suplementação de duas fontes e dois níveis de metionina.....	77
V. PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) E	

ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA GLUTATIONA PEROXIDASE EM CODORNAS SUBMETIDAS AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO.....	85
Figura 1- Produção de ROS mitocondrial no fígado de codornas submetidas à ambiente termoneutro e a estresse térmico agudo, em reação contendo apenas rotenona e em reação contendo rotenona mais antimicina.....	89
Figura 2 - Absorbância observada entre 0 e 50 segundos com base no consumo de NADPH na reação. (A): animais do ambiente termoneutro e (B): animais submetidos ao estresse térmico.	90
Figura 3 - Atividade da glutaciona peroxidase no fígado de codornas submetidas à ambiente termoneutro e submetidas a estresse térmico agudo, dada em nmol de NADPH oxidado por mg de proteína por minuto.....	91

RESUMO

A taxa de crescimento das aves está atrelada à eficiência alimentar e a deposição de massa muscular bem como, às condições ambientais a que os animais são expostos. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o ganho de peso e conversão alimentar das aves, a expressão de genes mitocondriais participantes da síntese de energia, mRNA UCP (proteína desacopladora), mRNA ANT (transportador de nucleotídeos de adenina) e mRNA COXIII (citocromo c oxidase subunidade III), e a expressão de genes envolvidos no crescimento animal, mRNA GHR (receptor do hormônio do crescimento) e do IGF-I (fator de crescimento semelhante a insulina I) no fígado e músculo do peito de frangos de corte, alimentados com dietas contendo duas fontes e dois níveis de suplementação de metionina, e avaliar a influência do estresse térmico agudo sobre a produção de ROS mitocondrial e atividade da enzima glutatona peroxidase no fígado de codornas de corte. Foram utilizados frangos de corte de 22 a 42 dias de idade distribuídos em cinco tratamentos (dieta basal, primeiro nível de suplementação de DL-metionina, segundo nível de DL-metionina, primeiro nível de MHA-FA e segundo nível de MHA-FA). Ao final do período experimental, as aves foram abatidas por deslocamento cervical, o músculo do peito e fígado foram coletados para extração do RNA total. O cDNA foi amplificado usando *primers* específicos para os genes analisados pela qRT-PCR. Foram mais eficientes na conversão alimentar as aves que receberam suplementação do segundo nível de suplementação de metionina, independente da fonte comercial utilizada. Já, o melhor ganho de peso foi observado no segundo nível de suplementação de DL-metionina. Foi observado significativamente menor quantidade de mRNA UCP no músculo dos animais que consumiram dieta com adição de metionina, sendo a maior expressão deste gene observada para dieta basal,

tratamento que também foi responsável pela pior eficiência alimentar. A expressão de mRNA UCP no fígado, e de mRNA COX III e mRNA ANT no fígado e no músculo não sofreram ação da suplementação de metionina. A expressão dos genes GHR e IGF-I no músculo não sofreu influência da suplementação de metionina. Entretanto, no fígado, foi observada diferença significativa entre os tratamentos basal e segundo nível de DL-metionina sobre a expressão de mRNA GHR. Os animais que receberam esse nível de suplementação apresentaram maior expressão do gene. A expressão de IGF-I no fígado foi maior para animais que receberam suplementação de metionina, comparados à dieta basal. A suplementação do segundo nível de DL-metionina também levou à maior expressão em relação àqueles animais alimentados com o primeiro nível de suplementação de DL-metionina (1,56 UA vs 0,97 UA). A suplementação de metionina melhorou o ganho de peso e a eficiência alimentar, como era esperado, em parte, por influenciar a expressão de genes envolvidos nestas características. Para avaliação da produção de ROS e da atividade da enzima glutathione peroxidase, aos 30 dias de idade, codornas de corte foram divididos em dois grupos: os animais pertencentes ao tratamento termoneutro foram abatidos imediatamente e o segundo grupo foi submetido ao estresse térmico de 34°C por 24 horas. Para análise de produção de ROS, foram coletados os fígados para isolamento de mitocôndrias e subsequente análise de ROS mitocondrial. Atividade da enzima glutathione peroxidase foi determinada utilizando peróxido de hidrogênio (H₂O₂), e baseada na quantidade de NADPH oxidado. Foi observada maior produção de ROS mitocondrial para animais submetidos ao estresse térmico, 0,34 vs 0,22, para reações contendo apenas rotenona, e 0,31 vs 0,23, nas reações com a presença de rotenona mais antimicina. Codornas que permaneceram em ambiente de estresse térmico apresentaram também significativamente maior atividade da enzima glutathione peroxidase nos hepatócitos (47,8 vs 39,6). Assim, verificou-se que estresse térmico agudo, de 34°C por 24 horas, foi capaz de atuar na produção de ROS mitocondrial e na atividade da enzima glutathione peroxidase no fígado de codornas.

Palavras-chave: metionina, genes mitocondriais, RNA, estresse oxidativo

ABSTRACT

The growth rate of birds occurs due to the feed efficiency and deposition of muscle mass, as well as environmental conditions. Thus, this study aimed to evaluate the weight gain and feed conversion and the expression of mitochondrial genes involved in the energy synthesis, mRNA UCP (uncoupling protein), mRNA ANT (adenine nucleotide translocator) and mRNA COXIII (cytochrome c oxidase subunit III), and the expression of genes involved in animal growth, GHR mRNA (growth hormone receptor) and IGF-I (insulin-like growth factor I) in the liver and in the breast muscle of broilers fed with diets containing two sources and two levels of methionine supplementation, and to evaluate the influence of acute thermal stress on the production of mitochondrial ROS and glutathione peroxidase activity in the liver of quails. In this work broilers from 22 to 42 days of age were distributed into five treatments (basal diet, supplementations of first level of DL-methionine, of second level of DL-methionine, of first level of MHA-FA and second level of MHA-FA). At the end of the experimental period the birds were killed by cervical dislocation, the breast muscle and the liver were collected for total RNA extraction. The cDNA was amplified using specific primers designed for the genes analyzed by qRT-PCR. The birds fed with second level of methionine supplementation were more efficient in the feed conversion, regardless the commercial source used. The best weight gain was observed in the second level of DL-methionine supplementation. Significant lower amount of mRNA UCP was observed in the breast muscle of animals fed with diets containing added methionine, being the highest expression of this gene observed in broilers fed with the basal diet, treatment which was also responsible for the worst feed efficiency. The mRNA UCP expression in the liver, and the mRNA COX III and mRNA ANT expression in the liver and in the

muscle was not influenced by methionine supplementation. The GHR and IGF-I gene expression in the breast muscle was not affected by methionine supplementation. However, a significant difference between the basal diet and the second level of DL-methionine on GHR mRNA expression in the liver was observed, whereas animals which received this level of supplementation showed higher expression of the gene. The expression of IGF-I in the liver was higher in the animals fed with diets supplemented with methionine compared to those fed with basal diet. The second level of DL-methionine supplementation also had the highest expression in relation to those animals which received the first level of DL-methionine supplementation (1.56 AU vs 0.97 AU). The methionine supplementation improved weight gain and feed efficiency, as expected, in part, by influencing the expression of genes involved in these characteristics. The birds' performance is also affected by environmental conditions. Thus, an experiment was conducted with the purpose of evaluating the production of mitochondrial ROS and glutathione peroxidase activity. Quails with 30 days of age were divided into two groups, the animals pertaining to thermoneutral treatment were slaughtered immediately and the second group was subjected to thermal stress of 34°C for 24 hours. To analyze the production of ROS, the livers were collected for the isolation of mitochondria and subsequent analysis of mitochondrial ROS. Glutathione peroxidase activity was determined using hydrogen peroxide (H₂O₂), and based on the amount of NADPH oxidized. A higher production of mitochondrial ROS was observed in animals subjected to thermal stress, 0.34 vs 0.22, for reactions containing only rotenone, and 0.31 vs 0.23, in reactions containing rotenone and antimycin. Quails that remained in the environment of heat stress also had significantly higher glutathione peroxidase activity in the hepatocytes (47.8 vs. 39.6). Therefore, it was observed that acute thermal stress of 34°C for a period of 24 hours was able to act in the mitochondrial ROS production and in the glutathione peroxidase activity in the liver of quails.

Key words: methionine, mitochondrial genes, RNA, oxidative stress

I. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de pesquisas científicas com avanços nas áreas de nutrição e genética na avicultura melhorou os índices alimentares e reduziram os custos de produção, possibilitando assim aumento na produtividade. Os gastos com a alimentação representam cerca de 50 a 70% do total dos custos de produção na pecuária, e, dentro disto, a eficiência alimentar se torna cada vez mais, um aspecto importante e de grande interesse nas pesquisas recentes (Lassiter et al., 2006). Entre estas, estão as pesquisas em nutrigênômica.

A taxa de crescimento está atrelada à eficiência alimentar, bem como a deposição de massa muscular. A eficiência de um animal em converter alimentos em peso corporal, está relacionada com a eficiência na produção de energia. Estudos mostram que aves com menor produção de ATP em função de menor eficiência mitocondrial de produzir ATP a partir de substratos, apresentam pior eficiência alimentar ou conversão alimentar (Bottje & Carstens, 2009).

A eficiência na produção de energia depende não somente da perfeita coordenação entre os complexos da cadeia respiratória, mas também de um potente sistema antioxidante que proteja as mitocôndrias dos danos gerados durante a produção de ATP. Já a deposição de massa é produto da síntese protéica, promovida em parte por hormônios ligados ao crescimento.

O desempenho das aves também é afetado pelas condições ambientais a que estes animais são expostos. A produção pode ser prejudicada em função de altas temperaturas, que levam os animais ao estresse térmico (Oliveira et al., 2006). O estresse térmico tem sido associado a alterações metabólicas que envolvem o estresse oxidativo. De acordo com Yang et al. (2010), aves submetidas ao estresse por altas

temperaturas podem apresentar redução na atividade da cadeia respiratória mitocondrial, seguida por maior produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Segundo estes autores, a atividade de algumas enzimas envolvidas no sistema de defesa antioxidante também é aumentada em função ao estresse térmico.

A busca por animais cada vez mais eficientes deixa clara a necessidade de conhecer melhor como todos esses fatores estão envolvidos no desempenho das aves, em função das modificações ocorridas devido a mudanças fisiológicas em nível celular / molecular.

1. Avicultura

A organização do setor avícola, aliada à qualidade do produto brasileiro, fez com que a carne de frango ganhasse espaço como escolha preferencial, e não apenas em substituição a outras carnes. Estes resultados positivos são refletidos nas estatísticas de produção e exportação no ano de 2011. As exportações de carne de frango aumentaram 6,8% no primeiro semestre de 2011, em relação ao mesmo período do ano 2010, gerando uma receita de 3,999 bilhões de dólares. 718,3 mil toneladas de carne embarcaram para o oriente médio, principal consumidor da carne brasileira. Em relação aos estados brasileiros, nos primeiros seis meses do ano de 2011, Santa Catarina foi o estado que mais exportou o produto, seguido pelo Paraná, com 499,2 mil toneladas (UBABEF, 2012). Esses avanços na criação de frangos de corte são devidos a pesquisas e tecnologias utilizadas na nutrição e genética das aves.

1.1 Nutrição

1.1.1 Proteína Ideal e metionina

Melhor desempenho dos frangos de corte, com menor custo de produção, é possível com a formulação de rações com base no conceito de proteína ideal (Hackenhaar & Lemme, 2005). Por definição, o conceito de proteína ideal refere-se ao balanço ideal de todos os aminoácidos essenciais da ração com a lisina, aminoácido de referência (Braga & Baião, 2001). Esse conceito otimiza a utilização da proteína da dieta, aumentando a retenção protéica e diminuindo a excreção de nitrogênio. Desta forma, as dietas são formuladas para que ocorra o fornecimento exato, sem excesso ou

falta de aminoácidos que permita o perfeito metabolismo de manutenção e produção (Araujo & Sobreira, 2008). Estes autores também relataram que alto nível protéico na ração estimula o catabolismo de proteínas, por intermédio de enzimas pancreáticas e intestinais e também de enzimas envolvidas na degradação de aminoácidos essenciais. Outro aspecto determinante para o sucesso do conceito de proteína ideal é o conhecimento do valor verdadeiro de digestibilidade dos aminoácidos de cada alimento.

As proteínas são formadas por aminoácidos, sendo suas conformações e funções biológicas ditadas pelas sequências destes (Nelson & Cox, 2008). As proteínas da dieta são hidrolisadas no lúmen intestinal e nas células da mucosa do trato gastrointestinal, resultando em aminoácidos livres que são em grande parte transportados para o fígado, através do sangue portal. O organismo animal possui pouca capacidade de estocar proteínas, quando há consumo acima da necessidade, o que ocorre é uma maior formação de uréia ou ácido úrico, acompanhada pela conversão do esqueleto de carbono a carboidratos, lipídeos e em CO₂ para a geração de ATP. Por outro lado, se a ingestão for menor que a necessidade do animal, haverá catabolismo das proteínas corpóreas (Reece, 2006).

A metionina é o primeiro aminoácido limitante para frangos de corte, devido à composição dos alimentos utilizados em suas dietas e em função da grande exigência deste aminoácido para deposição de penas. Além de ser utilizada para deposição de músculos e penas, a metionina desempenha importantes funções como doador de grupos metil (Simon, 1999), como participante da síntese de glutatona (Piovacari et al., 2008), como doador de enxofre (Wu & Davis, 2005) e como participante na síntese da cisteína e da S-adenosilmetionina (SAM), sendo este composto responsável pelas metilações essenciais para a biossíntese de uma variedade de compostos celulares, como creatina, carnitina, fosfolipídeos e proteínas (Stipanuk, 2004).

A metionina está envolvida no metabolismo da homocisteína através de duas rotas biológicas: a remetilação e a transsulfuração. A homocisteína é convertida em metionina pela remetilação por intermédio de duas enzimas: a metionina sintase e a betaína:homocisteína metiltransferase. Pela ação da metionina sintase, enzima dependente de vitamina B12, o metiltetrahidrofolato doa um grupo metil para a homocisteína, que é convertida então em metionina. Já, na reação catalisada pela betaína:homocisteína metiltransferase, o processo se dá de maneira similar, entretanto, neste caso o grupo metil é doado pela betaína (Stipanuk, 2004).

A transsulfuração ocorre em duas etapas. Na primeira, ocorre a reação da homocisteína com a serina, pela ação da cistationina β -sintase, resultando em cistationina. Na segunda, a cistationina é metabolizada, com ação da cistationina β -liase, ocorrendo a síntese da cisteína (Stipanuk, 2004). Estas rotas são consideradas de grande importância, já que o excesso de homocisteína no organismo está relacionado a doenças cardiovasculares (Laurenti, 2005) (Figura 1).

A remetilação é favorecida quando há baixas concentrações de metionina ou de S-adenosil metiltransferase (SAM). Já, quando há maiores quantidade de metionina ou de SAM, a rota de transsulfuração é a mais ativada, e há maior produção de cisteína (Finkelstein, 1998).

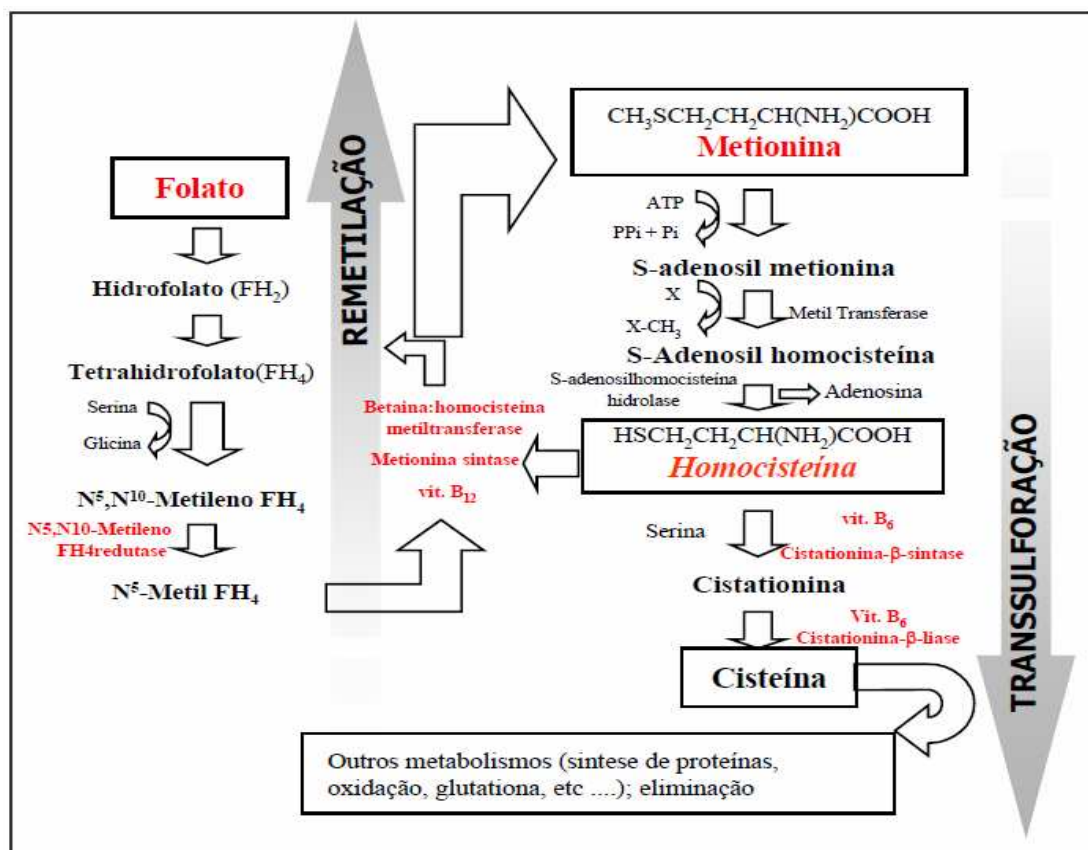


Figura 1- Biotransformação da Metionina. (Fonte: Adaptado de Haddad, 2001).

1.1.2 Fontes industriais de metionina

Em função da exigência em metionina, a suplementação de fontes industriais na dieta de aves é importante para se alcançar desempenho adequado. As duas principais fontes comerciais disponíveis no mercado utilizadas são a DL-metionina,

(ácido DL - 2 - amino-4 (metiltio) butanóico e a metionina hidroxil análogo, conhecida como MHA-FA, (ácido DL - 2 - hidroxil-4 (metilo) butanóico. A diferença entre estas duas moléculas é que o MHA-FA apresenta um grupamento hidroxila (OH) no lugar do grupamento amina (NH₂), localizado no carbono alfa (Marchizeli, 2009).

As duas fontes apresentam propriedades químicas e físicas bastantes diferentes. O MHA-FA, em termos bioquímicos, não é um aminoácido, portanto, depois de ingerido deve ser convertido em L-metionina por transaminação, para poder ser utilizado pelo organismo. O MHA-FA é uma fonte líquida, contendo 12% de água e impurezas, composta por uma mistura de monômeros (65%), dímeros e oligômeros (23%) de metionina, enquanto que a DL-metionina é uma substância em pó, composta apenas por monômeros de metionina (99%). O pH das duas fontes também é diferente: o MHA-FA apresenta pH ácido, enquanto a DL-metionina, pH por volta de 6,0 (Lemme et al., 2007).

Estas duas substâncias são compostas por uma mistura racêmica entre isômeros D (dextrógiro) e L (levógiro) (Jansman et al., 2003). Entretanto, as proteínas de origem animal não possuem aminoácidos na forma de D isômeros (Nelson & Cox, 2008), desta maneira, estes, para serem utilizados pelo organismo animal, devem ser convertidos na forma L.

A conversão de D-metionina para L-metionina envolve segundo Baker (1994), uma reação com duas etapas, ocorrendo primeiramente a oxidação do carbono alfa resultando em um ceto-análogo, e, posteriormente, a transaminação do ceto-metionina em L-metionina. A conversão da D-metionina para Ceto-metionina, primeira etapa da reação, necessita de uma enzima catalítica específica, a D- aminoácido oxidase (D-A OX) (Moura et al., 2010).

A conversão do MHA-FA à L-metionina também segue essas duas etapas, produção de ceto-metionina e transaminação (Martín-Venegas et al., 2006). Essas reações ocorrem rapidamente em vários tecidos e órgãos, incluindo fígado e rim. Após essa conversão em metionina, o MHA-FA terá a mesma disponibilidade para atuar como doador de grupos metil ou de enxofre como qualquer outra fonte de L-metionina (Dibner, 2003). A conversão do MHA-FA, na forma de D e L isômeros, à ceto-metionina ocorre com intermediários de enzimas diferentes, entretanto as reações se dão simultaneamente, a enzima específica para L-MHA é a L-2-hidroxiácido oxidase (L-HAOX), e para a D-MHA, D-2- hidroxil ácido desidrogenase (D-HAD) (Moura et al., 2010).

Como a composição química destas fontes é diferente, o processo de absorção das mesmas ocorre de forma distinta no trato digestivo animal, sendo a DL-metionina absorvida por transporte ativo, dependente de energia e também por intermédio de carreadores, enquanto o MHA-FA é absorvido por difusão, dependente de concentração (Dibner, 2003). A maior parte de MHA-FA é absorvida na parte superior do trato digestivo, onde há pH mais baixo (Moura et al., 2010).

Muitos trabalhos vêm sendo realizados para determinar a bioeficácia do MHA-FA em relação à DL-metionina (Jansman et al., 2003). De acordo com Lemme et al. (2007), a bioeficácia é um valor relativo que compara a potência nutricional ou a eficiência de um dado nutriente com um padrão definido. As melhores maneiras de conhecer a eficiência de determinado nutriente na alimentação animal são os ensaios de dose-resposta utilizando modelos exponenciais. Assim, para determinar o valor de bioeficácia de um produto em relação a outro, são feitas comparações entre as duas curvas de dose-resposta (Lemme et al., 2007). Com o objetivo de comprovar a eficiência deste modelo matemático para determinação de bioeficácia, e também para comparar a eficiência do MHA-FA em relação à DL-metionina, um estudo foi desenvolvido por Hoehler et al. (2005). Nesta pesquisa, foram realizados cinco experimentos sob condições locais de quatro países. Os resultados aceitam o método matemático como adequado para as análises e sugerem uma eficácia relativa do MHA-FA em relação à DL-metionina de 64%, sendo este o valor médio dos resultados encontrados em todos os experimentos, com relação a ganho de peso, eficiência alimentar e rendimento de peito.

Quando comparadas 100 partes de MHA-FA com 65 partes de DL-metionina sobre o desempenho de frangos de corte, observou-se que não houve diferença significativa nos dados de desempenho, confirmando que 65 partes de DL-metionina podem substituir sem prejuízo, 100 partes de MHA (Payne et al., 2006). Outros estudos que foram realizados com objetivo de comparar essas duas fontes de suplementação de metionina obtiveram resultados semelhantes, bioeficácia de 65% do MHA-FA em relação à DL-metionina (Viana et al., 2009; Bunchasak et al., 2006; Lemme et al., 2002).

De acordo com Lemme et al. (2007), essas são algumas das razões para essas diferenças entre as eficiências das duas fontes:

- os produtos são quimicamente diferentes, a DL-metionina é composta por 99% de metionina, já o MHA-FA apresenta 12% de água e impurezas.
- 23% das moléculas de MHA-FA estão sob forma de dímeros e oligômeros, que segundo Van Weerden et al. (1992), apresentam valor nutricional reduzido.

- A DL-metionina é absorvida de forma mais rápida e eficiente que os monômeros de MHA-FA, isso pode ser observado em estudos com radioisótopos (^{14}C), onde a recuperação de (^{14}C) foi maior naqueles animais alimentados com MHA-FA. Esse estudo mostrou ainda que a incorporação de (^{14}C) nos músculos do peito e coxa dos frangos foi maior para aves alimentadas com DL-metionina (Lingens & Molnar, 1996).

- O MHA-FA é parcialmente degradado por microorganismos intestinais. Isto foi comprovado por Drew et al. (2003) que, utilizando dietas marcadas, verificaram que além de pior absorção houve também a degradação do MHA-FA pelos microorganismos do trato digestivo.

1.2 Genética

1.2.1 Genes mitocondriais

O melhoramento genético proporcionou grande melhora no desempenho das aves nas últimas décadas (Harvenstein et al., 2003). Estudos recentes têm mostrado que animais mais eficientes em converter alimentos em peso corporal podem apresentar alterações na expressão de genes da cadeia transportadora de elétrons, o que pode influenciar a utilização de nutrientes e alterar o gasto energético corporal. Estas pesquisas sugerem que animais com maior consumo de ração residual, possuem falha no transporte de elétrons/prótons, reduzindo a eficiência de produção de ATP pelas mitocôndrias, o que influencia negativamente a conversão alimentar (Bottje & Carstens, 2009; Krueger et al., 2008).

Todas as células necessitam de energia para realizar suas atividades. As mitocôndrias são as organelas responsáveis por transformar a energia química dos metabolitos em energia facilmente acessível à célula (Schauss et al., 2010). Essa energia é acumulada em compostos lábeis, dos quais o principal é o ATP. De acordo com Bottje et al. (2006), as mitocôndrias são responsáveis pela produção de 90% de toda a energia requerida pelas células.

O sistema transportador de elétrons é uma cadeia formada por enzimas e compostos não enzimáticos, cuja função é transportar elétrons ricos em energia. Essa energia é fornecida para os complexos da cadeia, onde ocorrerá a produção de ATP (Junqueira & Carneiro, 2000). As enzimas mitocondriais envolvidas na fosforilação oxidativa estão posicionadas na membrana interna da organela, e dispostas em cinco

complexos multiproteicos: NADH:ubiquinona oxidoredutase (complexo I); succinato:ubiquinona oxidoredutase (complexo II); ubiquinol:citocromo c redutase (complexo III); citocromo c oxidase (complexo IV); e ATP sintase (complexo V) (Nelson & Cox, 2008).

A energia livre gerada pelo transporte de elétrons, ao passar pela cadeia respiratória até chegar a seu aceptor final, O_2 , é usada para produzir ATP a partir de $ADP+P_i$. O movimento dos elétrons através dos complexos da membrana mitocondrial interna está acoplado a um transporte ativo de prótons, da matriz para o espaço intermembranoso, onde se acumulam. A diferença de concentração de prótons gera um gradiente de pH e um potencial elétrico, que cria uma força próton-motriz. O ATP é sintetizado com a energia produzida pelo movimento retrógrado dos prótons através da ATPsintase (Jeremy et al., 2008). O ponto de entrada para os elétrons cedidos pelo NADH é a NADH desidrogenase, já os elétrons cedidos pelo $FADH_2$ ingressam na cadeia através da ubiquinona (De Robertis & Hib, 2001).

Durante a síntese de ATP, cerca de 2 a 4% do total de O_2 utilizado como aceptor de elétrons pelas mitocôndrias, não é totalmente reduzido a água (Bottje et al., 2006), no entanto, os mesmos formam compostos químicos que ainda são oxidantes potentes, conhecidos como espécies reativas de oxigênio (ROS).

As proteínas mitocondriais, UCP (proteína desacopladora), ANT (transportador de nucleotídeos de adenina) e COXIII (citocromo c oxidase subunidade III), têm-se tornado tema de pesquisas recentes, devido às suas importâncias na produção de ATP (Bottje et al., 2009; Ojano-Dirain et al., 2007).

As proteínas desacopladoras (UCPs) são transportadores presentes na membrana interna da mitocôndria capazes de desviar a energia de síntese de ATP, para a produção de calor catalisado por um vazamento de prótons através do interior da membrana (Ledesma et al., 2002). De acordo com Vidal-Puig (2000), o que a UCP faz é fornecer uma rota nova para os prótons, diferente da ATP sintase. A UCP aviária tem sido descrita como um agente que possibilita a redução da produção de ROS, por causar um leve desacoplamento na produção de ATP (Abe et al., 2006). Embora a UCP tenha o efeito benéfico de evitar danos ao DNA e as proteínas celulares, uma vez que reduzem a produção de radicais livres, observa-se que maior expressão do mRNA UCP pode piorar a conversão alimentar, já que pode reduzir a produção de ATP (Ojano-Dirain, et al., 2007). Com a diminuição da síntese de ATP, pode ocorrer aumento do catabolismo dos nutrientes como forma de manter a produção de energia. A expressão de UCP também é

influenciada pelo estresse térmico, e aves expostas a altas temperaturas apresentaram menor expressão de mRNA UCP (Mujahid et al., 2006), e pelo estado nutricional, a expressão de UCP é aumentada no músculo esquelético de aves em jejum (Evock-Clover et al., 2002).

