



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

TAMIRES MARCELINO DA SILVA FELIX

**AVALIAÇÃO DE NÍVEIS E FONTES DE METIONINA SINTÉTICA NO
DESEMPENHO E EXPRESSÃO DE GENES DO METABOLISMO E
TRANSPORTADORES JEJUNAIS EM FRANGOS**

AREIA
2023

TAMIRES MARCELINO DA SILVA FELIX

**AVALIAÇÃO DE NÍVEIS E FONTES DE METIONINA SINTÉTICA NO
DESEMPENHO E EXPRESSÃO DE GENES DO METABOLISMO E
TRANSPORTADORES JEJUNAIS EM FRANGOS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Zootecnia como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Zootecnia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra

Coorientador: Prof. Dr. José Humberto Vilar da Silva

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Patrícia Emília Naves Givisiez

AREIA

2023

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

F316a Felix, Tamires Marcelino da Silva.

Avaliação de níveis e fontes de metionina sintética no desempenho e expressão de genes do metabolismo e transportadores jejunais em frangos / Tamires Marcelino da Silva Felix. - Areia:UFPB/CCA, 2023.

108 f. : il.

Orientação: Ricardo Romão Guerra.

Coorientação: José Humberto Vilar da Silva, Patrícia Emília Naves Givisiez.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCA.

1. Zootecnia. 2. Aminoácidos sulfurosos. 3. DL-HMTBA. 4. DL-Metionina. 5. Expressão gênica. I. Guerra, Ricardo Romão. II. Silva, José Humberto Vilar da. III. Givisiez, Patrícia Emília Naves. IV. Título.

UFPB/CCA-AREIA

CDU 636(043.2)



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA
UFPB – UFC

PARECER DE DEFESA DO TRABALHO DE TESE

TÍTULO: “AVALIAÇÃO DE NÍVEIS E FONTES DE METIONINA SINTÉTICA NO DESEMPENHO E EXPRESSÃO DE GENES DO METABOLISMO E TRANSPORTADORES JEJUNAIS EM FRANGOS”

AUTORA: TAMIRES MARCELINO DA SILVA FÉLIX

ORIENTADOR: PROF. DR. RICARDO ROMÃO GUERRA

JULGAMENTO

CONCEITO: APROVADO

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra
Presidente
Universidade Federal da Paraíba - UFPB

Prof. Dr. Alexandre Lemos de Barros Moreira Filho
Examinador
Universidade Federal da Paraíba - UFPB

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



Prof. Dr. Matheus Ramalho de Lima
Examinador
Universidade Federal Rural do Semi-árido - UFRS

Dr. Jorge Cunha Lima Muniz
Examinador
Universidade Federal De Viçosa - UFV

Areia, 28 de fevereiro de 2023

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

TAMIRES MARCELINO DA SILVA FELIX – filha de Ricardo José da Silva e Edlene Marcelino da Silva, nascida em 9 de abril de 1994, na cidade de Recife, Pernambuco. Em 2012 ingressou no curso de Zootecnia na Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), foi bolsista CNPq de Iniciação Científica e trabalhou em diversas áreas, entre elas nutrição animal, também atuou como monitora das disciplinas de anatomia animal e melhoramento genético. Em 2017 obteve o título de Zootecnista. No ano seguinte, ingressou como aluna regular do Programa de Pós Graduação em Zootecnia da Universidade Federal da Paraíba (PPGZ/UFPB), com formação voltada a produção e nutrição de não ruminantes e sob orientação do Prof. Dr. José Humberto Vilar da Silva, obtendo o título de Mestre em Zootecnia no ano de 2020. No mesmo ano, ingressou no doutorado (PPGZ/UFPB), continuando na mesma área, sob orientação do Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra, submetendo-se a defesa de tese de doutorado no dia 28 de fevereiro de 2023.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me abençoado durante toda minha e ter me concedido sabedoria e condições físicas e mentais para o meu doutorado.

À Universidade Federal da Paraíba pela a oportunidade de realizar o curso.

Aos meus pais Ricardo e Edlene e aos meus irmãos Thayse, Lucas e Raquel, por terem me motivado a realizar o doutorado, me dando apoio incondicional e amor, nos momentos em que eu precisei sempre estiveram dispostos a me ajudar.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra, pelas valiosas considerações na produção deste trabalho.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. José Humberto Vilar da Silva, pelos ensinamentos que me fizeram amadurecer como pesquisadora e pela confiança depositada em mim.

À minha coorientadora Prof^ª. Dr^ª. Patrícia Emília Naves Givisiez, pela ajuda na idealização deste estudo.

