



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

**AVALIAÇÃO DE FONTES DE METIONINA SINTÉTICA NO
DESEMPENHO E EXPRESSÃO DE GENES DO METABOLISMO DOS
AMINOÁCIDOS SULFUROSOS NO TECIDO HEPÁTICO DE
FRANGOS**

SILVANA CRISTINA LIMA DOS SANTOS

**AREIA – PB
FEVEREIRO DE 2019**

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

**AVALIAÇÃO DE FONTES DE METIONINA SINTÉTICA NO DESEMPENHO E
EXPRESSÃO DE GENES DO METABOLISMO DOS AMINOÁCIDOS
SULFUROSOS NO TECIDO HEPÁTICO DE FRANGOS**

**SILVANA CRISTINA LIMA DOS SANTOS
Zootecnista**

**AREIA – PB
FEVEREIRO DE 2019**

SILVANA CRISTINA LIMA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DE FONTES DE METIONINA SINTÉTICA NO
DESEMPENHO E EXPRESSÃO DE GENES DO METABOLISMO DOS
AMINOÁCIDOS SULFUROSOS NO TECIDO HEPÁTICO DE
FRANGOS**

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

Comitê de Orientação:

Prof. Dr. José Humberto Vilar da Silva – Orientador principal

Profa. Dra. Patrícia Emília Naves Givisiez – Segunda orientadora

Prof. Dr. Samuel Aggrey – Terceiro orientador

AREIA – PB

FEVEREIRO DE 2019

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S237a Santos, Silvana Cristina Lima Dos.

Avaliação de fontes de metionina sintética no desempenho e expressão de genes do metabolismo dos aminoácidos sulfurados no tecido hepático de frangos / Silvana Cristina Lima Dos Santos. - Areia, 2019.
74 f. : il.

Orientação: José Humberto Vilar da Silva.
Coorientação: Patrícia Emília Naves Givisiez.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCA.

1. exigência nutricional. 2. Met+Cys digestível. 3. nutrigenômica. 4. remetilação. 5. transulfuração. I. Silva, José Humberto Vilar da. II. Givisiez, Patrícia Emília Naves. III. Título.

UFPB/CCA-AREIA



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

PARECER DE DEFESA DO TRABALHO DE TESE

TÍTULO: "AVALIAÇÃO DE FONTES DE METIONINA SINTÉTICA NO DESEMPENHO E EXPRESSÃO DE GENES DO METABOLISMO DOS AMINOÁCIDOS SULFUROSOS NO TECIDO HEPÁTICO DE FRANGOS"

AUTOR: Silvana Cristina lima dos Santos

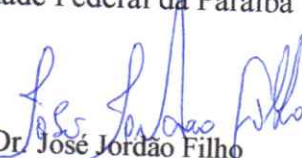
ORIENTADOR: Prof. Dr. José Humberto Vilar da Silva

JULGAMENTO

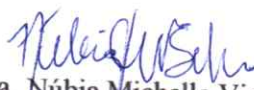
CONCEITO: APROVADO

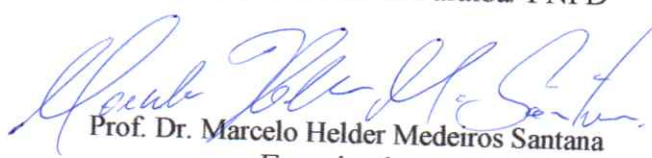
EXAMINADORES:


Prof. Dr. José Humberto Vilar da Silva
Presidente
Universidade Federal da Paraíba


Prof. Dr. José Jordão Filho
Examinador
Universidade Federal da Paraíba


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


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


Prof. Dr. Marcelo Helder Medeiros Santana
Examinadora
Instituto Federal de Educação, Ciência e tecnologia da Paraíba

Areia, 22 de fevereiro de 2019

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

SILVANA CRISTINA LIMA DOS SANTOS- filha de José de Arimatéia dos Santos e Maria Josélia Lima dos Santos, nasceu no dia 04 de março de 1990 na cidade de Esperança – PB. Em março do ano de 2008, ingressou no curso de Zootecnia da Universidade Federal da Paraíba. Durante a graduação foi bolsista de extensão (PROBEX) durante o período de abril a novembro de 2010. Foi bolsista de extensão de projeto aprovado no edital 33/2009 do CNPq, durante um ano. Ainda foi bolsista de iniciação científica- CNPq de agosto de 2011 a julho de 2012. Diplomou-se Zootecnista no ano de 2013. Em março de 2013, iniciou o curso de Mestrado em Zootecnia no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade Federal da Paraíba, na Área de Segurança alimentar, obtendo o título de Mestre em Zootecnia no ano de 2015. No mesmo ano, iniciou o Doutorado em Zootecnia no Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia, da Universidade Federal da Paraíba, Universidade Federal Rural de Pernambuco e Universidade Federal do Ceará, em que trabalhou na área de nutrição animal, subárea avicultura com ênfase em biologia molecular.

“Viva como se fosses morrer amanhã.
Aprenda como se fosses viver para sempre.”
Mahatma Gandhi

ÀS PESSOAS MAIS IMPORTANTES DA MINHA
VIDA E MEUS MOTIVOS PARA PERSISTIR E NÃO
DESISTIR DAS LUTAS DIÁRIAS:
JOSÉ (PAI) E JOSÉLIA (MÃE); SIMONE, SILENNE E
SILVESTRE (IRMÃOS); MARIA JÚLIA E ANA
BEATRIZ (SOBRINHAS) E MEU AMOR, MAURO.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Nesse momento, quero demonstrar minha gratidão a todos que foram importantes para que tudo se concretizasse. Desta forma, quero agradecer acima de tudo a Deus, pois a fé que tenho nele foi meu maior combustível para concluir este trabalho!

À CAPES, pelo incentivo à pesquisa e concessão da bolsa de estudo.

Ao Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia (PDIZ) pela contribuição na minha formação profissional.

À Universidade Federal da Paraíba (UFPB) pela oportunidade e acolhimento.

Ao meu orientador, Dr. José Humberto pela oportunidade concedida de colaborar com esta pesquisa e todo o suporte necessário para o seu desenvolvimento.

A minha co-orientadora, Dr^a Patrícia por toda orientação e conselhos ao longo da minha vida acadêmica e por seu exemplo de profissional e ser humano.

A Dr^a Danila Campos, por sua disponibilidade e não medir esforços para ajudar e esclarecer dúvidas.

À minha família, minha gratidão eterna: aos meus pais, minha maior fonte de inspiração; às minhas irmãs, por todo amor e companheirismo; ao meu cunhado, por toda ajuda ao longo desses anos; às minhas sobrinhas, por tanta doçura, carinho e alegrias e por tornarem os meus momentos mais leves. Amo todos vocês!

Ao meu Amor Mauro, por contribuir na minha vida acadêmica e tornar minha existência mais interessante e feliz. Sem você, muita coisa não teria acontecido, e foi devido aos seus incentivos, apoio emocional e científico, que consegui finalizar as atividades. Obrigada por todas as horas que segurou em minha mão e aconselhou. Muita gratidão e amor, sempre e para sempre!

À minha amiga Maylane, por ter colaborado em muitas atividades, independente do dia e horário; obrigada por estar sempre disponível a ajudar, conversar e ouvir. Espero que nossa amizade perdure por toda a vida.

À minha amiga Cristina, por estar sempre com belas palavras me confortando e passando paz. Pessoas como você trazem esperança para este mundo. Muito obrigada por ser exemplo de força e determinação!

À toda a equipe NEPaves, que colaboraram de alguma maneira para execução do experimento, em nome de: Aliton, João Pedro, Claudiana, Carol, Gabi, Flavio, Mario, Leo, Jane, Natali, Vaqueiro, Thiago, David, Lucas e Felipão (*in memoriam*); aos bolsistas de iniciação científica da avicultura do curso técnico e todos que fazem parte do CCHSA.

Aos meus colegas da turma de doutorado pela ajuda mútua, companheirismo, experiências divididas e momentos de descontração, especialmente a Juliete, Fatima e Fernanda!

Aos meus amigos ex-LAPOA, Herald, Candice e Laelia que mesmo distantes estão dispostos a ouvir e aconselhar, e que foram muito importantes ao longo da minha trajetória acadêmica.

À toda a equipe do LAPOA: mestrando, doutorando, pós doutorando, a técnica e os professores, por me acolherem para desenvolver todas as análises, em especial Dr. Alexandre Lemos, por ensinar-me pacientemente.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

	Páginas
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xii
RESUMO GERAL.....	xiii
GENERAL ABSTRACT	xv
CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	1
CAPÍTULO I.....	3
Exigência e desempenho produtivo de frangos alimentados com três níveis de Metionina+Cistina Digestível e três fontes de metionina	3
RESUMO	4
ABSTRACT.....	5
1 INTRODUÇÃO	6
2 MATERIAL E MÉTODOS	8
2.1 Local dos experimentos.....	8
2.2 Experimento I.....	8
2.2.1 Animais e delineamento experimental	8
2.2.2 Instalações	8
2.2.3 Dietas experimentais	9
2.3 Experimento II.....	9
2.3.1 Animais e delineamento experimental	9
2.3.2 Dietas experimentais	9
2.3.3 Variáveis analisadas	12
2.3.4 Abate e amostragens de tecidos	13
2.3.5 Histomorfometria do jejuno	13
2.3.6 Análises estatísticas.....	14
3 RESULTADOS	15
3.1 Experimento I.....	15
3.2 Experimento II.....	17
3.2.1 Desempenho	17
3.2.2 Pesos absolutos e relativos de carcaça e cortes	23

3.2.3	Empenamento.....	25
3.2.4	Histomorfometria do jejuno	26
4	DISCUSSÃO	33
4.1	Experimento I.....	33
4.2	Experimento II.....	34
4.3	Pesos de carcaça, cortes nobres e penas	36
4.4	Histomorfometria do jejuno	37
5	CONCLUSÃO	40
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	41
	CAPÍTULO II	48
	Expressão de genes relacionados a rota dos aminoácidos sulfurosos em frangos de corte alimentados com dietas contendo três níveis de metionina+cistina e duas fontes de metionina	48
	RESUMO	49
	ABSTRACT.....	50
2.1	Descrição do local e comitê de ética	53
2.2	Animais e instalação.....	53
2.3	Dietas experimentais e manejo	54
2.4	Variáveis analisadas	56
2.5	Coleta de tecidos para análises de RNA.....	56
2.6	Extração de RNA e expressão gênica.....	56
2.7	Análises estatísticas	58
3	RESULTADOS.....	59
3.1	Desempenho	59
3.2	Expressão gênica	60
4	DISCUSSÃO	64
5	CONCLUSÃO	68
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
7	CONSIDERAÇÕES E IMPLICAÇÕES FINAIS.....	74

LISTA DE TABELAS

Capítulo I	Páginas
Tabela 1 - Composição percentual e valores nutricionais das dietas experimentais.....	11
Tabela 2 - Determinação dos níveis de metionina (%), das substituições das fontes (%), quantidades de Met+CysD (g) e amido (g) nas dietas de frangos de corte.....	12
Tabela 3 - Desempenho, peso de penas, pesos absolutos e relativos de carcaças e cortes nobres de frangos de corte de 8-21 dias.....	16
Tabela 4 - Consumo de ração de frangos de corte alimentados com rações contendo três níveis de Met+CysD e substituições de DL-Met por DL-HMTBA.....	18
Tabela 5 - Ganho de peso de frangos de corte alimentados com rações contendo três níveis de Met+CysD e substituições de DL-Met por DL-HMTBA.....	20
Tabela 6 - Conversão alimentar de frangos de corte alimentados com rações contendo três níveis de Met+CysD e substituições de DL-Met por DL-HMTBA.....	22
Tabela 7 - Pesos absolutos e relativos de carcaças e cortes de frangos alimentados com dietas contendo três níveis de Met+CysD e substituições de DL-Met por DL-HMTBA.....	24
Tabela 8 - Dados de penas de frangos alimentados com dietas contendo três níveis de Met+CysD e substituições de DL-Met por DL-HMTBA.....	26
Tabela 9 - Valores histomorfométricos do jejuno de frangos alimentados com dietas contendo três níveis de Met+CysD e substituições de DL-Met por DL-HMTBA.....	27
Tabela 10 - Valores histomorfométricos do jejuno de frangos alimentados com dietas contendo três níveis de Met+CysD e substituições de DL-Met por DL-HMTBA.....	29
Tabela 11 - Valores histomorfométricos do jejuno de frangos alimentados com dietas contendo três níveis de Met+CysD e substituições de DL-Met por DL-HMTBA.....	31

LISTA DE TABELAS

Capítulo II	Páginas
Tabela 1 - Composição percentual e valores nutricionais das dietas experimentais para frangos de corte.....	55
Tabela 2 - Sequências dos <i>primers</i> utilizados para amplificação dos genes alvo e gene referência.....	58
Tabela 3 - Desempenho, peso de penas, pesos absolutos e relativos de carcaças e cortes nobres de frangos de corte de 8-21 dias.....	59

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I	Páginas
Figura 1. Exigência de Metionina + Cistina Digestível determinada pelo ganho de peso em frangos de corte de 8 a 21 dias de idade.....	17
Figura 2. Exigência de Metionina + Cistina Digestível determinada pela conversão alimentar em frangos de corte de 8 a 21 dias de idade.....	17
 Capítulo II	 Páginas
Figura 1 - Expressão dos genes no fígado de frangos alimentados com três níveis de Met+CysD e duas fontes de metionina. a) <i>MTRR</i> ; b) <i>CBS</i> e c) <i>GSS</i>	61
Figura 2 - Expressão de genes no fígado de frangos alimentados com três níveis de Met+CysD e duas fontes de metionina. a) <i>ACHY</i> , b) <i>BHMT</i> , c) <i>MAT1</i> e d) <i>MTR</i>	62
Figura 3 - Expressão de genes no fígado de frangos aos 49 dias de idade alimentados com três níveis de Met+CysD.....	63
Figura 4 - Expressão de genes no fígado de frangos suplementados com DL-Met e DL-HMTBA.....	63

AVALIAÇÃO DE FONTES DE METIONINA SINTÉTICA NO DESEMPENHO E EXPRESSÃO DE GENES DO METABOLISMO DOS AMINOÁCIDOS SULFUROSOS NO TECIDO HEPÁTICO DE FRANGOS

RESUMO GERAL

Este estudo foi desenvolvido com o intuito de avaliar a exigência e o efeito dos níveis de Metionina+Cistina digestível (Met+CysD) e das fontes comerciais de metionina no desempenho zootécnico, rendimento de cortes e na 0-pç;regulação da expressão de genes que codificam as enzimas do metabolismo dos aminoácidos sulfurosos. Para tanto no Capítulo I encontram-se descritos dois experimentos. No primeiro, objetivou-se determinar a exigência de Met+CysD utilizando a DL-Metionina e 5 níveis de Met+CysD (0,63; 0,76; 0,88; 1,00 e 1,13%) com 6 repetições e 15 frangos por parcela, totalizando 450 frangos (Cobb 500 *slow feathering*[®]) por um período de 8-21 dias. De acordo com os resultados obtidos, a exigência de Met+CysD foi estimada em 1,016 e 0,953%, para ganho de peso e conversão alimentar, respectivamente. No segundo experimento, avaliou-se o efeito de três substituições de DL-Met por DL-HMTBA e de três níveis de Met+CysD (0,63, 0,88 e 1,13 de 8-21 dias; 0,58, 0,83 e 1,08 de 8-33 dias e 0,52, 0,77 e 1,02% de 8-42 dias) na deficiência, exigência e excesso; além de uma dieta com a L-Metionina (controle positivo) no nível que atendia a exigência sobre o desempenho, rendimento de carcaça e cortes nobres, histomorfometria do jejuno e dados de penas. Na fase de 8-21 dias entre os níveis, a deficiência de Met+CysD promoveu aumento no consumo de ração na dieta com 50%DL-Met:50%DL-HMTBA. Na fase de 8-33 dias observou-se que a dieta deficiente proporcionou aumento no consumo de ração em relação aos demais níveis. Já de 8-42 dias a exigência em Met+CysD promoveu diminuição do consumo de ração dos frangos que receberam 100%DL-Met e 100%DL-HMTBA. Com relação ao ganho de peso na fase de 8-21 dias a deficiência de Met+CysD ocasionou diminuição no ganho de peso. Já a dieta com a L-Met proporcionou maior ganho de peso. Os frangos na fase de 8-33 dias que receberam a dieta em excesso de Met+CysD e com 100%DL-HMTBA apresentaram maior ganho de peso. O nível deficiente de Met+CysD proporcionou menor ganho de peso para 100%DL-HMTBA na fase de 8-42 dias e os frangos que consumiram a dieta com 50%DL-Met:50% DL-HMTBA neste nível obtiveram maior ganho de peso. A substituição com 100%DL-Met no nível em excesso promoveu maior ganho de peso. A dieta deficiente em Met+CysD nas fases de 8-21 e 8-33 dias piorou a conversão alimentar. Aos 42 dias verificou-se que no nível deficiente não houve diferenças entre as substituições. Melhor conversão alimentar foi notada nos frangos que consumiram a dieta que atendia a exigência de Met+CysD com a fonte 100%DL-Met. Para o nível em excesso, melhor conversão alimentar foi obtida com 100%DL-Met. Assim como no desempenho, a deficiência de Met+CysD prejudicou o peso vivo, os pesos absolutos e relativos de carcaças e cortes nobres. Em relação às substituições, os frangos que consumiram a dieta 100% DL-Met apresentaram maior peso vivo e pesos absoluto e relativo de peito e peito desossado. A fonte L-Met proporcionou maiores pesos absolutos e relativos de peito e peito desossado. A fonte 100%DL-HMTBA ocasionou maior

porcentagem de penas e maior peso da oitava pena primária aos 21 dias. A dieta controle positivo foi eficiente no empenamento com maiores porcentagens de penas. Para a morfometria do jejuno na fase 8-21 dias, a deficiência de Met+CysD com a substituição 100%DL-HMTBA proporcionou maior altura de vilosidades em relação às demais. No nível que atendia a exigência de Met+CysD notou-se menor profundidade de criptas para 100%DL-Met. Observou-se menor relação vilo:cripta no jejuno de frangos que receberam 100%DL-Met no nível deficiente em Met+CysD. Na fase 8-33 dias, a deficiência de Met+CysD com a substituição 100%DL-Met proporcionou maior altura de vilosidades em relação às demais. No nível que atendia a exigência foi observada maior altura de vilosidades na dieta com 100%DL-Met. A dieta que atendia a exigência em Met+CysD proporcionou maior profundidade de criptas com 100%DL-HMTBA. Observou-se maior profundidade de cripta no nível deficiente de Met+CysD em todas as substituições estudadas. Na dieta que atendia a exigência, a relação vilo:cripta foi maior quando comparada às demais. Na fase de 8-42 dias, a deficiência em Met+CysD proporcionou maiores altura de vilosidades e profundidade de cripta nas três substituições. A exigência de Met+CysD foi estimada em 0,953% e 1,016%, pela conversão alimentar e ganho de peso, respectivamente. O nível em excesso de Met+CysD e as fontes: 100%DL-Met e L-metionina mostraram-se eficientes para desempenho, morfometria intestinal e características dos cortes comerciais e os frangos que receberam dietas com a DL-HMTBA no nível em excesso e a L-Metionina apresentaram maiores porcentagens de penas. No Capítulo II utilizou-se delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial 3x2, constituído de 3 níveis de Met+CysD (deficiente, exigência e excesso) e 2 fontes: a DL-Met e DL-HMTBA, totalizando 6 tratamentos com 6 repetições e quinze frangos por parcela, para avaliar sua implicação sobre o desempenho e a expressão de genes que codificam as enzimas do metabolismo dos aminoácidos sulfurados. O nível de Met+CysD deficiente comprometeu a conversão alimentar, o nível em excesso proporcionou melhor conversão alimentar. Em relação às fontes, a DL-Met mostrou-se mais eficiente que a DL-HMTBA. Os níveis deficientes e em excesso de Met+CysD e a utilização da fonte DL-HMTBA promoveram aumento na expressão de mRNA dos genes *MTRR* ($p=0,02$), *CBS* ($p=0,09$) e *GSS* ($p=0,06$) no fígado de frangos de corte aos 49 dias de idade. Contudo, para os genes *ACHY*, *MTR*, *MAT1A* e *BHMT* não houve alterações na expressão ($p>0,10\%$) em nenhum nível ou fonte estudada. O nível de deficiência de Met+CysD prejudicou o desempenho e alterou a abundância de mRNA aumentando a expressão de genes do metabolismo dos aminoácidos sulfurados no tecido hepático de frangos de corte aos 42 dias de idade.