Outra proteína envolvida no processo de síntese energética é o ANT (transportador de nucleotídeos de adenina), responsável pelo deslocamento do ADP do citosol para a mitocôndria e pelo deslocamento do ATP através da membrana interna mitocondrial (Ojano-Dirain et al., 2007). Portanto, o ANT possui a função de aumentar a quantidade de ADP para ser transformado em ATP por ação da ATP sintase. A função mitocondrial pode ser prejudicada pela incapacidade de troca do ADP/ATP entre citosol e membrana, assim, pode ser que haja alguma ligação entre a expressão do ANT com a expressão do fenótipo da eficiência alimentar (Bottje et al., 2006). Ojano-Dirain et al. (2007) relataram que aves com menor expressão de ANT tiveram pior conversão alimentar em função da menor eficiência em produzir ATP. Nicoletti et al. (2005) verificaram redução na expressão do ANT com o aumento da idade. Segundo esses autores, alterações na expressão de subunidades da cadeia respiratória podem representar uma resposta adaptativa celular ao acúmulo de danos às proteínas e / ou DNA mitocondrial que ocorre devido ao aumento na quantidade de ROS. Assim como a UCP, o ANT também pode estar relacionado ao desacoplamento na cadeia respiratória, já que de acordo com Walter & Seebacher (2009), o ANT é a maior proteína desacopladora em aves. A expressão do gene ANT sofre influência da temperatura, havendo maior expressão em aves expostas a clima frio, sugerindo papel no desacoplamento para produção de calor (Toyomizu et al., 2002), e do estado nutricional, no qual observa-se uma maior expressão em aves submetidas a jejum (Toyomizu et al., 2006).

O COX III também está presente na cadeia transportadora de elétrons e está relacionado com a eficiência da fosforilação oxidativa. A citocromo c oxidase, subunidade III (COX III), é uma subunidade do complexo protéico IV da mitocôndria, responsável pelo bombeamento de prótons e pelo transporte de elétrons. O COX III possui grande relevância na eficiência energética mitocondrial (Scheffler, 1999) e menor expressão deste gene pode ocorrer devido à menor eficiência celular ou maior dano oxidativo devido à produção de substâncias reativas ao oxigênio (Kemp et al., 2003). Ojano-Dirain et al. (2007) sugerem que maior produção de ROS e maior oxidação protéica são observadas consistentemente em aves com baixa eficiência

alimentar, sugerindo que este fator pode alterar a expressão de genes mitocondriais. Estes autores também sugerem que os níveis de expressão dos genes mitocondriais, como o COXIII, podem variar de acordo com os níveis de danos causados pelo estresse oxidativo. Esta hipótese é corroborada pelos resultados de Barazzoni et al. (2000), que verificaram redução na expressão de mRNA COX III relacionada com alteração na capacidade oxidativa da mitocôndria em animais mais velhos, e por Li et al. (2002), que verificaram que não só a expressão desse gene, mas também sua atividade é afetada pela quantidade de ROS presente no tecido.

A coordenação entre os complexos da cadeia respiratória é necessária para que a produção de energia seja eficiente, e assim, para que os animais tenham maior eficiência alimentar. Qualquer desequilíbrio pode provocar vazamento de elétrons e geração de ROS.

1.2.2 Genes do crescimento

O crescimento das aves é dado pela ação do eixo somatotrófico, com ação principal do hormônio do crescimento (GH). A ação do GH sobre o crescimento pode ocorrer de forma direta, entretanto, seus efeitos são dados principalmente pela ação do IGF-I (fator de crescimento semelhante a insulina I). A presença de GH no organismo induz a síntese e a liberação deste hormônio (Becker et al., 2001).

O GH é produzido pelas células somatotróficas da hipófise, sua síntese é estimulada pela ligação entre o hormônio liberador de GH (GHRH), sintetizado pelo hipotálamo, e seu receptor (GHRHR) (Martinelli Júnior et al., 2002). A ação do GH sobre o IGF-I é mediada pelo receptor de GH (GHR), já que deve haver a ligação GH-GHR para estimular a síntese e liberação do IGF-I. O GHR é uma proteína transmembrana de 620 aminoácidos, seu domínio extracelular é responsável pela ligação do GH, e o domínio intracelular está envolvido na sinalização do GH. Esta proteína é codificada por um gene localizado no braço curto do cromossomo 5, composto por dez éxons e nove íntrons, sendo o fígado o local de maior expressão de mRNA GHR (Leung et al., 1987).

Para estimular a síntese de IGF-I, o GH provoca a dimerização do seu receptor, se ligando a ele (Brown et al., 2005). Essa mudança conformacional é responsável pela ligação da proteína JAK2 (Janus Kinase 2) ao complexo, formado anteriormente pelo

GH e GHR, e assim, pelo início da sinalização intracelular, que modula as ações do GH. Com a ligação da JAK2, diversas rotas biológicas podem ser induzidas (Burfoot et al., 1997). Uma das vias ativadas com a formação do complexo GH-GHR-JAK2 é a rota que envolve os fatores de transcrição chamados de STATs (**Transdutores do sinal e ativadores da transcrição**). Neste processo, as STATs são fosforiladas, o que faz com que estas formem complexos com outras proteínas e se movam para o núcleo, agindo na indução da síntese de mRNA IGF-I (Kofoed et al., 2003). O complexo pode ativar também as proteínas quinases MAPK (Proteína quinase ativadora de mitose), por intermédio do recrutamento da molécula adaptadora Grb2 (Proteína 2 ligada ao receptor de fator de crescimento). As MAPKs fosforilam moléculas responsáveis pela transcrição no núcleo, agindo na síntese protéica (Guyoti, 2009). A última rota bioquímica que pode ser ativada envolve as proteínas IRS-I (receptor de insulina substrato I), as quais quando fosforiladas servem como locais de ligação para uma variedade de moléculas sinalizantes, como PI3K (Fosfaditilinositol-3 cinase), envolvidas no metabolismo e crescimento (Carter-Su et al., 1996) (Figura 2).

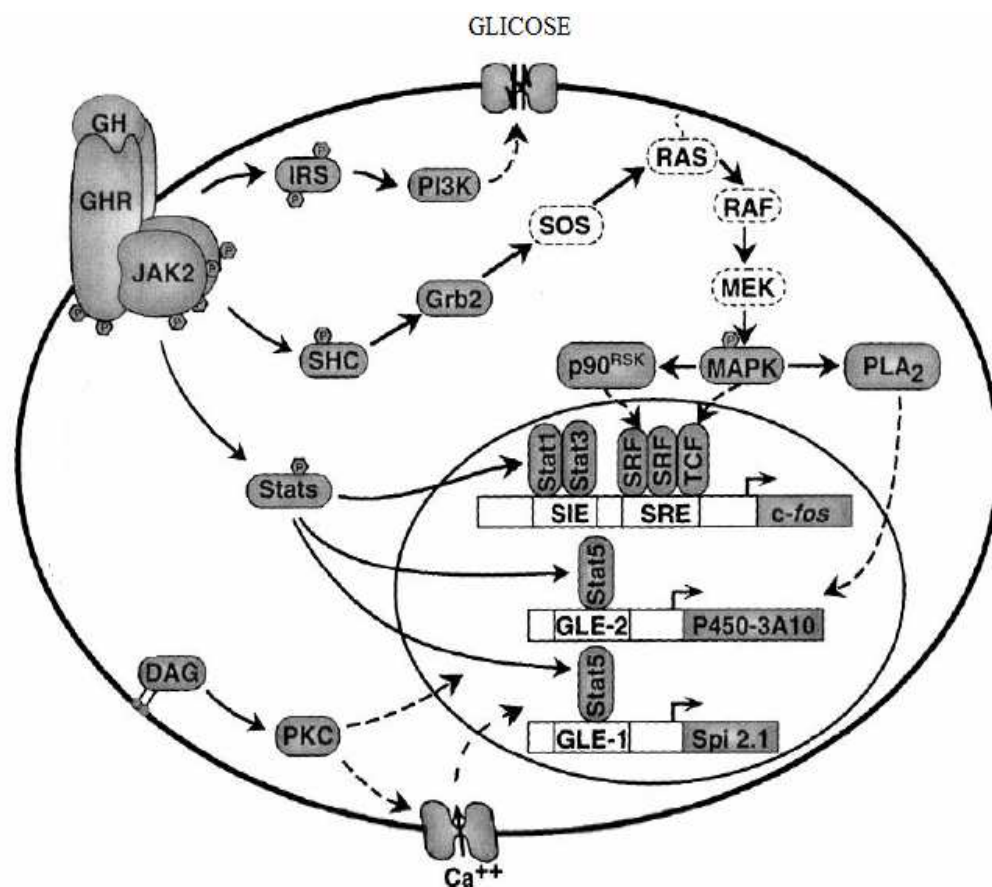


Figura 2- Possíveis rotas de sinalização para o GHR. (Fonte: Adaptado de Carter-Su et al., 1996).

Kuhn et al. (2002), afirmam que níveis sanguíneos de GH estão correlacionados inversamente com a expressão de GHR. Kim (2010) sugere que o GH inibe a expressão de GHR diretamente ou por intermédio da liberação de IGF-I, e estimula a formação do complexo GH-GRH pelas células.

O IGF-I é uma proteína de estrutura semelhante a insulina. É sintetizado principalmente no fígado, entretanto, sua produção ocorre também em outros tecidos, sendo fundamental para o crescimento adequado do animal. Como não há um local de armazenamento deste hormônio, a maioria do IGF-I está na circulação ligado a um complexo formado por uma proteína ligadora de IGF-I (IGFBP-3 ou IGFBP-5) e por uma subunidade protéica ácido-lábil (ALS). A ligação desta proteína ao complexo estende a meia vida do IGF-I por cerca de 15 horas (Kim, 2010).

Segundo Scanes (2009), o IGF-I possui um importante papel na taxa de crescimento corporal de aves, e quanto menor o nível de IGF-I encontrado, pior será o crescimento corporal. Tem-se observado maior síntese e menor degradação protéica em aves com maior nível de IGF-I plasmático, o que resulta em maior deposição de músculo esquelético (Colon & Kita, 2002). Alguns autores têm mostrado relação entre administração de aminoácidos, como a metionina, e a secreção de GH (Groschl et al., 2003; Collier et al., 2005), e ainda, o desempenho mediado pela ação do IGF-I também pode ser influenciado pela suplementação da metionina. Estudos mostram que aves recebendo dieta deficiente em metionina apresentam menor crescimento (Carew et al., 2003). Apesar de ainda não estar bem esclarecido como mudanças na suplementação de aminoácidos, pode iniciar mudanças na expressão de genes, como GH e IGF-I, por exemplo, sugere-se que a atividade da mTOR (alvo da rapamicina de mamíferos), enzima envolvida na regulação da síntese protéica, possa mediar tal efeito (Stubbs et al., 2002). Há evidências de que o metabolismo de síntese e degradação protéica possa ocorrer pela ação da mesma rota bioquímica. Alguns genes envolvidos com a atividade de degradação protéica no complexo ubiquitina-proteossoma são o Murf-1 (*muscle RING finger 1*) e a atrogina-1. Denominados de atrogenes, sua super expressão tem sido ligada à atrofia muscular (Sacheck et al., 2004). Tesseraud et al. (2007) demonstraram que a expressão da atrogina-1 no músculo esquelético de codornas pode ser reduzida não apenas por fatores de crescimento, mas também pela disponibilidade de metionina, via mecanismos que envolvem a proteína TOR (alvo da rapamicina).

A disponibilidade de aminoácidos pode também interferir especificamente no crescimento, já que estudos mostram que a deprivação destes nutrientes favorece a super expressão das IGFbps, o que acarreta em retardo no desenvolvimento (Fafournoux et al., 2000).

1.3 Nutrigenômica

As pesquisas em nutrigenômica estudam como os nutrientes da dieta interagem com o genoma (Rodríguez et al., 2007), e como as mudanças produzidas por essa interação afetam as características de interesse na produção animal. Nesta área de conhecimento, as ferramentas da genômica, como a expressão gênica, são aplicadas nas pesquisas em nutrição, e isso permite maior compreensão de como os nutrientes disponibilizados pela dieta influenciam em vias metabólicas e no controle homeostático do organismo (Muller & Kersten, 2003).

Muitos são os estudos sobre o efeito da nutrição ou de nutrientes específicos sobre o genoma das aves. Em um destes estudos, com o objetivo de investigar o efeito de fatores externos sobre a expressão do gene PPAR γ (*Peroxisome proliferator-activated receptor- γ*), um fator de transcrição relacionado ao metabolismo da glicose e de lipídeos em mamíferos, no tecido adiposo de aves, Sato et al. (2004), realizaram uma pesquisa que teve como resultado a expressão diferenciada deste gene para aves que receberam dietas distintas. A expressão do PPAR γ foi maior nos animais que receberam dieta contendo óleo de cártamo ou óleo de linhaça, em relação aos animais que foram alimentados com óleo de oliva.

Takahashi et al. (2008) realizaram um experimento para verificar o efeito da suplementação de glicina na dieta sobre a expressão de genes relacionados a respostas inflamatórias no baço e fígado de frangos de corte. A expressão de tais genes no baço das aves alimentadas com suplementação de glicina foi menor em relação a aves alimentadas com dieta basal. De acordo com os autores, isso sugere que a glicina pode modular em partes as respostas inflamatórias, através das mudanças na expressão gênica.

Também já foi pesquisada a suplementação de magnésio em dietas para frangos de corte com intuito de avaliar a expressão gênica. Liu et al. (2007) verificaram que ocorre correlação positiva entre a atividade da enzima catalase e a expressão de mRNA

catalase no fígado das aves. Assim, a suplementação proporciona maiores concentrações de magnésio hepático, aumento na expressão de mRNA catalase e conseqüentemente, maior atividade da enzima.

O ácido linoleico conjugado (CLA) é conhecido por seus efeitos benéficos na saúde humana. Deste modo, um estudo (Kim et al., 2009) foi realizado para verificar qual o efeito da suplementação de CLA na dieta de frangos de corte sobre a expressão de genes envolvido no metabolismo de lipídeos, bem como sua deposição no músculo das aves. Os autores verificaram que a suplementação induziu a lipogênese no fígado, aumentou significativamente a expressão de mRNA FAS (*fatty acid syntase*) e mRNA ACC (*acetyl coenzyme A carboxylase*), e também foi um eficiente promotor de acúmulo de CLA no músculo dos frangos de corte.

A enzima málica está envolvida com a síntese de ácidos graxos, com a quantidade de gordura abdominal e corporal em aves. Já, a histidase é a enzima catabólica primária no metabolismo da histidina. Essas duas enzimas apresentam comportamento contrário em função da ingestão de proteína: ocorre o aumento da expressão de mRNA da histidase e redução na expressão da enzima málica (Chendrimada et al., 2007). Os resultados das pesquisas realizadas por estes autores sugerem que a expressão de málica é regulada pela ingestão de N total da dieta, enquanto, a expressão hepática da histidase pode ser regulada por um aminoácido específico.

Como pode ser visto, ocorre a influência de muitos nutrientes, carboidratos, proteína, ácidos graxos, minerais e vitaminas, sobre a expressão de genes de grande importâncias para o desempenho animal, levando a diferenças no metabolismo, crescimento e diferenciação celular. Para que estas pesquisas possam avançar, é essencial a aplicação de tecnologias eficientes, que possam medir efeitos fisiológicos de determinados nutrientes ou de um regime alimentar.

1.3.1 Expressão gênica - qRT-PCR

Na produção animal, características de interesse, como eficiência alimentar e reprodutiva, são expressas em função da genética do animal, do ambiente a que este é exposto, e também em função da interação entre estes dois fatores.

Os animais devem adaptar seus metabolismos a condições fisiológicas e ambientais que estão em constante mudanças, e requerem respostas metabólicas

coordenadas pela expressão de genes específicos na presença ou ausência de nutrientes apropriados (Averous et al., 2003). O estudo da influência de determinados nutrientes na dieta de aves sobre a expressão de genes pode auxiliar a explicar diferenças obtidas no desempenho, em função das modificações ocorridas devido a mudanças fisiológicas

A técnica de transcrição reversa seguida pela PCR em tempo real (qRT-PCR) é um dos métodos que pode ser utilizado para análise da expressão gênica. Esta técnica, considerada altamente sensível, permite que até mesmo pequenas diferenças na expressão de determinado gene seja observada (Pfaffl, 2001). Outras características positivas da qRT-PCR são resultados de quantificação rápidos e alta acurácia (Ferraz, 2009).

A quantificação do material genético pela PCR em tempo real utiliza reagentes fluorescentes que possibilitam a detecção da formação do produto da PCR. Esses reagentes podem ser de dois tipos: uma sonda específica que reconhece sequências do genoma; ou um corante fluorescente que apresenta alta afinidade ao DNA dupla-fita, ligando-se a qualquer sequência amplificada. Essa ligação reagente-*amplicon* faz com que aumente a fluorescência e permite detectar o produto da PCR conforme este se acumula durante os ciclos da reação (Hunt, 2012).

Os resultados da quantificação da qRT-PCR podem ser dados na forma relativa ou absoluta. A quantificação relativa é baseada na expressão de um gene alvo em relação a um gene referência. Este é utilizado para minimizar o erro da PCR em tempo real. A normalização destes genes, denominados de genes *housekeeping*, controlam a entrada das quantidades de RNA na transcrição reversa, já que são genes constitutivos e não variam sob condições experimentais. Os mais comumente utilizados incluem a β -actina, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e 18S do RNA ribossomal (Huggett, 2005). Já o método de quantificação absoluta é baseado em uma curva padrão, através da qual é determinado o número de cópias do transcrito de interesse (Livak & Schmittgen, 2001).

Um dos motivos pelo qual a qRT-PCR é considerada uma técnica eficiente na quantificação dos ácidos nucléicos, é que os resultados obtidos são gerados durante a fase exponencial da reação de PCR. É chamado de Ciclo *Threshold* (Ct) o ponto em que a reação atinge o limiar da fase exponencial (Novais & Pires-Alves, 2004). O sinal dos compostos fluorescentes aumenta juntamente com a quantidade dos *amplicons*, assim, a amostra que apresentar maior quantidade de cópias de transcritos alcançará primeiramente o limiar de detecção (Bustin et al., 2005).

A fluorescência emitida pelo corante SYBR Green I indica a amplificação de cDNA total, para determinar se está ocorrendo a amplificação da região de interesse é utilizado a curva de *melting*. No ponto de *melting*, as duplas fitas são separadas e a fluorescência diminui rapidamente, o software plota a taxa de mudança da fluorescência relativa com o tempo no eixo Y e a temperatura no eixo X, esta curva atingirá o pico na temperatura de *melting* (T_m). Todos os produtos da PCR para um determinado *primer* devem apresentar a mesma T_m , e, se isso não estiver ocorrendo, pode ser sinal de formação de dímeros de *primers*, de amplificação de região não específica, ou algum outro problema. A temperatura de *melting* de uma determinada dupla hélice depende da sua composição de bases e também de seu tamanho (Hunt, 2012).

1.3.2 Influência da metionina na expressão gênica

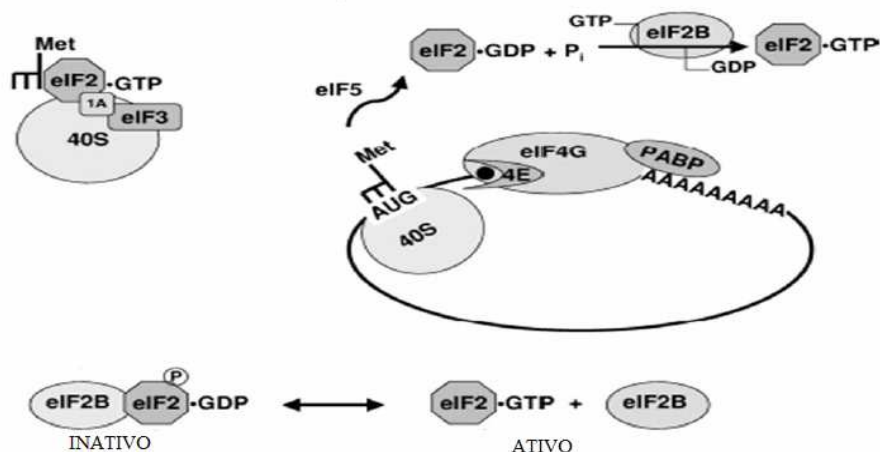
De acordo com Kimball & Jefferson (2004), os aminoácidos desempenham papel chave na regulação de alguns processos celulares, como a regulação da expressão gênica através da modulação do mRNA. Ainda de acordo com estes autores, as células são capazes de reconhecer a disponibilidade de aminoácidos e gerar alterações nas rotas de sinal de tradução, que são também reguladas por hormônios e fatores de crescimento.

Os aminoácidos são conhecidos por estimular a síntese de proteína e também por inibir sua proteólise em muitos tecidos. Apesar desse efeito geral, certos fatores de tradução e proteínas são afetados diretamente pela disponibilidade de aminoácidos (Fafournoux et al., 2000). A primeira etapa da tradução, síntese protéica, é a formação do complexo de iniciação. Para que isso ocorra, um fator de tradução chamado de eIF2 (fator de iniciação eucariótico 2) deve estar ligado a um GTP. Os próximos passos são a ligação de um tRNA associado a uma metionina e do complexo eIF2-GTP à subunidade 40S do ribossomo. No fim deste processo, o GTP é hidrolisado e o eIF2 liberado na forma inativa (Brown, 1999).

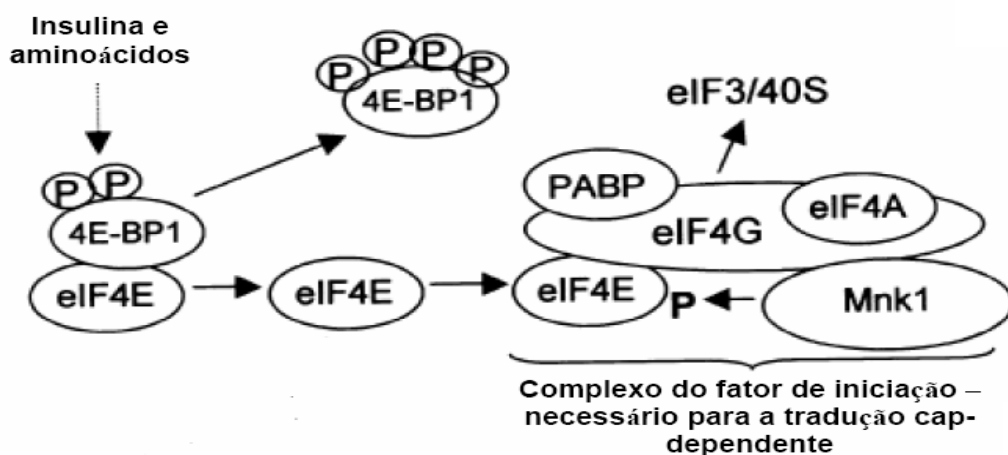
O eIF2 pode estar novamente em sua forma ativa (eIF2-GTP), desde que seja reciclado pelo eIF2B (fator de troca de guanina nucleotídeo para o eIF2). A atividade do eIF2B pode ser regulada pela fosforilação da subunidade α alfa do eIF-2 e também pela fosforilação da subunidade ϵ do eIF2B (Fafournoux et al., 2000) (Figura 3). A fosforilação da eIF2 α converte o eIF2 de um substrato a um competidor do eIF2B e reprime a tradução da maioria dos mRNAs. Esta fosforilação ocorre em resposta à

disponibilidade alterada de aminoácidos e é mediada por uma proteína quinase GCN2 (*general control nonderepressible 2*). A fosforilação da eIF2Bε também é afetada pela disponibilidade de aminoácidos (Kimball & Jefferson, 2004).

A segunda etapa do início da tradução é a ligação do mRNA ao complexo formado. Este passo é mediado por fatores de iniciação eucarióticos comumente chamados de eIF4, são eles: eIF4A, eIF4E e a eIF4G. A proteína eIF4E se liga à estrutura Cap do mRNA e através disso ocorre a ligação da eIF4G e eIF4A e do complexo de iniciação formado. A fosforilação da eIF4E faz com que aumente a afinidade pela Cap do mRNA. Já a ligação desta com uma proteína de ligação do fator de iniciação eucariótico, a 4E-BP, faz com que não ocorra a ligação eIF4E-eIF4G-Cap (Figura 3). Quando ocorre deprivação de aminoácidos, ocorre a desfosforilação da 4E-BP, o que leva ao sequestro da eIF4E, impedindo, assim, a tradução (Fafournoux et al., 2000).



(A)



(B)

Figura 3 - Principais etapas do início da tradução. (A) Formação do complexo de pré-iniciação 43S, liberação e reciclagem do eIF2-GDP e regulação da reciclagem do eIF2-GDP pela fosforilação do eIF2. (B) Ligação do mRNA ao complexo de iniciação, estrutura esquemática e regulação do eIF4E e 4E-BP1. A fosforilação da 4E-BP1, libera a eIF4E para formar o complexo eIF4F. (Fonte: Adaptado de Machado, 2010).

A disponibilidade de aminoácidos também influencia em uma proteína ribossomal S6. A falta de aminoácidos leva a uma perda de atividade da proteína p70 S6 quinase (P70^{S6K}), responsável pela fosforilação da S6. Desta forma, a síntese de proteínas fica comprometida (Kimball et al., 1999). De acordo com os autores, o aumento na fosforilação da S6 foi associada também com um aumento na síntese de um fator de alongação chamado eEF1A.

1.4. Coturnicultura

As codornas são animais pertencentes à ordem das Galináceas, família das Faisámidas, gênero Coturnix, possuem altos índices de produtividade, rápido crescimento, pequeno porte, facilmente manipuláveis, ciclo reprodutivo curto, com postura regular. Todas essas vantagens fazem da codorna um animal muito utilizado, não apenas para a produção de carne e ovos, mas também como modelo experimental para as aves domésticas em pesquisas laboratoriais (Oliveira, 2002).

1.4.1 Estresse térmico

As aves são animais endotérmicos, capazes de produzir calor internamente, e dependem de conforto térmico para expressar o máximo desempenho permitido por seus potenciais genéticos (Miragliotta, 2005). Na zona de conforto térmico, denominada de zona termoneutra, toda a energia produzida pelo organismo é direcionada para fins produtivos, ou seja, não há gasto de energia para termorregulação (Macari et al., 2004).

Para se termorregular, as aves primeiramente dispõem de mecanismos ambientais e posturais, entretanto, quando estes não são eficientes, entram em ação respostas fisiológicas, coordenados pelo hipotálamo. O sistema termorregulatório baseia-se em 4 unidades funcionais: os receptores, neurônios sensíveis ao frio e calor; o centro controlador, hipotálamo; os efetores, neurônios responsivos ao frio e calor; e o sistema

passivo, responsável por executar a resposta determinada pelo hipotálamo (Furlan & Macari, 2002).

Esses mecanismos de termorregulação, entretanto, são eficientes somente quando a temperatura ambiente está dentro de certos limites, chamado de zona de tolerância. O ponto no qual a temperatura ambiental está abaixo desta zona é chamado temperatura crítica inferior, e o ponto no qual a temperatura ambiental está acima, chamado de temperatura crítica superior (Abreu & Abreu, 2012).

Quando as aves estão sofrendo por estresse térmico, ocorre a tentativa de diminuir a produção de calor metabólico, e aumentar a dissipação de calor. De acordo com Macari et al. (2004), os principais métodos de dissipação de calor, são a vasodilatação e o aumento da evaporação através do aumento na frequência respiratória. Frequência respiratória aumentada pode ocasionar alcalose respiratória, e assim, desequilíbrio eletrolítico relacionado com redução na ingestão de alimentos, e portanto, pior desempenho (Silva, 2004).

Oliveira et al. (2006) observaram que altas temperaturas durante a produção de frangos de corte, influenciaram negativamente o consumo de ração e o ganho de peso, e também o rendimento de cortes nobres (coxa, sobrecoxa e peito). Esses autores observaram ainda, que esses efeitos negativos são acentuados pelo aumento da umidade relativa do ar.

Como o relatado pelos referidos autores, o estresse calórico depende não somente da temperatura, mas também da umidade relativa do ar, da idade, do tamanho e da fase produtiva das aves, e portanto, as respostas fisiológicas ao estresse também dependerão destes fatores (Abreu & Abreu, 2012).

Estresse agudo (Lin et al., 2006) ou crônico (Yang et al., 2010) por calor, também tem sido relacionado a alterações metabólicas envolvendo o estresse oxidativo, de acordo com os autores, maior produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e menor atividade da cadeia respiratória mitocondrial podem ser respostas ao estresse induzido por altas temperaturas. Anteriormente, Mager & Kruijff (1995) já haviam observado que células expostas a altas temperaturas apresentavam menor atividade de enzimas envolvidas na desintoxicação por oxigênio e menor manutenção dos níveis de glutathiona.

Salo et al. (1991), observaram que os níveis de mRNA da proteína HSP70 foram semelhantemente induzidos pelo estresse por calor ou pelo estresse oxidativo provocado pelo exercício. Essa similaridade no padrão de expressão gênica pode indicar relação

entre os dois fatores. Os autores sugerem ainda, que a hipertermia pode causar estresse oxidativo, já que com altas temperaturas houve maior produção de ROS.