À banca examinadora composta pelo Prof. Dr. Alexandre Lemos de Barros Moreira Filho, Prof. Dr. Leonardo Augusto Fonseca Pascoal, Prof. Dr. Matheus Ramalho de Lima e ao Zoot. Jorge Cunha Lima Muniz, por terem aceitado ao convite e pelas contribuições e sugestões neste trabalho.

Aos amigos da pós graduação, pela ajuda, pela troca de informações, pelo companheirismo, e por todos os momentos de estudo e momentos de descontração.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

A todos aqueles que contribuíram de forma direta e indireta para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

RESUMO

A metionina é um aminoácido essencial para as aves, sendo o primeiro aminoácido limitante em dietas comerciais para frangos de corte, juntamente com a cisteína. Os processos metabólicos dos aminoácidos sulfurosos geram metabólitos fundamentais para diversos processos fisiológicos, como a síntese de tecidos corporais, funções antioxidativas, divisão celular, produção de taurina, ativação da mTORC1 e regulação da expressão de genes envolvidos no metabolismo das aves. Para a suplementação de metionina em dietas deficientes, usualmente é utilizado a DL-Metionina (DL-Met) ou a DL-Metionina Hidróxi Análoga (DL-HMTBA), esses possuem estruturas químicas e físicas diferentes, interferindo na absorção e posterior metabolismo. Sendo assim, inicialmente foi realizada uma revisão sistemática com o intuito de apresentar um panorama dos estudos que avaliam a influência da suplementação com aminoácidos sulfurosos utilizando a DL-Met, DL-HMTBA ou L-Met, na expressão gênica em frangos de corte. Para isso, foi realizada uma busca completa em bases eletrônicas, usando uma combinação de palavras pelo método PICO (População, Interesse e Contexto) com termos relacionados a frangos de corte, metionina e expressão gênica. A busca foi realizada nas bases Scopus, Web of Science e PubMed através do acervo do Portal de Periódicos da CAPES. Os artigos resultantes foram exportados para um programa de gerenciamento de referências e submetido a vários critérios de seleção, que partiu de um total de 596 a 15 artigos. A partir da revisão foi possível obter um panorama dos estudos que avaliaram expressão gênica em frangos de corte. Com isso, foi realizado um experimento com o objetivo de avaliar os efeitos da DL-Met e DL-HMTBA em três níveis de suplementação no desempenho, expressão de genes do metabolismo de aminoácidos sulfurosos e expressão de transportadores de metionina. Para isso, foram utilizados 450 pintainhos distribuídos em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x3, sendo duas fontes de metionina (DL-Met e DL-HMTBA) e três níveis de suplementação (deficiência, exigência e excesso), totalizando 6 tratamentos com 5 repetições de 15 aves, cada. O experimento foi conduzido no Laboratório de Avicultura do Centro de Ciências Humanas, Sociais e Agrárias, Campus de Bananeiras/UFPB. Os parâmetros avaliados foram: ganho de peso (g), o consumo de ração (g), conversão alimentar (g/g), expressão de RNAm dos genes (MAT1, MTR, BHMT, MTRR, CBG e GSS), expressão de RNAm dos transportadores de glicose (SGLT1, GLUT2 e GLUT5), e expressão de RNAm dos transportadores de metionina (SAT1, SAT2, SAT3, ATB⁰⁺, y⁺LAT1, y⁺LAT2, LAT1, B⁰AT, b⁰⁺AT e rBAT) no jejuno de frangos. A DL-HMTBA aumentou a expressão de BHMT (p=0,0072) e MTRR (p=0,0003) no jejuno das aves. A deficiência de metionina aumentou a expressão de BHMT (p=0,0805) e MTRR (p=0,0018). Maior expressão de GSS foram observadas em aves que foram suplementadas com DL-HMTBA (p=0,0672). As aves alimentadas com DL-HMTBA apresentaram pior ganho de peso (p=0,0117) e maior conversão alimentar (p=0,0170); a deficiência de metionina acarretou em maior consumo de ração (p=0,0214), menor ganho de peso (p<0,0001) e consequentemente maior conversão alimentar (p<0,0001). O uso de DL-HMTBA aumentou a expressão de SGLT1 (p=0,0065), SAT1 (p=0,0167) e y⁺LAT2 (p<0,0001). A deficiência de metionina resultou em maior expressão de SGLT1 (p=0,0004), GLUT5 (p=0,0001), SAT2 (p=0,0064), y⁺LAT2 (p=0,0677) e rBAT (p=0,0800). O uso de DL-Met aumentou a expressão de LAT1 (p=0,0420). É preferível realizar a suplementação de aminoácidos sulfurosos com DL-Met na exigência e a DL-HMTBA acima da exigência.