Palavras-chave: exigência nutricional, Met+Cys digestível, nutrigenômica, remetilação, transulfuração

EVALUATION OF SYNTHETIC METHIONINE SOURCES IN PERFORMANCE AND GENE EXPRESSION OF SULFUR AMINO ACIDS METABOLISM IN BROILER HEPATIC TISSUE

GENERAL ABSTRACT

This study was designed to evaluate the requirement and effect of digestible Methionine + Cystine (Met+CysD) levels and the commercial methionine sources on zootechnical performance, cuts yield and gene expression regulation which encoding the enzymes of sulfur amino acid metabolism. Therefore, in Chapter I two experiments are described. In the first one, it was aimed to determine the requirement of Met+CysD, using DL-Methionine and 5 levels of Met+CysD (0.63; 0.76; 0.88; 1.00 and 1.13%) with 6 repetitions and 15 chickens per repetition, totaling 450 chickens (Cobb 500 slow feathering®) over a period of 8-21 days. According to the obtained results, the Met+CysD requirement was estimated at 1.016 and 0.953% for weight gain and feed conversion, respectively. In the second experiment, the effect of three DL-Met substitutions by DL-HMTBA, and three Met+CysD levels (0.63, 0.88 and 1.13 at 8-21 days; 0.58, 0.83 and 1.08 from 8-33 days and 0.52, 0.77 and 1.02% from 8-42 days) on deficiency, requirement and excess; in addition to a diet with L-Methionine (positive control) at the level that attend the requirement on performance, carcass yield and noble cuts, jejunum histomorphometry and feather data. In the 8-21 days phase between levels, Met+CysD deficiency promoted increased dietary feed intake when was used 50%DL-Met:50%DL-HMTBA. To the next phase, between 8-33 days, it was observed which the deficient diet provided an increase in feed intake in relation to the other levels. Then, from 8-42 days the requirement on Met+CysD promoted reduction of feed intake of chickens when 100% DL-Met and 100% DL-HMTBA was provided. Regarding weight gain in the 8-21 days phase, Met+CysD deficiency caused a decrease it during period; while the diet with L-Met provided greater weight gain. The broilers in the 8-33 days phase which received the Met+CysD excess diet and with 100%DL-HMTBA presented higher weight gain. The Met+CysD deficient level provided lower weight gain when 100%DL-HMTBA was used in first phase (8-42 day), as well as, the broilers which consumed the 50%DL-Met:50%DL-HMTBA diet at this level had the highest weight gain. Substitution of 100% DL-Met in excess level promoted greater weight gain. Met+CysD deficient diet both at 8-21 and 8-33 days phases worsened the feed conversion. At 42 days, it was found which in the deficient level there were no differences between used substitutions. The best feed conversion was observed in broilers that was feed by diet with attended the Met+CysD requirement with 100%DL-Met source. For the excess level, the better feed conversion was obtained with 100%DL-Met was provided to animals. Similarly, to performance, the Met+CysD deficiency impaired live weight, absolute and relative carcass weights and noble cuts. Regarding the substitutions, the broilers which consumed the 100%DL-Met diet presented higher live weight and absolute and relative weights of breast and boneless breast. The L-Met source provided higher both absolute and relative breast and boneless breast weights. The 100% DL-HMTBA source induced a higher percentage of feathers and greater weight of the eighth primary feather at 21 days. The positive control diet was

efficient in the feathering with higher feather percentages. For the jejunum morphometry during phase 8-21 days, Met+CysD deficiency with 100%DL-HMTBA substitution provided higher villus height than the others. At the Met+CysD level in the requirement, it was observed a smaller crypt depth to 100%DL-Met. Lower villus: crypt ratio was observed in the broiler jejunum which receiving 100%DL-Met at Met+CysD deficient level. In phase 8-33 days, Met+CysD deficiency with 100% DL-Met replacement provided higher villus height than the others. At the level that attend the requirement, it was observed higher villus height using diet with 100%DL-Met. Already for diet with Met+CysD in the requirement provided greater crypt depth with 100%DL-HMTBA. The greater crypt depth was observed at the deficient Met+CysD level in all studied substitutions. In the diet which attend the requirement, the villus: crypt ratio was higher when compared to the others. To all analyzed days (8-42 days phase), Met+CysD deficiency provided higher villus height and crypt depth for all three substitutions. Met+CysD requirement was estimated at 0.953% and 1.016% for feed conversion and weight gain, respectively. Met+CysD excess level and sources (100% DL-Met and L-methionine) were efficient for performance, intestinal morphometry and commercial cuts characteristics; broilers which was fed with DL-HMTBA level in excess and L-Methionine presented higher feather percentages. In Chapter II, a completely randomized design in a 3x2 factorial arrangement was used, consisting of 3 Met+CysD levels (deficient, demanding and excess) and 2 sources (DL-Met and DL-HMTBA), totaling 6 treatments with 6 repetitions and fifteen broiler chickens each, to evaluate their implications on the performance and expression of genes encoding sulfur amino acid metabolism enzymes. The deficient Met+CysD level compromised feed conversion, while the excess level provided better feed conversion; regarding sources, DL-Met was more efficient than DL-HMTBA. Deficient and excess Met+CysD levels and the use of the DL-HMTBA source promoted increased mRNA expression of the *MTRR* ($p = 0.02$), *CBS* ($p = 0.09$) and *GSS* ($p = 0.06$) in the broiler livers at 49 days of age. However, for *ACHY*, *MTR*, *MAT1A* and *BHMT* genes, there were no changes in expression ($p \geq 0.10$) at any level or source studied. Met+CysD deficiency impaired performance and altered mRNA abundance by increasing gene expression of sulfur amino acid metabolism in broiler liver tissue at 42 days of age.

Keywords: digestible Met+Cys, nutrigenomics, nutritional requirement, remethylation, transsulfuration

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

É notório que a produção de frangos de corte no Brasil conquistou importante espaço, tanto no mercado interno quanto externo. Os avanços adquiridos com o passar das décadas deram-se através de investimentos em pesquisas em todas áreas da cadeia avícola, destacando-se as áreas de genética e nutrição. Entretanto, existem muitos mecanismos nestas áreas, os quais, ainda não foram totalmente elucidados. Em particular, pouco se sabe sobre os inúmeros papéis desempenhados pela metionina no metabolismo dos aminoácidos sulfurosos e a sua influência na expressão dos genes que codificam as enzimas envolvidas no mesmo.

De modo geral, a metionina é indispensável nas formulações para frangos de corte, pois, além de ser um aminoácido essencial é a primeira limitante e sua importância deve-se a atuação em vários processos metabólicos. Além disso, embora a cisteína seja considerada aminoácido não-essencial, esta é incorporada às proteínas, assim como, a metionina.

Dentre as funções dos aminoácidos sulfurosos já descritas anteriormente na literatura, podemos destacar o fato da metionina atender às exigências de cisteína, a qual atua na deposição e no crescimento de penas. Nesse sentido, é necessário estudar qual fonte comercial de metionina sintética e o nível mínimo de Metionina+Cistina digestível (Met+CysD) podem disponibilizar um maior aporte deste aminoácido sem comprometer o desempenho produtivo dos frangos, e se este desvio é maior para via da remetilação ou transulfuração.

Devido à elevada exigência de metionina nas dietas de frangos de corte existem disponíveis no mercado diversas fontes comerciais, sendo as mais utilizadas, a L-metionina, DL-metionina (DL-Met) e seu análogo 2-ácido 4-hidroxi metil butanoico (DL-HMTBA), nas formas em pó e líquida, respectivamente. Ambas apresentam particularidades que podem estar relacionadas com as diferenças relatadas entre as fontes sobre alguns parâmetros produtivos. A partir destas constatações, torna-se importante o conhecimento da expressão de genes que codificam as enzimas relacionadas com o metabolismo dos aminoácidos sulfurosos,

bem como, o papel da nutrição de frangos de corte na regulação destes processos.

Assumindo estas proposições, o trabalho foi dividido em dois capítulos: no primeiro, o objetivo foi descrever a realização de dois experimentos: o primeiro, para determinar a exigência de Met+CysD em frangos de corte aos 21 dias de idade; o segundo, com intuito de avaliar o efeito dos níveis de Met+CysD e das fontes de metionina (L-metionina, DL-Met e DL-HMTBA) sobre o desempenho produtivo, morfometria intestinal e características de carcaça em frangos de corte de 8-42 dias de idade.

A proposta do segundo capítulo foi elucidar o efeito das fontes de metionina (DL-Met e DL-HMTBA) e dos níveis de Met+CysD sobre o desempenho e a expressão dos genes que codificam as enzimas que atuam no metabolismo dos aminoácidos sulfurados em frangos de corte aos 49 dias de idade.

CAPÍTULO I

**Exigência e desempenho produtivo de frangos alimentados com
três níveis de Metionina+Cistina Digestível e três fontes de
metionina**

Exigência e desempenho produtivo de frangos alimentados com três níveis de Metionina+Cistina Digestível e três fontes de metionina

RESUMO

Neste estudo foi realizados dois experimentos: no primeiro objetivou-se determinar a exigência de Met+CysD para frangos de corte de 8-21 dias de idade alimentados com dietas contendo DL-Metionina. Frangos Cobb 500 *slow feathering*[®] foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado com cinco níveis de Met+CysD (0,63; 0,76; 0,88; 1,00 e 1,13%), seis repetições e 15 frangos por parcela. A exigência de Met+CysD foi estimada em 1,016 e 0,953%, para ganho de peso e conversão alimentar, respectivamente. No segundo experimento, avaliou-se as respostas de frangos de corte que consumiram dietas contendo três níveis de Met+CysD e três fontes de Metionina. Os níveis de Met+CysD foram: 0,63; 0,88 e 1,13 de 8-21 dias; 0,58; 0,83 e 1,08 de 8-33 dias e, 0,52; 0,77 e 1,02% de 8-42 dias, juntamente com as três substituições (0, 50 e 100%) da DL-Met pela DL- HMTBA, além de uma dieta controle positivo suplementada com L-Met, totalizando 10 tratamentos. A deficiência de Met+CysD ocasionou a pior conversão alimentar. Em relação à substituição de DL-Met por DL-HMTBA, os frangos que receberam a DL-Met na fase de 8-42 dias obtiveram melhor desempenho. A L-Metionina foi mais eficiente que as demais. Os frangos que consumiram a dieta contendo 100%DL-Met apresentaram maiores pesos vivo, de peito e peito desossado. Com relação aos pesos relativos, os frangos que receberam dietas deficientes em Met+CysD tiveram redução no peso de peito e peito desossado. De acordo com as três substituições, 100%DL-Met proporcionou peito desossado mais pesado. Os frangos que receberam a dieta com L-Met, apresentaram aumento nos pesos absolutos e relativos de peito inteiro e desossado. A substituição 100%DL-HMTBA e a dieta com L-Metionina proporcionaram maiores porcentagens de penas e peso da oitava pena primária. Com relação aos níveis, observou-se maior porcentagem de penas nos frangos que consumiram a dieta em excesso de Met+CysD. Na morfometria intestinal a deficiência de Met+CysD promoveu menor altura de vilosidade do jejuno aos 21 dias, entretanto, nas demais fases houve aumento da altura de vilosidade, maior profundidade de cripta e menor relação vilo:cripta. Portanto, pode-se concluir que a exigência de Met+CysD foi estimada pela conversão alimentar em 0,953% para frangos de corte na fase de 8-21 dias de idade. O nível em excesso de Met+CysD e as fontes 100%DL-Met e L-Metionina mostraram-se eficientes para desempenho, morfometria intestinal e características dos cortes comerciais. E as fontes DL-HMTBA no nível em excesso e a L-Metionina promoveram maiores porcentagens de penas.

Palavras chave: aminoácidos sulfurosos, empenamento, histomorfometria intestinal, rendimento de carcaça

Requirement and performance production of broilers fed by diets-containing three levels of Methionine + Digestible Cystine and three sources of methionine

ABSTRACT

It was performed two experiments in this study: in the first one was aimed to determine the requirement of Met+CysD to broilers 8-21 days of age, fed with DL-Methionine-contained diet. Cobb 500 (*slow feathering*[®]) broilers were allocated in a completely randomized design with five Met+CysD levels (0.63; 0.76; 0.88; 1.00 e 1.13%), six repetitions and 15 chickens in each. The Met+CysD requirement was estimated in 1.016 and 0.953%, for weight gain and feed conversion, respectively. In the second experiment it was evaluated the broilers response to diet contained three Met+CysD levels and three methionine sources. The Met+CysD levels were: 0.63, 0.88 and 1,13 from 8-21 days; 0.58, 0.83 and 1.08 from 8-33 days, and 0.52; 0.77 and 1.02% from 8-42 days, amongst the three replacements (0, 50 and 100%) of DL-Met by DL-HMTBA, besides a positive-control diet supplemented with L-Met, totalizing ten treatments. The Met+CysD deficiency caused the worst feed conversion. Related to replacement of DL-Met by DL-HMTBA, broilers which received DL-Met in the 8-42 days level obtained the best performance. The L-Methionine was more efficient the others used. The broilers which was fed with 100%DL-Met-contained diet shown the highest body, breast and boneless breast weight values. About relative weights, broilers which received Met+CysD deficient diets shown reduction of breast and boneless breast weights. According to three replacement used, 100%DL-Met resulted in animals with boneless breast high weight. The broilers which received L-Met on the diet shown increase in the absolute and relative weight of breast and boneless breast. Both 100%DL-HMTBA and L-Methionine diet provided the highest percentage of feather and weight of primary eighth feather. Related to levels, it was observed high feather percentage in broilers fed with Met+CysD excess. In the intestinal morphometry, the Met+CysD deficiency promoted lowest height of jejunum villus at 21 days, however, in the other levels, there was villus height increase, higher crypt depth and lower villus:crypt ratio. Therefore, the Met+CysD exigency was estimated by feed conversion in 0.953% to broilers during 8-21 days of age. The level in Met+CysD excess, as well as 100%DL-Met and L-methionine sources showed efficient results to performance, intestinal morphometry and characteristics of commercial cuts. Besides that, excess DL-HMTBA source and L-Methionine promoted highest feather percentage.

Keywords: carcass yield, feathering, intestinal histomorphometry, sulfur amino acids

1 INTRODUÇÃO

A necessidade de incluir aminoácidos sulfurosos na dieta de frangos de corte é devido a inúmeros fatores, incluindo o fato de a metionina ser um aminoácido essencial para a síntese proteica (ZHANG et al., 2017), desempenhando papel de iniciadora na tradução das proteínas; ser precursora em mais de 100 reações de metilações no metabolismo de poliaminas, creatina e fosfatidilcolina (BROSNAN & BROSNAN, 2006). Ainda a metionina atua na síntese de cisteína, a qual por ser instável, forma ligações dissulfeto com outra molécula de cisteína dando origem a cistina (Cys), responsável por conferir força e rigidez à queratina (BARONE; SCHMIDT; LIEBNER, 2005). Desta forma, embora a cisteína não seja considerada um aminoácido essencial, seu fornecimento é necessário e se dá através da rota da transulfuração (FAGUNDES et al., 2019).

De modo geral, a deficiência de metionina pode ocasionar inúmeros prejuízos na produção de frangos. Foi demonstrado por Donsbough et al. (2010) que o teor de ácido úrico das excretas pode ser reduzido quando a metionina é adicionada às dietas, o que sugere que a sua deficiência limita a utilização de aminoácidos em dietas à base de milho e soja. Ainda a suplementação de metionina ajuda na proteção das células intestinais de frangos desafiados com *Eimeria* spp dos danos oxidativos induzidos pelos radicais livres, principalmente, através da modulação do sistema antioxidante (KHATLAB et al., 2019).

Por esta razão, a formulação deve ser realizada levando em consideração os requisitos nutricionais de frangos de corte para atender às exigências de Met+CysD o que possibilita a obtenção de maior deposição de massa muscular associada a melhor conversão alimentar.

De acordo com Agostini et al. (2016) as fontes mais utilizadas são a DL-metionina (DL-Met-99%) e o seu análogo, 2-ácido 4-hidroxi metil butanoico (DL-HMTBA-88%), esta última diferencia-se da primeira por apresentar um grupamento hidroxila no lugar do grupamento amina, podendo ser considerada um ácido orgânico até sua conversão em L-metionina, além de ser formada por monômeros, dímeros e oligômeros (DIBNER; BUTTIN, 2002). Devido às diferenças químicas e físicas, a biodisponibilidade (ZELENKA et al., 2013) e as funções fisiológicas podem ser diferentes entre as fontes.

A adição de fontes comerciais de metionina constitui um fator importante, promovendo ganhos produtivos nas criações de frangos de corte. Em contrapartida, existem controvérsias quanto a eficiência das principais fontes, pois alguns estudos relatam que a suplementação de metionina promove melhora no desempenho de frangos de corte (MEIRELLES et al., 2003; SWENNEN et al., 2011; DEL VESCO et al., 2013), independente da fonte utilizada.

Diante do exposto, foram realizados dois experimentos: o primeiro com intuito de determinar a exigência de Met+CysD para frangos de corte de 8-21 dias de idade alimentados com dietas contendo cinco níveis de Met+CysD e utilizando a fonte comercial DL-metionina; o segundo experimento foi realizado partindo da hipótese de que as fontes comerciais de metionina atuam distintamente nas principais características produtivas. Deste modo, objetivou-se avaliar as respostas de frangos de corte alimentados com dietas contendo três níveis de Met+CysD e três substituições de DL-Met por DL-HMTBA sobre o desempenho, características dos cortes comerciais, penas e morfometria intestinal do jejuno aos 42 dias de idade.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local dos experimentos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Avicultura do Departamento de Ciência Animal no Centro de Ciências Humanas, Sociais e Agrárias (CCHSA) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Campus III, localizado no Município de Bananeiras-PB.

Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com os preceitos e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA-UFPB) com o protocolo nº 075/2017.

2.2 Experimento I

2.2.1 Animais e delineamento experimental

Foram utilizados pintos de corte machos (Cobb 500 *slow feathering*[®]) com um dia de idade obtidos de incubatório comercial, vacinados contra Marek e Gumboro e sexados pela asa. Durante o período de 1 a 7 dias de idade, os pintainhos ficaram em círculo de proteção seguindo as recomendações do manual da linhagem. Aos oito dias de idade 450 pintos com o peso médio inicial de 185 ± 1 g, foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado em cinco tratamentos (níveis de Met+CysD: 0,63, 0,76; 0,88; 1,00 e 1,13%) com seis repetições e 15 frangos por parcela totalizando 450 animais no período de 8-21 dias.

2.2.2 Instalações

Os animais foram alojados em galpão de alvenaria, coberto com telhas de barro, piso de concreto e muretas laterais com telas de arame até o telhado, providos de cortinas laterais, utilizando-se a maravalha como material de cama. O galpão foi dividido em boxes de 1,0 x 1,5m, equipados com comedouros tubulares e bebedouros tipo pendular. Para garantir ambiente térmico adequado foram instaladas nos boxes lâmpadas

incandescentes de 150 watts, com altura regulada de acordo com o crescimento das aves mantendo-se os valores de temperatura e umidade relativa do ar dentro das faixas de conforto térmico, utilizando programa de luz contínuo (24 horas de luz = natural e artificial).

2.2.3 Dietas experimentais

As dietas experimentais foram isonitrogênicas e isoenergéticas e suplementadas de DL-Met em substituição ao amido. Os níveis de Met+CysD foram: 0,63% para a dieta deficiente (utilizada como referência para as demais); 0,76 intermediário; 0,88 atendendo a exigência; 1,00 intermediário e acima da exigência 1,13%.

A dieta referência foi composta por milho e farelo de soja e outros ingredientes seguindo as recomendações para frangos de corte na fase de 8-21 dias de idade (ROSTAGNO et al., 2011). Os frangos receberam ração e água à vontade durante todo o período experimental.

2.3 Experimento II

2.3.1 Animais e delineamento experimental

Aos oito dias de idade pintos (Cobb 500 *slow feathering*[®]) com média de peso inicial de 185 ± 1 g, foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial $3 \times 3 + 1$ (3 níveis de Met+CysD x 3 substituições da DL-Met pela DL-HMTBA) e uma dieta controle positivo suplementada com L-Metionina (99%), sendo dez tratamentos com seis repetições de 15, 13 e 11 aves, totalizando 900, 780 e 600 frangos para as fases de 8-21, 8-33 e 8-42 dias, respectivamente. O galpão utilizado foi o mesmo descrito para o experimento I e seguindo o programa de luz contínuo de 24 horas de luz (natural e artificial).

2.3.2 Dietas experimentais

A dieta referência foi composta por milho e farelo de soja e demais ingredientes e formulada seguindo as recomendações de Rostagno et al. (2011) para frangos de corte de 8-42 dias de idade (Tabela 1). Os níveis de Met+CysD foram: 0,63; 0,88 e 1,13% de 8-21 dias; 0,58, 0,83 e 1,08% de 8-33 dias e 0,52, 0,77 e 1,02% de 8-42 dias (Tabela 2) respectivamente, para os níveis de deficiência, exigência e excesso.

Todas as dietas experimentais foram isonitrogênicas e isoenergéticas e suplementadas com DL-Met ou DL-HMTBA em substituição ao amido. Além disso, a substituição da DL-Met por DL-HMTBA foi em base equimolar, ou seja, 1 unidade de DL-Met = 1,125 unidades de DL-HMTBA conforme descrito anteriormente por Visentini et al. (2005). A oferta de ração e água foi à vontade durante todo o período experimental.

Tabela 1 - Composição percentual e valores nutricionais das dietas experimentais

Ingredientes (%)	Inicial	Crescimento	Final
	8-21 dias	8-33 dias	8-42 dias
Milho (7,88%)	56,716	62,175	62,506
Farelo de soja (45%)	35,775	30,132	28,685
Óleo de soja	3,291	3,692	4,500
Fosfato bicálcico (18,1%)	1,558	1,353	1,151
Calcário	0,945	0,889	0,759
DL-Metionina	0,062	0,060	0,014
DL-HMTBA	0,070	0,068	0,016
L-Lisina HCl	0,245	0,308	0,315
L-Treonina	0,084	0,103	0,144
L-Arginina	0,000	0,058	0,191
L-Valina	0,000	0,086	0,084
L-Triptofano	0,000	0,000	0,024
Amido	0,600	0,600	0,600
Sal comum	0,491	0,338	0,743
Cloreto de Colina	0,100	0,070	0,100
Premix Vitamínico ¹	0,050	0,050	0,100
Premix Mineral ²	0,050	0,050	0,050
Coccidiostático ³	0,005	0,005	0,005
Bacitracina de zinco	0,015	0,015	0,015
Antioxidante ⁴	0,010	0,010	0,010
Total	100	100	100
Composição calculada			
Energia Metabolizável (kcal/kg)	3050	3150	3200
Proteína Bruta (%)	20,980	19,000	18,400
Cálcio (%)	0,841	0,758	0,663
Fósforo disponível (%)	0,401	0,354	0,309
Metionina digestível (%)	0,343	0,318	0,266
Metionina+cistina digestível (%)	0,630	0,580	0,520
Lisina digestível (%)	1,217	1,131	1,100
Treonina digestível (%)	0,791	0,735	0,750
Triptofano digestível (%)	0,236	0,206	0,220
Valina digestível (%)	0,891	0,880	0,850
Arginina digestível (%)	1,327	1,221	1,300
Sódio (%)	0,210	0,150	0,310
Cloro (%)	0,345	0,254	0,495
Potássio (%)	0,819	0,732	0,706

⁽¹⁾ Suplemento vitamínico: 1.000.000 UI de vitamina A, 1.700.000 UI de vitamina D3, 20.000 mg de vitamina E, 2.000 mg de vitamina K3, 2.000 mg de vitamina B1, 4.000 mg de vitamina B2, 2.000 mg de vitamina B6, 10.000 mcg de vitamina B12, 20.000 mg de niacina, 10.000 mg de ácido pantotênico, 25 mg de biotina, 500 mg de ácido fólico. ⁽²⁾ Suplemento mineral: 250 mg de selênio, 75.000 mg de manganês, 70.000 mg de zinco, 50.000 de ferro, 8.500 mg de cobre, 1.500 mg de iodo, 200 mg de cobalto (Níveis de garantia por kg de produto). ⁽³⁾ Salinomicina sódica 12g. ⁽⁴⁾ 200 ppm de Hidróxido de Tolueno Butilado (BHT).