1.4.2 Espécies reativas de oxigênio

Radical livre, é o termo utilizado para definir qualquer espécie química que tenha um, ou mais, elétrons desemparelhados. O elétron não pareado de um radical livre é representado como um ponto em negrito (\cdot), e estes radicais livres, quando relacionados ao oxigênio, são chamados de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Gutteridge & Mitchell, 1999). Durante o processo de obtenção de energia, cerca de 2 a 4% do total de O_2 utilizado como aceptor de elétrons pelas mitocôndrias, não é totalmente reduzido a água (Bottje et al., 2006), no entanto os mesmos formam compostos químicos intermediários neste processo, que ainda são oxidantes potentes, as espécies reativas de oxigênio (ROS). Essas substâncias são capazes de oxidar macromoléculas biológicas como proteínas e lipídeos. Trabalhos que estudam a oxidação de proteínas por O_2 mostram que este pode oxidar seletivamente resíduos de aminoácidos ou agregados protéicos podendo levar à destruição dos mesmos. Os peróxidos protéicos podem reagir com outras biomoléculas, como DNA, gerando um dano adicional (Ronsein et al., 2006). O nome ROS é dado ao conjunto de produtos intermediários formado pelas espécies reativas: radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\cdot OH$) (Vieira, 2008).

O superóxido é produzido em diversos processos biológicos, entre eles, como dito anteriormente, na cadeia transportadora de elétrons das mitocôndrias. A síntese de $O_2^{\cdot-}$ ocorre quando um elétron é adicionado a uma molécula de oxigênio, e a partir desta espécie reativa, as demais são sintetizadas. O peróxido de hidrogênio é sintetizado através de uma reação de dismutação catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) (Gutteridge & Mitchell, 1999). Este, por sua vez, em reações com metais reativos, como íons de ferro, pode participar na síntese de $\cdot OH$ (Fenton, 1894 citado por Gutteridge & Mitchell, 1999). O peróxido de hidrogênio também pode ser convertido em água, pela ação das enzimas catalase e glutatona peroxidase (Droge, 2002).

As espécies reativas de oxigênio são produzidas normalmente nos processos biológicos celulares. Entretanto, quando em maiores quantidades, são frequentemente

associadas a distúrbios, como apoptose (Moustafa et al., 2004), oxidação de proteínas (Ronsein et al., 2006), peroxidação de lipídeos (Maia & Bicudo, 2009), danos ao DNA mitocondrial (Lee & Wei, 2005), e a diversas doenças (Silva et al., 2011; Reis et al., 2008; Barbosa et al., 2006).

A produção aumentada de ROS tem sido relacionada ao avanço da idade, um ciclo vicioso parece estar envolvido nesse processo onde, escapes de elétrons, devido a distúrbios na cadeia respiratória, aumentam a produção de radicais livres, que provocam mais lesão no mtDNA, ocasionando produção de ROS adicional (Tengan et al., 1998); e à eficiência alimentar de aves, trabalhos recentes mostram que animais com menor produção de energia em função de menor eficiência das mitocôndrias em produzir ATP, apresentam pior conversão alimentar (Bottje et al., 2009; Parker et al., 2008). A disfunção mitocondrial pode ocorrer devido ao acúmulo no conteúdo de ROS, danos no mtDNA, bem como pela ação conjunta desses.

Outro tema de pesquisas recentes é a influência do estresse por calor na produção de ROS. Autores verificaram que aves expostas a altas temperaturas podem apresentar redução na atividade da cadeia respiratória mitocondrial e redução da proteína desacopladora (UCP), ligada à maior produção das espécies reativas de oxigênio, o que pode gerar estado de estresse oxidativo (Tan et al., 2010; Yang et al., 2010; Mujahid et al., 2009; Mujahid et al., 2005).

O desequilíbrio entre a produção e eliminação das espécies reativas de oxigênio pelo organismo, leva a um estado biológico conhecido como estresse oxidativo. Nesta condição, grandes quantidades de ROS estão presentes, e isto se deve não apenas a super produção destes, mas também à deficiência nos sistemas de defesas antioxidantes (Halliwell & Gutteridge, 2001).

1.4.3 Sistema antioxidante da glutathiona

A defesa dos organismos contra as espécies reativas de oxigênio pode ser mediada por antioxidantes não enzimáticos, sendo os principais, as vitaminas lipossolúveis, vitaminas hidrossolúveis, oligoelementos (Zinco, cobre, selênio, magnésio) e bioflavonóides (derivados de plantas); e por antioxidantes enzimáticos, representados principalmente pelas enzimas superóxido dismutase e catalase, e pelo sistema de defesa da glutathiona (Kuss, 2005).

A glutathiona (GSH) está envolvida em uma variedade de ações biológicas, entre elas, proteção contra compostos tóxicos, redução de ligações dissulfetos em proteínas, síntese de precursores de DNA, reservatório de cisteína, e a principal, defesa contra os radicais livres (Morand et al., 1997). Sua biossíntese ocorre na maioria dos tecidos, e é dependente da ação consecutiva de duas enzimas. Na primeira etapa, ocorre uma ligação entre os aminoácidos glutâmico e cisteína, por intermédio da enzima γ - glutamilcisteína sintetase, resultando em γ -L-glutamyl-L-cisteína. A segunda fase consiste na ligação desse dipeptídeo com a glicina, pela ação da enzima glutathiona sintetase. Para prevenção de síntese excessiva de glutathiona, a γ -glutamylcisteína sintetase, pode sofrer um *feedback* negativo a partir da GSH, este mecanismo também confere que não haja acúmulo do intermediário, γ -glutamylcisteína (Huber et al., 2008).

Além de síntese de novo, através de aminoácidos precursores, a homeostase da glutathiona, é mantida também pela regeneração da glutathiona oxidada (GSSG) e pela absorção de glutathiona extracelular intacta (Shoveller et al., 2005). Há uma estimativa de que cerca de 50% da produção da glutathiona é de origem da homocisteína, cisteína proveniente da homocisteína, através da rota de transsulfuração, e que sob condições de estresse oxidativo, na qual é requisitado maior produção de glutathiona e assim maior atividade da cistationina β -sintase, ocorre maior expressão desta enzima (Mosharov et al., 2000). Os resultados de Persa et al. (2004) confirmam que a presença de radicais livres podem induzir a super expressão de CBS (cistationina β -sintase) e inibir a metionina sintase, estimulando assim a transsulfuração- maior produção de cisteína e glutathiona.

O sistema da glutathiona é composto, além da GSH, pelas enzimas glutathiona oxidase (GO), glutathiona peroxidase (GSH-Px) e pela glutathiona redutase (GR), sendo assim, a ação de defesa antioxidante, depende da atividade de todo o conjunto. Para reduzir as espécies oxidantes, e assim cumprir seu papel, a glutathiona se oxida à glutathiona dissulfeto (GSSG), forma na qual está incapacitada para nova reação, pela ação das enzimas GO e GSH-Px. A enzima glutathiona redutase é a responsável por regenerar a GSH, a partir de GSSG, permitindo assim, que a mesma molécula seja usada mais de uma vez no combate às espécies reativas de oxigênio (Huber et al., 2008) (Figura 4).

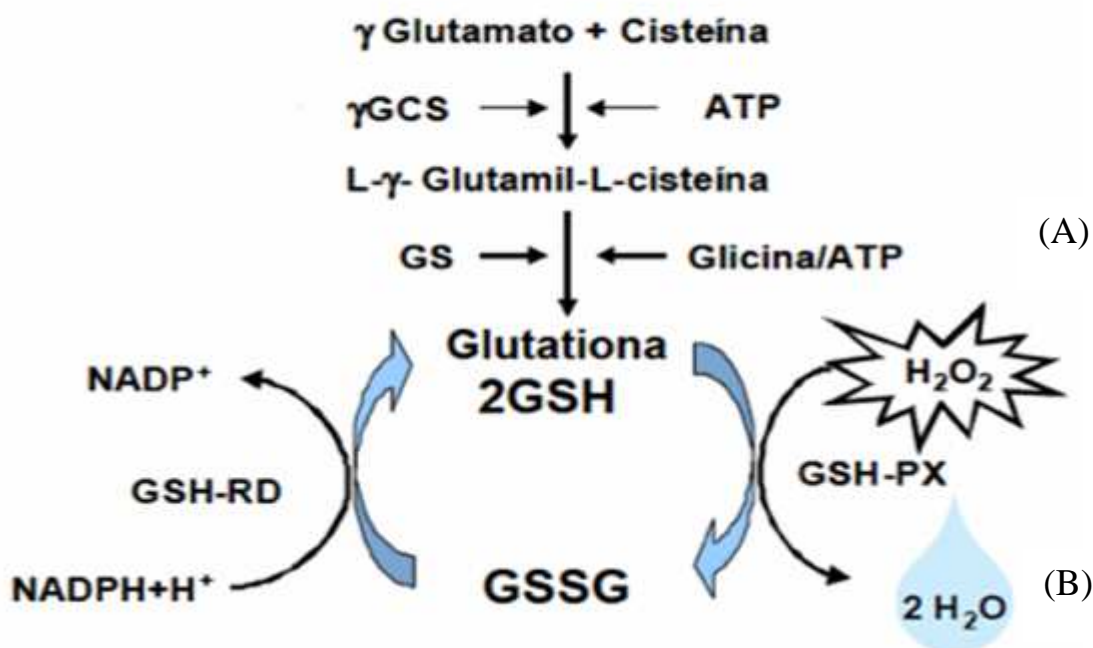


Figura 4 - Síntese da glutatona a partir dos aminoácidos glutâmico e cisteína (A); Sistema de defesa antioxidante da glutatona contra o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (B). GSH-PX: glutatona peroxidase; GSH-RD: glutatona redutase.

A família das enzimas glutatona peroxidases, pode ser dividida em duas classes: enzimas dependente de selênio e enzimas selênio independente, estas chamadas de glutatona S-transferases e com atividade relacionada à hidroperóxidos orgânicos (Arthur, 2000).

De acordo com Mézes et al. (2003), cinco isoformas de GSH-Px dependente de selênio já foram descritas, estas enzimas estão presentes em quase todas as células animais, entretanto, a distribuição das isoformas entre os tecidos ocorre de forma variada.

Entre os diversos fatores que afetam a atividade da GSH-Px, autores (Tan et al., 2010; Yang et al., 2010; Pamok et al., 2009) têm mostrado a influência do estresse térmico. Estes autores verificaram que animais expostos a altas temperaturas, em estresse térmico agudo, apresentam maior atividade desta enzima, e sugerem que isto pode ser uma tentativa do organismo de combater o ROS, que também tem sua produção aumentada nessa condição.

LITERATURA CITADA

- ABE, T.; MUJAHID, A.; SATO, K. et al. Possible role of avian uncoupling protein in down-regulating mitochondrial superoxide production in skeletal muscle of fasted chickens. **FEBS Letters**, v.580, p.4815-4822, 2006.
- ABREU, P.G.; ABREU, V.M.N. Estresse calórico- como ocorre e o que fazer? Embrapa suínos e aves. Disponível em: <<http://www.cnpsa.embrapa.br/calor/calor.pdf>> Acesso em janeiro de 2012.
- ARAÚJO, W.A.G.; SOBREIRA, G.F. Proteína Ideal como estratégia nutricional na alimentação de suínos. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.5, n.2, 537-545, 2008.
- ARTHUR, J.R. The glutathione peroxidases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.57, p.1825-1835, 2000.
- AVEROUS, J.; BRUHAT, A.; MORDIER, S. et al. Recent Advances in the Understanding of Amino Acid Regulation of Gene Expression. **Journal of Nutrition**, v.133, p.2040S-2045S, 2003.
- BAKER, D.H. **Utilization of precursors of L-amino-acids**. In: Amino acids in farm animal nutrition. D` Mello J. P. F. ed. CAB International ISBN, Wallingford UK, 1994. p. 37-61.
- BARAZZONI, R.; SHORT, K.R.; NAIR, K.S. Effects of aging on mitochondrial DNA copy number and cytochrome c oxidase gene expression in rat skeletal muscle, liver, and heart. **The Journal of Biological Chemistry**, v.275, n.5, p.3343-3347, 2000.
- BARBOSA, L.F.; MEDEIROS, M.H.G.; AUGUSTO, O. Danos oxidativos e neurodegeneração: O quê aprendemos com animais transgênicos e nocautes? **Química Nova**, v.29, n.6, p.1352-1360, 2006.
- BECKER, K.L. **Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins (LWW), 2001, 2512p.
- BOTTJE, W.; BRAND, M.D.; OJANO-DIRAIN, C. et al. Mitochondrial proton leak kinetics and relationship with feed efficiency within a single genetic line of male broilers. **Poultry Science**, v.88, p.1683-1693, 2009.
- BOTTJE, W.; PUMFORD, N.R.; OJANO-DIRAIN, C. et al. Feed Efficiency and Mitochondrial Function. **Poultry Science**, v.85, p.8-14, 2006.
- BOTTJE, W.G.; CARSTENS, G.E. Association of mitochondrial function and feed efficiency in poultry and livestock species. **Journal of Animal Science**, v.87, p.E48-E63, 2009.
- BRAGA, P.J.; BAIÃO, C.N. O Conceito de Proteína Ideal na Formulação de Ração para Frangos de Corte. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, v.34, p.29-37, 2001.
- BROWN, R.J.; ADAMS, J.J.; PELEKANOS, R.A. et al. Model for growth hormone receptor activation based on subunit rotation within a receptor dimer. **Nature Structural & Molecular Biology**, v.12, p.814-21, 2005.
- BROWN, T.A. **Genética Um Enfoque Molecular**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1999, 336p.
- BUNCHASAK, C.; SOOKSRIDANG, T.; CHAIYAPIT, R. Effect of Adding Methionine Hydroxy Analogue as Methionine Source at the Commercial Requirement Recommendation on Production Performance and Evidence of Ascites Syndrome of Male Broiler Chicks Fed Corn-Soybean Based. **International Journal of Poultry Science**, v.5, n.8, p.744-752, 2006.
- BURFOOT, M.S.; ROGERS, N.C.; WATLING, D. et al. Janus Kinase-dependent Activation of Insulin Receptor Substrate 1 in Response to Interleukin-4, Oncostatin

- M, and the Interferons. **The Journal of Biological Chemistry**, v.272, n.39, p.24183-24190, 1997.
- BUSTIN, A.S.; BENES, V.; NOLAN, T. et al. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.34, p. 597-601, 2005.
- CAREW, L.B.; MCMURTY, J.P.; ALSTER, F.A. Effects of methionine deficiency on plasma levels of thyroid hormones, insulin-like growth factor-I and –II, liver and body weights, and feed intake in growing chickens. **Poultry Science**, v.82, p.1932-1938, 2003.
- CARTER-SU, C.; PJ KING, A.; ARGETSINGER, L.S. et al. Signalling Pathway of GH. **Endocrine Journal**, v.43, p.S65-S70, 1996.
- CHENDRIMADA, T.P.; FREEMAN, E.; DAVIS, A.J. Dietary Nitrogen Intake Regulates Hepatic Malic Enzyme Messenger Ribonucleic Acid Expression. **Poultry Science**, v.86, p.1980-1198, 2007.
- COLLIER, S.R.; CASEY, D.P.; KANALEY, J.A. Growth hormone responses to varying doses of oral arginine. **Growth Hormone & IGF Research**, v.15, p.136-139, 2005.
- CONLON, M.A.; KITA, K. Muscle protein synthesis rate is altered in response to a single injection of insulin-like growth factor-I in seven-day-old leghorn chicks. **Poultry Science**, v.81, p.1543-1547, 2002.
- DE ROBERTIS, E.M.F.; HIB, J. **Bases da Biologia Celular e Molecular**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2001. 418p.
- DIBNER, J.J. Review of the metabolism of 2-hydroxy-4-(methylthio)butanoic acid to L-methionine in the chick: a stereospecific pathway. **Journal of Nutrition**, v.114, p.1716-1723, 2003.
- DREW, M.D.; VAN KESSEL, A.G.; MAENZ, D.D. Absorption of methionine and 2-hydroxy-4 methylthiobutanoic acid in conventional and germ-free chickens. **Poultry Science**, v.82, p.1149-1153, 2003.
- DROGE W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v.82, p.47-95, 2002.
- EVOCK-CLOVER, C.M.; POCH, S.M.; RICHARDS, M.P. et al. Expression of an uncoupling protein gene homologue in chickens. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A- Molecular & Integrative Physiology**, v.133, p.345-358, 2002.
- FAFOURNOUX, P.; BRUHAT, A.; JOUSSE, C. Amino acid regulation of gene expression. **Biochemistry Journal**, v.351, p.1-12, 2000.
- FENTON, H.J.H. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. **Chemical Society**, v.64, p.899-909, 1894.
- FERRAZ, J.L.A. **Análise da expressão gênica no músculo esquelético de bovinos das raças Nelore e Aberdeen Angus e sua relação como o desenvolvimento muscular e a maciez da carne**. 2009. 113f. Tese (Doutorado em Zootecnia)-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Jaboticabal.
- FINKELSTEIN, J.D. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. **European Journal of Pediatrics**, v.157, p.S40-S44, 1998.
- FURLAN, R.L.; MACARI, M. Termorregulação. In: MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E. (Ed.) **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. 1.ed. Jaboticabal: Funep/Unesp, 2002. p.209- 230.
- GROSCHL, M.; KNERR, I.; TOPF, H.G. et al. Endocrine responses to the oral ingestion of a physiological dose of essential amino acids in humans. **Journal of Endocrinology**, v.179, p.237-244, 2003.
- GUTTERIDGE, J.M.C.; MITCHELL, J. Redox imbalance in the critically ill. **British Medical Bulletin**, v.55, n.1, p.49-75, 1999.

- GUYOTI, V. Proteínas quinases e a ação hormonal. Seminário apresentado na disciplina bioquímica do tecido animal, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009. Disponível em: <<http://www6.ufrgs.br/favet/lacvet/restrito/pdf/protquinases.pdf>>. Acesso em: dezembro de 2011.
- HACKENHAAR, L.; LEMME, A. Como Reduzir o Nível de Proteína em Dietas de Frangos de Corte, Garantindo Performance e Reduzindo Custos. In: VII SIMPÓSIO GOIANO DE AVICULTURA E II SIMPÓSIO GOIANO DE SUINOCULTURA, 2005, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Avesui Centro-Oeste Seminários Técnicos de Avicultura, 2005. p.85-95.
- HADDAD, R. **Homocisteína: um novo método de análise utilizando o sistema DIMP/ T&R-MIMS**. 2001. 100f. Dissertação (mestrado em ciências médicas)- Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 3. ed. New York: Oxford University Press, 2001. 936 p.
- HARVENSTEIN, G.B.; FERKET, P.R.; QURESHI, M.A. Growth, livability, and feed conversion of 1957 versus 2001 broilers when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. **Poultry Science**, v.82, p.1500-1508, 2003.
- HOEHLER, D.; LEMME, A.; JENSEN, S.K. et al. Relative effectiveness of methionine sources in diets for broiler chickens. **Journal of Applied Poultry research**, v.14, p.679-693, 2005.
- HUBER, P.C.; ALMEIDA, W.P.; FÁTIMA, A. Glutathione e enzimas relacionadas: Papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v.31, n.5, p.1170-1179, 2008.
- HUGGETT, J.; DHEDA, K.; BUSTIN, S. et al. A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. **Genes and Immunity**, v.6, p.279-284, 2005.
- HUNT, M. Real Time PCR Tutorial. Microbiology and Immunology On-line, University of South Carolina School of Medicine. Disponível em: <<http://pathmicro.med.sc.edu/pcr/pcr-home.htm>>. Acesso em: janeiro de 2012.
- JASMAN, A.J.M.; KAN, C.A.; WIEBENGA, J. **Comparison of the biological efficacy of DL-methionine and hydroxy-4-methylthiobutanoic acid (HMB) in pigs and poultry**. Netherlands: Centraal Veevoederbureau (CVB, Central Bureau for livestock feeding), Documentation Report No29:55, 2003.
- JEREMY, M.B.; TYOMOCZKO, J.L.; STRYER, L. **Bioquímica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2008. 1114p.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000. 339p.
- KEMP, T.J.; CAUSTON, H.C.; CLERK, A. Changes in gene expression induced by H₂O₂ in cardiac myocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.307, p.416-421, 2003.
- KIM, J.H.; JEONG, W.S.; KIM, I.H. et al. Effect of an oil byproduct from conjugated linoleic acid (CLA) purification on CLA accumulation and lipogenic gene expression in broilers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, n.6, p.2397-404, 2009.
- KIM, J.W. The Endocrine Regulation of Chicken Growth. **Asian - Australasian Journal of Animal Sciences**, v.23, n.12, p.1668-1676, 2010.
- KIMBALL, S.R.; JEFFERSON, L.S. Amino acids as regulators of gene expression. **Nutrition & Metabolism**, v.1:3, 2004.
- KIMBALL, S.R.; SHANTZ, L.M.; HORETSKY, R.L. et al. Leucine Regulates Translation of Specific mRNAs in L6 Myoblasts through mTOR-mediated Changes

- in Availability of eIF4E and Phosphorylation of Ribosomal Protein S6. **The Journal of Biological Chemistry**, v.274, n.17, p.11647-11652, 1999.
- KOFOED, E.M.; HWA, V.; LITTLE, B. et al. Growth hormone insensitivity associated with a STAT5b mutation. **New England Journal of Medicine**, v.349, p.1139-47, 2003.
- KRUEGER, W.K.; CARSTENS, G.E.; LANCASTER, P.A. et al. Relationship between residual feed intake and apparent nutrient digestibility in growing calves. **Journal of Animal Science**, v.86, 25. (Abstr.), 2008.
- KUHN, E.R.; VLEURICK, L.; EDERY, M. et al. Internalization of the chicken growth hormone receptor complex and its effect on biological functions. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.132, p.299-308, 2002.
- KUSS, F. Agentes oxidantes e antioxidantes. Seminário apresentado na disciplina bioquímica do tecido animal, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em 2005. Disponível em: <http://www6.ufrgs.br/favet/lacvet/restrito/pdf/ag_oxid_antioxid.pdf> Acesso em: dezembro de 2011.
- LASSITER, K.; OJANO-DIRAIN, C.; IQBAL, M. et al. Differential expression of mitochondrial and extrami- tochondrial proteins in lymphocytes of male broilers with low and high feed efficiency. **Poultry Science**, v.85, p.2251-2259, 2006.
- LAURENTI, R. Nível sérico de homocisteína: hiperhomocisteinemia como fator de risco para doenças cardiovasculares. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.51, n.4, p.181-194, 2005.
- LEDESMA, A.; LACOPA, M.G.; RIAL, E. The mitochondrial uncoupling proteins. **Genome Biology**, v.3, p.3015.1-3015.9, 2002.
- LEE, H.C.; WEI, Y.H. Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.37, p.822-834, 2005.
- LEMME, A.; HOEHLER, D.; BRENNAN, J.J. Relative Effectiveness of methionine hydroxy analog compared to DL-methionine in broiler chicken. **Poultry Science**, v.81, p.838-845, 2002.
- LEMME, A.; PETRI, A.; REDSHAW, M. **Revisão: O que há de novo sobre as fontes comerciais de metionina em aves.** (S.L.): Degussa Feed Additives-amino acids and more, 2007. 34p.
- LEUNG, D.W.; SPENCER, S.A.; CACHIANES, G. et al. Growth hormone receptor and serum binding protein: purification, cloning and expression. **Nature**, v.330, p.537, 1987.
- LI, J.M.; Cai, Q.; Zhou, H. et al. Effects of hydrogen peroxide on mitochondrial gene expression of intestinal epithelial cells. **World Journal of Gastroenterology**, v.8, p.1117- 1122, 2002.
- LIN, H.; DECUYPERE, E.; BUYSE, J. Acute heat stress induces oxidative stress in broiler chickens. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v.144, p.11-17, 2006.
- LINGENS, G.; MOLNAR, S. Studies on metabolism of broilers by using ¹⁴C-labelled DL-methionine and DL-methionine hydroxy analogue Ca-salt. **Archives of Animal Nutrition**, v.49, p.113-124, 1996.
- LIU, Y.; GUO, Y.; WANG, Z. et al. Effects of source and level of magnesium on catalase activity and its gene expression in livers of broiler chickens. **Archives of Animal Nutrition**, v.61, n.4, p.292-300, 2007.

- LIVAK, J.K.; SCHMITTGEN, D.T. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. **Methods**, v.25, p.402-408, 2001.
- MACARI, M.; FURLAN, R.L.; MAIORKA, A. Aspectos fisiológicos e de manejo para manutenção da homeostase térmica e controle de síndromes metabólicas. In: MENDES, A.A.; NAAS, I.A.; MACARI, M. (Ed.) **Produção de frangos de corte**. 1.ed. Campinas: Facta, 2004. p.137-156.
- MACHADO, J. **Efeito da suplementação com β -hidroxi- β -metilbutirato sobre parâmetros envolvidos na atrofia muscular esquelética induzida pela imobilização em ratos**. 2010. 115f. Dissertação (Mestrado em Educação Física)- Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- MAGER, W.H.; KRUIJFF, A.J. Stress-induced transcriptional activation. **Microbiological Reviews**, v.59, n.3, p.506-531, 1995.
- MAIA, M.S.; BICUDO, S.D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão, **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, n.4, p.183-193, 2009.
- MARCHIZELI, P.C.A. **Glutamato de Sódio e fontes de metionina sobre o desempenho, morfometria intestinal e excreção de nitrogênio de poedeiras comerciais**. 2009. 57f. Dissertação (Mestrado em Zootenia) - Faculdade de ciências agrárias e veterinária-UNESP, Jaboticabal.
- MARTINELLI JÚNIOR, C.E.; OLIVEIRA, C.R.P.; BRITO, A.V.O. et al. Diagnóstico da Deficiência de Hormônio de Crescimento, a Rigor de IGF-1. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabolismo**, v.46, n.1, p.27-33, 2002
- MARTÍN-VENEGAS, R.; GERAERT, P.A.; FERRER, R. Conversion of the methionine hydroxy analogue DL-2- hydroxy-(4-methylthio)butanoic acid to sulfur-containing amino acids in the chicken small intestine. **Poultry Science**, v.85, p.1932-1938, 2006.
- MÉZES, M.; ERDÉLYI, M.; SHAABAN, G. et al. Genetics of glutathione peroxidase. **Acta Biologica Szegediensis**, v.47, n.1-4, p.135-138, 2003.
- MIRAGLIOTTA, M.Y. **Avaliação das condições do ambiente interno em dois galpões de produção comercial de frangos de corte, com ventilação e densidade populacional diferenciados**. 2005. 258f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola)- Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Agrícola, Campinas.
- MORAND, C.; RIOS, L.; MOUNDRAS, C. et al. Influence of methionine availability on glutathione synthesis and delivery by the liver. **Nutritional Biochemistry**, v.8, p.246-255, 1997.
- MOSHAROV, E.; CRANFORD, M.R.; BANERJEE, R. The quantitatively important relationship between homocysteine metabolism and glutathione synthesis by the transsulfuration pathway and its regulation by redox changes. **Biochemistry**, v.39, p.13005-13011, 2000.
- MOURA, A.M.A.; MELO, T.V.; MIRANDA, D.J.A. Utilização da DL-metionina e metionina hidroxi-análoga na alimentação de aves. **Boletim de Indústria animal**, v.67, n.1, p.97-107, 2010.
- MOUSTAFA, M.H.; SHARMA, R.K.; THORNTON, J. et al. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. **Human Reproduction**, v.19, n.1, p.129-138, 2004.
- MUJAHID, A.; AKIBA, Y.; TOYOMIZU, M. Olive oil-supplemented diet alleviates acute heat stress-induced mitochondrial ROS production in chicken skeletal muscle.

- American Journal Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.297, n.3, p.:R690-8, 2009.
- MUJAHID, A.; SATO, K.; AKIBA, Y. et al. Acute heat stress stimulates mitochondrial superoxide production in broiler skeletal muscle, possibly via downregulation of uncoupling protein content. **Poultry Science**, v.85, p.1259-1265, 2006.
- MUJAHID, A.; YOSHIKI, Y.; AKIBA, Y. et al. Super-oxide radical production in chicken skeletal muscle induced by acute heat stress. **Poultry Science**, v.84, p.307-314, 2005.
- MULLER, M.; KERSTEN, S. Nutrigenomics: goals and strategies. **Nature Review Genetics**, v.4, p.315-322, 2003.
- NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger Principles of biochemistry**. 5. ed. New York: Worth Publishers, 2008. 1119p.
- NICOLETTI, V.G.; MARINO, V.M.; CUPPARI, C. et al. Effect of antioxidant diets on mitochondrial gene expression in rat brain during aging. **Neurochemical research**, v.30, n.6/7, p.737-752, 2005.
- NOVAIS, M.C.; PIRES-ALVES, P.M. PCR em Tempo Real. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.33, p. 10-13, 2004.
- OJANO-DIRAIN, C.; TOYOMIZU, M.; WING, T. et al. Gene expression in breast muscle and duodenum from low and high feed efficient broilers. **Poultry Science**, v.86, p.372-381, 2007.
- OLIVEIRA, B.L. Manejo racional e produtividade das codornas. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL E COTURNICULTURA, 1., 2002, Lavras. **Anais...** Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2002. p.77-84.
- OLIVEIRA, R.F.M.; DONZELE, J.L.; ABREU, M.L.T. et al. Efeitos da temperatura e da umidade relativa sobre o desempenho e o rendimento de cortes nobres de frangos de corte de 1 a 49 dias de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, p.797-803, 2006.
- PAMOK, S.; AENGWANICH, W.; KOMUTRIN, T. Adaptation to oxidative stress and impact of chronic oxidative stress on immunity in heat-stressed broilers. **Journal of Thermal Biology**, v.34, n.7, p.353-357, 2009.
- PARKER, N.; AFFOURTIT, C.; VIDAL-PUIG, A. et al. Energization-dependent endogenous activation of proton conductance in skeletal muscle mitochondria. **Biochemical Journal**, v.412, p.131-139, 2008.
- PAYNE, R.L.; LEMME, A.; SEKO, H. Bioavailability of methionine hydroxy analog-free acid relative to DL-methionine in broilers. **Animal Science Journal**, v.77, p.427-439, 2006.
- PERSA, C.; PIERCE, A.; MA, Z. et al. The presence of a transsulfuration pathway in the lens: a new oxidative stress defense system. **Experimental Eye Research**, v.79, p.875-86, 2004.
- PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v.29, n.9, p.2002-2007.
- PIOVACARI, S.M.; SHIMA, M.; CARDOSO, R. et al. Imunonutrição. **einstein: Educação Continuada em Saúde**, v.6, n.1 Pt 2, p.41-43, 2008.
- REECE, W.O. **Dukes- Fisiologia dos Animais Domésticos**. 12. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2006. 926p.
- REIS, J.S.; VELOSO, C.A.; MATTOS, R.T. et al. Estresse Oxidativo: Revisão da Sinalização Metabólica no Diabetes Tipo 1. **Arquivos brasileiros de Endocrinologia e metabolismo**, v.52, n.7, p.1096-1105, 2008.
- RODRÍGUEZ, M.S.; MUÑOZ, L.M.; CASIERI, R.C. Nutrigenómica, obesidad y salud pública. **Revista Española de Salud Pública**, v.81, n.5, p. 475-487, 2007.

- RONSEIN, G.E.; MIYAMOTO, S.; BECHARA, E. et al. Oxidação de proteínas por oxigênio singlete: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. **Química Nova**, v.29, n.3, p.563-568, 2006.
- SACHECK, J.M.; OHTSUKA, A.; MCLARY, S.C. et al. IGF-I stimulates muscle growth by suppressing protein breakdown and expression of atrophy-related ubiquitin ligases, atrogin-1 and MuRF1. **American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism**, v.287, p.E591-E601, 2004.
- SALO, D.; DONOVAN, C.; DAVIES, K. HSP70 and other possible heat shock or oxidative stress proteins are induced in skeletal muscle, heart, and liver during exercise. **Free Radical Biology & Medicine**, v.11, p.239-246, 1991.
- SATO, K.; FUKAO, K.; SEKI, Y. et al. Expression of the chicken peroxisome proliferator-activated receptor- γ gene is influenced by aging, nutrition, and agonist administration. **Poultry Science**, v.83, p.1342-1347, 2004.
- SCANES, C.G. Perspectives o the endocrinology of poultry growth and metabolism. **General and Comparative Endocrinology**, v.163, p.24-32, 2009.
- SCHAUSS, A.C.; HUANG, H.; CHOI, S.Y. et al. A novel cell-free mitochondrial fusion assay amenable for high-throughput screenings of fusion modulators. **BMC Biology**, v.8, p.100, 2010.
- SCHEFFLER, I. **Mitochondria**. 1. ed. Nova York: Wiley-Liss Inc., 1999. 367p.
- SHOVELLER, A.K.; STOLL, B.; BALL, R.O. et al. Nutritional and Functional Importance of Intestinal Sulfur Amino Acid Metabolism1. **Journal of Nutrition**, v.135, p.1609-1612, 2005
- SILVA, D.C.; CERCHIARO, G.; HONÓRIO, K.M. Relações patofisiológicas entre estresse oxidativo e arteriosclerose. **Química Nova**, v.34, n.2, p.300-305, 2011.
- SILVA, V.F. Transtornos do equilíbrio ácido-básico em frangos de corte. Seminário apresentado à disciplina bioquímica do tecido animal do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em 2004. Disponível em: <http://www6.ufrgs.br/favet/lacvet/restrito/pdf/acidobasico_frangos.pdf> Acesso em: dezembro de 2011.
- SIMON, J. Choline, betaine and methionine interactions in chickens, pigs and fish (including crustaceans). **Worlds Poultry Science Journal**, v.55, p.353-374, 1999.
- STIPANUK, M.H. Sulfur amino acid metabolism: Pathways for Production and Removal of Homocysteine and Cysteine. **Annual Review of Nutrition**, v.24, p.539-77, 2004.
- STUBBS, A.K.; WHEELHOUSE, N.M.; LOMAX, M.A. et al. Nutrient-hormone interaction in ovine liver: methionine supply selectively modulates growth hormone-induced IGF-1 gene expression. **Journal of Endocrinology**, v.174, p.335-341, 2002.
- TAKAHASHI, K.; AOKI, A.; TAKIMOTO, T. et al. Dietary supplementation of glycine modulates inflammatory response indicators in broiler chickens. **British Journal of Nutrition**, v.100, p.1019-1028, 2008.
- TAN, G.Y.; YANG, L.; FU, Q.F. et al. Effects of different acute high ambient temperatures on function of hepatic mitochondrial respiration, antioxidative enzymes, and oxidative injury in broiler chickens. **Poultry Science**, v.89, p.115-122, 2010.
- TENGAN, C.H.; GABBAL, A.A.; MORAES, C.T. Deleções do DNA mitocondrial no envelhecimento: efeito da disfunção na fosforilação oxidativa. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v.25, n.3, p.126-131, 1998.

- TESSERAUD, S.; COUSTARD-MÉTAYER, S.,; BOUSSAID, S. et al. Insulin and amino acid availability regulate atrogen-1 in avian QT6 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.357, p. 181-186, 2007.
- TOYOMIZU, M.; ABE, T.; UEDA, M. et al. Progressive alteration of UCP and ANT in skeletal muscle of fasted chickens. **Journal of Poultry Science**, v.43, p.167-172, 2006.
- TOYOMIZU, M.; UEDA, M.; SATO, S. et al. Cold-induced mitochondrial uncoupling and expression of chicken UCP and ANT mRNA in chicken skeletal muscle. **FEBS Letters**, v.529, p.313-318, 2002.
- UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA-UBABEF- Volume é recorde histórico para o setor. Disponível em: <<http://www.abef.com.br/ubabef/exibenoticiaubabef.php?notcodigo=3113>>. Acesso em: janeiro de 2012.
- VAN WEERDEN, E.J., SCHUTTE, J.B.; BERTRAM, H.L. Utilization of the polymers of methionine hydroxy analogue free acid (MHA-FA) in broiler chicks. **Archiv fur Geflugelkunde**, v.56, p.63-68, 1992.
- VIANA, M.T.S.; ALBINO, L.F.T.; ROSTAGNO, H.S. et al. Methionine sources and levels in broilers chick diets. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.1751-1756, 2009.
- VIDAL-PUIG, A.J. Uncoupling expectations. **Nature Genetics**, v.26, p.387-388, 2000.
- VIEIRA, S.M.S. **Estudo da associação entre polimorfismos em genes relacionados ao metabolismo da glutatona e a suscetibilidade a complicações microvasculares no diabete melito tipo 1**. 2008. 138f. Tese (Doutorado em Ciências)- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- WARTER, I.; SEEBACHER, F. Endothermy in birds: underlying molecular mechanisms. **The Journal of Experimental Biology**, v.212, p.2328-2336, 2009.
- Wu, G.; DAVIS, D.A. Interrelationship among methionine, choline and betaine in channel catfish – *Ictalurus punctatus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.36, n.3, p.337-345, 2005.
- YANG, L.; TAN, G.Y.; FU, Y.Q. et al. Effects of acute heat stress and subsequent stress removal on function of hepatic mitochondrial respiration, ROS production and lipid peroxidation in broiler chickens. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v.151, n.2, p.204-208, 2010.

II. OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a expressão gênica do receptor do hormônio do crescimento (GHR) e do fator de crescimento semelhante a insulina I (IGF-I) no fígado e músculo do peito de frangos de corte alimentados com dietas, contendo duas fontes e dois níveis de suplementação de metionina.

Avaliar a expressão de mRNA da UCP (proteína desacopladora), mRNA ANT (transportador de nucleotídeos de adenina) e mRNA COXIII (citocromo c oxidase subunidade III) e o desempenho de frangos de corte alimentados com duas fontes e dois níveis de metionina comerciais.

Avaliar a influência do estresse térmico agudo sobre a produção de ROS mitocondrial e atividade da enzima glutathione peroxidase no fígado de codornas de corte.

III. Metionina na dieta de frangos de corte sobre a expressão de mRNA IGF-I e mRNA GHR

RESUMO- Este trabalho teve como objetivo avaliar a expressão gênica do fator de crescimento semelhante a insulina I (IGF-I) e do receptor do hormônio do crescimento (GHR) no fígado e músculo do peito de frangos de corte alimentados com dietas, contendo duas fontes e dois níveis de suplementação de metionina. Foram utilizados frangos de corte de 22 a 42 dias de idade distribuídos em cinco tratamentos (dieta basal, suplementação de primeiro nível de DL-metionina, segundo nível de DL-metionina, primeiro nível de suplementação de MHA-FA e segundo nível de MHA-FA). Ao final do período experimental, as aves foram abatidas por deslocamento cervical, o fígado e músculo do peito foram coletados para extração de RNA total. O cDNA foi amplificado usando primers específicos para os genes analisados pela qRT-PCR. A suplementação de metionina proporcionou melhor desempenho, sendo o segundo nível de DL-metionina o que apresentou melhores resultados para ganho de peso. A expressão dos genes GHR e IGF-I no músculo não sofreu influência da suplementação de metionina. A expressão de IGF-I no fígado foi maior para animais que receberam suplementação de metionina, comparados à dieta basal. A suplementação do segundo nível de DL-metionina levou à maior expressão de mRNA IGF-I, em relação àqueles animais alimentados com primeiro nível de DL-metionina (1,56 UA vs 0,97 UA), e maior expressão também quando comparado com aves alimentadas com ambos os níveis de MHA-FA. Foi observada diferença significativa entre os tratamentos basal e segundo nível de DL-metionina, sobre a expressão de mRNA GHR no fígado, sendo que os animais que receberam esse nível de suplementação apresentaram maior expressão do gene. A adição de metionina melhora o rendimento animal não apenas por estimular a síntese e a liberação de fatores de crescimento, mas também por atuar em rotas de síntese e degradação de proteína corporal.

Palavras-chave: DL-metionina, fator de crescimento semelhante a insulina I, metionina hidroxí análoga, receptor do hormônio do crescimento

Introdução

Características produtivas importantes para o sucesso na produção de aves, como taxa de ganho de peso diário e composição do ganho de peso (proteína e gordura) são influenciadas por diversos mecanismos biológicos. Entre estes, estão os hormônios relacionados ao crescimento e à dieta disponibilizada para os animais.

O GH (hormônio do crescimento) é um importante regulador do crescimento e da composição corporal. Seus efeitos são promovidos principalmente através da estimulação da síntese e liberação do IGF-I (Fator de crescimento semelhante à insulina I) (Van Vught et al., 2008), por intermédio do receptor do hormônio do crescimento (GHR) (Kita et al., 2005).

A composição nutricional da dieta pode influenciar a fisiologia e a expressão de vários genes, e assim tornar os animais mais ou menos eficientes em converter alimentos em crescimento corporal. A metionina é o primeiro aminoácido limitante para frangos de corte, devido à composição dos alimentos utilizados em suas dietas e em função à grande exigência das aves por este aminoácido para deposição de músculos e penas.

Em função da exigência em metionina, a suplementação de fontes industriais dessa substância na dieta de aves é importante para se alcançar o desempenho adequado. As duas fontes comerciais disponíveis em grande escala no mercado, e geralmente utilizadas, são a DL-metionina (ácido DL-2-amino-4(metiltio) butanóico), e a metionina hidroxil análogo, conhecida como MHA-FA (ácido DL-2-hidroxi-4 (metilo) butanóico) (Marchizeli, 2009).

As diferenças que existem entre as duas fontes fazem com que a forma de absorção destas, no trato gastrointestinal das aves, ocorra por diferentes mecanismos (Dibner, 2003), e que as fontes apresentem diferentes bioeficácias entre si (Jansman et al., 2003).

Apesar dos relatos na literatura referentes à influência da suplementação de metionina sobre o desempenho de frangos de corte, há poucos estudos realizados mostrando essa influência ou de outros nutrientes sobre a expressão gênica. O estudo da influência de níveis de metionina na dieta de aves, sobre a expressão de genes envolvidos no crescimento, pode auxiliar a explicar diferenças obtidas no desempenho,

em função das modificações ocorridas devido a mudanças fisiológicas a nível celular / molecular. Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar o ganho de peso e conversão alimentar das aves, e a expressão gênica do IGF-I e do GHR no fígado e músculo do peito de frangos de corte, alimentados com dietas contendo duas fontes e dois níveis de suplementação de metionina.

Material e Métodos

Frangos de corte machos (Cobb 500 slow) com um dia de idade foram obtidos de um incubatório comercial, vacinados para Marek e Gumboro e sexados pela asa. Durante o período inicial (1 a 21 dias de idade), as aves foram alojadas em galpão convencional e criadas sob as mesmas condições experimentais.

Aos 22 dias de idade, as aves foram distribuídas em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 2 (duas fontes e dois níveis de metionina), com a utilização de uma dieta basal (controle) sem adição de metionina industrial, totalizando cinco tratamentos, dieta basal, primeiro nível de suplementação de DL-metionina (DL1), segundo nível de DL-metionina (DL2), primeiro nível de suplementação de MHA-FA (MHA-FA1) e segundo nível de MHA-FA (MHA-FA2), com cinco repetições e 30 aves por Box, totalizando 750 aves.

As rações experimentais (Tabela 1) foram formuladas segundo recomendação de Rostagno et al. (2005). As relações de todos os aminoácidos com a lisina foram aumentadas em 5% para evitar qualquer limitação dos demais aminoácidos essenciais. Em todo período experimental os animais tiveram livre acesso à água e ração.

Tabela 1 - Composição centesimal das rações experimentais

Ingredientes	Tratamentos experimentais				
	Basal	DL1	DL2	MHA-FA1	MHA-FA2 ¹
Milho 7,8% PB	45,51	45,51	45,51	45,51	45,51
Sorgo 8,0% PB	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00
F. soja 46,7% PB	24,00	24,00	24,00	24,00	24,00
F. carne 46% PB	4,50	4,50	4,50	4,50	4,50
F. vísceras 59% PB	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Óleo de soja	2,80	2,80	2,80	2,80	2,80
DLM 99%	0,00	0,08	0,24	0,00	0,00
MHA-FA 88%	0,00	0,00	0,00	0,11	0,33
L- Lisina HCl 78%	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17
L-Treonina 78%	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
Sal	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34
Calcário 38%	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36
Inerte (Caolin)	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45
Premix ²	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
Total	100,60	100,70	100,90	100,70	100,90
Composição analisada ³ (%)					
PB	19,60	19,60	19,60	19,60	19,60
Lisina digestível	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Met+Cis digestível	0,52	0,59	0,75	0,59	0,75
Treonina digestível	0,68	0,68	0,68	0,68	0,68
Triptofano digestível	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19
Valina digestível	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79
Isoleucina digestível	0,69	0,69	0,69	0,69	0,69
Arginina digestível	1,13	1,13	1,13	1,13	1,13
Composição calculada (%)					
Ca	0,74	0,74	0,74	0,74	0,74
Pd	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38
Sódio	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19
EMA (kcal/kg)	3.150	3.150	3.150	3.150	3.150

¹DL1: primeiro nível de suplementação de DL-metionina, DL2: segundo nível de suplementação DL-metionina, MHA-FA1: primeiro nível de suplementação de MHA-FA, MHA-FA2: segundo nível de suplementação de MHA-FA. ²Composição por Kg de ração: acetato de retinil, 3,44 mg; colecalciferol, 50 µg; DL- α -tocoferol, 15 mg; tiamina, 1,63 mg; riboflavina, 4,9 mg; piridoxine, 3,26 mg; cianocobalamina, 12 µg; ácido D-pantotênico – 9,8 mg; D-biotina – 0,1 mg; menadiona, 2,4 mg; ácido fólico, 0,82 mg; niacinamida, 35 mg; selênio – 0,2 mg; ferro, 35 mg; cobre, 8 mg; Manganês, 60 mg; Zn, 50 mg; I, 1 mg; colina: 650 mg; salinomicina: 60 mg; avilamicina: 5 mg; Butil hidroxi tolueno, 80 mg.

³Formulações foram feitas com base no total de aminoácidos da farinha de milho e soja analisados pela Evonik Degussa (Hanau, Germany). O coeficiente de digestibilidade de

Rostagno et al. (2005) foi usado para obter a digestibilidade dos aminoácidos. EMA: energia metabolizável aparente.

Para determinação do ganho de peso, todas as aves foram pesadas no início (22 dias) e final (42 dias) do período experimental. O consumo de ração foi calculado a partir da quantidade de ração oferecida, subtraída da sobra no final do experimento. A conversão alimentar foi obtida pela divisão do consumo de ração pelo ganho de peso das aves. A mortalidade foi considerada para o cálculo da conversão alimentar.

Ao final do período experimental proposto, seis animais de cada tratamento foram eutanaseados por deslocamento cervical e os tecidos do fígado e peito (*Pectoralis superficialis*) foram coletados e armazenados em RNA Holder® (*BioAgency Biotecnologia*, Brasil) à -20°C até o momento da extração de RNA. Destes seis animais, apenas três de cada tratamento, foram utilizados para as análises de expressão gênica.

O RNA total 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. Todos os materiais utilizados foram previamente tratados com inibidor de RNase - RNase AWAY® (*Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA*). O tecido foi triturado com homogenizador elétrico Polytron (tecido + Trizol) até à completa dissociação. Logo após, foi adicionado 200 uL de clorofórmio e homogeneizado manualmente por 1 minuto. As amostras foram, então, centrifugadas por 15 minutos a 12.000 rpms a 4°C; e a fase líquida foi coletada e transferida para tubo limpo, com adição de 500 uL de isopropanol em cada tubo. As amostras foram homogeneizadas, centrifugadas por 15 minutos a 12.000 rpms, a 4°C. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado foi lavado em 1 mL de etanol 75%. O material foi centrifugado novamente a 12.000 rpms por 5 minutos, e o sobrenadante foi descartado. O pelet foi seco por 15 minutos e então, ressuspenso em água ultrapura livre de RNase.

A concentração total de RNA foi mensurada usando espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm. A integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio 10% e visualizado em luz ultravioleta. As amostras de RNA foram tratadas com DNase I (*Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA*), para remoção de possíveis resíduos de DNA genômico, de acordo com as recomendações do fabricante.

Para confecção do cDNA, foi utilizado o kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis Super Mix (*Invitrogen Corporation, Brasil*) de acordo com as normas do

fabricante. Em tubo estéril e livre de RNA, foram adicionados 6 uL de RNA total, 1 uL de oligo (dT) (50uM oligo(dT)₂₀) e 1uL de tampão de anelamento. A reação foi incubada por 5 minutos a 65°C e então colocada no gelo por 1 minuto. Foram adicionados em seguida 10 uL de solução 2x First-Strand Reaction Mix e 2 uL de solução contendo a enzima transcriptase reversa SuperScript III e inibidor de RNase. A solução foi incubada por 50 minutos a 50°C, para que ocorresse a síntese do DNA complementar. A reação foi então incubada por 5 minutos a 85°C e imediatamente colocada sob o gelo. As amostras foram armazenadas a -20°C até o momento do uso.

Para as reações de PCR em tempo real, foi utilizado o corante fluorescente SYBR GREEN (SYBR® GREEN PCR Máster Mix (Applied Biosystems, USA). As análises de PCR em tempo real foram realizadas no aparelho StepOnePlus v.2.2 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA). Todas as reações foram submetidas às mesmas condições de análise e normalizadas pelo sinal do corante de referência passiva ROX Reference Dye (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), para correção de flutuações na leitura decorrentes das variações de volume e evaporação ao longo da reação.

Os primers utilizados nas reações foram desenhados de acordo com as sequências dos genes GHR e IGF-I, depositados no site www.ncbi.nlm.nih.gov (nº de acesso-NM001001293.1 e FJ977570.1, respectivamente), usando o site www.idtdna.com (Tabela 2). Foram testados dois controles endógenos, os genes da β -actina e do GAPDH, sendo utilizado o gene da β -actina (nº de acesso - L08165), por ter apresentado melhor eficiência na reação. Todas as análises foram realizadas em um volume de 25 uL e em duplicatas.

Tabela 2 - Primers para qRT-PCR

Gene	Amplicom (pb)	Temperatura de Anelamento (°C)	Sequências dos primers (5'-3')
GHR	145	60°C	AACACAGATACCCAACAGCC AGAAGTCAGTGTTTGTTCAGGG
IGF-I	140	60°C	CACCTAAATCTGCACGCT CTTGTGGATGGCATGATCT
β -actina	136	60°C	ACCCCAAAGCCAACAGA CCAGAGTCCATCACAATACC

O método $2^{-\Delta CT}$ foi utilizado para as análises de quantificação relativa. A análise estatística foi realizada por metodologia de Inferência Bayesiana. Foi considerado que a resistência (Y_i) segue distribuição de Normal, isto é, $Y_i \sim \text{Normal}(\mu_i, \sigma_i^2)$, $i = 1, 2, \dots, n_j$

para os j -ésimos Tratamentos. Para cada μ_i e σ_i^2 foram consideradas *a priori* distribuições não-informativas, respectivamente, $\mu_i \sim \text{Normal}(0,10^6)$ e $\sigma_i^2 \sim \text{Gamma}(10^3,10^3)$. Foram realizadas comparações múltiplas entre as distribuições *a posteriori* das médias. Consideraram-se como diferentes, ao nível de 5% de significância, os tratamentos cujos intervalos de credibilidade para as diferenças médias não contemplam o valor zero. A obtenção das distribuições marginais *a posteriori* para todos os parâmetros, foi por meio do pacote BRugs do programa R (*R Development Core Team*, 2011). Foram gerados 110.000 de valores em um processo MCMC (Monte Carlo Markov Chain), considerando um período de descarte amostral de 10.000 valores iniciais, e, assim a amostra final contém 100.000 valores gerados. A convergência das cadeias foi verificada por meio do pacote CODA do programa R, pelo critério de Heidelberger e Welch (1983). Os resultados foram apresentados como médias *a posteriori* com seus desvios padrões representados pela barra vertical.

Resultados

Os primers para os genes do fator de crescimento semelhante a insulina I (IGF-I), e para o receptor do hormônio do crescimento (GHR) se mostraram adequados para as análises de PCR em tempo real realizadas neste trabalho. As análises das curvas de melting não revelaram qualquer presença de produtos inespecíficos (mais de um pico) ou formação de dímeros de primers (picos de T_m inespecíficos), mostrando a confiabilidade dos dados na estimativa da expressão de mRNA dos genes avaliados (Figura 1). A β -actina, utilizada como controle endógeno neste estudo, não mostrou diferença estatística entre os tratamentos estudados, comprovando a eficiência de seu uso na reação.

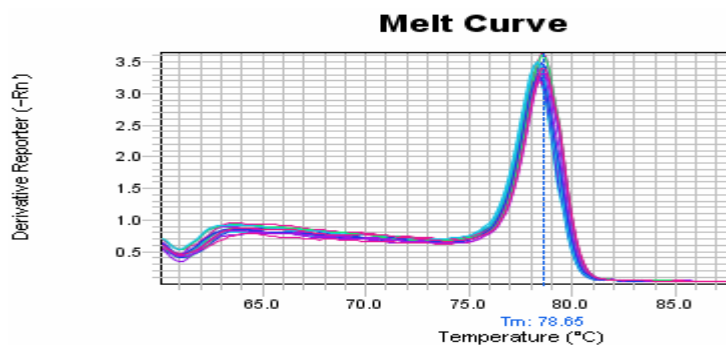


Figura 1- Curva de melting para o gene da β -actina.

A tabela 3 apresenta os resumos *a posteriori* (médias, desvio-padrão, medianas e intervalos de credibilidade em nível de 95%, dado pelos percentis $p_{2,5\%}$ e $p_{97,5\%}$) das estimativas dos parâmetros analisados, ganho de peso, conversão alimentar e expressão de mRNA GHR e IGF-I no músculo e fígado. Observando esta tabela, pode-se constatar que as distribuições *a posteriori* dos parâmetros avaliados são simétricas, já que média e mediana apresentaram valores próximos. Assim, optou-se pela média para representação dos dados.

Tabela 3 - Sumário *a posteriori* para os tratamentos avaliados sobre o ganho de peso (g), conversão alimentar (g/g) e expressão dos genes GHR e IGF-I (UA) no fígado e músculo

	Tratamentos	Média	Desvio-Padrão	Mediana	$p_{2,5\%}$	$p_{97,5\%}$ ¹
GP	BASAL	1610,00	29,12	1610,00	1551,00	1667,00
	DL1	1793,00	23,27	1793,00	1746,00	1838,00
	DL2	1827,00	45,25	1828,00	1735,00	1911,00
	MHA-FA1	1723,00	46,22	1725,00	1635,00	1803,00
	MHA-FA2	1778,00	40,26	1778,00	1696,00	1855,00
CA	BASAL	1,88	0,02	1,88	1,89	1,92
	DL1	1,68	0,01	1,68	1,65	1,71
	DL2	1,58	0,01	1,58	1,54	1,61
	MHA-FA1	1,72	0,02	1,72	1,68	1,77
	MHA-FA2	1,62	0,02	1,62	1,57	1,67
GHR- Fígado	BASAL	1,89	0,19	1,89	1,50	2,28
	DL1	3,51	1,15	3,51	1,41	5,63
	DL2	3,31	0,47	3,32	2,47	4,16
	MHA-FA1	2,52	0,66	2,52	1,20	3,84
	MHA-FA2	2,47	0,44	2,47	1,64	3,28
GHR- Músculo	BASAL	0,18	0,04	0,18	0,11	0,26
	DL1	0,25	0,01	0,25	0,22	0,28
	DL2	0,24	0,06	0,24	0,12	0,37
	MHA-FA1	0,23	0,04	0,23	0,15	0,32
	MHA-FA2	0,17	0,04	0,17	0,08	0,25
IGF-I- Fígado	BASAL	0,26	0,06	0,26	0,14	0,37
	DL1	0,97	0,03	0,97	0,90	1,04
	DL2	1,56	0,06	1,56	1,43	1,68
	MHA-FA1	0,77	0,04	0,77	0,69	0,86
	MHA-FA2	0,88	0,11	0,88	0,64	1,11
IGF-I- Músculo	BASAL	0,56	0,37	0,57	0,12	1,25
	DL1	0,79	0,30	0,79	0,23	1,36
	DL2	1,06	0,42	1,06	0,29	1,84
	MHA-FA1	0,81	0,18	0,81	0,45	1,17
	MHA-FA2	0,81	0,08	0,81	0,66	0,97

¹ $p_{2,5\%}$ e $p_{97,5\%}$: intervalo de 95% de credibilidade.

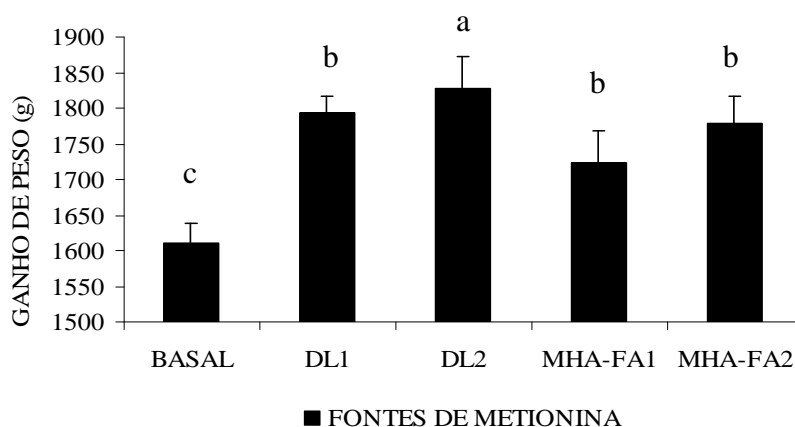
Na tabela 4, são apresentados os valores dos contrastes *a posteriori* entre os parâmetros avaliados, sobre a expressão do GHR e IGF-I no fígado. Com base nos resultados do intervalo de 95% de credibilidade, foi possível verificar a ocorrência de diferença significativa entre os tratamentos. A análise dos resultados de expressão dos genes GHR e IGF-I no músculo, também foi realizada a partir dos resultados dos contrastes *a posteriori*, entretanto, como não houve diferença estatística para a expressão destes genes no músculo, a tabela 4 não contém os resultados dos contrastes (dados em anexo).