Tabela 2 - Determinação dos níveis de metionina (%), das substituições das fontes (%), quantidades de Met+CysD (g) e amido (g) nas dietas de frangos de corte

8-21 dias		Níveis de Metionina (%)								
		0,63			0,88			1,13		
		Substituição (%)								
Fonte (g)	CP ¹	0	50	100	0	50	100	0	50	100
L-Met	0,312	-	-	-	0,062	0,062	0,062	0,062	0,062	0,062
DL-Met	-	0,062	0,031	-	0,250	0,125	-	0,500	0,250	-
DL-HMTBA	-	-	0,035	0,070	-	0,141	0,281	-	0,281	0,568
Amido (g)	0,350	0,600	0,594	0,592	0,350	0,334	0,319	0,100	0,069	0,032
8-33 dias		Níveis de Metionina (%)								
		0,58			0,83			1,08		
		Substituição (%)								
Fonte (g)	CP ¹	0	50	100	0	50	100	0	50	100
L-Met	0,310	-	-	-	0,060	0,060	0,060	0,060	0,060	0,060
DL-Met	-	0,060	0,030	-	0,250	0,125	-	0,500	0,250	-
DL-HMTBA	-	-	0,034	0,068	-	0,142	0,284	-	0,284	0,568
Amido (g)	0,350	0,600	0,596	0,592	0,350	0,333	0,316	0,100	0,066	0,032
8-42 dias		Níveis de Metionina (%)								
		0,52			0,77			1,02		
		Substituição (%)								
Fonte (g)	CP ¹	0	50	100	0	50	100	0	50	100
L-Met	0,264	-	-	-	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014
DL-Met	-	0,014	0,007	-	0,250	0,125	-	0,500	0,250	-
DL-HMTBA	-	-	0,008	0,016	-	0,142	0,284	-	0,284	0,568
Amido (g)	0,350	0,600	0,599	0,598	0,350	0,333	0,316	0,100	0,066	0,032

¹controle positivo.

2.3.3 Variáveis analisadas

No experimento I foram analisados os dados de desempenho (consumo de ração, peso vivo, ganho de peso, conversão alimentar), características dos cortes comerciais e dados de penas (peso da oitava pena primaria e percentual) de frangos alimentados com a fonte DL-Met na fase de 8-21 dias.

No experimento II avaliou-se o efeito de três substituições de DL-Met por DL-HMTBA e três níveis de Met+CysD além da fonte L-Met, sobre o desempenho (consumo de ração, peso vivo, ganho de peso, conversão alimentar) e morfometria intestinal (altura das vilosidades, profundidade de cripta e relação vilo:cripta) do jejuno nas fases de 8-21, 8-33 e 8-42 dias; as características dos cortes comerciais aos 42 dias

e dados de penas (peso da oitava pena primária e percentual) na fase de 8-21 dias de idade.

2.3.4 Abate e amostragens de tecidos

Foram selecionadas oito aves com peso médio representativo do tratamento para o abate. Após jejum de 6 horas as aves foram pesadas e insensibilizadas, em seguida, retirada a oitava pena primária para ser pesada em balança analítica de precisão e, seus valores comparados entre os tratamentos. Posteriormente, deu-se sequência ao abate por sangria na veia jugular

Em seguida, os frangos foram pesados novamente, depenados e pesados pela terceira vez para a obtenção do peso das penas e, subsequente, percentual de penas (razão entre o peso das penas e peso vivo multiplicado por 100). Para as características de carcaça, ela foi pesada, bem como, os cortes nobres para determinação do rendimento destes em relação ao peso vivo em jejum.

2.3.5 Histomorfometria do jejuno

Para a morfometria coletou-se o jejuno de 4 frangos por tratamento ao acaso, aproximadamente 2 cm da porção medial do jejuno foram colhidas. As amostras foram lavadas com água destilada e fixados em formol a 10% até o momento das análises. Em seguida, os tecidos foram desidratados em série crescentes de álcoois (70, 80, 90, 100%), diafanizadas em xilol e incluídos em parafina previamente derretida em estufa a 62°C. Foi então realizada microtomia semi-seriada para montagem das lâminas. Os cortes tiveram espessura de 5 µm, realizados com auxílio de micrótomo rotativo e os cortes colocados em lâminas. Posteriormente, foi feita a desparafinação e hidratação dos cortes, utilizando-se xilol, série de álcoois e água, em seguida, realizada a coloração das mesmas pelo método Hematoxilina-Eosina (HE).

A captura de imagens dos cortes histológicos foi realizada com microscópio óptico, utilizando-se aumento de 5X. As análises morfométricas foram realizadas em analisador de imagens realizando 40 medições de altura de vilosidades e 40 de profundidade de cripta por tratamento.

As variáveis estudadas foram altura de vilosidade, profundidade de cripta e relação vilo:cripta. A altura de vilosidade foi determinada do ápice até a sua região basal que coincide com a superfície da cripta até seu ápice; a profundidade de cripta foi medida a partir da região de transição vilosidade cripta até sua base e a relação vilo:cripta é a divisão da altura de vilosidades pela profundidade de cripta.

2.3.6 Análises estatísticas

As estimativas das exigências de Met+CysD foram estabelecidas por meio de modelo de regressão polinomial das variáveis avaliadas em função dos níveis (experimento I).

Os dados de desempenho, morfometria intestinal, características dos cortes comerciais e dados de penas foram analisados usando o JMP *Statistical Discovery Software SAS* (SAS Institute, 2009). Os efeitos significativos foram posteriormente avaliados pelo teste SNK (*Student-Newman-Keuls*) a 5% de probabilidade (experimento II).

3 RESULTADOS

3.1 Experimento I

Considerando as variáveis de desempenho não houve efeito dos níveis para o consumo de ração ($p=0,128$). Porém, constatou-se efeito quadrático para ganho de peso ($\hat{y}=-360,04x^2+731,26x+551,78$) e conversão alimentar ($\hat{y}=0,8949x^2-1,7056x+2,1016$) com as exigências de Met+CysD estimadas em 1,016 e 0,953%, respectivamente.

Os níveis de Met+CysD influenciaram o peso ($\hat{y}=-0,1325x^2+0,2294x-0,0137$) e a porcentagem de penas ($\hat{y}=-8,6281x^2+14,219x+2,0814$), com exigências estimadas em 0,8657 e 0,8240%, respectivamente. Observou-se efeito quadrático para peso vivo ($\hat{y}=-0,5454x^2+1,0435x+0,5856$), peso de carcaça ($\hat{y}=-0,7308x^2+1,3705x+0,1525$), peito com osso ($\hat{y}=-0,3769x^2+0,7202x-0,0513$), peito desossado ($\hat{y}=-0,4765x^2+0,9246x-0,2128$), asa ($\hat{y}=-0,0811x^2+0,1541x+0,0128$), coxa ($\hat{y}=-0,085x^2+0,1649x+0,0247$) e sobrecoxa ($\hat{y}=-0,0624x^2+0,1405x+0,0408$) e as exigências de Met+CysD foram estimadas em: 0,956%; 0,937%; 0,955%; 0,969%; 0,950%; 0,970% e 1,125%, respectivamente.

Observou-se efeito linear para os pesos relativos de peito ($\hat{y}=4,0798x+32,76$) e de sobrecoxa ($\hat{y}=2,8639x + 12,293$). No entanto, o peso relativo de peito desossado foi influenciado quadraticamente ($\hat{y}=-37,593x^2+74,688x-7,1505$) e a estimativa da exigência para máximo rendimento de peito desossado foi de 0,993% (Tabela 3).

Tabela 3 - Desempenho, peso de penas, pesos absolutos e relativos de carcaças e cortes nobres de frangos de corte de 8-21 dias

Variáveis	Níveis de Met+CysD (%)					P	EPM ¹	Regressão ²	R ²	Estimativa
	0,63	0,76	0,88	1,00	1,13					
CR (g/ave)	1217	1155	1199	1209	1197	0,128	6,1158	ns	----	----
GP (g/ave)	876	885	920	933	913	0,042	5,7717	Q	0,83	1,016
CA	1,389	1,305	1,303	1,296	1,313	0,008	0,0086	Q	0,92	0,953
Penas										
Penas (g)	0,0765	0,0875	0,0853	0,0798	0,0778	0,000	0,001	Q	0,69	0,865
Penas (%)	7,43	8,33	7,78	7,41	7,27	0,008	0,097	Q	0,56	0,824
Pesos absolutos (g)										
Peso vivo	1030	1052	1095	1078	1069	0,019	0,006	Q	0,85	0,956
Carcaça	730	759	806	788	768	0,042	0,007	Q	0,88	0,937
Peito	255	275	287	300	278	0,001	0,003	Q	0,90	0,955
Peito desossado	182	213	228	242	221	0,000	0,003	Q	0,96	0,970
Asa	78	82	86	86	83	0,005	0,000	Q	0,97	0,950
Coxa	95	100	106	103	103	0,012	0,001	Q	0,88	0,970
Sobrecoxa	105	110	118	118	120	0,041	0,001	Q	0,96	1,125
Pesos relativos (%)										
Carcaça	70,82	72,12	73,62	72,17	71,81	0,069	0,406	ns	----	----
Peito	34,90	36,27	35,64	38,65	36,26	0,019	0,298	L	0,32	----
Peito desossado	25,04	28,14	28,30	31,19	28,83	0,000	0,411	Q	0,83	0,993
Asa	10,73	10,84	10,61	11,06	10,80	0,641	0,095	ns	----	----
Coxa	13,00	13,19	13,20	12,81	13,42	0,985	0,113	ns	----	----
Sobrecoxa	14,34	14,19	14,67	15,25	15,59	0,001	0,161	L	0,87	----

¹EPM: Erro padrão da média²Q=efeito quadrático; L=efeito linear; ns=não significativo

As exigências de Met+CysD foram estimadas em 1,016% para ganho de peso e 0,9530% para conversão alimentar (Figuras 1 e 2).

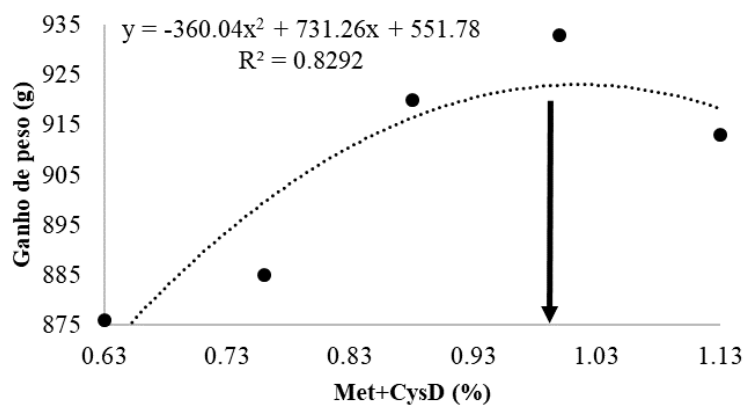


Figura 1. Exigência de Metionina + Cistina Digestível determinada pelo ganho de peso em frangos de corte de 8 a 21 dias de idade

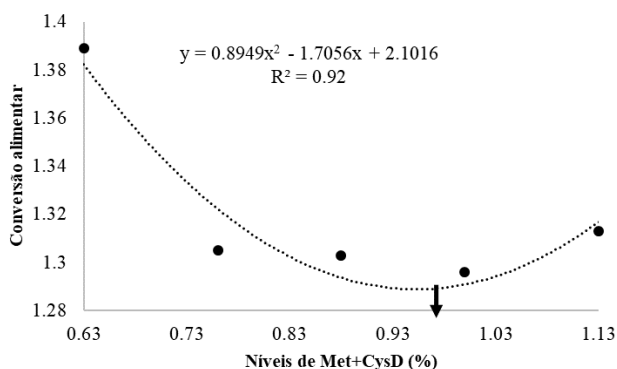


Figura 2. Exigência de Metionina + Cistina Digestível determinada pela conversão alimentar em frangos de corte de 8 a 21 dias de idade

3.2 Experimento II

3.2.1 Desempenho

Houve interação entre os níveis de Met+CysD e as substituições de DL-Met por DL-HMTBA para o consumo de ração de 8-21 e 8-42 dias ($P < 0,05$) (Tabela 4).

Tabela 4 - Consumo de ração de frangos de corte alimentados com rações contendo três níveis de Met+CysD e substituições de DL-Met por DL-HMTBA

Fase	Nível Met+CysD	Substituição				Médias	Fontes de variação				
		100%DL-Met	50%DL-Met: 50%DL-HMTBA	100%DL-HMTBA	100%L-Met ⁴		Nível	Substituição	SXN	EPM ⁵	CPxdemais ⁶
8-21 dias ¹	Deficiência	1216,7 ^{aAB}	1241,9 ^{aA}	1190,8 ^{aB}		1216,4	0,2411	0,1813	0,157	3,852	0,0858
	Exigência	1198,8 ^{aA}	1226,7 ^{aA}	1119,9 ^{aA}	1231,6	1215,2					
	Excesso	1197,4 ^{aA}	1193,5 ^{bA}	1217,0 ^{aA}		1202,6					
	Médias	1204,3	1204,3	1204,3							
Fase	Nível Met+CysD	100%DL-Met	50%DL-Met: 50%DL-HMTBA	100%DL-HMTBA	100%L-Met	Médias	Nível	Substituição	SXN	EPM	CPxdemais ⁶
8-33 dias ²	Deficiência	3067,3	3096,1	3018,5		3060,7 ^a	0,0034	0,7047	0,2965	11,835	0,2232
	Exigência	2972,5	3054,8	2993,7	3010,5	3007,0 ^b					
	Excesso	3006,8	2958,2	3005,1		2990,0 ^b					
	Médias	3015,5	3036,3	3009,4							
Fase	Nível Met+CysD	100%DL-Met	50%DL-Met: 50%DL-HMTBA	100%DL-HMTBA	100%L-Met	Médias	Nível	Substituição	SXN	EPM	CPxdemais ⁶
8-42 dias ³	Deficiência	4791,8 ^{aA}	4838,0 ^{aA}	4781,7 ^{aA}		4803,8 ^a	0,0028	0,3929	0,0204	17,209	0,4323
	Exigência	4621,9 ^{bB}	4833,6 ^{aA}	4697,5 ^{aB}	4689,5	4717,7 ^b					
	Excesso	4731,6 ^{abA}	4606,9 ^{abA}	4656,9 ^{aA}		4665,1 ^b					
	Médias	4715,1	4759,5	4712,0							

¹0,63 (deficiência); 0,88 (exigência) e 1,13% (excesso); ²0,58 (deficiência); 0,83 (exigência) e 1,08% (excesso); ³0,52% (deficiência); 0,77% (exigência) e 1,02% (excesso); ⁴CP=100%L-metionina 0,88 (8-21); 0,83 (8-33) e 0,77% (8-42 dias); ⁵EPM: Erro Padrão Médio; ⁶contraste ortogonal para comparar o controle positivo com as substituições e níveis;

^{A,B} para cada nível, médias de substituição seguidas por letras diferentes maiúsculas na linha diferem entre si pelo teste SNK;

^{a,b} para cada substituição, médias de níveis seguidos por letras diferentes minúsculas na coluna diferem entre si pelo teste SNK.

Entre os níveis, na fase de 8-21 dias a deficiência de Met+CysD promoveu aumento do consumo de ração na dieta 50%DL-Met:50%DL-HMTBA. Observou-se que entre as substituições as dietas com 100% DL-Met e 100%DL-HMTBA o consumo de ração permaneceu igual nos três níveis estudados. Já os frangos que receberam a dieta 50%DL-Met:50%DL-HMTBA no nível em excesso de Met+CysD apresentaram menor consumo de ração em relação aos demais.

Na fase de 8-33 dias observou-se que apenas o nível de Met+CysD afetou o consumo de ração. A dieta deficiente proporcionou aumento no consumo em relação aos demais. Já de 8-42 dias o consumo de ração não se alterou entre as três substituições no nível deficiente tampouco em excesso. A dieta na exigência de Met+CysD promoveu diminuição do consumo dos frangos que receberam 100%DL-Met e 100%DL-HMTBA em relação à 50%DL-Met:50%DL-HMTBA. De acordo com a análise das substituições entre os níveis, os frangos que se alimentaram com dietas 100%DL-Met no nível deficiente apresentaram maior consumo em relação aos demais níveis. Observou-se maior consumo de ração em frangos que receberam 50%DL-Met:50%DL-HMTBA nas dietas deficiente e exigência, quando comparados aos que se alimentaram com o nível em excesso. Já na substituição 100%DL-HMTBA, não houve interferência dos níveis no consumo de ração (Tabela 4).

Na Tabela 5 estão descritos os resultados obtidos dos três níveis de Met+CysD e das substituições, para o ganho de peso dos frangos de 8-21, 8-33 e 8-42 dias.

Tabela 5 - Ganho de peso de frangos de corte alimentados com rações contendo três níveis de Met+CysD e substituições de DL-Met por DL-HMTBA

Fase	Nível Met+CysD	Substituição				Médias	Fontes de variação				
		100%DL- Met	50%DL-Met: 50%DL-HMTBA	100%DL- HMTBA	100%L- Met ⁴		Nível	Substituição	SXN	EPM ⁵	CPxdemais ⁶
8-21 dias ¹	Deficiência	876,1	897,3	877,3		883,6 ^c	0,0001	0,4342	0,285	3,789	0,001
	Exigência	920,4	921,4	935,9	940,1 ^a	925,9 ^b					
	Excesso	912,8	918,2	918,3		916,4 ^b					
	Médias	903,1	912,3	909,0							
8-33 dias ²	Nível Met+CysD	100%DL- Met	50%DL-Met: 50%DL-HMTBA	100%DL- HMTBA	100%L- Met	Médias	Nível	Substituição	SXN	EPM	CPxdemais ⁶
	Deficiência	1958,0 ^{bA}	1954,7 ^{cA}	1956,1 ^{bA}		1954,1 ^b	0,0001	0,3921	0,0074	10,095	0,1772
	Exigência	2038,9 ^{abA}	2070,7 ^{aA}	2041,4 ^{bA}	2074,9	2050,3 ^a					
	Excesso	2058,7 ^{aAB}	2,023,3 ^{bB}	2095,2 ^{aA}		2059,0 ^a					
	Médias	2018,5	2016,3	2030,8							
8-42 dias ³	Nível Met+CysD	100%DL- Met	50%DL-Met: 50%DL-HMTBA	100%DL- HMTBA	100%L- Met	Médias	Nível	Substituição	SXN	EPM	CPxdemais ⁶
	Deficiência	2827,9 ^{cAB}	2886,0 ^{bA}	2795,6 ^{bB}		2836,5 ^b	0,0001	0,0382	0,0001	15,456	0,0941
	Exigência	2995,8 ^{ba}	3036,0 ^{aA}	2994,5 ^{aA}	3010,1	3008,7 ^a					
	Excesso	3161,0 ^{aA}	2936,4 ^{bC}	3032,9 ^{aB}		3043,4 ^a					
	Médias	2994,9 ^a	2952,8 ^{ab}	2941,0 ^b							

¹0,63 (deficiência); 0,88 (exigência) e 1,13% (excesso); ²0,58 (deficiência); 0,83 (exigência) e 1,08% (excesso); ³0,52% (deficiência); 0,77% (exigência) e 1,02% (excesso); ⁴CP=100%L-metionina 0,88 (8-21); 0,83 (8-33) e 0,77% (8-42 dias); ⁵EPM: Erro Padrão Médio; ⁶contraste ortogonal para comparar o controle positivo com as substituições e níveis;

^{A,B} para cada nível, médias de substituição seguidas por letras diferentes maiúsculas na linha diferem entre si pelo teste SNK;

^{a,b} para cada substituição, médias de níveis seguidos por letras diferentes minúsculas na coluna diferem entre si pelo teste SNK.

Os níveis de Met+CysD influenciaram o ganho de peso de frangos na fase de 8-21 dias. Pode-se observar que a deficiência de Met+CysD ocasionou diminuição no ganho de peso e os níveis na exigência e excesso proporcionaram frangos mais pesados. Além disso, os frangos que receberam a dieta com a L-Met apresentaram maior ganho de peso.

Nas fases de 8-33 e 8-42 dias observou-se interação entre os níveis de Met+CysD e as substituições de DL-Met por DL-HMTBA. Com relação às substituições na fase de 8-21 dias, nos níveis deficiente e o que atendia a exigência, o ganho de peso foi semelhante nas três substituições. Já para a dieta em excesso os frangos que receberam 100%DL-HMTBA apresentaram maior ganho de peso e a substituição de 100%DL-Met foi semelhante à 50%DL-Met:50%DL-HMTBA e 100%DL-HMTBA. Entre os níveis e com a substituição de 100%DL-Met, 50%DL-Met:50%DL-HMTBA e 100% DL-HMTBA, obteve-se maior ganho de peso nos níveis: excesso, exigente e excesso, respectivamente.

Ao avaliar os resultados obtidos na fase de 8-42 dias, observou-se que o nível deficiente de Met+CysD proporcionou menor ganho de peso para 100%DL-HMTBA e aqueles que consumiram a dieta com 50%DL-Met:50% DL-HMTBA neste nível obtiveram maior ganho de peso entre as substituições. O ganho de peso dos frangos que se alimentaram com a dieta no nível exigido de Met+CysD foi semelhante nas três substituições. Já no nível em excesso, a substituição 100%DL-Met proporcionou maior ganho de peso. Entre as substituições, maior ganho de peso foi obtido no nível em excesso para DL-Met, no nível exigente quando utilizou-se as duas fontes (50%DL-Met:50% DL-HMTBA) e nos níveis exigente e excesso de Met+CysD com 100%DL-HMTBA (Tabela 5). Na Tabela 6 estão descritos os resultados obtidos dos três níveis de Met+CysD e das substituições, para a conversão alimentar dos frangos de 8-21, 8-33 e 8-42 dias.

Tabela 6 - Conversão alimentar de frangos de corte alimentados com rações contendo três níveis de Met+CysD e substituições de DL-Met por DL-HMTBA

Fase	Nível Met+CysD	Substituição				Médias	Fontes de variação				
		100%DL-Met	50%DL-Met: 50%DL-HMTBA	100%DL-HMTBA	100%L-Met ⁴		Nível	Substituição	SXN	EPM ⁵	CPxdemais ⁶
8-21 dias ¹	Deficiência ¹	1,38	1,38	1,34		1,37 ^a	0,0001	0,7452	0,0961	0,005	0,0465
	Exigência	1,30	1,33	1,30	1,31 ^b	1,31 ^b					
	Excesso	1,31	1,29	1,32		1,31 ^b					
	Médias	1,33	1,33	1,32							
Fase	Nível Met+CysD	100%DL-Met	50%DL-Met: 50%DL-HMTBA	100%DL-HMTBA	100%L-Met	Médias	Nível	Substituição	SXN	EPM	CPxdemais ⁶
8-33 dias ²	Deficiência	1,56	1,58	1,54		1,56 ^a	0,0001	0,0755	0,1583	0,015	0,0465
	Exigência	1,45	1,47	1,46	1,45 ^b	1,46 ^b					
	Excesso	1,46	1,46	1,43		1,45 ^b					
	Médias	1,49	1,50	1,48							
Fase	Nível Met+CysD	100%DL-Met	50%DL-Met: 50%DL-HMTBA	100%DL-HMTBA	100%L-Met	Médias	Nível	Substituição	SXN	EPM	CPxdemais ⁶
8-42 dias ³	Deficiência	1,69 ^{aA}	1,67 ^{aA}	1,70 ^{aA}		1,69 ^a	<0,0001	0,005	0,019	0,009	0,0043
	Exigência	1,54 ^{bB}	1,59 ^{bA}	1,56 ^{bAB}	1,55 ^b	1,56 ^b					
	Excesso	1,49 ^{cB}	1,56 ^{bA}	1,53 ^{bA}		1,53 ^c					
	Médias	1,57 ^b	1,61 ^a	1,60 ^a							

¹0,63 (deficiência); 0,88 (exigência) e 1,13% (excesso); ²0,58 (deficiência); 0,83 (exigência) e 1,08% (excesso); ³0,52% (deficiência); 0,77% (exigência) e 1,02% (excesso); ⁴CP=100%L-metionina 0,88 (8-21); 0,83 (8-33) e 0,77% (8-42 dias); ⁵EPM: Erro Padrão Médio; ⁶contraste ortogonal para comparar o controle positivo com as substituições e níveis;

^{A,B} para cada nível, médias de substituição seguidas por letras diferentes maiúsculas na linha diferem entre si pelo teste SNK;

^{a,b} para cada substituição, médias de níveis seguidos por letras diferentes minúsculas na coluna diferem entre si pelo teste SNK.

Nas fases de 8-21 e 8-33 dias a pior conversão alimentar foi obtida para os frangos que receberam a dieta deficiente em Met+CysD. Houve efeito da interação na fase de 8-42 dias, em que no nível deficiente não existiu diferenças entre as substituições. Já no nível que atendia a exigência com 100%DL-Met proporcionou melhor conversão em relação às demais e 100%DL-HMTBA foi semelhante as duas substituições. Para o nível em excesso de Met+CysD, a melhor conversão alimentar foi obtida com 100%DL-Met.

Entre aos níveis, observou-se que para a DL-Met a melhor conversão foi obtida nos frangos que consumiram a dieta em excesso, seguida daqueles que receberam o nível que atendia a exigência de Met+CysD. Na dieta com 50%DL-Met:50%DL-MHA, tanto o nível na exigência quanto em excesso promoveu melhor conversão alimentar, comportamento semelhante quando comparada a dieta 100%DL-HMTBA entre os níveis de Met+CysD.

3.2.2 Pesos absolutos e relativos de carcaça e cortes

Na Tabela 7 estão descritos os pesos absolutos e relativos de frangos aos 42 dias de idade.

Tabela 7 - Pesos absolutos e relativos de carcaças e cortes de frangos alimentados com dietas contendo três níveis de Met+CysD e substituições de DL-Met por DL-HMTBA

Nível de Met+CysD ¹ Substituição	Pesos absolutos (g)						
	Peso vivo	Carcaça	Peito	Peito desossado	Asa	Coxa	Sobrecoxa
Deficiência	2879 ^b	2299 ^b	836 ^c	645 ^c	233	290	373
Exigência	3082 ^a	2464 ^a	995 ^b	790 ^b	237	316	394
Excesso	3116 ^a	2510 ^a	1041 ^a	847 ^a	241	309	401
100%DL-Met	3089 ^a	2484	988 ^a	800 ^a	238	309	394
50%DL-Met: 50%DL-HMTBA	3009 ^{ab}	2402	950 ^{ab}	745 ^b	233	304	384
100%DL-HMTBA	2980 ^b	2387	934 ^b	737 ^b	240	302	390
100%L-Met	3125	2504	1045 ^a	889 ^a	232	315	389
Fontes de variação							
Nível	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,2679	0,0001	0,0043
Substituição	0,0486	0,0942	0,0180	0,0001	0,3435	0,4389	0,4786
SXN	0,1423	0,2208	0,3124	0,3891	0,7867	0,1267	0,7618
EPM ³	0,0224	0,0218	0,0137	0,0134	0,0018	0,0026	0,0034
CPXdemaiss ⁴	0,0918	0,1958	0,0007	0,0001	0,5087	0,1815	0,9684
Pesos relativos (%)							
Deficiência	-	79,77	36,39 ^b	28,09 ^c	10,16 ^{ab}	12,67	16,27
Exigência	-	79,92	40,41 ^a	32,08 ^b	9,61 ^b	12,84	16,02
Excesso	-	80,55	41,51 ^a	33,79 ^a	9,59 ^b	12,34	16,01
100%DL-Met	-	80,40	39,76	32,22 ^a	9,59	12,48	15,89
50%DL-Met: 50%DL-HMTBA	-	79,77	39,50	30,94 ^b	9,71	12,68	16,01
100%DL-HMTBA	-	80,07	39,05	30,80 ^b	10,06	12,68	16,41
100%L-Met ²	-	80,14	41,74 ^a	35,52 ^a	9,28	12,60	15,54
Fontes de variação							
Nível	-	0,613	0,0001	0,0001	0,031	0,1048	0,742
Substituição	-	0,757	0,468	0,0342	0,1251	0,6303	0,3675
SXN	-	0,461	0,692	0,5355	0,9016	0,9919	0,3469
EPM ³	-	0,311	0,358	0,4048	0,0947	0,0885	0,1478
CPXdemaiss ⁴	-	0,952	0,003	0,0001	0,1023	0,9637	0,2638

¹0,52% (deficiência); 0,77% (exigência) e 1,02% (excesso); ²CP=100%L-metionina 0,88 (8-21); 0,83 (8-33) e 0,77% (8-42 dias); ³EPM: Erro Padrão Médio; ⁴contraste ortogonal para comparar o controle positivo com as substituições e níveis; ^{A,B} para cada nível, médias de substituição seguidas por letras diferentes maiúsculas na linha diferem entre si pelo teste SNK; ^{a,b} para cada substituição, médias de níveis seguidas por letras diferentes minúsculas na coluna diferem entre si pelo teste SNK.

Conforme já relatado nas variáveis de desempenho, o nível deficiente de Met+CysD prejudicou o peso vivo, os pesos absolutos de carcaças e cortes nobres ($P<0,05$). Contudo, os pesos absolutos de asas, sobrecoxa não apresentaram diferenças ($P>0,05$). Com relação ao nível em excesso, este promoveu maiores pesos absolutos de peito e peito desossado ($P<0,01$). Já o peso vivo e de carcaça não diferiram na exigência tampouco no excesso de Met+CysD ($P>0,05$). Ao avaliar as substituições, os frangos que consumiram a dieta contendo 100%DL-Met apresentaram maiores pesos vivo, de peito e peito desossado ($P<0,05$).

Com relação aos pesos relativos, os frangos que consumiram as dietas deficientes em Met+CysD tiveram redução no peso de peito e peito desossado ($P<0,01$). De acordo com as três substituições, 100%DL-Met proporcionou peito desossado mais pesado ($P<0,05$). Já os frangos que receberam a dieta com L-Met apresentaram aumento nos pesos absolutos e relativos de peito inteiro e desossado.

3.2.3 Empenamento

Na Tabela 8 pode-se observar os resultados de porcentagens de penas e peso da 8ª pena primária de frangos que consumiram dietas contendo três níveis de Met+CysD e substituições de DL-Met por DL-HMTBA na fase de 8-21 dias.

Tabela 8 – Dados de penas de frangos alimentados com dietas contendo três níveis de Met+CysD e substituições de DL-Met por DL-HMTBA

Nível de Met+CysD ¹ Substituição	Porcentagem de penas	Peso 8ª pena primária (mg)
Deficiência	7,714 ^b	0,138
Exigência	7,632 ^b	0,140
Excesso	8,031 ^a	0,147
100%DL-Met	7,576 ^b	0,136 ^b
50%DL-Met:50%DL-HMTBA	7,886 ^a	0,136 ^b
100%DL-HMTBA	7,914 ^a	0,153 ^a
100%L-Met ²	8,181 ^a	0,139
Fontes de variação		
Nível	0,014	0,089
Substituição	0,034	0,001
SXN	0,018	0,538
EPM ³	0,062	0,001
CPXdemais ⁴	0,035	0,621

¹0,63% (deficiência); 0,88% (exigência) e 1,13% (excesso); ²CP=100%L-metionina 0,88 (8-21); ³EPM: Erro Padrão Médio; ⁴contraste ortogonal para comparar o controle positivo com as substituições e níveis;

^{A,B} para cada nível, médias de substituição seguidas por letras diferentes maiúsculas na linha diferem entre si pelo teste SNK; ^{a,b} para cada substituição, médias de níveis seguidos por letras diferentes minúsculas na coluna diferem entre si pelo teste SNK.

De acordo com os resultados sobre empenamento (Tabela 8) pode-se notar que as porcentagens de penas de frangos (Cobb *Slow feathering*®) foram influenciadas pelos níveis de Met+CysD e pelas substituições. Não houve efeito significativo ($P>0,05$) entre os níveis de Met+CysD para o peso da oitava pena primária, entretanto este foi influenciado pelas substituições de DL-Met por DL-HMTBA ($P<0,01$). A substituição 100%DL-HMTBA proporcionou maiores porcentagens de penas e pesos da oitava pena primária. Com relação aos níveis, observou-se maior porcentagem de penas nos frangos que consumiram os níveis em excesso de Met+CysD. Vale salientar que a dieta 100%L-Met mostrou-se eficiente com maiores porcentagens de penas.

3.2.4 Histomorfometria do jejuno

Na Tabela 9 pode-se observar que a suplementação dietética de Met+CysD e as substituições das fontes em estudo, influenciaram a altura de vilo (AV), a profundidade de cripta (PC) e relação vilo:cripta (V:C) do jejuno de frangos de corte

Tabela 9 - Valores histomorfométricos do jejuno de frangos alimentados com dietas contendo três níveis de Met+CysD e substituições de DL-Met por DL-HMTBA

Fase	Nível Met+CysD ¹	Substituição				Médias	Fontes de variação				
		100%DLMet	50%DL- Met:50%DLHMTBA	100%DLHMTBA	CP ²		N	S	SXN	EPM ³	CPxD ⁴
21 dias											
AV (µm)	Deficiência	677,29 ^{bB}	689,78 ^{cB}	864,36 ^{aA}		743,8 ^c					
	Exigência	659,07 ^{bB}	864,71 ^{aA}	837,65 ^{aA}	552,2 ^d	787,1 ^b	<0,0001	<0,0001	<0,0001	90,336	<0,0001
	Excesso	823,89 ^{aA}	813,91 ^{bA}	843,00 ^{aA}		826,9 ^a					
	Médias	720,0 ^c	789,4 ^b	848,3 ^a							
PC (µm)	Deficiência	210,38 ^{aA}	207,56 ^{aA}	208,16 ^{aA}		208,7 ^a					
	Exigência	161,68 ^{cC}	206,82 ^{aB}	215,42 ^{aA}	163,6 ^c	194,6 ^b	<0,0001	<0,0001	<0,0001	28,877	<0,0001
	Excesso	195,18 ^{bA}	191,45 ^{bA}	193,80 ^{bA}		193,4 ^b					
	Médias	189,0 ^b	201,9 ^a	205,7 ^a							
V:C (µm)	Deficiência	3,27 ^{bB}	3,42 ^{bB}	4,24 ^{aA}		3,6 ^c					
	Exigência	4,15 ^{aA}	4,24 ^{aA}	4,01 ^{aA}	3,4 ^c	4,1 ^b	0,0027	<0,0001	<0,0001	0,717	<0,0001
	Excesso	4,28 ^{aA}	4,30 ^{aA}	4,38 ^{aA}		4,3 ^a					
	Médias	3,9 ^b	3,9 ^b	4,2 ^a							

¹0,63% (deficiência); 0,88% (exigência) e 1,13% (excesso); ²CP=100%L-metionina 0,88 (8-21 dias); ³EPM: Erro Padrão Médio; ⁴contraste ortogonal para comparar o controle positivo com as substituições e níveis;

^{A,B} para cada nível, médias de substituição seguidas por letras diferentes maiúsculas na linha diferem entre si pelo teste SNK;

^{a,b} para cada substituição, médias de níveis seguidos por letras diferentes minúsculas na coluna diferem entre si pelo teste SNK.

De acordo com os resultados descritos na Tabela 9 houve interação para as variáveis de frangos na fase de 8-21 dias ($P < 0,0001$). Entre o nível deficiente de Met+CysD e as substituições, a dieta com 100%DL-HMTBA proporcionou maior altura de vilosidades. No nível que atendia a exigência maior altura de vilosidades foi obtida com as dietas 50%DL-Met:50%DL-HMTBA e 100%DL-HMTBA. Já no nível em excesso, as substituições não diferiram entre si. Entre as substituições, 100%DL-Met promoveu aumento nos valores da altura de vilosidade do jejuno dos frangos que consumiram as dietas em excesso de Met+CysD. Para a substituição 50%DL-Met/50%DL-HMTBA, maior altura de vilosidades foi obtida no nível que atendia a exigência de Met+CysD. Ainda, na dieta com 100%DL-HMTBA a altura das vilosidades não diferiu entre as substituições.

Ao avaliar a profundidade de cripta, o nível deficiente de Met+CysD comparado às substituições não houve diferenças. Por outro lado, no nível que atendia a exigência de Met+CysD notou-se menor profundidade de criptas para 100%DL-Met, seguida de 50%DL-Met:50%DL-HMTBA. Além disso, na dieta em excesso de Met+CysD não se observou diferenças. A substituição com 100%DL-Met no nível deficiente observou-se maior profundidade de cripta. Na dieta 50%DL-Met/50%DL-HMTBA proporcionou criptas com menor profundidade apenas no nível em excesso. Comportamento semelhante foi observado com 100%DL-HMTBA.

Na análise dos resultados da relação vilo:cripta, no nível deficiente de Met+CysD houve maior relação vilo:cripta com 100%DL-HMTBA; nos níveis que atendia a exigência e em excesso a relação vilo:cripta não diferiu entre as substituições. Ao relacionar os níveis nos frangos que receberam 100%DL-Met, observou-se menor relação vilo:cripta no nível deficiente em Met+CysD, comportamento semelhante foi observado para 50%DL-Met/50%DL-HMTBA e em 100%DL-HMTBA não se observou diferenças entre os níveis avaliados.

Tabela 10 - Valores histomorfométricos do jejuno de frangos alimentados com dietas contendo três níveis de Met+CysD e substituições de DL-Met por DL-HMTBA

Fase	Nível Met+CysD ¹	Substituição				Médias	Fontes de variação				
		100%DLMet	50%DL- Met:50%DLHMTBA	100%DLHMTBA	CP ²		N	S	SXN	EPM ³	CPxD ⁴
AV (µm)	Deficiência	908,47 ^{aA}	865,34 ^{aB}	887,55 ^{aAB}		887,1 ^a					
	Exigência	787,10 ^{cA}	707,77 ^{bB}	715,46 ^{cB}	808,6	736,7 ^c	<0,0001	<0,0001	<0,0001	68,260	0,4321
	Excesso	845,78 ^{bB}	885,96 ^{aA}	805,32 ^{bC}		845,6 ^b					
	Médias	847,1 ^a	819,6 ^b	802,7 ^b							
PC (µm)	Deficiência	200,77 ^{aA}	198,38 ^{aA}	197,89 ^{aA}		199,0 ^a					
	Exigência	116,75 ^{cC}	165,34 ^{bB}	181,35 ^{bA}	145,0 ^c	154,4 ^c	<0,0001	<0,0001	<0,0001	24,732	<0,0001
	Excesso	169,17 ^{bB}	155,14 ^{bB}	166,24 ^{cA}		163,5 ^b					
	Médias	162,2 ^c	172,9 ^b	181,8 ^a							
V:C (µm)	Deficiência	4,62 ^{cA}	4,45 ^{bA}	4,52 ^{bA}		4,5 ^c					
	Exigência	6,83 ^{aA}	4,38 ^{bB}	4,02 ^{cC}	5,6 ^a	5,0 ^b	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,793	<0,0001
	Excesso	5,09 ^{bB}	5,82 ^{aA}	4,95 ^{aB}		5,2 ^a					
	Médias	4,5 ^c	5,0 ^b	5,2 ^a							

¹0,58 (deficiência); 0,83 (exigência) e 1,08% (excesso); ²CP=100%L-metionina 0,83 (8-33 dias); ³EPM: Erro Padrão Médio; ⁴contraste ortogonal para comparar o controle positivo com as substituições e níveis;

^{A,B} para cada nível, médias de substituição seguidas por letras diferentes maiúsculas na linha diferem entre si pelo teste SNK;

^{a,b} para cada substituição, médias de níveis seguidos por letras diferentes minúsculas na coluna diferem entre si pelo teste SNK.

De acordo com os resultados descritos na Tabela 10, a deficiência em Met+CysD, a substituição 100%DL-Met proporcionou maior altura de vilosidades em relação às demais. No nível que atendia a exigência de Met+CysD maior altura de vilosidades também foi observada na dieta com 100%DL-Met. Já na dieta em excesso, maior altura de vilosidades foi obtida no jejuno de frangos que receberam 50%DL-Met:50%DL-HMTBA em comparação as demais. Interessantemente, os frangos que receberam dietas contendo 100%DL-Met no nível deficiente tiveram aumento na altura de vilosidades; contudo, na substituição 50%DL-Met:50%DL-HMTBA observou-se maior altura de vilosidades tanto na deficiência quanto no excesso de Met+CysD. Já para 100%DL-HMTBA o aumento de vilosidades foi observado apenas nos jejunos de frangos que consumiram a dieta deficiente em Met+CysD.

A profundidade de criptas não se alterou no jejuno de frangos que receberam a dieta deficiente, entre as substituições, em contrapartida, na dieta que atendia a exigência em Met+CysD foi observada maior profundidade de criptas com 100%DL-HMTBA. Já no nível em excesso as maiores profundidades de criptas foram observadas nas substituições com 100%DL-Met e 100%DL-HMTBA. Observou-se maior profundidade de criptas no nível deficiente em Met+CysD em todas as substituições estudadas.

A relação vilo:cripta não se alterou na deficiência, entre as substituições. Na dieta que atendia a exigência de Met+CysD, a relação foi maior quando comparada as demais. Para 50%DL-Met/50%DL-HMTBA a dieta deficiente também promoveu menor relação vilo:cripta, e ao correlacioná-la as demais substituições, observou-se maior relação vilo:cripta ao nível em excesso. Na substituição 100%DL-HMTBA, obteve-se maior relação vilo:cripta ao nível em excesso; quando correlacionada com as demais pode-se notar que, no nível da exigência de Met+CysD a relação foi menor em comparação as demais e no nível em excesso, a relação vilo:cripta foi menor do que 50%DL-Met/50%DL-HMTBA.

Tabela 11 - Valores histomorfométricos do jejuno de frangos alimentados com dietas contendo três níveis de Met+CysD e substituições de DL-Met por DL-HMTBA

Fase	Nível Met+CysD ¹	Substituição				Médias	Fontes de variação				
		100%DLMet	50%DL- Met:50%DLHMTBA	100%DLHMTBA	CP ²		N	S	SXN	EPM ³	CPxD ⁴
AV (µm)	Deficiência	-	-	-		1009,1 ^a					
	Exigência	-	-	-	902,8 ^b	960,8 ^b	<0,0001	<0,0001	0,3574	85,208	<0,0001
	Excesso	-	-	-		977,1 ^b					
	Médias	982,1 ^b	1018,8 ^a	946,2 ^c							
PC (µm)	Deficiência	259,62 ^{aA}	235,88 ^{aB}	226,91 ^{aB}		240,8 ^a					
	Exigência	213,46 ^{bA}	190,31 ^{bB}	168,82 ^{bC}	171,7 ^c	190,8 ^b	<0,0001	<0,0001	<0,0001	24,818	<0,0001
	Excesso	152,67 ^{cB}	172,94 ^{cA}	160,16 ^{bB}		161,9 ^c					
	Médias	208,5 ^a	199,7 ^b	185,3 ^c							
V:C (µm)	Deficiência	3,96 ^{cB}	4,49 ^{cA}	4,33 ^{cA}		4,2 ^c					
	Exigência	4,58 ^{bB}	5,28 ^{bA}	5,51 ^{bA}	5,2	5,1 ^b	0,0048	<0,0001	<0,0001	0,758	0,5432
	Excesso	6,43 ^{aA}	5,96 ^{aB}	6,04 ^{aB}		6,1 ^a					
	Médias	4,9 ^b	5,2 ^a	5,2 ^a							

¹0,52% (deficiência); 0,77% (exigência) e 1,02% (excesso); ²CP=100%L-metionina 0,77 (8-42 dias); ³EPM: Erro Padrão Médio; ⁴contraste ortogonal para comparar o controle positivo com as substituições e níveis;

^{A,B} para cada nível, médias de substituição seguidas por letras diferentes maiúsculas na linha diferem entre si pelo teste SNK;

^{a,b} para cada substituição, médias de níveis seguidos por letras diferentes minúsculas na coluna diferem entre si pelo teste SNK.

Na fase de 8-42 dias, o nível deficiente de Met+CysD proporcionou maior altura de vilosidades, e entre as substituições observou-se aumento nas vilosidades do jejuno de frangos que consumiram 50%DL-Met:50%DL-HMTBA. Houve interação para profundidade de cripta e relação vilo:cripta ($P<0,0001$). Ao avaliar o nível deficiente e o que atendia a exigência de Met+CysD foi observada maior profundidade de cripta com 100%DL-Met, já no nível em excesso com a dieta 50%DL-Met:50%DL-HMTBA. A deficiência de Met+CysD proporcionou maior profundidade de cripta nas três substituições.

Quanto a relação vilo:cripta, evidenciou-se que ela foi reduzida no nível deficiente com 100%DL-Met e com 50%DL-Met:50%DL-HMTBA, entretanto, esta relação aumentou no nível em excesso. Entre os níveis o jejuno de frangos que consumiram as três substituições no nível em excesso de Met+CysD apresentaram maior relação vilo:cripta.

4 DISCUSSÃO

4.1 Experimento I

Os resultados obtidos na estimativa da exigência de Met+CysD para frangos de corte aos 21 dias de Met+CysD pelas variáveis: ganho de peso e conversão alimentar (1,01 e 0,95%) estão acima da recomendação para a fase de 8-21 dias, utilizada para estabelecer a dieta exigente do nosso estudo que foi de 0,88% (ROSTAGNO et al., 2011); em contrapartida, está de acordo com os valores posteriormente determinados de 0,96%, para frangos de corte por Rostagno et al. (2017). Tais resultados comprovam o que já vem sendo descrito na literatura em relação às inúmeras funções da metionina no organismo de frangos de corte: como precursora de importantes compostos de enxofre antioxidantes, incluindo, taurina e glutathione (MÉTAYER et al., 2008).

A L-Cys é considerada não essencial, visto que, pode ser sintetizada *in vivo* a partir de metionina, entretanto, o inverso não é possível. Deste modo, em dietas a base de milho e soja onde os aminoácidos sulfurosos são igualmente eficientes, cada parte de metionina é dividida para fornecer tanto L-Met quanto L-Cys pela via da transulfuração (BAKER, 2006; 2009). Desta forma, as dietas de frangos de corte devem ser suplementadas com metionina para atender aos requisitos de aminoácidos sulfurosos (DILGER; BAKER, 2007), bem como, deve-se levar em consideração a exigência de Met+CysD na formulação. Além disso, a cisteína pode ser uma “fonte poupadora” de metionina, uma vez que, parte desta é convertida normalmente em cisteína e seu fornecimento na dieta pode reduzir ou substituir parte da exigência de L-Met em até 80% em mamíferos e aves (SHOVELLER et al., 2005).