Tabela 4 - Estimativas *a posteriori* das distribuições dos contrastes entre os tratamentos avaliados sobre a expressão dos genes GHR e IGF-I (UA) no fígado

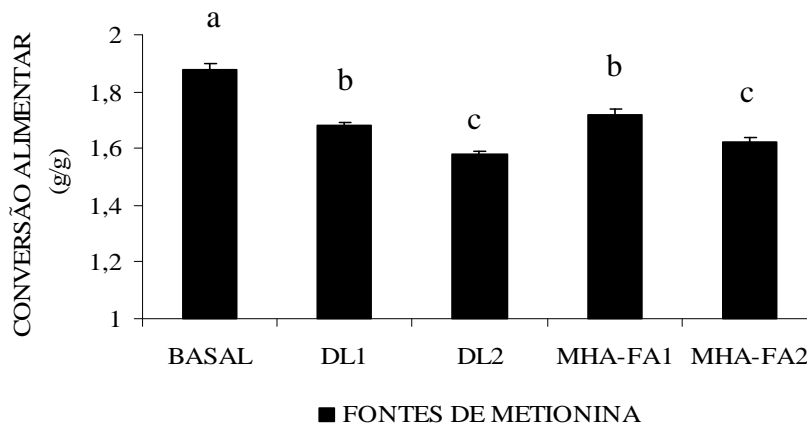
	Contrastes	Média	Desvio-padrão	Mediana	p _{2,5%}	p _{97,5%} ¹
IGF-I	Δ1	-0,71*	0,07	-0,71	-0,84	-0,57
	Δ2	-1,30*	0,09	-1,30	-1,47	-1,12
	Δ3	-0,51*	0,07	-0,51	-0,65	-0,37
	Δ4	-0,62*	0,13	-0,62	-0,88	-0,36
	Δ5	-0,59*	0,07	-0,59	-0,73	-0,44
	Δ6	0,19*	0,05	0,19	0,08	0,30
	Δ7	0,09	0,12	0,09	-0,15	0,33
	Δ8	0,78*	0,08	0,78	0,63	0,94
	Δ9	0,68*	0,13	0,68	0,41	0,94
	Δ10	-0,10	0,12	-0,10	-0,35	0,14
GHR	Δ1	-1,61	1,16	-1,61	-3,77	0,50
	Δ2	-1,42*	0,51	-1,42	-2,35	-0,49
	Δ3	-0,63	0,69	-0,63	-1,99	0,73
	Δ4	-0,57	0,48	-0,57	-1,48	0,33
	Δ5	0,19	1,24	0,19	-2,10	2,49
	Δ6	0,98	1,32	0,98	-1,50	3,47
	Δ7	1,04	1,23	1,03	-1,22	3,33
	Δ8	0,79	0,81	0,79	-0,77	2,36
	Δ9	0,84	0,65	0,84	-0,35	2,04
	Δ10	0,05	0,79	0,05	-1,51	1,61

Δ1= contraste entre dieta basal e DL1; Δ2= contraste entre dieta basal e DL2; Δ3= contraste entre dieta basal e MHA-FA1; Δ4= contraste entre dieta basal e MHA-FA2; Δ5= contraste entre DL1 e DL2; Δ6= contraste entre DL1 e MHA-FA1; Δ7= contraste entre DL1 e MHA-FA2; Δ8= contraste entre DL2 e MHA-FA1; Δ9= contraste entre DL2 e MHA-FA2; Δ10= contraste entre MHA-FA1 e MHA-FA2; * Diferença estatística significativa a 5%.

A suplementação de qualquer uma das fontes de metionina e em qualquer um dos níveis avaliados proporcionou melhor ganho de peso para as aves, sendo o segundo nível de DL-metionina o que levou a melhores resultados. Não houve diferença entre os níveis de suplementação de MHA-FA sobre o ganho de peso (Figura 2A). A conversão alimentar também foi melhorada com a suplementação de metionina, não tendo havido, dentro de cada nível, diferença entre as fontes de suplementação (Figura 2B).



A



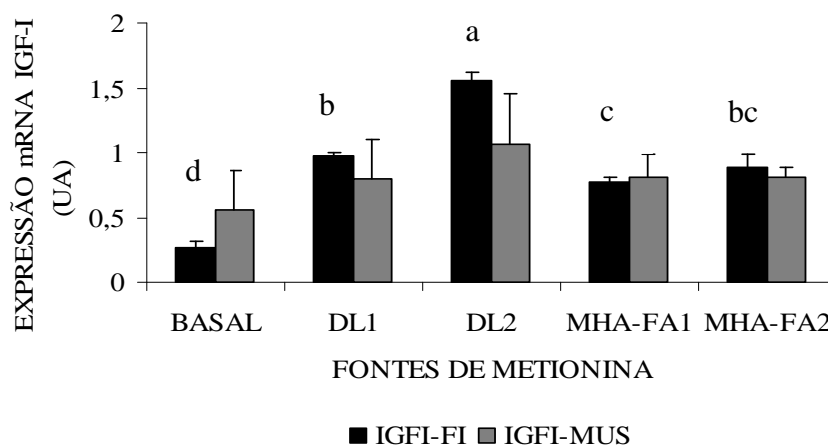
B

Figura 2- Resultados de ganho de peso (A) e conversão alimentar (B) de frangos de corte recebendo dieta basal ou com suplementação de duas fontes e dois níveis de metionina. Os resultados são apresentados como médias *a posteriori* e seus desvios padrões representados pelas barras verticais. Letras diferentes representam diferenças estatísticas pelo intervalo de 95% de credibilidade.

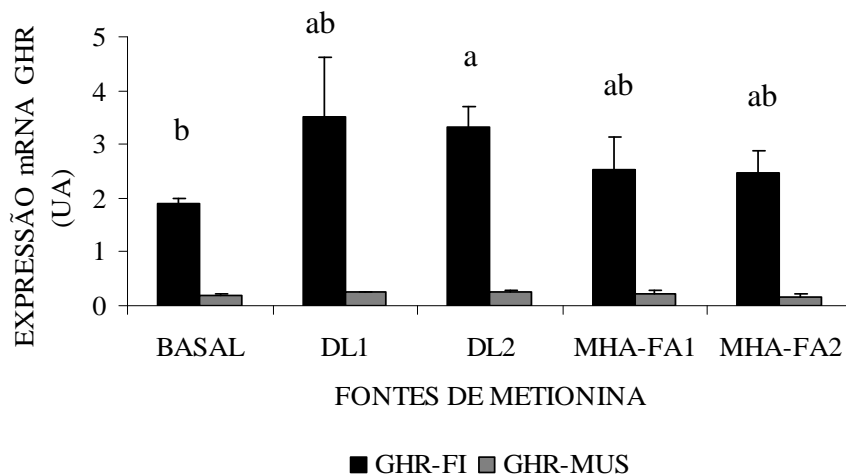
A expressão dos genes IGF-I e GHR no fígado e no músculo dos frangos de corte é mostrada na figura 3. A expressão de mRNA IGF-I no músculo das aves não foi

influenciada pela suplementação de metionina. Já, no fígado, houve diferença significativa na expressão gênica dos animais alimentados com dieta basal comparado aos que receberam alguma fonte de suplementação. A suplementação do segundo nível de DL-metionina levou à maior expressão em relação àqueles animais alimentados com o primeiro nível de DL-metionina (1,56 UA vs 0,97 UA), e maior expressão também quando comparado com aves alimentadas com ambos os níveis de MHA-FA (Figura 3A).

Quando comparado a expressão de mRNA GHR no fígado e no músculo, pode-se observar que ocorre maior expressão no fígado independente da dieta oferecida. A expressão deste gene no músculo, assim como a expressão de IGF-1, também não foi influenciada pela suplementação de metionina. Entretanto, no fígado, foi observada diferença significativa entre os tratamentos basal e segundo nível de DL-metionina, sendo observada maior expressão nos animais que consumiram dieta com a adição deste aminoácido (Figura 3B).



A



B

Figura 3- Expressão de mRNA IGF-I (A) e mRNA GHR (B) no fígado e músculo de frangos de corte recebendo dieta basal ou com suplementação de duas fontes e dois níveis de metionina. Os resultados são médias *a posteriori* com seus desvios padrões representados pela barra vertical. Letras diferentes entre os tratamentos representam diferenças estatísticas pelo intervalo de 95% de credibilidade.

Discussão

Por ser a metionina um aminoácido essencial para as aves, muitos trabalhos têm relacionado sua suplementação com melhor desempenho destes animais (Oliveira et al., 2006; Silva Junior et al., 2006; Whitaker et al., 2002). Muitos destes estudos comparam a eficácia das duas principais fontes comerciais de suplementação disponíveis no mercado, a DL-metionina e a metionina hidróxi análogo, MHA-FA, sobre características como ganho de peso e eficiência alimentar. Estes estudos obtiveram resultados semelhantes, bioeficácia de 65% do MHA-FA em relação à DL-metionina (Moura et al., 2010; Viana et al., 2009; Bunchasak et al., 2006; Payne et al., 2006; Lemme et al., 2002). Esta diferença é devida em parte, à composição química dos dois produtos: o MHA-FA apresenta na sua formulação, além de metionina, 12% de água e impurezas, enquanto a DL-metionina é uma substância em pó, composta apenas por monômeros deste aminoácido (99%) (Lemme et al., 2007).

Neste estudo, foi observado que a suplementação de qualquer uma das duas fontes levou a melhor desempenho, quando comparado a animais que receberam dieta basal, isso se deve em parte, ao fato de que a metionina participa não apenas na síntese

protéica, mas também em outras reações metabólicas importantes, para manter o desempenho adequado. O segundo nível de suplementação de DL-metionina foi o que proporcionou melhor resultado para ganho de peso (1827 g) e melhor eficiência alimentar. É possível verificar que o maior nível de suplementação avaliado, permitiu melhor conversão de alimentos em deposição corporal (Figura 2). E que dentro de cada nível de suplementação, não houve diferença significativa entre as fontes comerciais (Viana et al., 2009). O fato de não terem sido observadas diferenças entre as duas fontes pode ser devido ao nível de proteína bruta contido na dieta. Pequenas diferenças de desempenho entre fontes de aminoácidos são de difícil percepção, quando há alta concentração de proteína (Visentini et al., 2005).

O crescimento é devido em grande parte à deposição protéica, esta por sua vez, é dada por um balanço entre a síntese e a degradação de proteína pelo metabolismo animal. Autores afirmam que estes dois caminhos distintos são produtos da mesma rota biológica (Sacheck et al., 2004), e que a concentração hormonal e a dieta são fatores que podem determinar qual destes irá prevalecer.

O principal objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da suplementação de diferentes fontes e diferentes níveis de metionina na dieta dos frangos de corte, sobre a expressão dos genes envolvidos no crescimento animal. O crescimento é dado pela ação do eixo somatotrópico, com ação principal do hormônio do crescimento (GH). A atividade do GH sobre o crescimento é mediada pela ação do IGF-I, a presença de GH no organismo induz à síntese e à liberação deste hormônio, por intermédio do receptor de GH (GHR). A ligação do GH a um local específico em seu receptor é seguida por alterações conformacionais que estimula diversas rotas de sinalização, entre estas a via que envolve a Janus quinase 2 (JAK2), e leva a diferentes respostas celulares, como síntese e liberação de IGF-I (Kita et al., 2005). Segundo Scanes (2009), o IGF-I possui um importante papel na taxa de crescimento de aves, e quanto menor o nível de IGF-I encontrado, pior será o crescimento corporal.

Maior quantidade de mRNA IGF-I no fígado foi observada para aqueles animais que receberam dietas com suplementação de metionina. Diversos autores têm relacionado a influência de determinado nutriente sobre a expressão de genes ligados ao crescimento. Dietas deficientes em aminoácidos essenciais, mesmo contendo teor de proteína adequado, levam à redução na expressão de mRNA IGF-I e levam a menores níveis plasmáticos deste hormônio (Kita et al., 2002). A expressão do IGF-I no fígado de ovinos também é reduzida em dietas com menores níveis de metionina (Stubbs et al.,

2002). De acordo com os autores, a metionina é capaz de influenciar a liberação de IGF-I plasmático induzida pelo GH. Os autores não observaram redução na liberação de IGF-I quando os animais receberam dietas com redução no conteúdo total de aminoácidos, e então sugerem, que a limitação de metionina é capaz de bloquear seletivamente as respostas transcricionais ao GH, afetando a expressão do IGF-I no fígado.

Também pode ser observada diferença significativa entre as fontes de suplementação, sendo o maior nível de DL-metionina o que proporcionou maior expressão deste gene. Este fato pode estar relacionado à eficácia da fonte de suplementação, já que de acordo com Miura et al. (1992), a expressão de mRNA IGF-I depende, entre outros fatores, da qualidade da proteína disponibilizada para os animais. Estes autores observaram maiores níveis de mRNA IGF-I no fígado de ratos alimentados com proteína de melhor qualidade (caseína em substituição ao glúten), e maiores quantidades de mRNA de alguns genes, quando os animais recebiam dieta com suplementação de metionina em substituição à proteína da soja.

Quando observamos a suplementação de DL-metionina, pode-se notar que o maior nível de suplementação, levou à maior expressão de IGF-I. De acordo com Carew et al. (2003), a concentração de IGF-I é afetada não apenas pela restrição de metionina, mas também é dependente do grau de deficiência deste aminoácido. Assim, pode ser que a expressão de mRNA IGF-I também seja influenciada pela quantidade de metionina disponibilizada. Katsumata et al. (2002) sugerem que os mecanismos que regulam os níveis plasmáticos de IGF-I sejam mais sensíveis a aminoácidos da dieta, que aqueles que regulam a expressão de mRNA IGF-I. Assim, é necessário uma restrição de maior magnitude para que ocorra diferença na expressão desse gene.

Maior expressão de mRNA IGF-I no músculo, comparada ao fígado, foi observada em aves alimentadas com dieta sem suplementação de metionina (basal) e com menor nível de MHA-FA. De acordo com Katsumata et al. (2002), tecidos extra-hepáticos expressando altos níveis de mRNA IGF-I sugerem que a redução na concentração plasmática deste hormônio, que ocorre com dietas com restrição de um aminoácido, como a lisina, pode estar relacionada à expressão reduzida de mRNA IGF-I em outros tecidos além do fígado. Para testar essa possibilidade, os autores analisaram os níveis de mRNA IGF-I no músculo *longissimus dorsi* de suínos, no entanto, a expressão de IGF-I neste tecido não diferiram entre as dietas. Assim como o observado pelos autores, a suplementação de metionina avaliada neste experimento, não

influenciou a expressão de mRNA IGF-I no músculo das aves. Visto que o fígado é o principal local de síntese deste hormônio, (Schwander et al., 1983), este pode ter sofrido maior influência da dieta, possivelmente por sinais transcricionais e traducionais.

Neste trabalho, foi observado efeito da suplementação de metionina sobre a expressão do gene GHR no fígado, e, pode-se verificar que o consumo da dieta basal levou à redução significativa na quantidade de mRNA GHR neste tecido (Brameld et al., 1999; Katsumata et al., 2002). Quando analisado dentro de cada fonte, pode-se observar que o menor nível de metionina tendeu a uma maior quantidade de mRNA GHR. Estes resultados são o inverso dos encontrados para expressão de mRNA IGF-I no fígado dos frangos de corte, tendo o menor nível de suplementação levado à menor expressão do gene codificador deste hormônio. Kim et al. (2010) sugere que expressão de GHR pode ser reduzida diretamente pela quantidade de GH presente no organismo, ou que essa influência possa ocorrer por intermédio do IGF-I. Assim, pode ser que maior quantidade de IGF-I, o que aconteceu no maior nível de suplementação de cada fonte de metionina, possa ter levado à menor expressão de GHR. Lu et al. (2008) observaram padrão de expressão inverso para mRNA GH e mRNA GHR, e sugerem que esses dois genes possam exercer papel sensorial invertido, transmitindo padrão de expressão inversa no perfil de sinalização dos mecanismos que regulam o crescimento.

De acordo com os resultados encontrados na literatura, a expressão de mRNA GHR influenciada pela dieta, ocorre de forma dependente de tecido. Os resultados deste trabalho corroboram esta hipótese, já que diferentemente do observado no fígado, no músculo não houve efeito da suplementação de metionina sobre a expressão de mRNA GHR. Katsumata et al. (2002), observaram que a redução na quantidade de lisina da dieta leva à menor expressão de mRNA GHR no fígado de suínos. Entretanto, no músculo, dietas com restrição deste aminoácido levou à maior expressão de tal gene. Dauncey et al. (1994) sugerem que como o GH exerce funções diferentes no músculo e no fígado, a expressão de GHR, regulada pelo estado nutricional, também possa ocorrer de forma distinta nestes tecidos.

Ambos os fatores, inclusão de metionina na dieta e maior concentração de IGF-I, levam à deposição protéica, não apenas por estimular a síntese protéica, mas também por causar redução na degradação das proteínas. O efeito da suplementação de metionina sobre a expressão dos fatores de crescimento, como o GHR e IGF-I, pode estar relacionado com a atividade da mTOR (mammalian Target of Rapamycin), enzima envolvida na regulação da síntese protéica (Stubbs et al., 2002), por mecanismos

dependentes ou independentes de insulina. Os aminoácidos atuam não apenas no início da tradução e sobre os fatores de alongação, mas também agem sobre rotas de sinalização para síntese de proteínas que antes eram pensadas ser influenciadas apenas por hormônios (Kimball e Jefferson, 2006). A expressão de genes envolvidos na degradação protéica pode ser reduzida não apenas por fatores de crescimento, mas também pela disponibilidade de metionina da dieta (Tesserau et al., 2007).

Conclusões

A suplementação de metionina proporciona melhor ganho de peso e conversão alimentar, independente da fonte ou nível de suplementação utilizado. A expressão dos genes IGF-I e GHR no fígado é influenciada pela adição de metionina, sendo, a maior quantidade de mRNA IGF-I e mRNA GHR e melhores resultados de desempenho, observados no segundo nível (0,08) de DL-metionina.

Refêrencias

- AMARANTE JÚNIOR, V.S.; PERAZZO, F.G.C.; BARROS, L.R. et al. Níveis de metionina+cistina nos períodos de 22 a 42 e de 43 a 49 dias de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.4, p.1195-1201, 2005.
- BRAMELD, J.M.; GILMOUR, R.S.; BUTTERY, P.J. Glucose and amino acids interact with hormones to control expression of insulin-like growth factor-I and growth hormone receptor mRNA in cultured pig hepatocytes. **Journal of Nutrition**, v.129, p.1298-1306, 1999.
- BUNCHASAK, C.; SOOKSRIDANG, T.; CHAIYAPIT, R. Effect of Adding Methionine Hydroxy Analogue as Methionine Source at the Commercial Requirement Recommendation on Production Performance and Evidence of Ascites Syndrome of Male Broiler Chicks Fed Corn-Soybean Based. **International Journal of Poultry Science**, v.5, n.8, p.744-752, 2006.
- CAREW, L.B.; MCMURTY, J.P.; ALSTER, F.A. Effects of methionine deficiency on plasma levels of thyroid hormones, insulin-like growth factor-I and -II, liver and body weights, and feed intake in growing chickens. **Poultry Science**, v.82, p.1932-1938, 2003.
- DAUNCEY, M.J.; BURTON, K.A.; WHITE, P. et al. Nutritional regulation of growth hormone receptor gene expression. **FASEB Journal**, v.8, p.81-88, 1994.
- DIBNER, J.J. Review of the metabolism of 2-hydroxy-4-(methylthio)butanoic acid to L-methionine in the chick: a stereospecific pathway. **Journal of Nutrition**, v.114, p.1716-1723, 2003.
- HEIDELBERGER, P.; WELCH, P. Simulation run length control in the presence of an initial transient. **Operations Research**, v.31, p.1109-1144, 1983.
- INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES- IDT. Disponível em: <<http://www.idtdna.com/Home/Home.aspx>> Acesso em: março de 2010.
- JASMAN, A.J.M.; KAN, C.A.; WIEBENGA, J. **Comparison of the biological efficacy of DL-methionine and hydroxy-4-methylthiobutanoic acid (HMB) in pigs and**

- poultry**. Netherlands: Centraal Veevoederbureau (CVB, Central Bureau for livestock feeding), Documentation Report No29:55, 2003.
- KATSUMATA, M.; KAWAKAMI, S.; KAJI, Y. et al. Differential Regulation of Porcine Hepatic IGF-I mRNA Expression and Plasma IGF-I Concentration by a Low Lysine Diet. **Journal of Nutrition**, v.132, p.688-692, 2002.
- KIM, J.W. The Endocrine Regulation of Chicken Growth. **Asian - Australasian Journal of Animal Sciences**, v.23, n.12, p.1668-1676, 2010.
- KIMBALL, S.R.; JEFFERSON, L.S. Signaling pathways and molecular mechanisms through which branched-chain amino acids mediate translational control of protein synthesis. **Journal of Nutrition**, v.136, p.227-231, 2006.
- KITA, K.; NAGAO, K.; OKUMURA, J. Nutritional and tissue Specificity of IGF-I and IGFBP-2 Gene Expression in Growing Chickens- A Review. **Asian - Australasian Journal of Animal Sciences**, v.18, n.5, p.747-754, 2005.
- KITA, K.; NAGAO, K.; TANEDA, N. et al. Insulin-like growth factor binding protein-2 gene expression can be regulated by diet manipulation in several tissues of young chickens. **Nutrition**, v.132, p.145-151, 2002.
- LEMME, A.; HOEHLER, D.; BRENNAN, J.J. Relative Effectiveness of methionine hydroxy analog compared to DL-methionine in broiler chicken. **Poultry Science**, v.81, p.838-845, 2002.
- LEMME, A.; PETRI, A.; REDSHAW, M. **Revisão: O que há de novo sobre as fontes comerciais de metionina em aves**. (S.L.): Degussa Feed Additives-amino acids and more, 2007. 34p.
- LU, F.Z.; WANG, X.X.; PAN, Q.X. et al. Expression of Genes Involved in the Somatotropic, Thyrotropic, and Corticotropic Axes During Development of Langshan and Arbor Acres Chickens. **Poultry Science**, v.87, p.2087-2097, 2008.
- MARCHIZELI, P.C.A. **Glutamato de Sódio e fontes de metionina sobre o desempenho, morfometria intestinal e excreção de nitrogênio de poedeiras comerciais**. 2009. 57f. Dissertação (Mestrado em Zootenia) - Faculdade de ciências agrárias e veterinária-UNESP, Jaboticabal.
- MIURA, Y.; KATO, H.; NOGUCHI, T. Effect of dietary proteins on insulin-like growth factor-I (IGF-I) messenger ribonucleic acid content in rat liver. **British Journal of Nutrition**, v.67, p.257-265, 1992.
- MOURA, A.M.A.; MELO, T.V.; MIRANDA, D.J.A. Utilização da DL-metionina e metionina hidroxí-análoga na alimentação de aves. **Boletim de Indústria animal**, v.67, n.1, p.97-107, 2010.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHONOLOGY INFORMATION. National Center for Biotechnology Information [home page]. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: março de 2010.
- OLIVEIRA, R.F.M.; DONZELE, J.L.; ABREU, M.L.T. et al. Efeitos da temperatura e da umidade relativa sobre o desempenho e o rendimento de cortes nobres de frangos de corte de 1 a 49 dias de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, p.797-803, 2006.
- PAYNE, R.L.; LEMME, A.; SEKO, H. Bioavailability of methionine hydroxy analog-free acid relative to DL-methionine in broilers. **Animal Science Journal**, v.77, p.427-439, 2006.
- ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L. et al. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 2. ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2005. 186p.
- SACHECK, J.M.; OHTSUKA, A.; MCLARY, S.C. et al. IGF-I stimulates muscle growth by suppressing protein breakdown and expression of atrophy-related

- ubiquitin ligases, atrogin-1 and MuRF1. **American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism**, v.287, p.E591-E601, 2004.
- SCANES, C.G. Perspectives o the endocrinology of poultry growth and metabolism. **General and Comparative Endocrinology**, v.163, p.24-32, 2009.
- SCHWANDER, J.C.; HAURI, C.; ZAPF, J. et al. Synthesis and secretion of insulin-like growth factor and its binding protein by the perfused rat liver: dependence on growth hormone status. **Endocrinology**, v.113, p.297-305, 1983.
- SILVA JUNIOR, R.G.C.; LANA, G.R.Q.; RABELLO, C.B.V. et al. Exigências de metionina + cistina para frangos de corte fêmeas de 1 a 21 e de 22 a 42 dias de idade criados em região de clima tropical. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.2, p.497-503, 2006.
- STUBBS, A.K.; WHEELHOUSE, N.M.; LOMAX, M.A. et al. Nutrient-hormone interaction in ovine liver: methionine supply selectively modulates growth hormone-induced IGF-1 gene expression. **Journal of Endocrinology**, v.174, p.335-341, 2002.
- TESSERAUD, S.; COUSTARD-MÉTAYER, S.,; BOUSSAID, S. et al. Insulin and amino acid availability regulate atrogin-1 in avian QT6 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.357, p. 181-186, 2007.
- VAN VUGHT, A.J.A.H.; NIEUWENHUIZEN, A.G.; BRUMMER, R.J.M. et al. Effects of Oral Ingestion of Amino Acids and Proteins on the Somatotropic Axis. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.93, n.2, p.584-590, 2008.
- VIANA, M.T.S.; ALBINO, L.F.T.; ROSTAGNO, H.S. et al. Methionine sources and levels in broilers chick diets. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.1751-1756, 2009.
- VISENTINI, P.; LOPES, J.; TOLEDO, G.S. et al. Níveis de substituição da DL-metionina pela metionina hidroxianáloga em base equimolar, em dietas para frangos de corte. **Ciência Rural**, v.35, p.1400-1405, 2005.
- WHITAKER, H.M.A; MENDES, A.A.; GARCIA, E.A. et al. Efeito da suplementação de metionina sobre o desempenho e a avaliação de carcaças de frangos de corte. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.4, p.1-9, 2002.

IV. Expressão de genes mitocondriais em resposta a suplementação de metionina na dieta de frangos de corte

RESUMO- Este trabalho teve como objetivo avaliar a expressão de mRNA da UCP (proteína desacopladora), mRNA ANT (transportador de nucleotídeos de adenina) e mRNA COXIII (citocromo c oxidase subunidade III) e o desempenho de frangos de corte alimentados com duas fontes e dois níveis de metionina comerciais. Foram utilizados frangos de corte de 22 a 42 dias de idade, distribuídos em cinco tratamentos (dieta basal, suplementação de primeiro nível de DL-metionina, segundo nível de DL-metionina, primeiro nível de suplementação de MHA-FA e segundo nível de MHA-FA). Ao final do período experimental, as aves foram abatidas por deslocamento cervical, e o fígado e o músculo do peito foram coletados para extração do RNA total. O cDNA foi amplificado usando primers específicos para os genes analisados na qRT-PCR. Foi observado melhor ganho de peso para animais alimentados com segundo nível de suplementação de DL-metionina. Foram mais eficientes na conversão alimentar as aves que receberam dietas com segundo nível de suplementação de metionina, independente da fonte comercial. Foi observado significativamente menor quantidade de mRNA UCP no músculo dos animais que consumiram dieta com adição de metionina, independente da fonte e do nível utilizado. A maior expressão deste gene foi observada para dieta basal, tratamento que também foi responsável pela pior eficiência alimentar. A expressão de mRNA UCP no fígado, e de mRNA COX III e mRNA ANT no fígado e no músculo não apresentou variação significativa da suplementação de metionina. Nossos resultados reforçam a idéia de que a metionina, além de ser um aminoácido amplamente conhecido e estudado devido à sua importância nos processos de desenvolvimento e produção das aves, pode atuar de maneira mais pontual, diretamente sobre a expressão de um ou grupo de genes que tornam o animal mais eficiente na conversão dos alimentos.

Palavras-chave: DL-metionina, metionina hidroxí análoga, mRNA ANT, mRNA COXIII, mRNA UCP

Introdução

A evolução genética, sem dúvida, é responsável por grande parte do desenvolvimento alcançado na produção de frangos de corte até os dias atuais, principalmente no quesito conversão alimentar. Já que os gastos com a alimentação podem representar boa parte dos custos de produção na pecuária, a eficiência alimentar se torna cada vez mais um aspecto importante e de grande foco nas pesquisas recentes (Lassiter et al., 2006).

A taxa de crescimento está atrelada à eficiência alimentar, bem como a deposição de massa muscular. A eficiência de um animal em converter alimentos em massa muscular está relacionada com a eficiência na produção de energia. Estudos mostram que aves com menor produção de ATP em função de menor eficiência mitocondrial em produzir ATP a partir de substratos, apresentam pior eficiência alimentar ou conversão alimentar (Bottje & Carstens, 2009). A eficiência na produção de energia depende não somente da perfeita coordenação entre os complexos da cadeia respiratória, mas também de um potente sistema antioxidante que proteja as mitocôndrias dos danos gerados durante a produção de ATP.