Embora a exigência estimada de Met+CysD para melhor desempenho tem sido mais elevada que aquele utilizado como recomendação, a estimativa da exigência para penas pode confirmar que os frangos Cobb 500 *slow feathering*[®] tem menor exigência de Met+CysD para empenamento. Portanto, fica claro que esta não é uma variável indicada de forma isolada, para determinar a exigência desta.

4.2 Experimento II

No presente estudo obteve-se diferentes respostas entre frangos de corte que receberam dietas contendo níveis deficientes, exigentes e em excesso de Met+CysD. Além disso, verificou-se diferentes comportamentos entre as fontes comerciais, bem como, a atuação delas em relação aos níveis deste estudo.

As dietas com os níveis deficientes em Met+CysD em todas as idades estudadas comprometeram o desempenho de frangos de corte, corroborando com estudos anteriores, os quais demonstraram que quantidades deficientes nas dietas prejudicam o desempenho (DEL VESCO et al., 2013; DEL VESCO et al., 2015a; WEN et al., 2017; ZHANG et al., 2017). Desse modo, fica evidenciado o importante papel da metionina para o crescimento de frangos de corte, o que justifica o fato deste aminoácido ser o primeiro limitante nas dietas de aves (DILGER; BAKER, 2007).

Em relação às substituições, a melhor conversão foi obtida para a fonte DL-Met e nos níveis em excesso para todas as idades. Este achado está de acordo com Meireles et al. (2003), os autores relataram que frangos de corte alimentados com dietas contendo a fonte DL-Met e com níveis mais elevados obtiveram melhora na conversão alimentar. Em contrapartida, alguns trabalhos não encontraram diferenças para variáveis de desempenho em frangos alimentados com dietas contendo L-Met, DL-Met ou DL-HMTBA (DEL VESCO et al., 2013; CONDE-AGUILERA et al., 2016) ou entre L-Met e DL-Met (PACHECO et al., 2018).

De acordo com Aggrey et al. (2017) as formas D, L-Met e DL-HMTBA restauraram o crescimento de frangos submetidos previamente a deficiência de Metionina. Igualmente, Zhang et al. (2017) relatam que tanto a DL-Met, L-Met e DL-HMTBA promoveram melhores taxas de crescimento e na eficiência alimentar, quando comparada a dieta deficiente em Metionina, em contrapartida, embora não tenham apresentado diferenças entre si quanto ao desempenho dos frangos, influenciaram as vias bioquímicas de maneiras distintas, uma vez que, a DL-HMTBA não afetou a expressão de transportadores de aminoácidos de maneira similar a DL-Met e L-Met.

As diferentes respostas de crescimento relacionadas à suplementação com as fontes no nosso estudo, podem ser explicadas devido às particularidades na estrutura e

absorção intestinal, que são diferentes entre elas (VISENTINI et al., 2005). A DL-Met é absorvida por transporte ativo, ou seja, dependente de energia e por intermédio de carreadores por transportadores presentes na borda da escova. Enquanto a DL-HMTBA é absorvida por difusão, dependente de concentração, bem como, a maior parte de DL-HMTBA é absorvida na parte superior do trato digestivo onde o pH baixo é mais propício e transportada por carreadores da membrana basal. Além disso, a DL-HMTBA possui em sua estrutura uma hidroxila ao invés do grupamento amina dos aminoácidos e tende a aumentar os transportadores na membrana basal (DIBNER, 2003; WANG et al., 2019).

Poosuwan et al. (2015), relataram que a DL-HMTBA possui propriedade acidificante semelhante aos ácidos orgânicos enquanto não é convertida em L-Metionina, pois, reduz o pH da digesta e exibe benefícios antimicrobianos (DIBNER & BUTTIN, 2002). Segundo Yodseranee & Bunchasak (2012), a concentração de ácido úrico, importante antioxidante, no plasma aumentou com a suplementação de DL-HMTBA; isto implica que DL-HMTBA satisfaz a necessidade de aminoácidos sulfurosos na dieta e aumentou a retenção de nitrogênio. Os autores também sugerem que a suplementação com DL-Met ou DL-HMTBA pode melhorar o equilíbrio dietético e aumentar a biodisponibilidade de aminoácidos, pois a dieta suplementada com DL-Met aumenta o teor de metionina plasmática a um nível superior a DL-HMTBA.

Ademais, além de monômeros, cerca de 23% da fração da molécula de DL-HMTBA está presente na forma de oligômeros e dímeros, os quais, de acordo com Hoehler et al. (2005) são pouco absorvidos. Ainda a L-Met tem maior afinidade por seu transportador e é absorvida em maior velocidade, por isso é removida mais rapidamente do lúmen intestinal quando comparada a DL-HMTBA (MAENZ & ENGELE-SCHAAN, 1996).

Portanto, baixa utilização das formas poliméricas, conversão mais lenta ou menos eficiente antes da absorção e a maior interferência da microbiota intestinal seria a principal razão para a menor eficácia biológica da DL-HMTBA (PAYNE et al., 2006; HADINIA et al., 2014), a qual, pode ser observada devido a pior conversão alimentar de frangos de corte 8-42 dias, quando comparada a L-Met e DL-Met no presente estudo.

4.3 Pesos de carcaça, cortes nobres e penas

A metionina é essencial para produção e desenvolvimento de carne (LIU et al., 2010) conforme constatou-se neste estudo, uma vez que, o nível deficiente de Met+CysD reduziu a deposição muscular do peito. Portanto, a suplementação de metionina estimula a deposição de proteínas, por garantir não só maior expressão de genes relacionados à síntese, mas também, menor expressão de genes relacionados à degradação (DEL VESCO et al., 2015b). Os maiores pesos absolutos e relativos para peito e peito desossado foram observados para a fonte comercial DL-Metionina, comprovando que, as fontes podem atuar de formas distintas nas características do principal corte nobre de frangos de corte. Embora não tenham encontrado diferenças para os pesos de peito ao utilizar DL-HMTBA na dieta, Montanhini Neto; Ceccantini & Fernandes (2013) obtiveram melhores resultados no rendimento da carcaça e nos pesos das pernas de frangos de corte.

Os níveis deficientes de Met+CysD promoveram menores pesos e porcentagens de penas, da mesma forma Meireles et al. (2003) obtiveram maior rendimento de penas em frangos de corte que receberam os níveis mais elevados de Metionina quando comparados com os menores níveis. Por outro lado, os níveis de metionina não influenciaram o empenamento, uma vez que o estresse que os animais foram submetidos pode não ter sido suficiente para prejudicar o empenamento, pois, os autores relataram que os frangos estavam alojados em baterias e não em piso (RIBEIRO, DAHLKE & KESSLER, 2005).

Quando comparadas as fontes observa-se que, a DL-HMTBA apresentou maior peso e porcentagem de penas, corroborando com Conde-Aguilera et al. (2016) os quais, observaram que a quantidade de Cys tende a ser mais importante quando se utiliza a DL-HMTBA como fonte de metionina. Da mesma forma, Martín-Venegas; Geraert & Ferrer (2006) sugerem que a DL-HMTBA é mais rapidamente metabolizada para Cys pela via de transulfuração em comparação com DL-Met.

Os achados deste estudo elucidam o importante papel da cisteína para formação das penas em frangos de corte, corroborando com Kalinowski; Moran, Jr & Wyatt (2003), os quais afirmam que a síntese de proteínas para penas tem alta demanda por este aminoácido. As proteínas das penas contêm mais Cys do que outras proteínas teciduais, pois é o aminoácido mais abundante em queratina de penas. Sua importância é devida por

trazer prejuízos econômicos para a indústria de frangos de corte moderna, uma vez que, a baixa penugem é a principal causa da baixa qualidade das carcaças e por condenações de carcaça no abate (GRABER; BAKER, 1971), devido ao canibalismo entre as aves (KJAER & BESSEI, 2003).

De acordo com Silva et al. (2018), a inibição da via da transulfuração por meio da utilização de um inibidor (propargylglycine) da enzima cistationina gama liase e consequentemente, a produção de cisteína na dieta de frangos reduziu significativamente o peso da pena, bem como, espessura da epiderme e o comprimento e diâmetro do folículo piloso primário. Ainda, os autores observaram que a derme e hipoderme, aparentavam-se mais finas nos frangos que receberam as dietas contendo o inibidor. Assim, a partir dos nossos resultados e conforme relatado na literatura, fica comprovado que a cisteína atua na produção e desenvolvimento de penas e sua deficiência na dieta ou comprometimento na sua formação a partir da via da transulfuração prejudica o empenamento de frangos.

4.4 Histomorfometria do jejuno

A integridade da mucosa intestinal é de extrema importância para os processos de digestão e absorção de nutrientes refletindo assim, diretamente no desempenho dos animais. Entre os compartimentos do intestino delgado, escolheu-se a porção do jejuno porque constitui o principal local de absorção de nutrientes, sendo a porção intestinal mais longa e com maior densidade de vilosidades (SWENSON & REECE, 1996).

O desenvolvimento da mucosa intestinal é decorrente de dois eventos primários associados: renovação celular, o qual é a proliferação e diferenciação, resultante das divisões mitóticas sofridas por células totipotentes localizadas na cripta e ao longo da vilosidade, e a perda (extrusão) de células por descamação, que ocorre naturalmente no ápice da vilosidade (UNI et al., 2000).

Os resultados do presente estudo demonstram que os frangos que receberam a dieta deficiente em Met+CysD aos 21 dias apresentaram menor altura de vilosidade e posteriormente, aos 33 e 42 dias houve aumento das vilosidades; entretanto, apesar da maior altura de vilosidade isso não se refletiu em melhorias no desempenho, conforme observou-se nos dados de desempenho e de características de carcaça em que foram obtidos os piores valores de conversão alimentar, e de peso de peito, respectivamente.

Embora a maior altura de vilosidade possa possibilitar uma melhor área de absorção e subsequentemente, uma ação enzimática digestiva satisfatória (TUFARELLI et al 2010), por outro lado, quanto maior a altura de vilosidade o animal terá maior custo energético de manutenção (REISINGER et al., 2011), o qual deverá ser recompensando apenas se for observada melhora no desempenho. Deste modo, isso não foi notado para as dietas com níveis deficientes de Met+CysD, uma vez que, observou-se maiores valores de altura de vilosidade e profundidade de cripta resultando em menor relação vilo:cripta.

A manutenção fisiológica da integridade do epitélio tem custo elevado, estimado em 20% da energia bruta consumida pelo animal (McBRIDE & KELLY, 1990). Sendo assim, condições que afetam a dinâmica de renovação do epitélio intestinal, aumentando a necessidade de multiplicação celular na cripta, como é caso de deficiências nutricionais, aumentam ainda mais esse custo energético.

É possível que o aumento na altura de vilosidade apresentado pelos frangos da dieta deficiente em Met+CysD aos 33 e 42 dias de idade, seja uma tentativa do epitélio intestinal de compensar a deficiência aumentando ao máximo a captação de aminoácidos. Entretanto, tal mecanismo compensatório resultou de alta atividade da cripta, com maior profundidade dela e maior gasto energético, por isso, obteve-se menor relação vilo:cripta, tendo como consequências os prejuízos no desempenho. Chen et al. (2005) observaram que a deficiência de proteína na dieta de frangos de corte regula de forma positiva o desenvolvimento e expressão do transportador de peptídeo na mucosa intestinal.

Em contrapartida, diferentemente da dieta deficiente, os níveis em excesso de Met+CysD promoveram menor profundidade de cripta e maior relação vilo:cripta. Sendo assim, a maior relação vilo:cripta em frangos resulta em menor taxa de turnover da mucosa intestinal, e consequentemente, menor gasto de energético. Ademais, a menor profundidade de cripta pode sugerir a ocorrência de redução na atividade para compensar a extrusão celular normal ou a atrofia das vilosidades devido a fatores indesejáveis e, portanto, é necessário o menor suprimento de nutrientes para suportar o turnover mais lento (BOKA et al., 2013). Isto resulta na diminuição dos requerimentos para manutenção, consequentemente, induz a maior taxa de crescimento do animal (VAN, NEVEL; DECUYPERE & MOLLY 2005).

As diferenças observadas quanto as fontes metionina na altura no epitélio do jejuno no nosso estudo podem estar relacionadas ao fato que a DL-HMTBA por sua forma

estrutural, ou seja, presença da hidroxila ao invés do grupamento amina, é considerada um ácido orgânico até ser convertido em L-Metionina (DIBNER & BUTTIN, 2003). De acordo com Shen et al. (2015) a suplementação de qualquer fonte de Metionina aumenta os níveis de glutathione peroxidase na mucosa duodenal e melhorou o desenvolvimento das vilosidades. Deste modo, os autores comentam que os efeitos benéficos de Metionina no crescimento e desenvolvimento do trato gastrointestinal podem estar relacionados à sua função antioxidante.

Por outro lado, Adeniji et al. (2015) comparando as fontes de Metionina e adição de ácido fórmico na dieta, constataram que aves alimentadas com dietas contendo DL-HMTBA apresentaram maior altura de vilosidade e profundidade de cripta em relação às alimentadas com DL-Met. Além disso, a inclusão de ácido fórmico, combinado à DL-HMTBA promove melhorias nestes resultados (ADENIJI et al., 2015), uma vez que, inclusões de ácidos orgânicos estimulam a proliferação de células epiteliais no trato gastrointestinal (ICHIKAWA et al., 1999).

5 CONCLUSÃO

A exigência de Met+CysD foi estimada em 0,953% e 1,016%, pela conversão alimentar e ganho de peso, respectivamente. O nível em excesso de Met+CysD e as fontes 100%DL-Met e L-metionina mostraram-se eficientes para desempenho, morfometria intestinal e características dos cortes comerciais e os frangos que receberam dietas com a DL-HMTBA no nível em excesso e a L-metionina, apresentaram maiores porcentagens de penas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADENIJI, A. O.; OLOGHOB, A. D.; ADEBIYI, O. A.; ADEJUMO, I. O. Effect of methionine and organic acid on apparent nutrient utilization and gut morphology of broiler chicken. **Advances in Research**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 87–93. 2015. Disponível em: <http://www.sciencedomain.org/abstract/7494>. Acesso em: 12 nov. 2018.
- AGOSTINI, P. S.; DALIBARD, P.; MERCIER Y.; VAN DER AAR P.; VAN DER KLIS, J.D. Comparison of methionine sources around requirement levels using a methionine efficacy method in 0 to 28-day old broilers. **Poultry Science**, [s. l.], v. 95, n. 3, p. 560–569. mar. 2016. Disponível em: <https://academic.oup.com/ps/article/95/3/560/2588859>. Acesso em: 10 jan. 2019.
- AGGREY, S. E.; GONZÁLEZ-CERÓN, F.; REKAYA, R.; MERCIER, Y. Gene expression differences in the methionine remethylation and transsulphuration pathways under methionine restriction and recovery with D, L-methionine or D, L-HMTBA in meat-type chickens. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, [s. l.], v. 102, n. 1, p. e468–e475, fev. 2017. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jpn.12779>. Acesso em: 04 nov. 2018.
- BAKER, D. H. Comparative species utilization and toxicity of sulfur amino acids. **The Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 136, n. 6, p. 1670S–1675S, jun. 2006. Disponível em: <https://academic.oup.com/jn/article/136/6/1670S/4664454>. Acesso em: 02 jan. 2018.
- BARONE, J. R.; SCHMIDT, W. F.; LIEBNER, C. F. E. Compounding and molding of polyethylene composites reinforced with keratin feather fiber. **Composites Science and Technology**, [s.l.], v. 65(3,4), p. 683–692, mar. 2005. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S026635380400288X>. Acesso em: 9 out, 2018.
- BOKA, J.; MAHDAVI, A. H.; SAMIE, A. H.; JAHANIAN, R. Effect of different levels of black cumin (*Nigella sativa* L.) on performance, intestinal *Escherichia coli* colonization and jejunal morphology in laying hens. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, [s. l.], v. 98, n. 2, p. 373–383, ago. 2013. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jpn.12109>. Acesso em: 21 set. 2017.
- BROSNAN, J. T.; BROSNAN, M. E. The Sulfur-Containing Amino Acids: An Overview. **The Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 136, n. 6, p. 1636S–1640S, jun. 2006. Disponível em: <https://academic.oup.com/jn/article/136/6/1636S/4664439>. Acesso em: 4 dez. 2018.
- CONDE-AGUILERA, J. A.; CHOLET, J. C.; LESSIRE, M.; MERCIER, Y.; TESSERAUD, S.; VAN MILGEN, J. The level and source of free methionine affect body composition and breast muscle traits in growing broilers. **Poultry Science**, [s. l.],

v. 95, n. 10, p. 2322–2331, mar. 2016. Disponível em: <https://academic.oup.com/ps/article/95/10/2322/2223397>. Acesso em: 10 jan. 2018.

CHEN, H.; PAN, Y. X.; WONG, E. A.; WEBB, Jr. K. E. Dietary protein level and stage of development affect expression of an intestinal peptide transporter (cPepT1) in chickens. **The Journal of Nutrition**, [s. l], v. 135, n. 2, p. 193–198, fev. 2005. Disponível em: <https://academic.oup.com/jn/article/135/2/193/4663626>. Acesso em: 10 jan. 2018.

DEL VESCO, A. P.; GASPARINO, E.; OLIVEIRA NETO, A. R.; ROSSI, R. M.; SOARES, M. A. M.; DA SILVA, S. C. C. Effect of methionine supplementation on mitochondrial genes expression in the breast muscle and liver of broilers. **Livestock Science**, [s. l], v. 151, n. 2, p. 284–291, 1 fev. 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S187114131200426X>. Acesso em: 4 fev. 2018.

_____. Effects of methionine supplementation on the expression of oxidative stress-related genes in acute heat stress-exposed broilers. **British Journal of Nutrition**, [s. l], v. 113, n. 4, p. 549–559, fev. 2015a. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/british-journal-of-nutrition/article/effects-of-methionine-supplementation-on-the-expression-of-oxidative-stressrelated-genes-in-acute-heat-stress-exposed-broilers/5F29593C5CD008708DD5AD9C3FF2DB01>. Acesso em: 4 fev. 2018.

_____. Effects of Methionine Supplementation on the Expression of Protein Deposition-Related Genes in Acute Heat Stress-Exposed Broilers. **PLOS ONE** 10:e0115821, fev. 2015b. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0115821>. Acesso em: 4 fev. 2018.

DIBNER, J. J. Review of the metabolism of 2-hydroxy-4-(methylthio) butanoic acid. **Worlds Poultry Science Journal**, [s. l], v. 59, n. 1, p. 99–110, mar. 2003. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/world-s-poultry-science-journal/article/review-of-the-metabolism-of-2hydroxy4methylthio-butanoic-acid/D537A5BF6129450B1313CAB6C336EEB5>. Acesso em: 04 nov. 2018.

_____. Use of organic acids as a model to study the impact of gut microflora on nutrition and metabolism. **Journal of Applied Poultry Research**, [s. l], v. 11, n. 4, p. 453–463, dez. 2002. Disponível em: <https://academic.oup.com/japr/article/11/4/453/753187>. Acesso em: 8 out. 2018.

DILGER, R. N.; BAKER, D. H. DL-methionine is as efficacious as l-methionine, but modest l-cystine excesses are anorexigenic in sulfur amino acid-deficient purified and practical-type diets fed to chicks. **Poultry Science**, [s. l], v. 86, n. 11, p. 2367–2374, nov. 2007. Disponível em: <https://academic.oup.com/ps/article/86/11/2367/1573622>. Acesso em: 17 jan. 2018.

DONSBOUGH, A. L.; POWELL, S.; WAGUESPACK, A.; BIDNER, T. D.; SOUTHERN, L.L. Uric acid, urea, and ammonia concentrations in serum and uric acid concentration in excreta as indicators of amino acid utilization in diets for broilers.

Poultry Science, [s. l], v. 89, n. 2, p. 287–294, fev. 2010. Disponível em: <https://academic.oup.com/ps/article/89/2/287/1547994>. Acesso em: 4 nov. 2018.

FAGUNDES, N. S.; MILFORT, M. C.; WILLIAMS, S. M.; DA COSTA, M. J.; FULLER, A. L.; MENTEN, J. F.; REKAYA, R.; AGGREY, S. E. Dietary methionine level alters growth, digestibility, and gene expression of amino acid transporters in meat-type chickens. **Poultry Science**, [s. l], 0, p. 1-9, pez588, out. 2019. Disponível em: <https://academic.oup.com/ps/advance-article-abstract/doi/10.3382/ps/pez588/5585632?redirectedFrom=fulltext>. Acesso em: 5 nov. 2019.

GRABER, G.; BAKER, D. H. Sulfur amino acid nutrition of the growing chick: quantitative aspects concerning the efficacy of dietary methionine, cysteine and cystine. **Journal of Animal Science**, [s. l], v. 33, n. 5, p. 1005–1011, nov. 1971. Disponível em: <https://academic.oup.com/jas/articleabstract/33/5/1005/4666830?redirectedFrom=fulltext>. Acesso em: 16 dez. 2016.

HADINIA, S.; SHIVAZAD, M.; MORAVEJ, H.; ALAHYARI-SHAHRASB, M.; NABI, M. M. Bio-efficacy comparison of herbal-methionine and DL-methionine based on performance and blood parameters of broiler chickens. **Veterinary Research Forum: An International Quarterly Journal**, [s. l], v. 5, n. 2, p. 81–87, jun. 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4279633/>. Acesso em: 15 dez. 2017.

HOEHLER, D.; LEMME, A.; JENSEN, S. K.; VIEIRA, S. L. Relative Effectiveness of Methionine Sources in Diets for Broiler Chickens. **The Journal of Applied Poultry Research**, [s. l], v. 14, n. 4, p. 679–693, dez. 2005. Disponível em: <https://academic.oup.com/japr/article/14/4/679/708408>. Acesso em: 7 jun. 2018.

ICHIKAWA, H.; KUROIWA, T.; INAGAKI, A.; SHINEHA, R.; NISHIHARA, T.; SATOMI, S.; SAKATA, T. Probiotic Bacteria Stimulate Gut Epithelial Cell Proliferation in Rat. **Digestive Diseases and Sciences**, [s. l], v. 44, n. 10, p. 2119–2123, out. 1999. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1023%2FA%3A1026647024077>. Acesso em: 15 jan. 2016.

KJAER, J; BESSEI W. The interrelationships of nutrition and feather pecking in the domestic fowl—A review. **European Poultry Science**, [s. l], v. 77, n. 1, p. 1–9, 2013. Disponível em: <https://www.european-poultry-science.com/The-interrelationships-of-nutrition-and-feather-pecking-in-the-domestic-fowl-x2013-A-review,QUIEPTQyMjE0MDYmTUIEPTE2MTAxNA.html>. Acesso em: 04 dez. 2018.

KALINOWSKI, A.; MORAN, Jr. E. T.; WYATT, C. L. Methionine and cystine requirements of slow and fast-feathering broiler males from three to six weeks of age. **Poultry Science**, [s. l], v. 82, n. 9, p. 1428–1437, abr. 2003. Disponível em: <https://academic.oup.com/ps/article/82/9/1428/1537607>. Acesso em: 10 dez. 2017.

KHATLAB, A.; DEL VESCO, A. P.; OLIVEIRA NETO, A. R.; FERNANDES, R. P. M.; GASPARINO, E. Dietary supplementation with free methionine or methionine dipeptide mitigates intestinal oxidative stress induced by *Eimeriaspp.* challenge in broiler chickens. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, [s. l], v. 10, n. 58, 17p, jun. 2019. Disponível em: <https://jasbsci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40104-019-0353-6>. Acesso em: 09 out. 2019.

LIU, G.; ZONG, K.; ZHANG, L.; CAO, S. Dietary methionine affect meat quality and myostatin gene exon 1 region methylation in skeletal muscle tissues of broilers. **Agricultural Sciences in China**, [s. l], v. 9, n. 9, p. 1338–1346, set. 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1671292709602248>. Acesso em: 21 set. 2018.

MAENZ, D. D.; ENGELE-SCHAAN, C. M. Methionine and 2-hydroxy-4-methylthiobutanoic acid are partially converted to nonabsorbed compounds during passage through the small intestine and heat exposure does not affect small intestinal absorption of methionine sources in broiler chicks. **The Journal of Nutrition**, v. 126, n. 5, p. 1438–1444, maio. 1996. Disponível em: <https://academic.oup.com/jn/article/126/5/1438/4722814>. Acesso em: 17 jan. 2017.

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**, [s. l], v. 85, n. 11, p. 1932–1938, nov. 2006. Disponível em: <https://academic.oup.com/ps/article/85/11/1932/1577911>. Acesso em: 13 dez. 2017.

MEIRELLES, H. T.; ALBUQUERQUE, R.; BORGATTI, L. M. O.; SOUZA, L. W. O.; MEISTER, N. C.; LIMA, F. R. Performance of broilers fed with different levels of methionine hydroxy analogue and DL-methionine. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, [Campinas], v. 5, n. 1, p. 69–74, jan. 2003. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-635X2003000100009. Acesso em: 01 set. 2018.

MÉTAYER, S.; SEILIEZ, I.; COLLIN, A.; DUCHÊNE, S.; MERCIER, Y.; PIERRE-ANDRÉ, GERAERT, P-A.; TESSERAU, S. Mechanisms through which sulfur amino acids control protein metabolism and oxidative status. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, [s. l], v. 19, n. 4, p. 207–215, abr. 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0955286307001386?via%3Dihub>. Acesso em: 02 jan. 2018.

MONTANHINI NETO, R.; CECCANTINI, M. L.; FERNANDES, J. I. M. Effects of methionine source, arginine: lysine ratio and sodium chloride level in the diets of grower broilers reared under high-temperature conditions. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, [Campinas], v. 15, n. 2, p. 151–160, abr. 2013. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-635X2013000200012. Acesso em: 17 dez. 2017.

McBRIDE, B.W.; KELLY, J.M. Energy cost of absorption and metabolism in the ruminant gastrointestinal tract and liver: A review. **Journal of Animal Science**, [s. l], v. 68, n. 9, p. 2997-3010, set. 1990. Disponível em: <https://academic.oup.com/jas/article-abstract/68/9/2997/4705393?redirectedFrom=fulltext>. Acesso em: 01 jan. 2018.

PACHECO, L. G.; SAKOMURA, N. K.; SUZUKI, R. M.; DORIGAM, J. C. P.; VIANA, G. S.; Van MILGEN, J.; DENADAI, J. C. Methionine to cystine ratio in the total sulfur amino acid requirements and sulfur amino acid metabolism using labelled amino acid approach for broilers. **BMC Veterinary Research**, [s. l], v. 14, n. 364, p. 11, nov. 2018. Disponível em: <https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-018-1677-8>. Acesso em: 10 fev. 2019.

PAYNE, R. L.; LEMME, A.; SEKO, H.; HASHIMOTO, Y.; FUJISAKI, H.; KORELESKI, J.; SWIATKIEWICZ, S.; SZCZUREK, W.; ROSTAGNO, H. Bioavailability of methionine hydroxy analog-free acid relative to DL-methionine in broilers. **Animal Science Journal**, [s. l], v. 77, n. 4, p. 427-439, ago. 2006. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1740-0929.2006.00369.x#accessDenialLayout>. Acesso em: 09 Jan. 2016.

POOSUWAN, K.; BUNCHASAK, C.; Thiengtham, J.; Markvichitr, K.; Chansawarn, S.; Chutesa, A. Effects of varying levels of liquid dl-methionine hydroxy analog free acid in drinking water on production performance and gastrointestinal tract of broiler chickens at 42 days of age. **The Thai Journal of Veterinary Medicine**, [Bangkok], v. 45, n. 4, p. 581-591, 2015. Disponível em: <https://www.tcithaijo.org/index.php/tjvm/article/view/43527>. Acesso em: 11 set. 2018.

REISINGER, N.; STEINER, T.; NITSCH, S.; SCHATZMAYR, G.; APPLGATE, T. J. Effects of a blend of essential oils on broiler performance and intestinal morphology during coccidial vaccine exposure. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 20, n. 3, p. 272-283, out. 2011. Disponível em: <https://academic.oup.com/japr/article/20/3/272/689024>. Acesso em: 01 dez. 2018.

RIBEIRO, A. M. L.; DAHLKE, F.; KESSLER, A. M. Methionine sources do not affect performance and carcass yield of broilers fed vegetable diets and submitted to cyclic heat stress. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, [Campinas], v. 7, n. 3, p. 159-164, jul. 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbca/v7n3/a04v7n3>. Acesso em: 15 jan. 2016.

ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; DONZELE, J. L.; GOMES, P. C.; OLIVEIRA, R. F.; LOPES, D. C.; FERREIRA, A. S.; BARRETO, S. L. T.; EUCLIDES, R. F. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: Composição de alimentos exigências nutricionais**, [Viçosa], 3ª. ed. UFV-Departamento de Zootecnia, p. 252, 2011. Disponível em: <http://www.lisina.com.br/arquivos/Geral%20Portugu%C3%AAs.pdf>. Acesso em: 02 set. 2018.

_____. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: Composição de alimentos exigências nutricionais**, [Viçosa], 4ª. ed. UFV-Departamento de Zootecnia, p. 488,

2017. Disponível em: <https://www.passeidireto.com/arquivo/49622433/tabela-brasileira-de-aves-e-suinos-2017-pdf>. Acesso em: 20 dez. 2018.

SILVA, J.H.V.; GONZÁLEZ-CERÓN, F.; HOWERTH, E. W.; REKAYA, R.; AGGREY, S. E. Inhibition of the transsulfuration pathway affects growth and feather follicle development in meat-type chickens. **Animal Biotechnology**. [s. l.], v. 30, n. 2, p. 175-179, abr. 2018. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10495398.2018.1461634>. Acesso em: 10 dez. 2018.

SHEN, Y. B.; FERKET, P.; PARK, I.; MALHEIROS, R. D.; KIM, S. W. Effects of feed grade L-methionine on intestinal redox status, intestinal development, and growth performance of young chickens compared with conventional DL-methionine. **Journal of Animal Science**, [s. l.], v. 93, n. 6, p. 2977–2986, jun. 2015. Disponível em: <https://academic.oup.com/jas/article/93/6/2977/4703678>. Acesso em: 15 jan. 2018.

SHOVELLER, A. K.; STOLL B.; BALL, R. O.; BURRIN, D. G. Nutritional and functional importance of intestinal sulfur amino acid metabolism. **The Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 135, n. 7, p. 1609–1612, jan. 2005. Disponível em: <https://academic.oup.com/jn/article/135/7/1609/4663895>. Acesso em: 10 dez. 2017.

SWENNEN, Q.; GERAERT, P. A.; MERCIER, Y.; EVERAERT, N.; STINCKENS, A.; WILLEMSSEN, H.; LI, Y.; DECUYPERE, E.; BUYSE, J. Effects of dietary protein content and 2-hydroxy-4-methylthiobutanoic acid or DL-methionine supplementation on performance and oxidative status of broiler chickens. **The British Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 106, n. 12, p. 1845–1854, jun. 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21736775>. Acesso em: 08 set. 2018.

SWENSON, M. S.; REECE, W. O. Dukes: **Fisiologia dos animais domésticos**; 12^a ED., Guanabara Koogan.1996.

TUFARELLI, V.; DESANTIS, S.; ZIZZA, S.; LAUDADIO, V. Performance, gut morphology and carcass characteristics of fattening rabbits as affected by particle size of pelleted diets. **Archives of Animal Nutrition**, [s. l.], v. 64, n. 5, p. 373–382, jul. 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21114233>. Acesso em: 01 jan. 2018.

UNI, Z.; ZAIGER, G.; GAL-GARBER, O.; PINES, M.; ROZENBOIM, I.; REIFEN, R. Vitamin A deficiency interferes with proliferation and maturation of cells in the chicken small intestine. **British Poultry Science**, [s. l.], v. 41, n. 4, p. 410–415, set. 2000. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11128381>. Acesso em: 10 nov. 2018.

VAN, NEVEL, C. J.; DECUYPERE, J. A.; DIERICK, N. A.; MOLLY, K. Incorporation of galactomannans in the diet of newly weaned piglets: Effect on bacteriological and some morphological characteristics of the small intestine. **Archives of Animal Nutrition**, [s. l.], v. 59, n. 2, p. 123–138, abr. 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16080306>. Acesso em: 10 nov. 2018.

VISENTINI, P.; LOPES, J.; TOLEDO, G. S. de.; COSTA, P. T. Níveis de substituição da DL-metionina pela metionina hidróxi análoga em base equimolar, em dietas para frangos de corte. **Ciência Rural**, [online], v. 35, n. 6, p. 1400-1405, 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cr/v35n6/a27v35n6.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2017.

WEN, C.; JIANG, X. Y.; DING, L. R.; WANG, T.; ZHOU, Y. M. Effects of dietary methionine on growth performance, meat quality and oxidative status of breast muscle in fast- and slow-growing broilers. **Poultry Science**, [s. l], v. 96, n. 6, p. 1707–1714, jun. 2017. Disponível em: <https://academic.oup.com/ps/article/96/6/1707/2730225>. Acesso em: 02 dez. 2018.

WANG, Y.; YIN, X.; YIN, D.; LEI, Z.; MAHMOOD, T.; YUAN, J. Antioxidant response and bioavailability of methionine hydroxy analog relative to DL-methionine in broiler chickens. **Animal Nutrition**, [s. l], v. 5, p. 241-247, jul. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405654518303652>. Acesso em: 11 out. 2019.

YODSERANEE, R.; BUNCHASAK, C. Effects of dietary methionine source on productive performance, blood chemical, and hematological profiles in broiler chickens under tropical conditions. **Tropical Animal Health and Production**, [s. l], v. 44, n. 8, p. 1957–1963, mai. 2012. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11250-012-0164-7>. Acesso em: 17 nov. 2018.

ZELENKA, J.; HEGER, J.; MACHANDER, V.; WILTAFSKY, M.; LEŠTÁK, M. Bioavailability of liquid methionine hydroxy analogue-free acid relative to DL-methionine in broilers. **Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis**, [s.l], v. 61, n. 5, p. 1513–1520, abr. 2013. Disponível em: https://acta.mendelu.cz/media/pdf/actaun_2013061051513.pdf. Acesso em: 09 jan. 2019.

ZHANG, S.; SAREMI, B.; GILBERT, E.R.; WONG, E.A. Physiological and biochemical aspects of methionine isomers and a methionine analogue in broilers. **Poultry Science**, [s.l.], v. 96, n. 2, p. 425–439, fev. 2017. Disponível em: <https://academic.oup.com/ps/article/96/2/425/2623744>. Acesso em: 10 Jan. 2019.

CAPÍTULO II

**Expressão de genes relacionados a rota dos aminoácidos sulfurosos
em frangos de corte alimentados com dietas contendo três níveis de
metionina+cistina e duas fontes de metionina**

Expressão de genes relacionados a rota dos aminoácidos sulfurosos em frangos de corte alimentados com dietas contendo três níveis de metionina+cistina e duas fontes de metionina

RESUMO

A proposta deste estudo foi de avaliar fontes comerciais de metionina e os níveis de Met+CysD sobre o desempenho e expressão de genes das enzimas relacionadas com o metabolismo dos aminoácidos sulfurosos em frangos de corte aos 49 dias de idade. Para tanto foram utilizados 540 pintinhos machos, os quais foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial 3x2, constituindo três níveis de Met+CysD (deficiente, exigência e excesso) e duas fontes (DL-Met e DL-HMTBA), sendo seis tratamentos com seis repetições e quinze frangos por parcela. As variáveis de desempenho zootécnico e a expressão dos genes: *MAT1A*, *MTR*, *CBS*, *BHMT*, *GSS*, *ACHY* e *MTRR*, os quais codificam as enzimas hepáticas dos aminoácidos sulfurosos, foram analisadas em frangos aos 49 dias de idade. O nível deficiente de Met+CysD prejudicou o desempenho zootécnico, ocorrendo aumento no consumo de ração, reduzindo o ganho de peso e consequentemente, piorando a conversão alimentar. Assim, a melhor conversão alimentar foi obtida ao nível em excesso de Met+CysD. Em relação às fontes, os frangos que consumiram a dieta com a DL-Met apresentaram maior ganho de peso e melhor conversão alimentar quando comparados aos que receberam DL-HMTBA. Os níveis deficientes e em excesso de Met+CysD, bem como, a utilização da fonte DL-HMTBA promoveram aumento na expressão de mRNA dos genes *MTRR* ($p=0,02$), *CBS* ($p=0,09$) e *GSS* ($p=0,06$) no fígado de frangos de corte aos 49 dias de idade. O nível deficiente em Met+CysD prejudicou o desempenho de frangos de corte aos 42 dias de idade e alterou a abundância de mRNA aumentando a expressão dos genes *MTRR*, *CBS* e *GSS* no tecido hepático.

Palavras-chave: DL-metionina, DL-HMTBA, metabolismo hepático, remetilação, transulfuração

Expression of sulphurous amino acid-related genes in broilers fed diets containing three levels of methionine + cystine and two sources of methionine

ABSTRACT

This study was purpose to evaluate methionine commercial sources and Met+CysD levels on the performance and enzyme gene expression related to sulfur amino acid metabolism in broilers at 49 days of age. 540 male chicks were used, and distributed in a completely randomized design, a 3x2 factorial arrangement, constituting three levels of Met+CysD (deficient, requirement and excess) and two sources (DL-Met and DL-HMTBA), resulting in six treatments, with six repetitions and fifteen chickens in each. Zootechnical performance variables and expression of genes *MAT1A*, *MTR*, *CBS*, *BHMT*, *GSS*, *ACHY* and *MTRR*, which encode hepatic enzymes of sulfur amino acid, were analyzed in broilers at 49 days of age. The deficient level of Met+CysD affected the zootechnical performance, increasing feed intake, reducing weight gain and, consequently, worsening feed conversion. Thus, the best feed conversion was obtained at the excess level of Met+CysD. In relation to the sources, the broilers that consumed the diet with DL-Met presented higher weight gain and better feed conversion when compared to those that received DL-HMTBA. Deficient and excess Met+CysD levels as well as the use of the DL-HMTBA source promoted an increase in mRNA expression of the *MTRR* ($p = 0.02$), *CBS* ($p = 0.09$) and *GSS* ($p = 0.06$) in the broiler liver at 49 days of age. Met+CysD deficient level compromised broiler performance at 42 days of age and altered mRNA abundance by increasing *MTRR*, *CBS* and *GSS* gene expression in liver tissue.

Keywords: DL-methionine, DL-HMTBA, hepatic metabolism, remethylation, transulfurization

1 INTRODUÇÃO

A metionina é um aminoácido essencial para a síntese proteica (WAN et al., 2017; ZHANG et al., 2017); de modo geral, atua no início da tradução, envolvendo a associação do iniciador tRNA ($\text{met-tRNA}^{\text{met}}$) com o eIF-2 e a subunidade ribossomal 40S juntamente com uma molécula de mRNA (BROSNAN & BROSNAN, 2006).

A metionina desempenha também um papel importante através da rota dos aminoácidos sulfurosos ou da homocisteína, por meio da qual, as enzimas e os seus produtos exercem inúmeras funções fisiológicas. A enzima metionina-adenosil-transferase (MAT), o produto do gene *MAT1A*, o qual é expresso no fígado (STIPANUK, 2004) forma a S-adenosilmetionina (SAM). A SAM é responsável por doar grupos metil à aceptores (DNA, RNA, lipídeos e proteínas), reação favorecida pela enzima 5-metiltetrahidrofolato-homocisteína-metil-transferase (MTR) que produz a homocisteína (SHOVELLER et al., 2005), esta é convertida em metionina através da enzima metionina sintetase ou betaina-homocisteína metiltransferase (BHMT).

As enzimas que atuam na produção da cisteína, ou na via da transulfuração, ocorrem principalmente no fígado, rins, intestino delgado e pâncreas (BROSNAN et al., 2004). Uma destas é a cistationina beta sintase (CBS), a qual condensa a serina e homocisteína para formar cistationina, que é então convertida à cisteína (MACLEAN et al., 2010). Após a sua formação, a cisteína pode então ser catabolizada em taurina, sulfatos ou incorporada à glutathione (GSS) (SHOVELLER et al., 2005; MATO; MARTÍNEZ-CHANTAR; LU 2013), as quais são importantes para a defesa do organismo contra o estresse oxidativo (MÉTAYER et al., 2008).

Quando há menores concentrações de metionina no organismo animal, aumenta a atividade de MTR, a qual atua elevando a disponibilidade deste aminoácido (MATO; MARTÍNEZ-CHANTAR; LU 2013). Em contrapartida, quando há excesso de metionina, a expressão dos genes que codificam as enzimas envolvidas na rota da transulfuração é elevada e tal mecanismo acrescenta cisteína no organismo (STIPANUK, 2004).

O fígado tem um papel chave nos processos biológicos e é o responsável por regular a concentração de metionina no sangue. Assim, qualquer desequilíbrio do ciclo causado por deficiência ou excesso de metionina poderia causar lesão neste órgão, devido

à síntese de DNA e reações de metilação anormais, ou estresse oxidativo (WAN et al., 2017), consequentemente, prejuízos no desempenho de frangos de corte, os quais, exigem uma dieta de alta qualidade, de tal modo, que atenda adequadamente aos requisitos nutricionais para cada fase.

A metionina é o primeiro aminoácido limitante e pode suprir até 50% das exigências de cisteína para frangos de corte. Desta forma, as dietas destes animais devem ser formuladas levando em consideração os níveis de Met+CysD que sejam adequados para o suprimento de ambas, bem como, a utilização de uma fonte comercial de metionina.

As fontes mais utilizadas são a DL-metionina (DL-Met) e o seu análogo, 2-ácido 4-hidroxi metil butanoico (DL-HMTBA), esta última apresenta um grupamento hidroxila no lugar do grupamento amina, localizado no carbono alfa da molécula (MARTÍN-VENEGAS et al., 2006). Devido a estas diferenças químicas e físicas, as fontes podem apresentar funções fisiológicas diferentes (WAN et al., 2017).

Como se vê, estudos para esclarecer como os nutrientes disponíveis nas dietas afetam o padrão de expressão dos genes, são importantes (SWANSON; SCHOOK & FAHEY, 2003), principalmente, para justificar as respostas de desempenho e complementar as abordagens disponíveis na literatura. Assim, a compreensão da via metabólica dos aminoácidos sulfurosos possibilita manipular os níveis de metionina na dieta (AGGREY et al., 2017).

Portanto, é necessário avaliar o metabolismo compartilhado dos aminoácidos sulfurosos, pois existem vários trabalhos que abordam a utilização dos níveis de Met+CysD e das fontes de metionina sobre o desempenho de frangos de corte; entretanto, ainda é desconhecido o seu efeito sobre a expressão de genes que codificam as enzimas relacionadas a rota metabólica dos aminoácidos sulfurosos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Descrição do local e comitê de ética

O experimento foi conduzido no Laboratório de Avicultura do Departamento de Ciência Animal do Centro de Ciências Humanas Sociais e Agrárias (CCHSA) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Campus III, localizada no Município de Bananeiras-PB, Brasil. E, foi executado de acordo com os preceitos e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA-UFPB) com protocolo de nº 075/2017.

2.2 Animais e instalação

Pintinhos machos (Cobb 500 *slow feathering*[®]) com um dia de idade foram obtidos de um incubatório comercial, vacinados para Marek e Gumboro e sexados pela asa, ficaram em círculo de proteção recebendo todos os cuidados necessários para expressar um adequado desempenho, durante o período inicial (1 a 7 dias de idade). No oitavo dia, após a uniformização dos pesos médios iniciais de 185 ± 1 g nas parcelas, foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial 3x2, constituído de: três níveis de Met+CysD (deficiente, exigência e excesso) e duas fontes de metionina: DL-Met e DL-HMTBA, sendo seis tratamentos com seis repetições e quinze frangos por parcela, totalizando 540 animais.

Os frangos foram alojados em galpão de alvenaria, coberto com telhas de barro, piso de concreto e muretas laterais com telas de arame até o telhado, providos de cortinas laterais. O material utilizado como cama foi a maravalha. O galpão é dividido em boxes de 1,0 x 1,5m, equipados com comedouros tubulares e bebedouros tipo pendular. Para garantir ambiente térmico adequado foram instaladas nos boxes lâmpadas incandescentes de 150 watts, a altura destas, regulada de acordo com o crescimento das aves mantendo os valores de temperatura e umidade relativa do ar dentro das faixas de conforto térmico. Foi utilizado programa de luz contínuo (24 horas de luz = natural + artificial).

2.3 Dietas experimentais e manejo

A dieta referência foi composta principalmente, por milho e farelo de soja de acordo com recomendações de Rostagno et al. (2011) para frangos de corte de 8 a 21, 8-33 e 8-49 dias de idade, conforme descrito na Tabela 1. A suplementação da fonte de metionina (DL-Met e DL-HMTBA) foi em substituição ao amido e todas as dietas experimentais foram isonitrogênicas e isoenergéticas. Os níveis deficientes, exigência e excesso de Met+CysD das dietas foram: 0,63; 0,83 e 1,03%; 0,58; 0,83 e 1,08%; 0,52; 0,77 e 1,02% para frangos de 8-21, 8-33 e 8-49 dias, respectivamente. O fornecimento de ração e água foi *ad libitum* durante todo o período experimental.