Visto que a metionina está associada a melhor desempenho das aves, (Oliveira et al., 2006), e que também é necessária para síntese da glutathione, potente antioxidante mitocondrial e celular (Griffith & Meister, 1985), é necessário que sejam realizadas pesquisas para melhor se compreender como a suplementação deste aminoácido pode influenciar a expressão de genes atuantes na produção de energia nas mitocôndrias. Algumas proteínas importantes envolvidas no processo de produção de ATP pelas mitocôndrias são: UCP (proteína desacopladora), ANT (transportador de nucleotídeos de adenina) e COXIII (citocromo c oxidase subunidade III). Diversos trabalhos mostram a relação entre a expressão dos genes codificadores de tais proteínas com a eficiência alimentar em aves (Bottje et al., 2009; Ojano-Dirain et al., 2007).

Outro aspecto que deve ser levado em consideração é a fonte de metionina que será disponibilizada para as aves, já que diferentes fontes apresentam diferentes disponibilidades e bioeficácias, e podem levar a diferenças no desempenho observado (Lemme et al., 2002; Payne et al., 2006; Viana et al., 2009). As duas principais fontes de metionina utilizadas são DL-metionina (99%) e metionina hidroxí análogo, MHA-FA (88%).

A busca por animais cada vez mais eficientes deixa clara a necessidade de conhecer como nutrientes disponíveis nas dietas atuam no padrão de expressão de genes envolvidos nos processos de produção de energia celular, responsáveis por parte da eficiência alimentar observada nas aves. Assim, o presente trabalho foi desenvolvido com objetivo de avaliar a expressão de mRNA da UCP, mRNA COX III e mRNA ANT no músculo e fígado de frangos de corte alimentados com dietas, contendo duas fontes e dois níveis de suplementação de metionina.

Material e Métodos

Frangos de corte machos (Cobb 500 slow), com um dia de idade, foram obtidos de um incubatório comercial, vacinados para Marek e Gumboro e sexados pela asa. Durante o período inicial (1 a 21 dias de idade), as aves foram alojadas em galpão convencional e criadas sob as mesmas condições experimentais.

Aos 22 dias de idade, as aves foram distribuídas em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 2 (duas fontes e dois níveis de metionina), com a utilização de uma dieta basal (controle) sem adição de metionina industrial, totalizando cinco tratamentos, dieta basal, primeiro nível de suplementação de DL-metionina (DL1), segundo nível de DL-metionina (DL2), primeiro nível de suplementação de MHA-FA (MHA-FA1) e segundo nível de MHA-FA (MHA-FA2), com cinco repetições e 30 aves por Box, totalizando 750 aves.

As rações experimentais (Tabela 1) foram formuladas segundo recomendação de Rostagno et al. (2005). As relações de todos os aminoácidos com a lisina foram aumentadas em 5% para evitar qualquer limitação dos demais aminoácidos essenciais. Em todo período experimental, os animais tiveram livre acesso à água e ração.

Tabela 1 - Composição centesimal das rações experimentais

Ingredientes	Tratamentos experimentais				
	Basal	DL1	DL2	MHA-FA1	MHA-FA2 ¹
Milho 7,8% PB	45,51	45,51	45,51	45,51	45,51
Sorgo 8,0% PB	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00
F. soja 46,7% PB	24,00	24,00	24,00	24,00	24,00
F. carne 46% PB	4,50	4,50	4,50	4,50	4,50
F. vísceras 59% PB	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Óleo de soja	2,80	2,80	2,80	2,80	2,80
DLM 99%	0,00	0,08	0,24	0,00	0,00
MHA-FA 88%	0,00	0,00	0,00	0,11	0,33
L- Lisina HCl 78%	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17
L-Treonina 78%	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
Sal	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34
Calcário 38%	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36
Inerte (Caolin)	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45
Premix ²	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
Total	100,60	100,70	100,90	100,70	100,90
Composição analisada ³ (%)					
PB	19,60	19,60	19,60	19,60	19,60
Lisina digestível	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Met+Cis digestível	0,52	0,59	0,75	0,59	0,75
Treonina digestível	0,68	0,68	0,68	0,68	0,68
Triptofano digestível	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19
Valina digestível	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79
Isoleucina digestível	0,69	0,69	0,69	0,69	0,69
Arginina digestível	1,13	1,13	1,13	1,13	1,13
Composição calculada (%)					
Ca	0,74	0,74	0,74	0,74	0,74
Pd	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38
Sódio	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19
EMA (kcal/kg)	3.150	3.150	3.150	3.150	3.150

¹DL1: primeiro nível de suplementação de DL-metionina, DL2: segundo nível de suplementação de DL-metionina, MHA-FA1: primeiro nível de suplementação de MHA-FA, MHA-FA2: segundo nível de suplementação de MHA-FA. ²Composição por Kg de ração: acetato de retinil, 3,44 mg; colecalciferol, 50 µg; DL- α -tocoferol, 15 mg; tiamina, 1,63 mg; riboflavina, 4,9 mg; piridoxine, 3,26 mg; cianocobalamina, 12 µg; ácido D-pantotênico – 9,8 mg; D-biotina – 0,1 mg; menadiona, 2,4 mg; ácido fólico, 0,82 mg; niacinamida, 35 mg; selênio – 0,2 mg; ferro, 35 mg; cobre, 8 mg; Manganês, 60 mg; Zn, 50 mg; I, 1 mg; colina: 650 mg; salinomicina: 60 mg; avilamicina: 5 mg; Butil hidroxi tolueno, 80 mg.

³Formulações foram feitas com base no total de aminoácidos da farinha de milho e soja analisados pela Evonik Degussa (Hanau, Germany). O coeficiente de digestibilidade de

Rostagno et al. (2005) foi usado para obter a digestibilidade dos aminoácidos. EMA: energia metabolizável aparente.

Para determinação do ganho de peso, todas as aves foram pesadas, no início (22 dias) e final (42 dias) do período experimental. O consumo de ração foi calculado a partir da quantidade de ração oferecida, subtraída da sobra no final do experimento. A conversão alimentar foi obtida pela divisão do consumo de ração pelo ganho de peso das aves. A mortalidade foi considerada para o cálculo da conversão alimentar.

Ao final do período experimental proposto, seis animais de cada tratamento foram eutanaseados por deslocamento cervical e os tecidos do fígado e peito (*Pectoralis superficialis*) foram coletados e armazenados em RNA Holder® (*BioAgency Biotecnologia*, Brasil) à -20°C até o momento da extração de RNA. Destes seis animais, apenas três de cada tratamento, foram utilizados para as análises de expressão gênica.

O RNA total foi extraído com uso do reagente Trizol® (*Invitrogen, Carlsbad CA, USA*) de acordo com as normas do fabricante, na proporção de 1mL para cada 100 mg de tecido. Todos os materiais utilizados foram previamente tratados com inibidor de RNase -RNase AWAY® (*Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA*). O tecido foi triturado com homogenizador elétrico Polytron (tecido + Trizol) até a completa dissociação, logo após foi adicionado 200 uL de clorofórmio e homogeneizado manualmente por 1 minuto. As amostras foram, então, centrifugadas por 15 minutos a 12.000 rpms a 4°C, a fase líquida foi coletada e transferida para tubo limpo, com adição de 500 uL de isopropanol em cada tubo. As amostras foram homogeneizadas, centrifugadas por 15 minutos a 12.000 rpms, a 4°C. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado foi lavado em 1 mL de etanol 75%. O material foi centrifugado novamente a 12.000 rpms por 5 minutos, e o sobrenadante foi descartado. O pelet foi seco por 15 minutos e então, ressuspenso em água ultrapura livre de RNase.

A concentração total de RNA foi mensurada usando espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm. A integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio 10% e visualizado em luz ultravioleta. As amostras de RNA foram tratadas com DNase I (*Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA*), para remoção de possíveis resíduos de DNA genômico, de acordo com as recomendações do fabricante.

Para confecção do cDNA, foi utilizado o kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis Super Mix (*Invitrogen Corporation, Brasil*), de acordo com as normas do

fabricante. Em tubo estéril e livre de RNA, foram adicionados 6 uL de RNA total, 1 uL de oligo (dT) (50uM oligo(dT)₂₀) e 1uL de tampão de anelamento. A reação foi incubada por 5 minutos a 65°C e então colocada sobre o gelo por 1 minuto. Foi adicionado em seguida 10 uL de solução 2x First-Strand Reaction Mix e 2 uL de solução contendo a enzima transcriptase reversa SuperScript III e inibidor de RNase. A solução foi incubada por 50 minutos a 50°C para que ocorresse a síntese do DNA complementar. A reação foi então incubada por 5 minutos a 85°C e, imediatamente, colocada no gelo. As amostras foram armazenada a -20°C até o momento do uso.

Para as reações de PCR em tempo real, foi utilizado o corante fluorescente SYBR GREEN (SYBR® GREEN PCR Máster Mix (Applied Biosystems, USA). As análises de PCR em tempo real foram realizadas no aparelho StepOnePlus v.2.2 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA). Todas as reações foram submetidas às mesmas condições de análise e normalizadas pelo sinal do corante de referência passiva ROX Reference Dye (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), para correção de flutuações na leitura decorrentes das variações de volume e evaporação ao longo da reação.

Os primers utilizados nas reações foram desenhados de acordo com Ojano-Dirain et al. (2007) (Tabela 2). Foram testados dois controles endógenos, os genes da β -actina e do GAPDH, sendo utilizado o gene da β -actina, por ter apresentado melhor eficiência na reação. Todas as análises foram realizadas em um volume de 25 uL e em duplicatas.

Tabela 2 - Primers para qRT-PCR

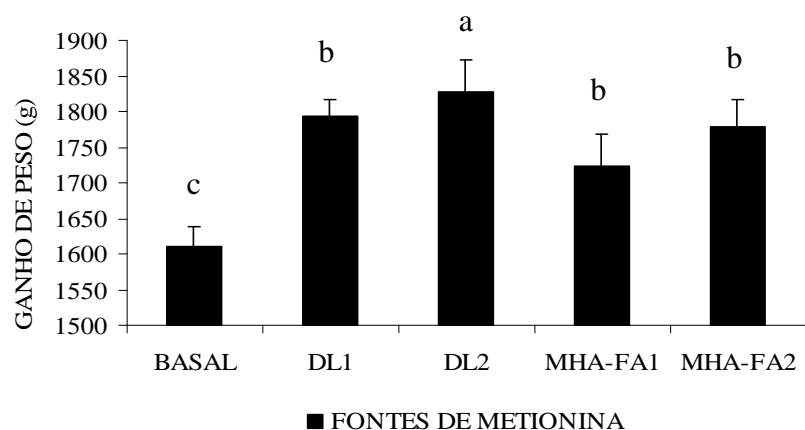
Gene	Amplicom (pb)	Número de acesso	Sequências dos primers (5'-3')
UCP	41	AB088685	GCAGCGGCAGATGAGCTT AGAGCTGCTTCACAGAGTCGTAGA
COX III	71	NP_006921	AGGATTCTATTTCACAGCCCTACAAG AGACGCTGTCAGCGATTGAGA
ANT	67	AB088686	TGTGGCTGGTGTGGTTTCCTA GCGTCCTGACTGCATCATCA
β -actina	136	L08165	ACCCCAAAGCCAACAGA CCAGAGTCCATCACAATACC

O método $2^{-\Delta CT}$ foi utilizado para as análises de quantificação relativa. A análise estatística foi realizada por metodologia de Inferência Bayesiana. Foi considerado que a resistência (Y_i) segue distribuição de Normal, isto é, $Y_i \sim \text{Normal}(\mu_i, \sigma_i^2)$, $i = 1, 2, \dots, n_j$ para os j -ésimos Tratamentos. Para cada μ_i e σ_i^2 foram consideradas *a priori* distribuições não-informativas, respectivamente, $\mu_i \sim \text{Normal}(0, 10^6)$ e $\sigma_i^2 \sim \text{Gamma}$

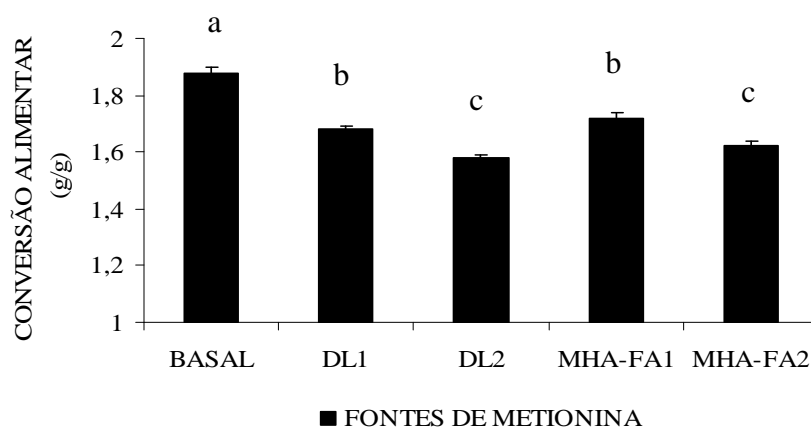
($10^3, 10^3$). Foram realizadas comparações múltiplas entre as distribuições *a posteriori* das médias. Consideraram-se como diferentes, ao nível de 5% de significância, os tratamentos cujos intervalos de credibilidade para as diferenças médias não contemplam o valor zero. A obtenção das distribuições marginais *a posteriori* para todos os parâmetros foi por meio do pacote BRugs do programa R (*R Development Core Team*, 2011). Foram gerados 110.000 de valores em um processo MCMC (*Monte Carlo Markov Chain*), e, considerando um período de descarte amostral de 10.000 valores iniciais, assim a amostra final contém 100.000 valores gerados. A convergência das cadeias foi verificada por meio do pacote CODA do programa R, pelo critério de Heidelberger & Welch (1983). Os resultados foram apresentados como médias *a posteriori* com seus desvios padrões representados pela barra vertical.

Resultados

A suplementação de metionina melhorou significativamente o ganho de peso e a conversão alimentar, sendo os melhores resultados de ganho de peso observado em animais recebendo dieta com segundo nível de suplementação de DL-metionina (Figura 1A). Melhores resultados de conversão alimentar foram observados nas aves que foram alimentadas com dieta contendo segundo nível de DL-metionina (1,58 g/g), e de MHA-FA, entretanto, não se verificou diferenças estatísticas entre as fontes comerciais dentro de um mesmo nível de suplementação (Figura 1B).



A



B

Figura 1- Resultados de ganho de peso (A) e conversão alimentar (B) de frangos de corte recebendo dieta basal ou com suplementação de duas fontes e dois níveis de metionina. Os resultados são apresentados como médias *a posteriori* e seus desvios padrões representados pelas barras verticais. Letras diferentes representam diferenças estatísticas pelo intervalo de 95% de credibilidade.

A técnica de PCR em tempo real permitiu avaliar eficientemente a resposta da expressão dos genes no fígado e músculo dos frangos de corte. Para isto, o Ct dos genes alvos de cada amostra foi normalizado em relação ao Ct do controle endógeno de cada amostra. O gene referência utilizado para normalizar a amplificação dos genes alvo neste trabalho foi o gene da β -actina, já que este apresentou comportamento similar em todos os tratamentos, sem diferença estatística entre eles, o que é desejável e necessário para utilização do controle endógeno.

Os valores das estimativas médias *a posteriori* para as características de expressão de mRNA UCP, mRNA COX III e mRNA ANT são encontrados na Tabela 3. O intervalo de credibilidade em nível de 95% é dado pelos percentis $p_{2,5\%}$ e $p_{97,5\%}$, e a

representação dos dados foi feita pelos valores da média, já que as distribuições *a posteriori* se mostraram simétricas.

Tabela 3 - Sumário *a posteriori* para os tratamentos avaliados sobre a expressão dos genes UCP, COX III e ANT (UA) no fígado e músculo de aves de 22-42 dias

Tratamentos		Média	Desvio-Padrão	Mediana	p _{2,5%}	P _{97,5%} ¹
UCP Fígado	BASAL	0,32	0,08	0,32	-0,06	0,71
	DL1	0,23	0,05	0,23	-0,04	0,52
	DL2	0,20	0,06	0,20	0,04	0,36
	MHA-FA1	0,28	0,05	0,28	0,19	0,37
	MHA-FA2	0,23	0,07	0,23	0,04	0,41
UCP Músculo	BASAL	0,37	0,05	0,37	0,17	0,57
	DL1	0,16	0,04	0,16	0,01	0,30
	DL2	0,07	0,02	0,07	0,02	0,11
	MHA-FA1	0,12	0,05	0,12	0,02	0,22
	MHA-FA2	0,10	0,02	0,10	0,05	0,14
COX III Fígado	BASAL	176,60	62,00	176,70	51,90	299,90
	DL1	174,70	39,40	174,70	95,40	253,10
	DL2	268,60	60,20	270,20	-11,70	540,30
	MHA-FA1	198,30	20,00	198,30	158,50	238,60
	MHA-FA2	188,00	8,24	188,00	171,40	204,40
COX III Músculo	BASAL	181,30	14,99	181,30	151,50	211,20
	DL1	165,80	11,75	165,80	142,50	189,00
	DL2	199,90	35,66	200,10	64,46	333,80
	MHA-FA1	186,80	19,91	186,90	147,60	226,00
	MHA-FA2	205,40	28,90	205,80	98,77	310,40
ANT Fígado	BASAL	29,94	9,00	29,92	-0,70	61,00
	DL1	25,85	4,77	25,83	16,30	35,20
	DL2	27,47	4,30	27,48	19,00	35,90
	MHA-FA1	33,16	5,60	33,17	22,30	43,90
	MHA-FA2	29,61	4,40	29,61	21,10	38,10
ANT Músculo	BASAL	20,15	3,80	20,15	12,30	27,90
	DL1	16,91	2,40	16,91	12,10	21,70
	DL2	13,58	3,40	13,59	6,70	20,30
	MHA-FA1	14,24	4,20	14,25	5,70	22,80
	MHA-FA2	16,69	3,30	16,70	10,00	23,30

¹p_{2,5%} e p_{97,5%}: intervalo de 95% de credibilidade.

As diferenças significativas para os tratamentos avaliados foram observadas pela avaliação dos contrastes *a posteriori* entre os parâmetros (Tabela 4). Além de ganho de peso e conversão alimentar, também foram observadas diferenças significativas para a expressão do mRNA UCP no músculo do peito das aves. A

expressão de mRNA UCP no fígado, e do mRNA COX III e mRNA ANT no músculo e no fígado também foram avaliadas por contrastes *a posteriori* (Dados em anexo).

Tabela 4 - Estimativas *a posteriori* das distribuições dos contrastes entre os tratamentos avaliados sobre a expressão de mRNA UCP (UA) no músculo, do ganho de peso (g) e da conversão alimentar (g/g)

	Contrastes	Média	Desvio-padrão	Mediana	p _{2,5%}	P _{97,5%} ¹
UCP Músculo	Δ1	0,21	0,14	0,21	-0,04	0,46
	Δ2	0,30*	0,10	0,30	0,09	0,50
	Δ3	0,25*	0,11	0,25	0,02	0,47
	Δ4	0,27*	0,10	0,27	0,06	0,47
	Δ5	-0,09	0,10	-0,09	-0,24	0,06
	Δ6	-0,05	0,05	-0,05	-0,16	0,06
	Δ7	-0,03	0,03	-0,03	-0,09	0,03
	Δ8	0,03	0,11	0,03	-0,14	0,22
	Δ9	0,06	0,10	0,06	-0,09	0,21
	Δ10	0,02	0,05	0,02	-0,08	0,13
GP	Δ1	-183,60*	37,27	-183,50	-257,90	-109,90
	Δ2	-217,10*	53,81	-217,90	-320,40	-110,00
	Δ3	-113,60*	54,65	-114,70	-213,20	-9,42
	Δ4	-168,10*	49,63	-168,50	-263,90	-68,40
	Δ5	-33,56*	51,02	-34,50	-130,10	-67,90
	Δ6	69,98	51,84	68,81	-23,12	168,90
	Δ7	15,48	46,57	14,80	-75,48	109,10
	Δ8	103,5*	64,62	103,2	-19,33	-227,30
	Δ9	49,04*	60,53	49,22	-70,09	-167,30
	Δ10	-54,51	61,12	-54,09	-172,30	60,40
CA	Δ1	0,19*	0,02	0,19	0,14	0,24
	Δ2	0,30*	0,02	0,30	0,24	0,35
	Δ3	0,15*	0,03	0,15	0,09	0,21
	Δ4	0,25*	0,03	0,25	0,19	0,32
	Δ5	0,10*	0,02	0,10	0,05	0,15
	Δ6	-0,03	0,02	-0,03	-0,09	0,01
	Δ7	0,06*	0,03	0,06	0,001	0,12
	Δ8	-0,14*	0,03	-0,14	-0,20	-0,08
	Δ9	-0,04	0,03	-0,04	-0,10	0,02
	Δ10	0,10*	0,03	0,10	0,03	0,17

Δ1= contraste entre dieta basal e DL1; Δ2= contraste entre dieta basal e DL2; Δ3= contraste entre dieta basal e MHA-FA1; Δ4= contraste entre dieta basal e MHA-FA2; Δ5= contraste entre DL1 e DL2; Δ6= contraste entre DL1 e MHA-FA1; Δ7= contraste entre DL1 e MHA-FA2; Δ8= contraste entre DL2 e MHA-FA1; Δ9= contraste entre DL2 e MHA-FA2; Δ10= contraste entre MHA-FA1 e MHA-FA2; * Diferença estatística significativa a 5%.

Não houve efeito significativo da suplementação de metionina sobre a expressão do mRNA UCP no fígado. Entretanto, no músculo, os animais alimentados com dieta basal apresentaram maior expressão de mRNA UCP. Animais que receberam menor nível de suplementação de metionina, quando comparados ao segundo nível, também tenderam a apresentar maior expressão, 0,16 UA vs 0,07 UA para DL-metionina, e 0,12 UA vs 0,10 UA para MHA-FA (Figura 2).

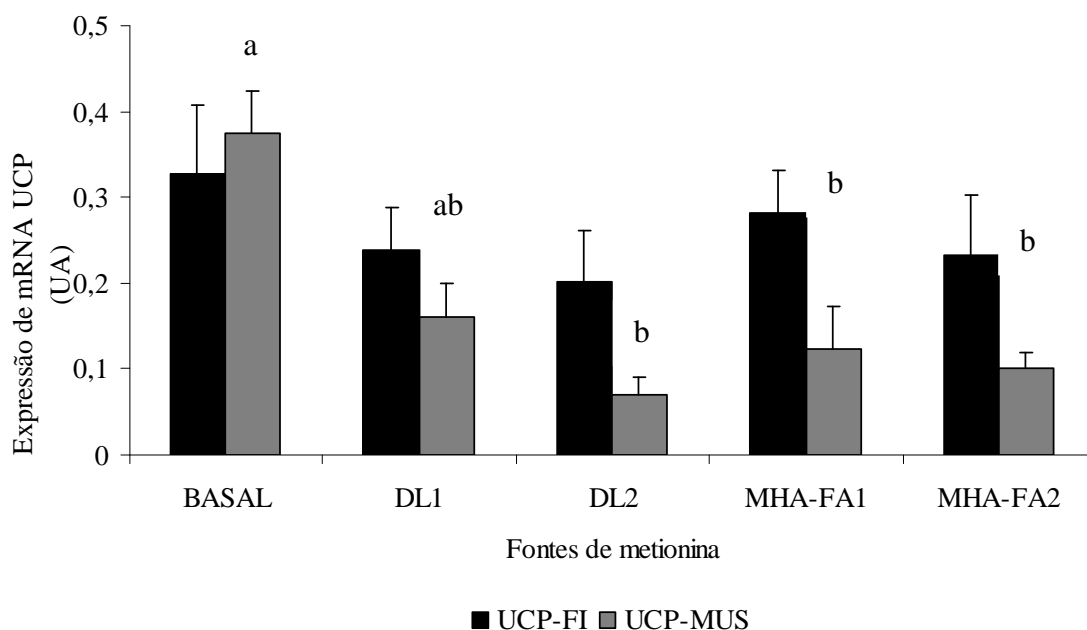


Figura 2 - Expressão de mRNA UCP no fígado (UCP-FI) e músculo (UCP-MUS) de frangos de corte recebendo dieta basal ou com suplementação de duas fontes e dois níveis de metionina. Os resultados são apresentados como médias *a posteriori* e seus desvios padrões representados pelas barras verticais. Letras diferentes entre os tratamentos dentro do músculo representam diferenças estatísticas pelo intervalo de 95% de credibilidade.

A expressão de mRNA COX III foi maior que a expressão dos outros genes avaliados. Isto pode ser notado observando os valores em unidades arbitrárias em ambos os tecidos. Não houve efeito da adição de metionina sobre a expressão deste gene, embora, numericamente observa-se maior expressão em animais alimentados com segundo nível de suplementação de qualquer uma das fontes de metionina (Figura 3A).

Da mesma forma que a expressão do mRNA COX III, a expressão do mRNA ANT também não foi influenciada pelos tratamentos avaliados neste experimento (Figura 3B).

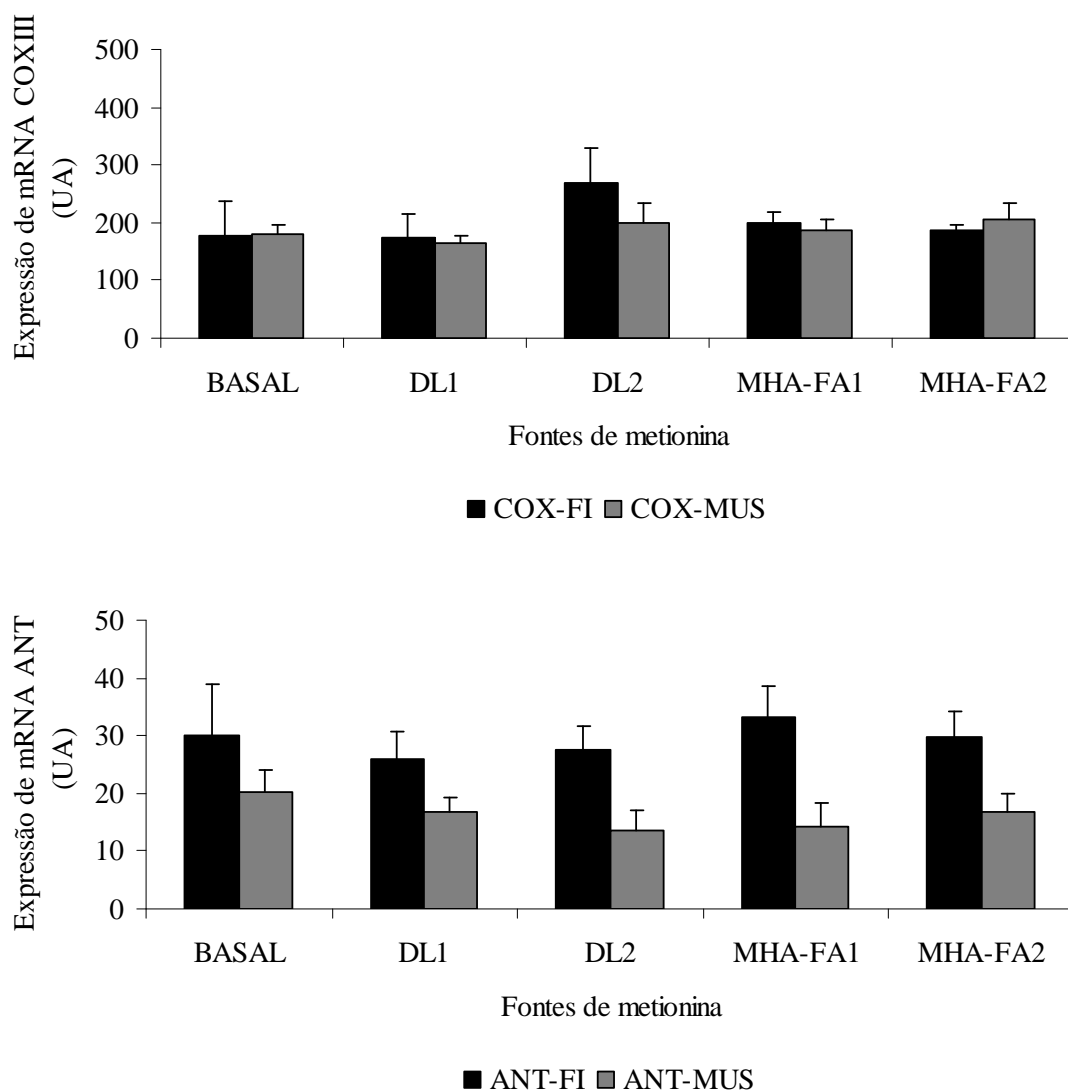


Figura 3 - Expressão de mRNA COX III (A) e mRNA ANT (B) no fígado e músculo de frangos de corte recebendo dieta basal ou com suplementação de duas fontes e dois níveis de metionina. Os resultados são apresentados como médias *a posteriori* e seus desvios padrões representados pelas barras verticais.

Discussão

A produção de energia pelo organismo animal é controlada por uma variedade de mecanismos, e, entre estes, estão fatores genéticos e nutricionais. Com relação aos macronutrientes da dieta, a proteína é o nutriente que apresenta a maior taxa de oxidação, seguida por carboidratos e gordura. Assim, a composição da dieta, relacionada à quantidade de proteína, tem um impacto importante no metabolismo energético e na composição corporal de frangos de corte (Collin et al., 2003).

A suplementação de metionina é um dos fatores nutricionais melhorador do desempenho animal, como ganho de peso, eficiência alimentar, rendimento de cortes nobres e produção / qualidade de ovos (Viana et al., 2009; Daskiranetal et al., 2009; Oliveira et al., 2006). Sendo assim, diferentes fontes de suplementação deste aminoácido essencial, têm sido avaliadas sobre o desempenho produtivo de aves (Jasman et al., 2003). Neste trabalho, foi observado que a suplementação de qualquer uma das fontes utilizadas, DL-metionina ou MHA-FA, melhoraram significativamente o ganho de peso das aves, e isso se deve, em parte, ao fato de que a metionina estimula positivamente o crescimento, por intermédio dos fatores de crescimento (Stubbs et al., 2002), ou pela influência que este aminoácido exerce na síntese (Kimball e Jefferson, 2006) e degradação protéica (Tesseraud et al., 2007). O melhor resultado para ganho de peso foi observado em animais que receberam adição do segundo nível de DL-metionina em suas dietas, e essa diferença entre as fontes de suplementação pode ter ocorrido devido à distinção que ambos os produtos apresentam em suas propriedades físicas e químicas (Lemme et al., 2007).

A conversão alimentar também foi melhorada com a suplementação de ambas as fontes de metionina, sendo, o segundo nível de suplementação, o que proporcionou melhor eficiência. A menor eficiência em converter alimento em peso corporal está associada, além de outros fatores, a dietas desbalanceadas ou com deficiência em algum nutriente específico (Collin et al., 2003).

Estudos recentes têm mostrado que animais mais eficientes em converter alimentos em peso corporal podem apresentar alterações na expressão de genes da cadeia transportadora de elétrons, o que pode influenciar na utilização de nutrientes e alterar o gasto energético corporal. Estas pesquisas sugerem que animais com pior desempenho, possuem falha no transporte de elétrons/prótons, reduzindo a eficiência de produção de ATP pelas mitocôndrias, ou apresentam maior produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), o que influenciaria negativamente a conversão alimentar (Bottje & Carstens, 2009; Krueger et al., 2008; Iqbal et al., 2004).

As proteínas desacopladoras (UCPs), são transportadores presentes na membrana interna das mitocôndrias, estas desviam a energia de síntese de ATP, para a produção de calor catalisado por um vazamento de prótons através do interior da membrana (Ledesma et al., 2002). A UCP encontrada em aves tem sido descrita como um agente que possibilita a redução da produção de ROS, por causar um leve desacoplamento na produção de ATP (Abe et al., 2006). Embora a UCP tenha este efeito benéfico de evitar danos ao DNA e as proteínas celulares, uma vez que reduzem a produção de radicais livres, observa-se que maior expressão do mRNA UCP pode piorar a conversão alimentar, já que pode reduzir a produção de ATP (Ojano-Diran, et al., 2007; Raimbault et al., 2001). Neste trabalho foi observado que a suplementação de metionina levou à redução significativa na expressão de mRNA UCP no músculo das aves. Já no fígado, essa redução não foi estatisticamente significativa (Figura 2). Assim como ocorre em animais expostos a baixas temperaturas (Dridi et al., 2008), a expressão deste gene parece ser influenciada também pela magnitude da suplementação nutricional, entretanto, nesse estudo não foi possível avaliar com segurança esse efeito, devido aos tratamentos propostos. Talvez considerando níveis mais distantes um do outro, esse efeito pudesse ser evidenciado. Os resultados de expressão acompanharam os resultados de eficiência alimentar (Figura 1), menor nível de adição de metionina, proporcionou menor eficiência alimentar, sugerindo que a UCP pode interferir no desempenho produtivo das aves, aumentando a dissipação de energia via oxidação mitocondrial (Dridi et al., 2004).

Quando a metionina está em pequenas quantidades nas dietas, pode ocorrer acúmulo de gordura pelo fígado, relacionado à cetonemia. Pequenas quantidades de metionina podem causar aumento no fluxo hepático de ácidos graxos através da via de β -oxidação, que por sua vez aumenta o gasto energético corporal total e promove o desacoplamento mitocondrial. O aumento na expressão de mRNA UCP, influenciada pela restrição deste aminoácido, é acompanhada por uma diminuição acentuada nos níveis de ATP hepático em ratos (Rizki et al., 2006). De acordo com Hasek et al. (2010), o aumento da expressão de mRNA UCP, envolvida no metabolismo lipídico e no ciclo da glicose, sugere um mecanismo de detecção de nutrientes, que compensa a dieta com restrição de metionina, através de efeitos integrados da homeostase energética.

Considerando o papel da UCP na taxa metabólica e metabolismo de lipídios, a menor expressão desta no músculo esquelético pode estar associada ao maior ganho de peso (Kerner, 2001), resultado observado neste experimento.

Também tem sido observado menor produção de espécies reativas de oxigênio em mitocôndrias de animais alimentados com menor nível de metionina (Romestaing et al., 2008). Parte deste resultado pode ser devido à maior expressão do gene da proteína desacopladora que também é observado sob essa condição.

O COX III também está presente na cadeia transportadora de elétrons e é relacionado com a eficiência da fosforilação oxidativa. A citocromo oxidase, subunidade III (COX III) é uma subunidade do complexo protéico IV da mitocôndria, responsável pelo bombeamento de prótons e pelo transporte de elétrons. O COX III possui grande relevância na eficiência energética mitocondrial (Scheffler, 1999) e menor expressão deste gene pode ocorrer devido à menor eficiência celular ou maior dano oxidativo devido à produção de substâncias reativas ao oxigênio (Kemp et al., 2003). Ojano-Dirain et al. (2007) sugerem que maior produção de ROS e maior oxidação protéica são observadas consistentemente em aves com baixa eficiência alimentar, sugerindo que este fator pode alterar a expressão de genes mitocondriais. Mitocôndrias que apresentam maior quantidade de proteínas carboniladas apresentam também menor expressão de mRNA COX III (Iqbal et al., 2004), e ainda, ocorre redução na expressão deste gene relacionada com alteração na capacidade oxidativa da mitocôndria em animais mais velhos (Barazzoni et al., 2000).

Apesar de não ter havido influência da suplementação de metionina sobre a expressão de mRNA COX III, pode-se observar que aves que receberam o segundo nível de DL-metionina, portanto mais eficientes em converter alimentos (Figura 1), tenderam a maior expressão deste gene (Figura 3). A eficiência alimentar pode estar relacionada não apenas com a expressão de genes que codifiquem proteínas dos complexos das cadeias, mas também com a atividade destes complexos. Menor atividade dos complexos da cadeia respiratória, inclusive do complexo IV, vem sido relacionada a animais de baixa eficiência alimentar (Iqbal et al., 2004).

Mitocôndrias de ratos alimentados com dieta restrita em metionina exibiram elevada fosforilação oxidativa, com aumento da atividade da citocromo oxidase (COX). Entretanto, esta maior atividade foi associada a uma baixa eficiência da fosforilação oxidativa (ATP/O, quantidade de ATP produzido pela quantidade de oxigênio consumido). Os resultados indicam que a eficiência de síntese de ATP mitocondrial, em

animais recebendo dieta com restrição de metionina, pode ter diminuído em função da ineficiência da bomba de prótons no nível do COX, e também em função do aumento no vazamento de prótons, embora a contribuição relativa de cada fenômeno não possa ser discriminado (Romestaing et al., 2008).

Outra proteína envolvida no processo de síntese energética é o ANT (transportador de nucleotídeos de adenina), responsável pelo deslocamento do ADP do citosol para a mitocôndria e pelo deslocamento do ATP através da membrana interna mitocondrial (Ojano-Dirain et al., 2007). Portanto, o ANT possui a função de aumentar a quantidade de ADP para ser transformado em ATP por ação da ATP sintase. A função mitocondrial pode ser prejudicada pela incapacidade de troca do ADP/ATP entre citosol e membrana, assim pode ser que haja alguma ligação entre a expressão do ANT com a expressão do fenótipo da eficiência alimentar (Bottje et al., 2006). De acordo com Ojano-Dirain et al. (2007), aves com menor expressão de ANT apresentam pior conversão alimentar em função da menor eficiência em produzir ATP. Neste trabalho, não foi observada influência da suplementação de metionina sobre a expressão deste gene, e nem mesmo um padrão de expressão entre os tratamentos (Figura 3).

Alterações na expressão de subunidades da cadeia respiratória podem representar uma resposta adaptativa celular ao acúmulo de danos às proteínas e / ou DNA mitocondrial que ocorre devido ao aumento na quantidade de ROS (Nicoletti et al., 2005). Coordenação entre os complexos da cadeia respiratória, necessária para eficiente produção de energia e assim para animais com maior eficiência alimentar, exige quantidade e atividade equilibrada entre os complexos. Qualquer desequilíbrio pode provocar vazamento de elétrons e geração de ROS.

Além de influenciar o desacoplamento mitocondrial, a metionina também atua nos mecanismo de defesa contra os radicais livres, já que participa da biossíntese da glutathiona. A quantidade disponível deste aminoácido no organismo é responsável por favorecer a rota da remetilação ou da transsulfuração. Quando há baixa quantidade de metionina no organismo animal, é favorecida a rota de remetilação, responsável por aumentar a quantidade disponível deste aminoácido. Já, quando há maiores quantidades de metionina, a rota de transsulfuração, é a mais ativada, e há maior produção de cisteína (Finkelstein, 1998), e assim, maior produção de glutathiona para combater o ROS. Maior quantidade de metionina também está associada à maior quantidade de glutathiona peroxidase e de catalase, enzimas envolvidas nos combate ao estresse oxidativo (Romestaing et al., 2008).

Conclusões

A suplementação de metionina proporciona melhor desempenho das aves, sendo o segundo nível de suplementação de ambas as fontes, o responsável por animais mais eficientes. O efeito da suplementação de metionina sobre a expressão de genes mitocondriais em frangos de corte até o momento não tem sido encontrado na literatura, sendo os resultados encontrados nesse estudo um ponto de partida para novos trabalhos.

Referências

- ABE, T.; MUJAHID, A.; SATO, K. et al. Possible role of avian uncoupling protein in down-regulating mitochondrial superoxide production in skeletal muscle of fasted chickens. **FEBS Letters**, v.580, p.4815-4822, 2006.
- BARAZZONI, R.; SHORT, K.R.; NAIR, K.S. Effects of aging on mitochondrial DNA copy number and cytochrome c oxidase gene expression in rat skeletal muscle, liver, and heart. **The Journal of Biological Chemistry**, v.275, n.5, p.3343-3347, 2000.
- BOTTJE, W.; BRAND, M.D.; OJANO-DIRAIN, C. et al. Mitochondrial proton leak kinetics and relationship with feed efficiency within a single genetic line of male broilers. **Poultry Science**, v.88, p.1683-1693, 2009.
- BOTTJE, W.; PUMFORD, N.R.; OJANO-DIRAIN, C. et al. Feed Efficiency and Mitochondrial Function. **Poultry Science**, v.85, p.8-14, 2006.
- BOTTJE, W.G.; CARSTENS, G.E. Association of mitochondrial function and feed efficiency in poultry and livestock species. **Journal of Animal Science**, v.87, p.E48-E63, 2009.
- COLLIN, A.; MALHEIROS, R.D.; MORAES, V.M.B. et al. Effects of dietary macronutrient content on energy metabolism and uncoupling protein mRNA expression in broiler chickens. **British Journal of Nutrition**, v.90, p.261-269, 2003.
- DASKIRAN, M.; ONOL, A.G.; CENGIZ, O. et al. Effects of dietary methionine levels and L-carnitine supplementation on performance and egg quality parameters of layers. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v.18, p.650-661, 2009.
- DRIDI, S.; ONAGBESAN, O.; SWENNEN, Q. et al. Gene expression, tissue distribution and potential physiological role of uncoupling protein in avian species. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v.139, p.273-283, 2004.
- DRIDI, S.; TEMIM, S.; DEROUET, M. et al. Acute cold- and chronic heat-exposure upregulate hepatic leptin and muscle uncoupling protein (UCP) gene expression in broiler chickens. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology**, v.309A, p.381-388, 2008.
- FINKELSTEIN, J.D. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. **European Journal of Pediatrics**, v.157, p.S40-S44, 1998.
- GRIFFITH, O.W.; MEISTER, A. Origin and turnover of mitochondrial glutathione. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.82, p.4668-4672, 1985.
- HEIDELBERGER, P.; WELCH, P. Simulation run length control in the presence of an initial transient. **Operations Research**, v.31, p.1109-1144, 1983.

- IQBAL, M.; PUMFORD, N.R.; TANG, Z.X. et al. Low feed efficient broilers within a single genetic line exhibit higher oxidative stress and protein expression in breast muscle with lower mitochondrial complex activity. **Poultry Science**, v.83, p.474-484, 2004.
- JASMAN, A.J.M.; KAN, C.A.; WIEBENGA, J. **Comparison of the biological efficacy of DL-methionine and hydroxy-4-methylthiobutanoic acid (HMB) in pigs and poultry**. Netherlands: Centraal Veevoederbureau (CVB, Central Bureau for livestock feeding), Documentation Report No29:55, 2003.
- KASEK, B.E.; STEWART, L.K.; HENAGAN, T.M. et al. Dietary methionine restriction enhances metabolic flexibility and increases uncoupled respiration in both fed and fasted states. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.299, n.3, p.R728-R739, 2010.
- KEMP, T.J.; CAUSTON, H.C.; CLERK, A. Changes in gene expression induced by H₂O₂ in cardiac myocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.307, p.416-421, 2003.
- KERNER, J.; TURKALY, P.J.; MINKLER, P.E. et al. Aging skeletal muscle mitochondria in the rat: decreased uncoupling protein-3 content. **American Journal of Endocrinology and Metabolism**, v.281, p.E1054-E1062, 2001.
- KIMBALL, S.R.; JEFFERSON, L.S. Signaling pathways and molecular mechanisms through which branched-chain amino acids mediate translational control of protein synthesis. **Journal of Nutrition**, v.136, p.227-231, 2006.
- KRUEGER, W.K.; CARSTENS, G.E.; LANCASTER, P.A. et al. Relationship between residual feed intake and apparent nutrient digestibility in growing calves. **Journal of Animal Science**, v.86, 25. (Abstr.), 2008.
- LASSITER, K.; OJANO-DIRAIN, C.; IQBAL, M. et al. Differential expression of mitochondrial and extramitochondrial proteins in lymphocytes of male broilers with low and high feed efficiency. **Poultry Science**, v.85, p.2251-2259, 2006.
- LEDESMA, A.; LACOPA, M.G.; RIAL, E. The mitochondrial uncoupling proteins. **Genome Biology**, v.3, p.3015.1-3015.9, 2002.
- LEMME, A.; HOEHLER, D.; BRENNAN, J.J. Relative Effectiveness of methionine hydroxy analog compared to DL-methionine in broiler chicken. **Poultry Science**, v.81, p.838-845, 2002.
- LEMME, A.; PETRI, A.; REDSHAW, M. **Revisão: O que há de novo sobre as fontes comerciais de metionina em aves**. (S.L.): Degussa Feed Additives-amino acids and more, 2007. 34p.
- NICOLETTI, V.G.; MARINO, V.M.; CUPPARI, C. et al. Effect of antioxidant diets on mitochondrial gene expression in rat brain during aging. **Neurochemical research**, v.30, n.6/7, p.737-752, 2005.
- OJANO-DIRAIN, C.; TOYOMIZU, M.; WING, T. et al. Gene expression in breast muscle and duodenum from low and high feed efficient broilers. **Poultry Science**, v.86, p.372-381, 2007.
- OLIVEIRA, R.F.M.; DONZELE, J.L.; ABREU, M.L.T. et al. Efeitos da temperatura e da umidade relativa sobre o desempenho e o rendimento de cortes nobres de frangos de corte de 1 a 49 dias de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, p.797-803, 2006.
- PAYNE, R.L.; LEMME, A.; SEKO, H. Bioavailability of methionine hydroxy analog-free acid relative to DL-methionine in broilers. **Animal Science Journal**, v.77, p.427-439, 2006.

- RAIMBAULT, S.; DRIDI, S.; DENJEAN, F. et al. An uncoupling protein homologue putatively involved in facultative thermogenesis in birds. **Biochemical Journal**, v.353, p.441-444, 2001.
- RIZKI, G.; ARNABOLDI, L.; GABRIELLI, B. et al. Mice fed a lipogenic methionine-choline-deficient diet develop hypermetabolism coincident with hepatic suppression of SCD-1. **Journal of Lipid Research**, v. 47, p.2280-2290, 2006.
- ROMESTAING, C.; PIQUET, M.A.; LETEXIER, D. et al. Mitochondrial adaptations to steatohepatitis induced by a methionine- and choline-deficient diet. **American Journal of Physiology- Endocrinology and Metabolism**, v.294, n.1, p.E110-E119, 2008.
- ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L. et al. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 2. ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2005. 186p.
- SCHEFFLER, I. **Mitochondria**. 1. ed. Nova York: Wiley-Liss Inc., 1999. 367p.
- STUBBS, A.K.; WHEELHOUSE, N.M.; LOMAX, M.A. et al. Nutrient-hormone interaction in ovine liver: methionine supply selectively modulates growth hormone-induced IGF-1 gene expression. **Journal of Endocrinology**, v.174, p.335-341, 2002.
- TESSERAUD, S.; COUSTARD-MÉTAYER, S.; BOUSSAID, S. et al. Insulin and amino acid availability regulate atrogen-1 in avian QT6 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.357, p. 181-186, 2007.
- VIANA, M.T.S.; ALBINO, L.F.T.; ROSTAGNO, H.S. et al. Methionine sources and levels in broilers chick diets. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.1751-1756, 2009.

V. Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e atividade enzimática da glutathiona peroxidase em codornas submetidas ao estresse térmico agudo

RESUMO- Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a influência do estresse térmico agudo sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) mitocondrial e atividade da enzima glutathiona peroxidase no fígado de codornas de corte. Inicialmente foram alojadas 40 codornas de uma linhagem de corte de 23 dias de idade em ambiente termoneutro. Aos 30 dias de idade, estes animais foram divididos em dois grupos. Os animais pertencentes ao tratamento termoneutro foram abatidos imediatamente após a divisão dos animais nos tratamentos, e o segundo grupo foi submetido ao estresse térmico de 34°C por 24 horas. Para análise de produção de ROS, foram abatidas quatro codornas de cada tratamento, e, destes animais foram coletados os fígados para isolamento de mitocôndrias e subsequente análise de ROS mitocondrial. Seis animais de cada tratamento foram abatidos para análise da atividade glutathiona peroxidase, que foi determinada utilizando peróxido de hidrogênio (H₂O₂), e baseada na quantidade de NADPH oxidado. Foi observada maior produção de ROS mitocondrial para animais submetidos ao estresse térmico, 0,34 vs 0,22, para reações contendo apenas rotenona, e 0,31 vs 0,23, nas reações com a presença de rotenona mais antimicina. Codornas que permaneceram em ambiente de estresse calórico por 24 horas apresentaram, também significativamente, maior atividade da enzima glutathiona peroxidase nos hepatócitos (47,8 vs 39,6). Assim, verifica-se que estresse térmico agudo, de 34°C por 24 horas, é capaz de atuar na produção de ROS mitocondrial e na atividade da enzima glutathiona peroxidase no fígado de codornas.

Palavras-chave: estresse oxidativo, H₂O₂, sistema antioxidante

Introdução

Em países onde há ocorrência de altas temperaturas, a produção de aves pode ser grandemente afetada, havendo aumento na idade de abate e aumento no custo de produção (Al-Fataftah & Abu-Dieyeh, 2007). Alta temperatura ambiental acompanhada por elevada umidade relativa do ar, pode levar a um aumento na severidade do estresse por calor, sendo possível observar mortalidade total das aves em temperaturas acima de 36°C (Abreu & Abreu, 2012).

Durante a produção de frangos de corte, altas temperaturas que levam os animais ao estresse térmico, influencia negativamente o consumo de ração e o ganho de peso, além do rendimento de cortes nobres (coxa, sobrecoxa e peito) (Oliveira et al., 2006).

Essas alterações observadas no desempenho das aves podem ser devidas, em parte, ao estado de estresse oxidativo que ocorre em animais expostos ao estresse térmico, já que aves submetidas ao estresse por altas temperaturas podem apresentar redução na atividade da cadeia respiratória mitocondrial, seguida por maior produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Yang et al., 2010). O ROS é produzido normalmente nos processos biológicos celulares. Entretanto, quando em maiores quantidades, são frequentemente associados a distúrbios, como apoptose (Moustafa et al., 2004), oxidação de proteínas (Ronsein et al., 2006), peroxidação de lipídeos (Maia & Bicudo, 2009), danos ao DNA mitocondrial (Lee & Wei, 2005), e a diversas doenças (Silva et al., 2011; Reis et al., 2008; Barbosa et al., 2006).

Grandes quantidades de ROS estão presentes quando há estado de estresse oxidativo, e isto ocorre não apenas devido a super produção das espécies reativas de oxigênio, mas também em função da deficiência nos sistemas de defesas antioxidantes em combatê-las (Halliwell & Gutteridge, 2001).

A glutathiona peroxidase (GSH-Px) faz parte do sistema de defesa antioxidante da glutathiona, e assim tem papel fundamental na eliminação do ROS pelo organismo. Entre os diversos fatores que afetam a atividade desta enzima, tem sido mostrado a influência de altas temperaturas. Desta forma, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a influência do estresse térmico sobre a produção de ROS mitocondrial e atividade da enzima glutathiona peroxidase no fígado de codornas de corte.

Material e Métodos

Inicialmente foram alojadas individualmente, em gaiolas metálicas, 40 codornas de uma linhagem de corte de 23 dias de idade. Foi dado um período de sete dias de adaptação para estes animais em ambiente termoneutro, 25°C e 60% de umidade relativa (Singh & Narayam, 2002). Aos 30 dias de idade estes animais, foram divididos em dois grupos, um abatido imediatamente após a divisão dos grupos, sendo pertencente ao tratamento termoneutro. O segundo grupo foi submetido ao estresse térmico de 34°C por 24 horas, umidade relativa de 60%. A temperatura foi medida a cada minuto através de sensores distribuídos pela câmara climática acoplados ao computador.

Em todo período experimental, os animais tiveram livre acesso à água e ração. A ração foi formulada para atender às exigências nutricionais dos animais (Rostagno et al., 2005) sendo composta à base de milho e farelo de soja, contendo 23,9% de PB e 2900 Kcal de EMA. Os animais foram pesados no início do experimento e antes do abate. Durante todo o experimento, utilizou-se programa de luz contínuo.

Ao final do período experimental, as aves foram abatidas por deslocamento cervical, e o fígado foi coletado para as subseqüentes análises de produção de ROS mitocondrial e atividade da enzima glutatona peroxidase.

Para análise de produção de ROS, foram abatidas quatro codornas de cada tratamento. Destes animais, foram coletados os fígados para isolamento de mitocôndrias e subseqüente análise de ROS mitocondrial. Para o isolamento das mitocôndrias, o fígado foi acondicionado em Becker resfriado contendo meio de isolamento (manitol 0,2 M, sacarose 0,075 M, Tris-HCl 2,0 mM, pH 7,4, EGTA 0,2 mM, fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) 100 µM e albumina bovina livre de ácidos graxos 50 mg%) e picotado com tesoura. O material foi transferido para o homogeneizador Dounce juntamente com o meio de isolamento. O homogenato foi filtrado e submetido a 2 centrifugações sequenciais de 10 min: a 536 g e 7.080 g. O sedimento foi lavado por meio de duas centrifugações a 6.392 g. As mitocôndrias foram homogeneizadas no mesmo meio, a uma concentração protéica de 80-100 mg/ml.

O conteúdo protéico das frações subcelulares foi determinado conforme descrito por Lowry et al. (1951), utilizando albumina bovina como padrão, em espectrofotômetro em comprimento de onda de 700 nm.

O nível de produção de ROS mitocondrial, peróxido de hidrogênio, foi estimado por mensuração do aumento linear de fluorescência. O H_2O_2 induz oxidação do diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) formando um composto fluorescente (2'-7' diclorofluoresceína) na presença da enzima horse-peroxidase (HRP) (Zaccagnino et al., 2009).

Mitocôndrias intactas (10 uL contendo ≈ 0.8 mg de proteína) foram adicionadas em 2 mL de tampão Manitol 250 mM, Hepes 10 mM, pH 7,2, contendo 1,36 μ M de DCFH-DA e succinato (10mM) + rotenona (10 μ M) ou succinato (10mM) + rotenona + antimicina (15 μ M). A reação foi iniciada pela adição de 0,4 μ M de HRP, e a fluorescência registrada em intervalos de 1 minuto durante 10 minutos. Todo o ensaio ocorreu sob agitação em espectrofluorímetro. Os resultados foram expressos em nmoles de ROS produzido/minuto/miligrama de proteína.

Cinco codornas de cada tratamento foram utilizadas para análise da atividade da enzima glutathione peroxidase. Logo após o abate, o fígado de cada animal foi retirado, prensado e armazenado em nitrogênio líquido, até o momento das análises. Para análise da atividade enzimática, as amostras foram pesadas, e então trituradas no nitrogênio líquido com auxílio de cadinho e pistilo. O material foi transferido para proveta resfriada e neste recipiente foi adicionado 10% do peso da amostra de tampão fosfato de potássio gelado (K_2HPO_4 e KH_2PO_4 0,1M pH 7,4). As amostras foram homogeneizadas em Van Potter. O homogenato obtido foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos e as atividades enzimáticas foram determinadas no sobrenadante. Foi realizada dosagem de proteína conforme descrito por Lowry et al. (1951) utilizando albumina bovina como padrão.

A atividade da enzima glutathione peroxidase foi determinada de acordo com Paglia & Valentine (1967), utilizando peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A atividade da enzima foi mensurada por meio da quantidade de NADPH oxidado, observado no espectrofotômetro em comprimento de onda de 340 nm. Para a ocorrência da reação, foram adicionados 350 μ L de tampão fosfato de potássio 171 mM, 250 μ L de GSH 6 mM, 300 μ L de NADPH 0,9 mM, 10 μ L enzima Glutathione redutase 2U/mL, 40 μ L do Sobrenadante e 520 μ L de H_2O miliQ. Foi realizada homogeneização da solução e então adicionado 30 μ L H_2O_2 6mM. A fluorescência foi registrada em intervalos de 10 segundos durante 90 segundos. A atividade foi expressa como nmol de NADPH oxidado/mg de proteína/minuto.

Os resultados foram apresentados como médias e desvios padrões. A análise

estatística foi realizada usando o teste t de Students ($p < 0,05$) para comparação entre o grupo de conforto térmico e o grupo submetido ao estresse térmico agudo (SAS, 2000).

Resultados

Durante todo o período experimental, foi observado o comportamento das codornas. Pode-se verificar que os animais que permaneceram no conforto térmico apresentaram comportamento normal, enquanto aqueles expostos a alta temperatura apresentaram menor consumo de ração, maior consumo de água, fezes aquosa, e na maior parte do tempo, pode-se observar aves com asas abertas.

No momento do alojamento, as codornas selecionadas para produção de carne apresentavam em média 160 g. Ao final do experimento, os animais que permaneceram em conforto térmico apresentavam peso médio de 167,5 g, já os animais expostos ao estresse calórico por 24 horas, apresentavam peso médio de 140 g.

A produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi maior nas mitocôndrias das aves submetidas ao estresse por calor. Este resultado foi observado quando foi avaliado a produção de ROS apenas com Rotenona (0,34 vs 0,22), e também quando a produção foi avaliada na presença de Rotenona mais Antimicina (0,31 vs 0,23) (Figura 1).

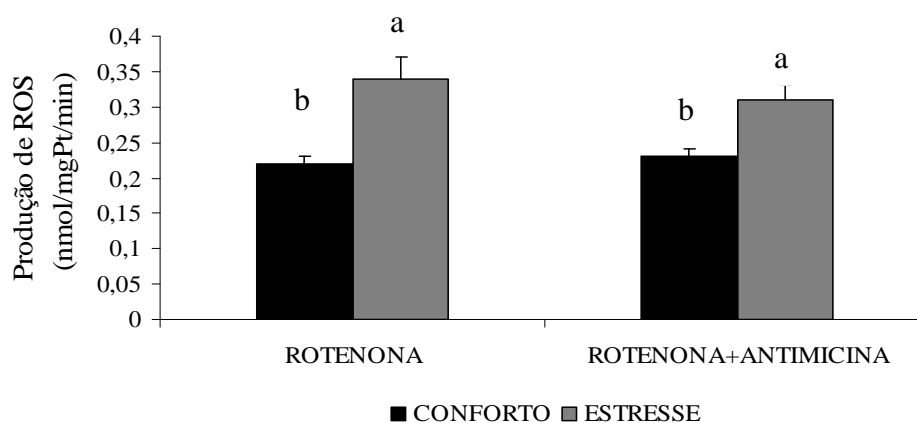


Figura 1- Produção de ROS mitocondrial no fígado de codornas submetidas à ambiente termoneutro e a estresse térmico agudo, em reação contendo apenas rotenona e em reação contendo rotenona mais antimicina. Os resultados são médias com seus desvios padrões representados pela barra vertical. Letras diferentes entre os tratamentos representam diferenças estatísticas $p < 0,05$.