Tabela 1 - Composição percentual e valores nutricionais das dietas experimentais para frangos de corte

Ingredientes (%)	Inicial	Crescimento	Final
	8-21 dias	8-33 dias	8-49 dias
Milho (7,88%)	56,716	62,175	62,506
Farelo de soja (45%)	35,775	30,132	28,685
Óleo de soja	3,291	3,692	4,500
Fosfato bicálcico (18,1%)	1,558	1,353	1,151
Calcário	0,945	0,889	0,759
DL-Metionina ⁵	0,062	0,060	0,014
DL-HMTBA ⁵	0,070	0,068	0,016
L-Lisina HCl	0,245	0,308	0,315
L-Treonina	0,084	0,103	0,144
L-Arginina	0,000	0,058	0,191
L-Valina	0,000	0,086	0,084
L-Triptofano	0,000	0,000	0,024
Amido	0,600	0,600	0,600
Sal comum	0,491	0,338	0,743
Cloreto de Colina	0,100	0,070	0,100
Premix Vitamínico ¹	0,050	0,050	0,100
Premix Mineral ²	0,050	0,050	0,050
Coccidiostático ³	0,005	0,005	0,005
Bacitracina de zinco	0,015	0,015	0,015
Antioxidante ⁴	0,010	0,010	0,010
Total	100	100	100
Composição calculada			
Energia Metabolizável (kcal/kg)	3050	3150	3200
Proteína Bruta (%)	20,980	19,000	18,400
Cálcio (%)	0,841	0,758	0,663
Fósforo disponível (%)	0,401	0,354	0,309
Metionina digestível (%)	0,343	0,318	0,266
Metionina+cistina digestível (%)	0,630	0,580	0,520
Treonina digestível (%)	0,791	0,735	0,750
Triptofano digestível (%)	0,236	0,206	0,220
Lisina digestível (%)	1,217	1,131	1,100
Valina digestível (%)	0,891	0,880	0,850
Arginina digestível (%)	1,327	1,221	1,300
Sódio (%)	0,210	0,150	0,310
Cloro (%)	0,345	0,254	0,495
Potássio (%)	0,819	0,732	0,706

(¹) Suplemento vitamínico: 1.000.000 UI de vitamina A, 1.700.000 UI de vitamina D3, 20.000 mg de vitamina E, 2.000 mg de vitamina K3, 2.000 mg de vitamina B1, 4.000 mg de vitamina B2, 2.000 mg de vitamina B6, 10.000 mcg de vitamina B12, 20.000 mg de niacina, 10.000 mg de ácido pantotênico, 25 mg de biotina, 500 mg de ácido fólico. (²) Suplemento mineral: 250 mg de selênio, 75.000 mg de manganês, 70.000 mg de zinco, 50.000 de ferro, 8.500 mg de cobre, 1.500 mg de iodo, 200 mg de cobalto (Níveis de garantia por kg de produto). (³) Salinomicina sódica 12g. (⁴) 200 ppm de Hidróxido de Tolueno Butilado (BHT).

2.4 Variáveis analisadas

Foram avaliados os dados de consumo de ração, ganho de peso e conversão alimentar, bem como, a expressão do mRNA dos genes *MAT1A*, *MTR*, *MTRR*, *GSS*, *CBS*, *BHMT* e *ACHY*, os quais codificam as enzimas metionina adenosil-transferase 1; 5-metiltetrahydrofolato homocisteína metil transferase; 5-metiltetrahydrofolato homocisteína metil transferase redutase; glutatona sintetase; cistationina beta sintase; betaina-homocisteína S-metiltransferase; adenosil-homocisteinase, respectivamente, as quais atuam na via da remetilação e transulfuração da rota metabólica dos aminoácidos sulfurosos.

2.5 Coleta de tecidos para análises de RNA

Ao final do período experimental proposto, cinco aves de cada tratamento foram insensibilizadas e eutanasiadas por deslocamento cervical e o tecido do fígado foi colhido e armazenado à -80°C até o momento da extração de RNA.

2.6 Extração de RNA e 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 até 100 mg de tecido. Todos os materiais utilizados para este procedimento foram autoclavados e tratados com o inibidor de RNase, dietil pirocarbonato (DEPC water, *Sigma Aldrich*[®]).

Os tecidos foram macerados com auxílio de almofarizes contendo nitrogênio líquido até à completa dissociação, transferidos para tubos contendo 1mL de Trizol e incubados em gelo por 15 minutos. Posteriormente, adicionados 200µL de clorofórmio e homogeneizados manualmente por aproximadamente 1 minuto.

As amostras foram, então, centrifugadas por 15 minutos a 12.000 rpm à 4°C. A fase líquida foi transferida para um tubo, seguida da adição 1mL de fenol:isopropil:álcool:isoamílico e novamente centrifugada. Desta, retirou-se a fase aquosa novamente e adicionado 500µL de isopropil álcool, incubada a temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugada por 15 minutos a 12.000 rpm, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado em 1mL de etanol 75%. O material

foi centrifugado novamente por 5 minutos e o sobrenadante descartado. O pelete foi seco por 15 minutos e então, ressuscitado em água ultrapura livre de RNase. Em seguida, mediu-se o RNA bruto por auxílio de colibri e submetido à purificação pelo RNeasy Mini Kit (Qiagen, nº 74.104) de acordo com as informações do fabricante.

Dois microgramas de RNA total foram transcritos de forma reversa com o kit de High-Capacity cDNA RT (Thermo Fischer, nº. 4368814) seguindo o protocolo analítico padrão do kit, o qual recomenda as seguintes condições: 25°C por 10 minutos, 37° por 120 minutos, 85° por 5 minutos e 4°C, ao total de 4 horas. Tais condições foram executadas em termociclador de reação em cadeia de polimerase (PCR) convencional. Em seguida, tomou-se 1µL de cDNA como modelo padrão em uma mistura de 20µl para qPCR contendo 1µL de cada primer (*forward* e *reverse* a partir de 10µM) e 2X Fast SYBR Green Master Mix (Agilent Technologies®).

Os ciclos da reação de cadeia em polimerase em tempo real (RT-PCR) foram realizados no termociclador Stragene mx3000p (Agilent Technologies®), sendo 95°C durante 20 segundos, seguida por 40 ciclos de 95°C por 3 segundos e 60°C por 30 segundos e 95°C a 15 segundos, 60°C a 1 minuto e por último, 95°C por 15 segundos. Além disso, ao final de cada reação, a curva da temperatura de fusão de cada reação da RT-PCR foi determinada.

As análises de RT-PCR de cada uma das 5 amostras, cada uma representando um animal, foram executadas em triplicatas. A expressão gênica relativa foi calculada com base no método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Ct (Livak & Schmittgen, 2001) e foram normalizados pela expressão do gene da *β-actina* em cada amostra, como gene de referência. Os números de acessos no *GenBank*, os *primers forward* e *reverse* dos genes usados no estudo estão disponíveis na Tabela 2.

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

¹ Gene	GenBank N°	Primer Forward	Primer Reverse
<i>GSS</i>	XM_425692.5	TTGCTGGGCTGTACTCACTG	CTCCTTCTCGCTGTGGTTTC
<i>MAT</i>	NM_001199519.1	TCATACCAGTGCGTGTCCAT	CACACGATCCTTCAGGGTTT
<i>CBS</i>	XM_416752.4	CTGGGATCTTGAAACCTGGA	ACAGCGGTAACCCTTCACTG
<i>βActina</i>	L_08165.1	CTCCAGGTGTGACACAAAGT	CAGGACTCCATACCCAAGAAAG
<i>MTR</i>	XM_015284113.1	TACACCGGCACATATCAGGA	CCAGACCTGACAGCAGCATA
<i>BHMT</i>	XM_414685.4	GGTGCTTCCATTGTTGGAGT	CAGGTGGGCTTTCAGCTTAG
<i>ACHY</i>	XM_417331.5	AGGCAGACTGGTCAATTTGG	TTGTCCACAGCTCAATCTGC
<i>MTRR</i>	XM_004935129.2	ATTGATGGTCTTTGGCTTGC	AACATGTGGGTCTGCACTGA

¹*GSS*: glutationa sintetase; *MAT*: metionina adenosil-transferase 1; *CBS*: Cistationina beta sintase; *MTR*: 5-metiltetrahidrofolato-homocisteína-metil-transferase; *BHMT*: betaina-homocisteína S-metiltransferase; *ACHY*: adenosil-homocisteinase e *MTRR*: 5-metiltetrahidrofolato-homocisteína-metil-transferase redutase.

2.7 Análises estatísticas

Os dados de desempenho e expressão gênica foram analisados usando o JMP *Statistical Discovery Software* (SAS Institute, 2009) e os efeitos significativos foram posteriormente avaliados pelo teste SNK (*Student-Newman-Keuls*) para desempenho e expressão gênica.

3 RESULTADOS

3.1 Desempenho

Não houve efeito de interação sobre as fontes e níveis de Met+CysD na dieta para o consumo e conversão alimentar ($P>0,05$), mas houve ($P\leq 0,05$) para o ganho de peso. Entretanto, o consumo e a conversão alimentar foram afetados pelos níveis de Met+CysD na dieta, enquanto as fontes alteraram a conversão alimentar (Tabela 3).

Tabela 3 - Desempenho de frangos de corte alimentados com dietas contendo três níveis de Met+CysD e duas fontes de metionina

Variáveis	Nível Met+CysD	Fontes		Médias	Fontes de variação			
		DL-Met	DL-HMTBA		Nível	Fonte	N*S	EPM
CR (g)	Deficiente	4791,861	4781,713	4786,787 ^a				
	Exigência	4621,970	4697,599	4659,784 ^b	*0,0211	0,9329	0,2509	19,7394
	Excesso	4731,614	4656,942	4694,278 ^b				
	Médias	4715,148	4712,084					
GP (g)	Deficiente	2827,951 ^{cA}	2795,674 ^{bA}	2811,812				
	Exigência	2995,827 ^{bA}	2994,510 ^{aA}	2995,168	**<0001	**0,0095	*0,0325	22,8148
	Excesso	3161,066 ^{aA}	3032,966 ^{aB}	3097,015				
	Médias	2994,947	2941,049					
CA	Deficiente	1,694	1,710	1,702 ^a				
	Exigência	1,543	1,568	1,556 ^b	**<0001	*0,0193	0,6943	0,0146
	Excesso	1,497	1,535	1,516 ^c				
	Médias	1,578 ^B	1,604 ^A					

^{A,B} para cada nível, médias de substituição seguidas por letras diferentes maiúsculas na linha diferem entre si pelo teste SNK;

^{a,b} para cada substituição, médias de níveis seguidos por letras diferentes minúsculas na coluna diferem entre si pelo teste SNK.

O nível deficiente em Met+CysD promoveu aumento no consumo de ração ($p<0,05$), prejudicando o ganho de peso ($p<0,01$) e consequentemente, piorando a conversão alimentar ($p<0,01$). Entretanto, a melhor conversão alimentar foi obtida no nível em excesso ($p<0,01$). As fontes testadas influenciaram tanto o ganho de peso ($p<0,01$) quanto a conversão alimentar ($p<0,05$), assim, animais que receberam DL-Met obtiveram maior ganho de peso e melhor conversão alimentar quando comparados com

o grupo DL-HMTBA. Houve interação para ganho de peso ($p<0,05$) entre as fontes e níveis de Met+CysD. O grupo com DL-Met apresentou maior ganho de peso no nível em excesso, em relação à DL-HMTBA, a qual teve maior ganho de peso nos níveis na exigência e excesso.

3. 2 Expressão gênica

As expressões do mRNA dos genes que codificam as enzimas hepáticas de frangos de corte aos 49 dias de idade que consumiram dietas contendo três níveis de Met+CysD e duas fontes de metionina, podem ser visualizadas nas Figuras 1 e 2.

Os níveis deficientes e em excesso de Met+CysD, bem como, a utilização da fonte DL-HMTBA promoveram aumento na expressão dos genes: *MTRR*: 5-metiltetrahydrofolato-homocisteína-metil-transferase redutase ($p=0,02$), *CBS*: Cistationina beta sintase ($p=0,09$) e *GSS*: glutathione sintetase ($p=0,06$) no fígado de frangos de corte aos 49 dias de idade (Figura 1).

Para os genes *ACHY*: adenosil-homocisteinase, *MTR*: 5-metiltetrahydrofolato-homocisteína-metil-transferase, *MAT1A*: metionina adenosil-transferase e *BHMT*: betaina-homocisteína S-metiltransferase, não houve alterações na expressão ($p>0,10\%$) em nenhum nível de Met+CysD ou fonte estudada (Figura 2).

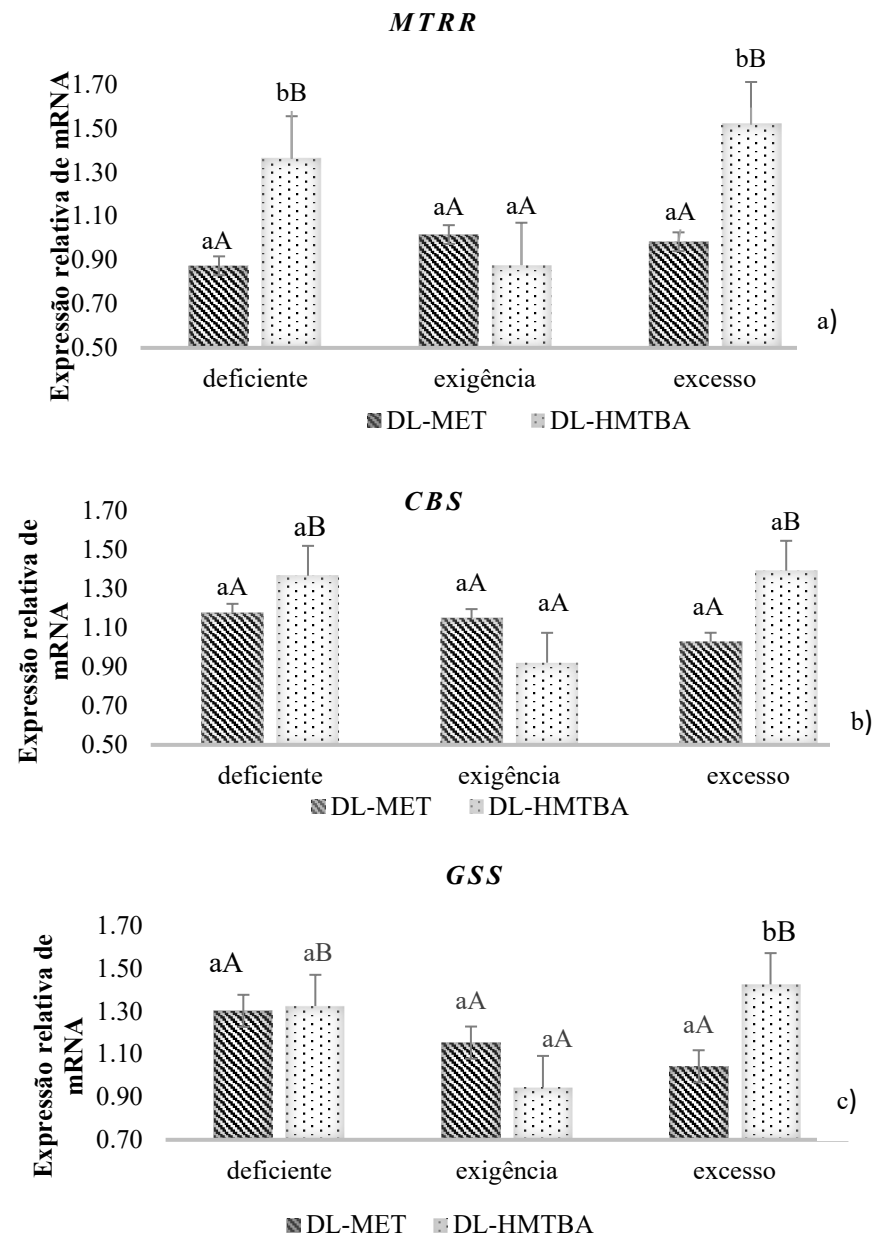


Figura 1 - Expressão dos genes no fígado de frangos alimentados com três níveis de Met+CysD e duas fontes de metionina. a) *MTRR*: Letras minúsculas ou maiúsculas iguais não diferem pelo teste SNK a 5%; b) *CBS* e c) *GSS* (Letras minúsculas iguais indicam expressão semelhante entre as fontes em cada nível; letras maiúsculas iguais indicam expressão semelhante entre os níveis em cada fonte).

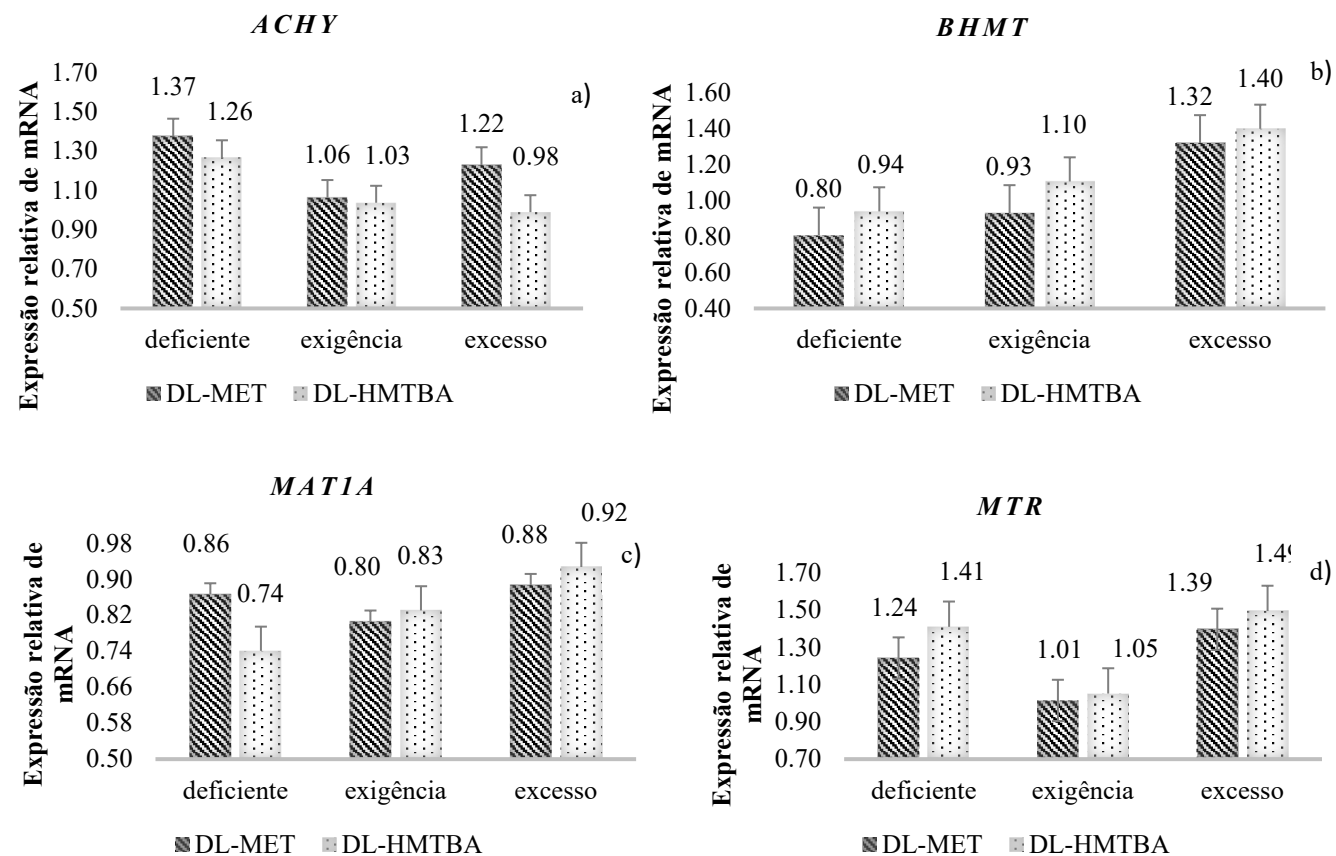


Figura 2 - Expressão de genes no fígado de frangos alimentados com três níveis de Met+CysD e duas fontes de metionina. a) *ACHY*, b) *BHMT*, c) *MAT1* e d) *MTR* (n=5 por tratamento).

Na Figura 3 pode-se observar aumento na expressão do gene *BHMT* no tecido do fígado de frangos que receberam dietas com o nível em excesso de Met+CysD ($p=0,004$).

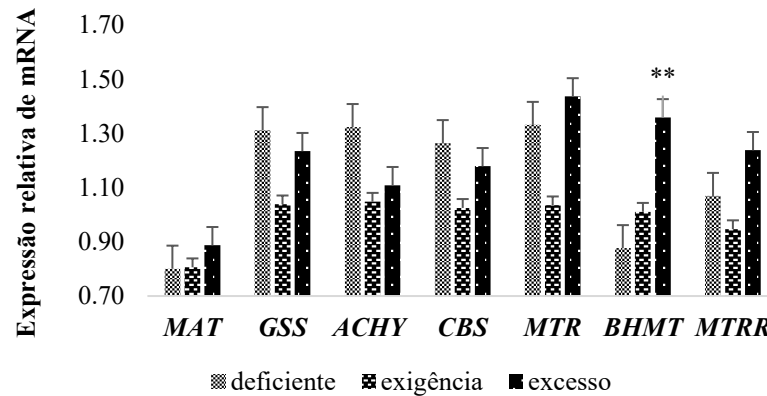


Figura 3 - Expressão de genes no fígado de frangos aos 49 dias de idade alimentados com três níveis de Met+CysD. ** $p<0,01$.

Ao avaliar a expressão dos genes em relação às fontes, o gene *MTRR* foi mais expresso quando os frangos foram suplementados com DL-HMTBA ($p=0,02$). Não houve diferença entre os demais genes (Figura 4).

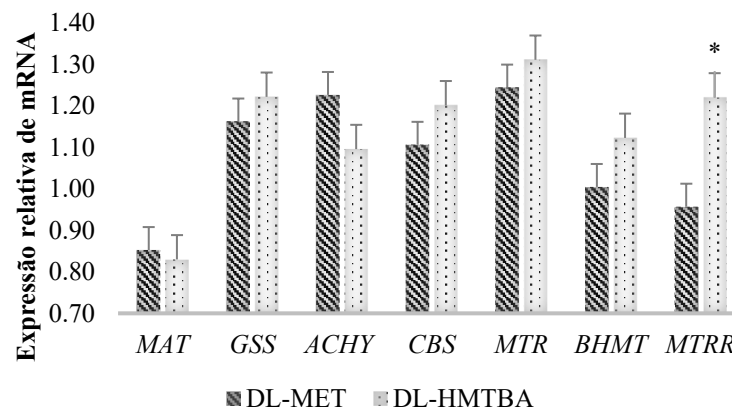


Figura 4 - Expressão de genes no fígado de frangos suplementados com DL-Met e DL-HMTBA. * $p<0,05$.