A atividade da enzima glutationa peroxidase (GSH-Px) foi verificada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 340 nm através da fluorescência emitida pela quantidade de NADPH consumida, sendo, então, determinada com base no decaimento da absorbância observada entre os segundos avaliados. Os valores de absorbância observados nos segundos iniciais das medidas, nos diferentes grupos de animais avaliados estão na Figura 2. Pode-se observar decaimento da absorbância (ΔA) de maneira distinta entre os tratamentos o que levou a diferença significativa na atividade da enzima no fígado das codornas submetidas aos dois ambientes (Figura 3).

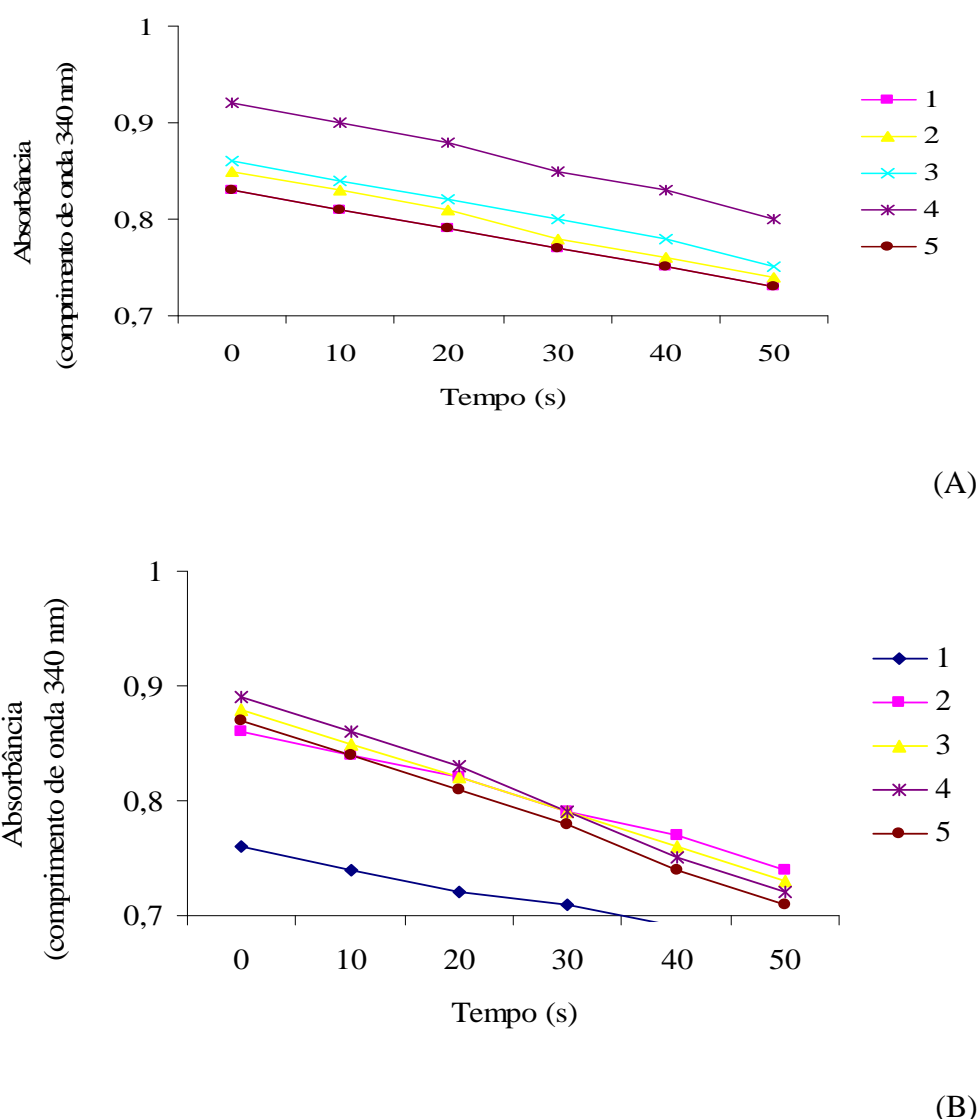


Figura 2 - Absorbância observada entre 0 e 50 segundos com base no consumo de NADPH na reação. (A): animais do ambiente termoneutro e (B): animais submetidos ao estresse térmico.

Concomitantemente com maior produção de ROS, animais expostos ao estresse calórico agudo também apresentaram maior atividade de GSH-Px no fígado (47,8 vs 39,6) (Figura 3).

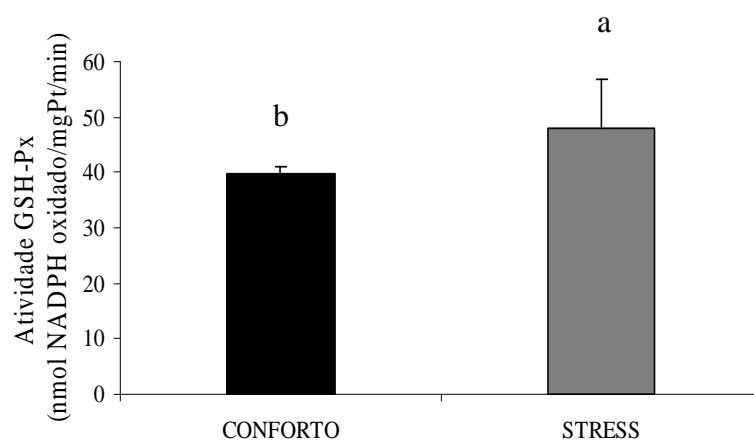


Figura 3 - Atividade da glutatona peroxidase no fígado de codornas submetidas à ambiente termoneutro e a estresse térmico agudo, dada em nmol de NADPH oxidado por mg de proteína por minuto. Os resultados são médias com seus desvios padrões representados pela barra vertical. Letras diferentes entre os tratamentos representam diferenças estatísticas $p < 0,05$.

Discussão

As aves são animais endotérmicos e dependem de conforto térmico para expressar o máximo desempenho permitido por seus potenciais genéticos (Miragliotta, 2005). Na zona de conforto térmico, denominada de zona termoneutra, toda a energia produzida pelo organismo é direcionada para fins produtivos (Macari et al., 2004).

As codornas submetidas ao estresse térmico agudo apresentaram comportamento diferenciado daquelas que permaneceram em conforto térmico, e este fato foi bem evidenciado pela redução no consumo de alimento e aumento na ingestão de água. Quando as aves estão sofrendo por estresse térmico, ocorre a tentativa de diminuir a produção de calor metabólico e aumentar a dissipação de calor, dispondo primeiramente de mecanismos ambientais e posturais (Furlan & Macari, 2002). Também foi possível observar neste trabalho, que as aves expostas ao estresse perderam peso. Exposição a altas temperaturas podem causar redução no ganho de peso, no consumo e eficiência alimentar (Mujahid et al., 2005).

O estresse térmico provocado por altas temperaturas também está relacionado a produção de ROS mitocondrial (Tan et al., 2010; Yang et al., 2010). As espécies reativas de oxigênio, são formadas pelo conjunto que compreende o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\cdot OH$) (Vieira, 2008). Durante a o processo de obtenção de energia, cerca de 2 a 4% do total de O_2 utilizado como aceptor de elétrons pelas mitocôndrias não é totalmente reduzido a água, participando na geração de ROS (Bottje et al., 2006).

O superóxido é produzido em diversos processos biológicos, entre eles, como dito anteriormente, na cadeia transportadora de elétrons das mitocôndrias. A síntese de $O_2^{\cdot-}$ ocorre quando um elétron é adicionado a uma molécula de oxigênio, e a partir desta espécie reativa, as demais podem ser sintetizadas. O peróxido de hidrogênio é sintetizado através de uma reação de dismutação catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) (Gutteridge & Mitchell, 1999), este por sua vez, em reações com metais reativos, como íons de ferro, pode participar na síntese de radicais hidroxilas (Fenton, 1894 citado por Gutteridge & Mitchell, 1999).

Para verificar a produção de ROS pelas mitocôndrias isoladas de hepatócitos, e para garantir que todo o radical livre produzido seja medido, foram realizados ensaios apenas com rotenona, agente bloqueador do complexo I da cadeia respiratória, e também ensaios com a presença de rotenona mais antimicina, sendo esta um bloqueador do complexo III da cadeia. A partir destes ensaios, pode ser observado que as aves expostas à temperatura de $34^{\circ}C$ por 24 horas apresentaram maior produção de ROS mitocondrial, independente da reação avaliada. Frangos de corte submetidos a estresse térmico agudo também apresentaram maiores níveis de ROS mitocondrial. Este resultado pode ser observado quando foi utilizado glutamato ou succinato como substrato na cadeia transportadora de elétrons, sugerindo que a produção de ROS ocorre de forma elevada durante o período de estresse térmico independente do substrato (Mujahid et al., 2006).

Possíveis mecanismos envolvidos no aumento da produção de ROS em situações de estresse térmico, podem estar associados com vazamento de elétrons na cadeia mitocondrial, oxidação das proteínas dos complexos da cadeia, redução na atividade dos complexos da cadeia, ou outras formas de danos ocorridos nas mitocôndrias. Estes danos podem estar envolvidos com a temperatura corporal, desde que é observado aumento na produção de ROS, seguido pela redução no ganho de peso, em aves que apresentam maior temperatura corporal (Mujahid et al., 2005). Já que as taxas das

reações químicas e bioquímicas aumentam com a temperatura, é provável que a elevação da temperatura corporal induza a geração de ROS através de reações metabólicas aceleradas nas células e tecidos (Lin et al., 2006).

A produção aumentada de ROS parece estar envolvida em um ciclo vicioso, onde escapes de elétrons, devido a distúrbios na cadeia respiratória, aumentam a produção de radicais livres, que provocam mais lesão no mtDNA, ocasionando produção de ROS adicional (Tengan et al., 1998). Assim, a perfeita atividade dos complexos da cadeia respiratória é exigida para manter o sistema em equilíbrio. Entretanto, ocorre inibição de alguns complexos da cadeia após a exposição ao estresse térmico agudo (Tan et al., 2010).

A produção de ROS em animais expostos a altas temperaturas também tem sido relacionado ao potencial de membrana da mitocôndria e à expressão gênica da proteína desacopladora (UCP). Tem-se que maior potencial de membrana está relacionado a maior produção de ROS; e maior expressão de mRNA UCP está ligada a menores quantidades de radicais livres e também menores danos celulares induzidos por estes. É observado maior potencial de membrana e menor expressão de mRNA UCP em animais submetidos a estresse térmico (Mujahid et al., 2009).

O ROS mitocondrial é combatido, entre outros, pelo sistema de defesa antioxidante da glutathiona (GSH). O sistema da glutathiona é composto, além da GSH, pelas enzimas glutathiona oxidase (GO), glutathiona peroxidase (GSH-Px) e pela glutathiona redutase (GR). Sendo assim, a ação de defesa deste sistema, depende da atividade de todo o conjunto. Para reduzir as espécies oxidantes, e assim cumprir seu papel, a glutathiona se oxida à glutathiona dissulfeto (GSSG) pela ação das enzimas GO e GSH-Px. A enzima glutathiona redutase é a responsável por regenerar a GSH, a partir de GSSG, permitindo assim, que a mesma molécula seja usada mais de uma vez no combate às espécies reativas de oxigênio (Huber et al., 2008).

A atividade da enzima glutathiona peroxidase, parece estar relacionada diretamente com o balanço entre a produção de ROS e sua eliminação do organismo. Entre os diversos fatores que afetam a atividade da GSH-Px, autores têm mostrado a influência do estresse térmico. Neste estudo, foi observado que codornas mantidas em estresse térmico agudo apresentaram maior atividade desta enzima em hepatócitos. Este resultado foi encontrado também por autores que sugerem que esta maior atividade pode ser uma tentativa do organismo de combater o ROS, que também tem sua

produção aumentada nessa condição (Tan et al., 2010; Yang et al., 2010; Pamok et al., 2009).

Conclusões

Estresse térmico agudo, de 34°C por 24 horas, é capaz de atuar sob a produção de ROS mitocondrial e atividade da enzima glutathiona peroxidase no fígado de codornas de corte.

Refêrencias

- ABREU, P.G.; ABREU, V.M.N. Estresse calórico- como ocorre e o que fazer? Embrapa suínos e aves. Disponível em: <<http://www.cnpsa.embrapa.br/calor/calor.pdf>> Acesso em janeiro de 2012.
- AL-FATAFTAH, A.R.A.; ABU-DIEYEH, Z.H.M. Effect of Chronic Heat Stress on Broiler Performance in Jordan. **International Journal of Poultry Science**, v.6, n.1., p.64-70, 2007.
- BARBOSA, L.F.; MEDEIROS, M.H.G.; AUGUSTO, O. Danos oxidativos e neurodegeneração: O quê aprendemos com animais transgênicos e nocautes? **Química Nova**, v.29, n.6, p.1352-1360, 2006.
- BOTTJE, W.; PUMFORD, N.R.; OJANO-DIRAIN, C. et al. Feed Efficiency and Mitochondrial Function. **Poultry Science**, v.85, p.8-14, 2006.
- FENTON, H.J.H. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. **Chemical Society**, v.64, p.899-909, 1894.
- FURLAN, R.L.; MACARI, M. Termorregulação. In: MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E. (Ed.) **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. 1.ed. Jaboticabal: Funep/Unesp, 2002. p.209- 230.
- GUTTERIDGE, J.M.C.; MITCHELL, J. Redox imbalance in the critically ill. **British Medical Bulletin**, v.55, n.1, p.49-75, 1999.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 3. ed. New York: Oxford University Press, 2001. 936 p.
- HUBER, P.C.; ALMEIDA, W.P.; FÁTIMA, A. Glutathiona e enzimas relacionadas: Papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v.31, n.5, p.1170-1179, 2008.
- LEE, H.C.; WEI, Y.H. Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.37, p.822-834, 2005.
- LIN, H.; DECUYPERE, E.; BUYSE, J. Acute heat stress induces oxidative stress in broiler chickens. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v.144, p.11-17, 2006.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. et al. Protein measurement with Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v.193, p.131-138, 1951.
- MACARI, M.; FURLAN, R.L.; MAIORKA, A. Aspectos fisiológicos e de manejo para manutenção da homeostase térmica e controle de síndromes metabólicas. In: MENDES, A.A.; NAAS, I.A.; MACARI, M. (Ed.) **Produção de frangos de corte**. 1.ed. Campinas: Facta, 2004. p.137-156.

- MAIA, M.S.; BICUDO, S.D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão, **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, n.4, p.183-193, 2009.
- MIRAGLIOTTA, M.Y. **Avaliação das condições do ambiente interno em dois galpões de produção comercial de frangos de corte, com ventilação e densidade populacional diferenciados**. 2005. 258f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola)- Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Agrícola, Campinas.
- MOUSTAFA, M.H.; SHARMA, R.K.; THORNTON, J. et al. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. **Human Reproduction**, v.19, n.1, p.129-138, 2004.
- MUJAHID, A.; AKIBA, Y.; TOYOMIZU, M. Olive oil-supplemented diet alleviates acute heat stress-induced mitochondrial ROS production in chicken skeletal muscle. **American Journal Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.297, n.3, p.:R690-8, 2009.
- MUJAHID, A.; SATO, K.; AKIBA, Y. et al. Acute heat stress stimulates mitochondrial superoxide production in broiler skeletal muscle, possibly via downregulation of uncoupling protein content. **Poultry Science**, v.85, p.1259-1265, 2006.
- MUJAHID, A.; YOSHIKI, Y.; AKIBA, Y. et al. Super-oxide radical production in chicken skeletal muscle induced by acute heat stress. **Poultry Science**, v.84, p.307-314, 2005.
- OLIVEIRA, R.F.M.; DONZELE, J.L.; ABREU, M.L.T. et al. Efeitos da temperatura e da umidade relativa sobre o desempenho e o rendimento de cortes nobres de frangos de corte de 1 a 49 dias de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, p.797-803, 2006.
- PAGLIA, D.E.; VALENTINE, W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocytes glutathione peroxidase. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.70, p.158-169, 1967.
- PAMOK, S.; AENGWANICH, W.; KOMUTRIN, T. Adaptation to oxidative stress and impact of chronic oxidative stress on immunity in heat-stressed broilers. **Journal of Thermal Biology**, v.34, n.7, p.353-357, 2009.
- REIS, J.S.; VELOSO, C.A.; MATTOS, R.T. et al. Estresse Oxidativo: Revisão da Sinalização Metabólica no Diabetes Tipo 1. **Arquivos brasileiros de Endocrinologia e metabolismo**, v.52, n.7, p.1096-1105, 2008.
- RONSEIN, G.E.; MIYAMOTO, S.; BECHARA, E. et al. Oxidação de proteínas por oxigênio singlete: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. **Química Nova**, v.29, n.3, p.563-568, 2006.
- ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L. et al. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 2. ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2005. 186p.
- SILVA, D.C.; CERCHIARO, G.; HONÓRIO, K.M. Relações patofisiológicas entre estresse oxidativo e arteriosclerose. **Química Nova**, v.34, n.2, p.300-305, 2011.
- SINGH, R.V.; NARAYAN, R. Produção de codornas nos trópicos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE COTURNICULTURA, 1., 2002, Lavras. **Anais...Lavras: Universidade Federal de Lavras**, 2002. p.27-36.
- STATISCAL ANALYSES SYNTEM - SAS. **SAS/STAT 2000**: version 8. Cary: 2000.
- TAN, G.Y.; YANG, L.; FU, Q.F. et al. Effects of different acute high ambient temperatures on function of hepatic mitochondrial respiration, antioxidative enzymes, and oxidative injury in broiler chickens. **Poultry Science**, v.89, p.115-122, 2010.

- TENGAN, C.H.; GABBAI, A.A.; MORAES, C.T. Deleções do DNA mitocondrial no envelhecimento: efeito da disfunção na fosforilação oxidativa. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v.25, n.3, p.126-131, 1998.
- VIEIRA, S.M.S. **Estudo da associação entre polimorfismos em genes relacionados ao metabolismo da glutatona e a suscetibilidade a complicações microvasculares no diabete melito tipo 1**. 2008. 138f. Tese (Doutorado em Ciências)- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- YANG, L.; TAN, G.Y.; FU, Y.Q. et al. Effects of acute heat stress and subsequent stress removal on function of hepatic mitochondrial respiration, ROS production and lipid peroxidation in broiler chickens. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v.151, n.2, p.204-208, 2010.
- ZACCAGNINO, P.; SALTARELLA, M.; D'ORIO, S. et al. N- arachidonylglycine causes ROS production and cytochrome c release in liver mitochondria. **Free Radical Biology and Medicine**, v.47, p. 585-592, 2009.

CONCLUSÕES GERAIS

A suplementação de metionina na dieta das aves influenciou na expressão de genes relacionados ao crescimento no fígado. Assim, a adição deste aminoácido melhorou o rendimento animal não apenas por estimular a síntese e liberação de fatores de crescimento, mas também por atuar em rotas de síntese e degradação de proteína corporal.

A suplementação de metionina na dieta influenciou a expressão da proteína desacopladora (UCP), presente nas mitocôndrias e envolvidas na síntese de ATP. Assim, este aminoácido se mostrou importante não apenas por atuar no desacoplamento mitocondrial, mas também por participar nos mecanismos de defesa contra o ROS.

Estresse térmico agudo, de 34°C por 24 horas, foi capaz de atuar na produção de ROS mitocondrial e na atividade da enzima glutathiona peroxidase no fígado de codornas.

APÊNDICE

Tabela 1 - Estimativas *a posteriori* das distribuições dos contrastes entre os tratamentos avaliados sobre a expressão de mRNA IGF-1 e GHR no músculo

	Contrastes	Média	desvio-padrão	mediana	p _{2,5%}	p _{97,5%}
IGF-1	Δ1	-0,23	0,48	-0,22	-1,13	0,67
	Δ2	-0,48	0,56	-0,49	-1,55	0,55
	Δ3	-0,24	0,41	-0,24	-1,02	0,52
	Δ4	-0,24	0,38	-0,24	-0,95	0,45
	Δ5	-0,26	0,52	-0,26	-1,24	0,70
	Δ6	-0,01	0,35	-0,01	-0,69	0,66
	Δ7	-0,01	0,31	-0,01	-0,59	0,56
	Δ8	0,25	0,46	0,25	-0,60	1,10
	Δ9	0,24	0,43	0,24	-0,53	1,02
	Δ10	-0,00	0,20	-0,002	-0,39	0,38
GHR	Δ1	-0,06	0,04	-0,06	-0,14	0,01
	Δ2	-0,06	0,07	-0,06	-0,20	0,08
	Δ3	-0,05	0,06	-0,05	-0,16	0,06
	Δ4	0,01	0,06	0,01	-0,09	0,13
	Δ5	0,01	0,06	0,01	-0,11	0,13
	Δ6	0,01	0,04	0,01	-0,07	0,10
	Δ7	0,08	0,04	0,08	-0,01	0,17
	Δ8	0,01	0,07	0,01	-0,13	0,16
	Δ9	0,07	0,07	0,07	-0,07	0,22
	Δ10	0,06	0,06	0,06	-0,05	0,19

Δ1= contraste entre dieta basal e DL1; Δ2= contraste entre dieta basal e DL2; Δ3= contraste entre dieta basal e MHA-FA1; Δ4= contraste entre dieta basal e MHA-FA2; Δ5= contraste entre DL1 e DL2; Δ6= contraste entre DL1 e MHA-FA1; Δ7= contraste entre DL1 e MHA-FA2; Δ8= contraste entre DL2 e MHA-FA1; Δ9= contraste entre DL2 e MHA-FA2; Δ10= contraste entre MHA-FA1 e MHA-FA2

Tabela 2 - Estimativas *a posteriori* das distribuições dos contrastes entre os tratamentos avaliados sobre a expressão de mRNA UCP no fígado

	Contrastes	Média	desvio-padrão	mediana	p _{2,5%}	p _{97,5%}
UCP	$\Delta 1$	0,12	0,2	0,12	-0,29	0,54
	$\Delta 2$	0,08	0,2	0,08	-0,39	0,57
	$\Delta 3$	0,04	0,2	0,04	-0,35	0,44
	$\Delta 4$	0,09	0,2	0,09	-0,33	0,52
	$\Delta 5$	-0,03	0,1	-0,03	-0,30	0,29
	$\Delta 6$	-0,08	0,1	-0,08	-0,26	0,10
	$\Delta 7$	-0,03	0,1	-0,03	-0,27	0,21
	$\Delta 8$	-0,04	0,1	-0,04	-0,30	0,25
	$\Delta 9$	0,01	0,1	0,01	-0,33	0,34
	$\Delta 10$	0,05	0,1	0,05	-0,15	0,25

$\Delta 1$ = contraste entre dieta basal e DL1; $\Delta 2$ = contraste entre dieta basal e DL2; $\Delta 3$ = contraste entre dieta basal e MHA-FA1; $\Delta 4$ = contraste entre dieta basal e MHA-FA2; $\Delta 5$ = contraste entre DL1 e DL2; $\Delta 6$ = contraste entre DL1 e MHA-FA1; $\Delta 7$ = contraste entre DL1 e MHA-FA2; $\Delta 8$ = contraste entre DL2 e MHA-FA1; $\Delta 9$ = contraste entre DL2 e MHA-FA2; $\Delta 10$ = contraste entre MHA-FA1 e MHA-FA2

Tabela 3 - Estimativas *a posteriori* das distribuições dos contrastes entre os tratamentos avaliados sobre a expressão de mRNA COX III no fígado e músculo

	Contrastes	média	desvio-padrão	mediana	p2,5%	p97,5%
COX III Fígado	$\Delta 1$	1,89	73,30	1,860	-144,40	147,00
	$\Delta 2$	-92,05	151,40	-93,50	-388,40	214,50
	$\Delta 3$	-21,70	65,10	-21,50	-152,40	107,10
	$\Delta 4$	-11,40	62,50	-11,30	-137,10	113,10
	$\Delta 5$	-93,95	143,90	-95,80	-376,50	196,50
	$\Delta 6$	-23,60	44,40	-23,40	-111,90	64,50
	$\Delta 7$	-13,32	40,37	-13,29	-93,88	66,79
	$\Delta 8$	70,35	139,00	71,70	-211,70	344,00
	$\Delta 9$	80,63	138,40	82,10	-199,00	353,50
	$\Delta 10$	10,20	21,60	10,20	-33,00	53,40
COX III Músculo	$\Delta 1$	15,45	19,00	15,47	-22,40	53,00
	$\Delta 2$	-18,58	69,20	-18,83	-154,80	120,50
	$\Delta 3$	-5,50	24,80	-5,50	-55,10	43,80
	$\Delta 4$	-24,10	55,10	-24,40	-133,00	86,80
	$\Delta 5$	-34,00	68,70	-34,30	-169,90	103,50
	$\Delta 6$	-20,90	23,10	-21,00	-66,60	25,00
	$\Delta 7$	-39,60	54,32	-39,93	-146,90	69,40
	$\Delta 8$	13,00	70,40	13,40	-127,30	152,20
	$\Delta 9$	-5,50	85,70	-5,80	-175,20	167,20
	$\Delta 10$	-18,60	56,60	-18,80	-130,70	94,60

$\Delta 1$ = contraste entre dieta basal e DL1; $\Delta 2$ = contraste entre dieta basal e DL2; $\Delta 3$ = contraste entre dieta basal e MHA-FA1; $\Delta 4$ = contraste entre dieta basal e MHA-FA2; $\Delta 5$ = contraste entre DL1 e DL2; $\Delta 6$ = contraste entre DL1 e MHA-FA1; $\Delta 7$ = contraste entre DL1 e MHA-FA2; $\Delta 8$ = contraste entre DL2 e MHA-FA1; $\Delta 9$ = contraste entre DL2 e MHA-FA2; $\Delta 10$ = contraste entre MHA-FA1 e MHA-FA2

Tabela 4 - Estimativas *a posteriori* das distribuições dos contrastes entre os tratamentos avaliados sobre a expressão de mRNA ANT no fígado e músculo

	Contrastes	média	desvio-padrão	mediana	p2,5%	p97,5%
ANT Fígado	$\Delta 1$	4,09	16,30	4,07	-27,80	36,40
	$\Delta 2$	2,47	16,20	2,46	-29,10	34,40
	$\Delta 3$	-3,21	16,60	-3,27	-36,03	29,69
	$\Delta 4$	0,33	16,20	0,324	-31,50	32,5
	$\Delta 5$	-1,62	6,40	-1,60	-14,32	11,00
	$\Delta 6$	-7,31	7,30	-7,32	-21,60	7,08
	$\Delta 7$	-3,76	6,50	-3,77	-16,65	8,97
	$\Delta 8$	-5,69	7,00	-5,71	-19,43	7,95
	$\Delta 9$	-2,14	6,20	-2,11	-14,36	9,68
	$\Delta 10$	3,54	7,10	3,56	-10,45	17,51
ANT Músculo	$\Delta 1$	3,24	4,50	3,23	-5,80	12,30
	$\Delta 2$	6,57	5,10	6,55	-3,70	16,90
	$\Delta 3$	5,91	5,70	5,91	-5,70	17,50
	$\Delta 4$	3,46	5,10	3,45	-6,70	13,70
	$\Delta 5$	3,32	4,20	3,30	-5,02	11,60
	$\Delta 6$	2,67	4,90	2,69	-7,10	12,40
	$\Delta 7$	0,21	4,10	0,22	-8,00	8,40
	$\Delta 8$	-0,65	5,40	-0,63	-11,60	10,10
	$\Delta 9$	-3,10	4,70	-3,11	-12,60	6,44
	$\Delta 10$	-2,45	5,40	-2,45	-13,30	8,37

$\Delta 1$ = contraste entre dieta basal e DL1; $\Delta 2$ = contraste entre dieta basal e DL2; $\Delta 3$ = contraste entre dieta basal e MHA-FA1; $\Delta 4$ = contraste entre dieta basal e MHA-FA2; $\Delta 5$ = contraste entre DL1 e DL2; $\Delta 6$ = contraste entre DL1 e MHA-FA1; $\Delta 7$ = contraste entre DL1 e MHA-FA2; $\Delta 8$ = contraste entre DL2 e MHA-FA1; $\Delta 9$ = contraste entre DL2 e MHA-FA2; $\Delta 10$ = contraste entre MHA-FA1 e MHA-FA2