4 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo demonstram que existe relação entre o nível de metionina dietética e o desempenho de frangos de corte, corroborando com vários trabalhos (MEIRELLES et al., 2003; DEL VESCO et al., 2013; ZHANG et al., 2017). De acordo com as fontes de metionina, esta pesquisa discorda de outras que não encontraram diferenças entre as fontes sobre o desempenho. Aggrey et al. (2017) relataram que não há diferenças entre as fontes, uma vez que, tanto DL-Met quanto DL-HMTBA restabeleceram o crescimento de frangos previamente submetidos a deficiência de metionina.

O melhor desempenho observado ao utilizar a fonte DL-Met quando comparada a DL-HMTBA, pode estar relacionada as diferenças nas suas moléculas levando à mecanismos e locais distintos de absorção; uma vez que, a absorção de DL-HMTBA é principalmente, dependente de concentração, independente de transportador e energia e ocorre no duodeno, onde o pH é mais baixo; em contrapartida, a absorção de DL-Met é dependente de energia e mediada por transportador, e a maior parte ocorre no íleo (DIBNER, 2003).

Os aminoácidos sulfurosos desempenham papéis chaves na regulação do metabolismo proteico. Também são precursores de importantes moléculas, tendo em vista a participação da metionina no metabolismo como doadora de grupos metil na síntese de compostos como creatina, colina, poliaminas e carnitina (HEGER; PHUNG; KŘÍŽOVÁ, 2002) e síntese de cisteína, a qual atua na formação de compostos necessários para a defesa do organismo contra o estresse oxidativo, incluindo a glutatona e a taurina (FINKELSTEIN, 1990; MÉTAYER et al., 2008), e por esta razão, a metionina atua no sistema imunológico através dos seus metabólitos (MARTÍNEZ et al., 2017).

Desta forma, as inúmeras funções dos aminoácidos sulfurosos no organismo justificam porque o desempenho dos frangos que receberam as dietas deficientes em Met+CysD foi comprometido neste estudo. É importante frisar que embora a metionina possa atender até 50% das exigências de cisteína, a via da transsulfuração é irreversível (D'MELLO, 2003). Então, em caso de deficiência de aminoácidos sulfurosos este seria um agravante já que não há uma rota de regeneração da metionina a partir da cisteína.

De acordo com os resultados deste estudo, os níveis de Met+CysD e as fontes de metionina influenciaram a expressão dos genes *MTRR*, *CBS* e *GSS*, pois tanto os níveis deficientes e em excesso e a fonte DL-HMTBA proporcionaram maior expressão destes no tecido do fígado.

O aumento da expressão de *CBS* na deficiência de Met+CysD pode ser devido a um efeito compensatório conforme descrito anteriormente por Hine et al. (2015), em que a restrição de aminoácidos sulfurosos em ratos promoveu maior expressão de *CBS*. Além disso, a maior expressão de *CBS* é relacionada a necessidade de aumentar os níveis de glutathione. Portanto, uma possível justificativa para o aumento na expressão de *CBS* nas dietas deste estudo, poderia ser uma resposta ao estresse oxidativo causado pelas dietas deficientes em Met+CysD (AGGREY et al., 2017).

Em pesquisa realizada por Aggrey et al. (2017) há relatos que a rota da metionina é regulada de acordo com a necessidade do tecido. Igualmente a este trabalho, os autores encontraram maior expressão de *CBS* e menor de *MAT1A* no fígado de frangos que consumiram a dieta com restrição dietética de metionina.

Menor expressão de *MAT1A* ocasiona redução de S-adenosilmetionina (SAM), que é o composto responsável pelas metilações essenciais para a biossíntese de uma variedade de compostos celulares (STIPANUK, 2004), formação de várias substâncias corporais importantes como as poliaminas que agem na divisão celular (SHOVELLER et al., 2005) além disso, atua como inibidor e/ou ativador alostérico, pois, quando os níveis celulares de SAM estão baixos, a cisteína beta sintase é suprimida, para conservar homocisteína para remetilação e consequente produção de metionina. Entretanto, o inverso ocorre quando os níveis de SAM são elevados, uma vez que, a via da transulfuração é ativada para aumentar a síntese de cisteína beta sintase (SELHUB & MILLER, 1992).

Frangos de corte submetidos ao estresse térmico e suplementados com teor elevado de metionina aumentaram a expressão de *CBS* e *GSS* (Del Vesco et al., 2015). Sob condições de estresse oxidativo, em que é necessário maiores quantidades de glutathione, ocorre aumento da sua taxa de produção através do estímulo da via da transulfuração e consequente aumento da expressão e atividade da cisteína beta sintase (MOSHAROV et al., 2000). Portanto, a presença de radicais livres pode induzir a maior expressão de *CBS* e também pode inibir a metionina sintase, estimulando assim, o

aumento da produção de cisteína e glutatona, por este motivo, a via da transulfuração é considerada responsável pela geração de moléculas antioxidantes para o organismo (PERSA et al., 2004).

Conforme foi observado neste estudo, as fontes de metionina influenciaram a expressão dos genes. Assim, a expressão de *MTRR* foi maior no fígado quando os frangos receberam dietas suplementadas com a DL-HMTBA. Segundo Wan et al. (2017), a fonte de metionina afeta o metabolismo hepático, pois, os mecanismos envolvidos na expressão de genes no fígado por DL-HMTBA são diferentes quando comparados à DL-Met. Estes autores investigaram os efeitos das fontes e níveis de metionina sobre a expressão de genes envolvidos no metabolismo hepático do grupo metil em galinhas. Os resultados obtidos descreveram que as expressões relativas foram afetadas pelo nível de suplementação de DL-HMTBA, pois a medida que o nível de DL-HMTBA aumentou, a expressão dos genes se comportou de forma quadrática.

Quando é utilizada a DL-HMTBA como fonte de metionina o corpo pode liberar sinais de deficiência deste aminoácido, o que aumenta a expressão de genes que codificam as enzimas relacionadas a síntese para uma maior regeneração da metionina e desta forma, reduzir o consumo de metionina pela reação de metilação (PILLAI et al., 2006). A formação de cisteína e taurina por DL-HMTBA é maior comparada a L-Met, portanto, a via da transulfuração é favorecida (MARTÍN-VENEGAS et al., 2006).

De tal modo, pode-se sugerir que a DL-HMTBA tem melhor ação na proteção da célula contra o estresse oxidativo (YANG et al., 2016). Este achado foi consistente com Conde-Aguilera et al. (2016), os quais encontraram maior composição corporal de cisteína, que consequentemente, leva à formação da glutatona e taurina, quando os animais receberam como fonte a DL-HMTBA. Ainda, em estudos realizados por Jankowski et al. (2017) observaram aumento nos níveis plasmáticos de glutatona em perus que receberam dietas contendo a DL-HMTBA. Portanto, as células sob estresse oxidativo utilizam a via da transulfuração para produzir mais cisteína e compensar o desequilíbrio *redox* causado pelo oxidante (PERSA et al., 2004).

O fígado é o tecido de maior importância para o metabolismo dos aminoácidos sulfurosos, sendo o responsável por manter o nível circulante de metionina e homocisteína no organismo (YAKUB et al., 2012). A compreensão das vias de produção e remoção de homocisteína é necessária porque a sua elevação no plasma é considerada

fator de risco para ocorrência de doenças cardiovasculares e doença de Alzheimer (BROSNAN & BROSNAN, 2006). Segundo Mosharov et al. (2000) cerca de metade da glutathiona é derivada do metabolismo da via da homocisteína, enquanto o restante é possivelmente, advindo de cisteína liberada durante o *turnover* de proteína ou até mesmo, importada do meio extracelular. Desta forma, os autores destacam a importância do metabolismo da homocisteína para a manutenção do *pool* de glutathiona intracelular em células hepáticas humanas.

Segundo Stipanuk (2004), as vias da remetilação e transulfuração são alteradas em resposta à ingestão de aminoácidos sulfurosos, no entanto, não está claro até que ponto as mudanças nas atividades são devidas à alterações na concentração de enzima em relação ao seu estado de ativação. Contudo, a elevação nas quantidades de pelo menos algumas das enzimas nas vias metabólicas de metionina podem ser induzidas devido ao aumento na ingestão de metionina. Assim como foi observado neste estudo, em que, o nível em excesso de Met+CysD aumentou a expressão de *BHMT*, independente da fonte, e dos genes *MTRR*, *CBS* e *GSS* com a DL-HMTBA no fígado de frangos de corte aos 49 dias de idade.

5 CONCLUSÃO

Diante do exposto, conclui-se que o nível deficiente em Met+CysD prejudica o desempenho de frangos de corte e altera a expressão dos genes *MTRR*, *CBS* e *GSS* no tecido hepático. Fica claro um efeito compensatório, visto que, a via da transulfuração foi ativada em resposta a deficiência de Met+CysD. Mais estudos são necessários para uma avaliação mais aprofundada das enzimas relacionadas às vias da remetilação e da transulfuração em outros tecidos para melhor elucidação destes mecanismos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGGREY, S. E.; GONZÁLEZ-CERÓN, F.; REKAYA, R.; MERCIER, Y. Gene expression differences in the methionine remethylation and transsulphuration pathways under methionine restriction and recovery with D, L-methionine or D, L-HMTBA in meat-type chickens. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, [s. l.], v. 102, n. 1, p. e468–e475, fev. 2017. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jpn.12779>. Acesso em: 04 nov. 2018.
- BROSNAN, J. T.; BROSNAN, M. E. The Sulfur-Containing Amino Acids: An Overview. **The Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 136, n. 6, p. 1636S-1640S, jun. 2006. Disponível em: <https://academic.oup.com/jn/article/136/6/1636S/4664439>. Acesso em: 4 dez. 2018.
- CONDE-AGUILERA, J. A.; CHOLET, J. C.; LESSIRE, M.; MERCIER, Y.; TESSERAUD, S.; VAN MILGEN, J. The level and source of free methionine affect body composition and breast muscle traits in growing broilers. **Poultry Science**, [s. l.], v. 95, n. 10, p. 2322–2331, mar. 2016. Disponível em: <https://academic.oup.com/ps/article/95/10/2322/2223397>. Acesso em: 10 jan. 2018.
- _____. Methylation demand: a key determinant of homocysteine metabolism. **Acta Biochimica Polonica**, [s. l.], v. 51, n. 2, p. 405–413, 2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15218538>. Acesso em: 05 jan. 2017.
- DEL VESCO, A. P.; GASPARINO, E.; OLIVEIRA NETO, A. R.; ROSSI, R. M.; SOARES, M. A. M.; DA SILVA, S. C. C. Effect of methionine supplementation on mitochondrial genes expression in the breast muscle and liver of broilers. **Livestock Science**, [s. l.], v. 151, n. 2, p. 284–291, 1 fev. 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S187114131200426X>. Acesso em: 4 fev. 2018.
- _____. Oxidative stress-related genes in acute heat stress-exposed broilers. **British Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 113, n. 4, p. 549–559, fev. 2015a. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/british-journal-of-nutrition/article/effects-of-methionine-supplementation-on-the-expression-of-oxidative-stressrelated-genes-in-acute-heat-stress-exposed-broilers/5F29593C5CD008708DD5AD9C3FF2DB01>. Acesso em: 4 fev. 2018.
- DIBNER, J. J. Review of the metabolism of 2-hydroxy-4-(methylthio) butanoic acid. **Worlds Poultry Science Journal**, [s. l.], v. 59, n. 1, p. 99–110, mar. 2003. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/world-s-poultry-science-journal/article/review-of-the-metabolism-of-2hydroxy4methylthio-butanoic-acid/D537A5BF6129450B1313CAB6C336EEB5>. Acesso em: 04 nov. 2018.

D'MELLO, J. P. F. Amino acids as multifunctional molecules. In: _____. **Amino Acids in Animal Nutrition**. 2. ed. Wallingford: CABI Publishing, 2003. p. 1-14. Disponível em: <https://www.cabi.org/cabebooks/ebook/20033071519>. Acesso em: 15 dez. 2017.

FINKELSTEIN, J. D. Methionine metabolism in mammals. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, [s. l], v. 1, n. 5, p. 228–237, mai. 1990. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0955286390900702?via%3Dihub>. Acesso em: 10 set. 2018.

HEGER, J.; PHUNG, T.V.; KŘÍŽOVÁ, L. Efficiency of amino acid utilization in the growing pig at suboptimal levels of intake: lysine, threonine, sulfur amino acids and tryptophan. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, [s. l], v. 86, n. 5–6, p. 153–165, mai. 2002. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.14390396.2002.00368.x?sid=nlm%3Apubmed>. Acesso em: 11 set. 2018.

HINE, C.; HARPUTLUGIL, E.; ZHANG, Y.; MADEO, F.; MAIR, W. B.; MITCHELL, J. R. Endogenous hydrogen sulfide production is essential for dietary restriction benefits. **Cell**, [s. l], v. 160, n. 1, p. 132–144, jan. 2015. Disponível em: [https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(14\)015256?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867414015256%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(14)015256?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867414015256%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em: 10 jun. 2018.

JANKOWSKI, J.; OGNIK, K.; KUBIŃSKA, M.; CZECH, A.; JUŚKIEWICZ, J.; ZDUŃCZYK, Z. The effect of DL-, L-isomers and DL-hydroxy analog administered at 2 levels as dietary sources of methionine on the metabolic and antioxidant parameters and growth performance of turkeys. **Poultry Science**, [s. l], v. 96, n. 9, p. 3229–3238, set. 2017. Disponível em: <https://academic.oup.com/ps/article/96/9/3229/3830241>. Acesso em: 02 nov. 2018.

LIVAK, K. J.; SCHMITTIGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. **Methods**, [s. l], v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609>. Acesso em: 05 nov. 2017.

MACLEAN, K. N.; SIKORA, J.; KOŽICH, V.; JIANG, H.; GREINER, L. S.; KRAUS, E.; KRIJT, J.; OVERDIER, K. H.; COLLARD, R.; BRODSKY, G. L.; MELTESSEN, L.; CRNIC, L. S.; ALLEN, R. H.; STABLER, S. P.; ELLEDER, M.; ROZEN, R.; PATTERSON, KRAUS, J. P. A novel transgenic mouse model of CBS-deficient homocystinuria does not incur hepatic steatosis or fibrosis and exhibits a hypercoagulable phenotype that is ameliorated by betaine treatment. **Molecular Genetics and Metabolism**, [s. l], v. 101, n. 2–3, p. 153–162, out. 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2954364/>. Acesso em: 19 jan. 2017.

MARTÍNEZ, Y.; LI, X.; LIU, G.; BIN, P.; YAN, W.; MÁŠ, D.; VALDIVIÉ, M.; HU, C. A.; REN, W.; YIN, Y. The role of methionine on metabolism, oxidative stress, and diseases. **Amino Acids**, [s. l], v. 49, n. 12, p. 2091–2098, dez. 2017. Disponível em:

<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00726-017-2494-2>. Acesso em: 08 jan. 2018.

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**, [s. l], v. 85, n. 11, p. 1932–1938, nov. 2006. Disponível em: <https://academic.oup.com/ps/article/85/11/1932/1577911>. Acesso em: 13 dez. 2017.

MATO, J. M.; MARTÍNEZ-CHANTAR, M. L.; LU, S. C. S-adenosylmethionine metabolism and liver disease. **Annals of Hepatology**, [s. l], v. 12, n. 2, p. 183–189, abr. 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1665268119313559?via%3Dihub>. Acesso em: 02 jun. 2017.

MEIRELLES, H. T.; ALBUQUERQUE, R.; BORGATTI, L. M. O.; SOUZA, L. W. O.; MEISTER, N. C.; LIMA, F. R. Performance of broilers fed with different levels of methionine hydroxy analogue and DL-methionine. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, [Campinas], v. 5, n. 1, p. 69–74, jan. 2003. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-635X2003000100009. Acesso em: 01 set. 2018.

MÉTAYER, S.; SEILIEZ, I.; COLLIN, A.; DUCHÊNE, S.; MERCIER, Y.; PIERRE-ANDRÉ, GERAERT, P-A.; TESSERAU, S. Mechanisms through which sulfur amino acids control protein metabolism and oxidative status. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, [s. l], v. 19, n. 4, p. 207–215, abr. 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0955286307001386?via%3Dihub>. Acesso em: 02 jan. 2018.

MOSHAROV, E.; MATTHEW R. 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**, [s. l], v. 39, n. 42, p. 13005–13011, out. 2000. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/bi001088w>. Acesso em: 01 jan. 2018.

PERSA, C.; PIERCE A.; MA, Z.; KABIL, O.; LOU, M. F. The presence of a transsulfuration pathway in the lens: a new oxidative stress defense system. **Experimental Eye Research**, [s. l], v. 79, n. 6, p. 875–886, dez. 2004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001448350400171X?via%3Dihub>. Acesso em 09 jan. 2018.

PILLAI, P. B.; FANATICO, A. C.; BLAIR, M. E.; EMMERT, J. L. Homocysteine remethylation in broilers fed surfeit choline or betaine and varying levels and sources of methionine from eight to twenty-two days of age. **Poultry Science**, [s. l], v. 85, n. 10, p. 1729–1736, out. 2006. Disponível em: <https://academic.oup.com/ps/article/85/10/1729/1533729>. Acesso em: 16 jan. 2018.

ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; DONZELE, J. L.; GOMES, P. C.; OLIVEIRA, R. F.; LOPES, D. C.; FERREIRA, A. S.; BARRETO, S. L. T.; EUCLIDES, R. F.

Tabelas brasileiras para aves e suínos: Composição de alimentos exigências nutricionais, [Viçosa], 3^a. ed. UFV-Departamento de Zootecnia, p. 252, 2011.

Disponível em: <http://www.lisina.com.br/arquivos/Geral%20Portugu%C3%AAs.pdf>.

Acesso em: 02 set. 2018.

SELHUB, J.; MILLER, J. W. The pathogenesis of homocysteinemia: interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of the remethylation and transsulfuration of homocysteine. **The American Journal of Clinical Nutrition**, [s. l], v. 55, n. 1, p. 131–138, jan. 1992. Disponível em: <https://academic.oup.com/ajcn/article-abstract/55/1/131/4715282?redirectedFrom=fulltext>. Acesso em: 01 set. 2018.

STIPANUK, M. H. Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine. **Annual Review of Nutrition**, [s. l], v. 24, n. 1, p. 539–577, jul. 2004. Disponível em:

<https://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.nutr.24.012003.132418>.

Acesso em: 15 nov. 2017.

SHOVELLER, A. K.; STOLL B.; BALL, R. O.; BURRIN, D. G. Nutritional and functional importance of intestinal sulfur amino acid metabolism. **The Journal of Nutrition**, [s. l], v. 135, n. 7, p. 1609–1612, jan. 2005. Disponível em:

<https://academic.oup.com/jn/article/135/7/1609/4663895>. Acesso em: 10 dez. 2017.

SWANSON, K. S.; SCHOOK, L. B.; FAHEY, Jr. G. C. Nutritional genomics: implications for companion animals. **The Journal of Nutrition**, [s. l], v. 133, n. 10, p. 3033–3040, out. 2003. Disponível em:

<https://academic.oup.com/jn/article/133/10/3033/4687528>. Acesso em: 19 ago. 2017.

WAN, J.; DING, X.; WANG, J.; BAY, S.; PENG, H.; LUO, Y.; SU, Z.; XUAN, Y.; ZHANG, K. Dietary methionine source and level affect hepatic sulfur amino acid metabolism of broiler breeder hens. **Animal Science Journal**, [s. l], v. 88, n. 12, p. 2016–2024, dez. 2017. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/asj.12882>. Acesso em: 09 jan. 2019.

YANG, G. L.; ZHANG, K. Y.; DING, X. M.; ZHENG, P.; LUO, Y. H.; BAI, S. P.; WANG, J. P.; XUAN, Y.; SU, Z. W.; ZENG, Q. F. Effects of dietary DL-2-hydroxy-4(methylthio)butanoic acid supplementation on growth performance, indices of ascites syndrome, and antioxidant capacity of broilers reared at low ambient temperature.

International Journal of Biometeorology, [s. l], v. 60, n. 8, p. 1193–1203, jan. 2016.

Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00484-015-1114-7>.

Acesso em: 10 set. 2018.

YAKUB, M.; MOTI, N.; PARVEEN, S.; CHAUDHRY, B.; AZAM, I.; IQBAL, M.P. Polymorphisms in *MTHFR*, *MS* and *CBS* genes and homocysteine levels in a pakistani population. **PLoS ONE**, [s. l], v. 7, n. 3, p. e33222, mar. 2012. Disponível em:

<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0033222>. Acesso em: 15 jan. 2017.

ZHANG, S.; SAREMI, B.; GILBERT, E.R.; WONG, E.A. Physiological and biochemical aspects of methionine isomers and a methionine analogue in broilers. **Poultry Science**, [s.l.], v. 96, n. 2, p. 425–439, fev. 2017. Disponível em: <https://academic.oup.com/ps/article/96/2/425/2623744>. Acesso em: 10 Jan. 2019.

7 CONSIDERAÇÕES E IMPLICAÇÕES FINAIS

A avicultura industrial vem alcançando inúmeros patamares produtivos e as tecnologias empregadas são as principais responsáveis pelos benefícios observados nas variáveis de desempenho em frangos de corte. A partir dos investimentos em pesquisas de melhoramento genético foi possível a obtenção de frangos mais precoces o que implica em redução dos custos, principalmente, com relação à alimentação. Atrelado a isto, têm-se muitas questões relacionadas ao manejo dos nutrientes fornecidos, como os aminoácidos sulfurosos, que ainda não foram respondidas e que podem contribuir para melhorar a eficiência alimentar.

A partir dos resultados deste estudo, ficou comprovado que a Met+CysD atuam diretamente na obtenção de melhor desempenho em frangos durante toda sua vida produtiva. Tal fato pode ser confirmado quando se associa os dados de desempenho, rendimento de carcaça e cortes nobres, morfometria do jejuno, as percentagens de penas e a expressão dos genes que codificam as enzimas das vias da transulfuração e da remetilação dos aminoácidos sulfurosos.

Desta forma, fica claro que a deficiência em Met+CysD prejudica as características produtivas dos frangos e as fontes comerciais disponíveis se comportam distintamente, dependendo do nível de Met+cysD. Além disso, a partir dos resultados da morfometria do jejuno, nos quais, embora a dieta deficiente em Met+CysD tenha proporcionado aumento na altura das vilosidades, observou-se maior profundidade de cripta, o que justifica as piores respostas no desempenho para este nível. Portanto, podemos sugerir que os valores morfométricos devem estar sempre associados às respostas de desempenho para melhor compreensão desses mecanismos. Ou seja, o aumento das vilosidades pode não refletir em melhor desempenho se o gasto energético para manter os vilos for superior ao ganho animal.

Como se vê, este estudo serve como subsídio para pesquisas futuras que visem avaliar os níveis de Met+CysD, bem como, as fontes comerciais de metionina e seus efeitos sobre a expressão gênica. Além disso, auxiliará na compreensão de como ocorre a regulação dos genes que codificam as enzimas do metabolismo dos aminoácidos sulfurosos. o que pode favorecer a manipulação futura destes, de acordo com as necessidades do organismo animal.