Palavras-chave: aminoácidos sulfurosos; DL-HMTBA; DL-metionina; expressão gênica; frangos de corte; nutrigenômica.

ABSTRACT

Methionine is an essential amino acid for poultry, being the first limiting amino acid in commercial broiler diets, along with cysteine. The metabolic processes of sulfur amino acids generate fundamental metabolites for several physiological processes, such as the synthesis of body tissues, antioxidative functions, cell division, taurine production, activation of mTORC1 and regulation of the expression of genes involved in the metabolism of birds. For methionine supplementation in deficient diets, DL-Methionine (DL-Met) or DL-Methionine Hydroxy Analogue (DL-HMTBA) is usually used, these have different chemical and physical structures, interfering with absorption and subsequent metabolism. Therefore, a systematic review was initially carried out in order to present an overview of the studies that evaluate the influence of supplementation with sulfur amino acids using DL-Met, DL-HMTBA or L-Met, on gene expression in broiler chickens. For this, a complete search was performed in electronic databases, using a combination of words by the PICo method (Population, Interest and Context) with terms related to broiler chickens, methionine and gene expression. The search was carried out in the Scopus, Web of Science and PubMed databases through the collection of the CAPES Periodicals Portal. The resulting articles were exported to a reference management program and subjected to various selection criteria, which ranged from a total of 596 to 15 articles. From the review it was possible to obtain an overview of the studies that evaluated gene expression in broiler chickens. With this, an experiment was carried out with the objective of evaluating the effects of DL-Met and DL-HMTBA in three levels of supplementation in the performance, expression of genes of the metabolism of sulphurous amino acids and expression of methionine transporters. For this, 450 chicks were distributed in a completely randomized design in a 2x3 factorial scheme, with two sources of methionine (DL-Met and DL-HMTBA) and three levels of supplementation (deficiency, requirement and excess), totaling 6 treatments with 5 replications. of 15 birds each. The experiment was carried out at the Poultry Laboratory of the Center for Human, Social and Agrarian Sciences, Campus de Bananeiras/UFPB. The evaluated parameters were: weight gain (g), feed intake (g), feed conversion (g/g), mRNA expression of genes (MAT1, MTR, BHMT, MTRR, CBG and GSS), mRNA expression of glucose transporters (SGLT1, GLUT2 and GLUT5), and mRNA expression of methionine transporters (SAT1, SAT2, SAT3, ATB⁰⁺, y⁺LAT1, y⁺LAT2, LAT1, B⁰AT, b⁰⁺AT and rBAT) in the jejunum of broilers. DL-HMTBA increased the expression of BHMT (p=0.0072) and MTRR (p=0.0003) in the jejunum of birds. Methionine deficiency increased the expression of BHMT (p=0.0805) and MTRR (p=0.0018). Higher GSS expression was observed in birds that were supplemented with DL-HMTBA (p=0.0672). Birds fed with DL-HMTBA showed worse weight gain (p=0.0117) and higher feed conversion (p=0.0170); methionine deficiency resulted in higher feed intake (p=0.0214), lower weight gain (p<0.0001) and consequently higher feed conversion (p<0.0001). The use of DL-HMTBA increased the expression of SGLT1 (p=0.0065), SAT1 (p=0.0167) and y⁺LAT2 (p<0.0001). Methionine deficiency resulted in increased expression of SGLT1 (p=0.0004), GLUT5 (p=0.0001), SAT2 (p=0.0064), y⁺LAT2 (p=0.0677) and rBAT (p =0.0800). The use of DL-Met increased LAT1 expression (p=0.0420). It is preferable to carry out sulfur amino acid supplementation with DL-Met at the requirement and DL-HMTBA above the requirement.

Keywords: broilers; DL-HMTBA; DL-methionine; gene expression.; nutrigenomics; sulfur amino acids.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 - Vias da metilação, remetilação e transulfuração	26
Figura 2 - Absorção de DL-Met e DL-HMTBA em aves	29

CAPÍTULO 2

Figure 1 - Flow diagram of studies selection process, to obtain the 15 reviewed documents.	42
Figure 2 - Countries of origin of the reviewed studies.	44
Figure 3 - Time frequency of the reviewed studies.	45
Figure 4 - Variables analyzed in the 20 experiments reviewed.	45
Figure 5 - Organs or tissues studied in the 20 experiments reviewed.	46
Figure 6 - Distribution of the genes studied in the breast muscle, according to their main function or pathway.	46
Figure 7 - Distribution of the genes studied in the liver, according to their main function or pathway.	47
Figure 8 - Distribution of the genes studied in the small intestine, according to their main function or pathway.	48
Figure 9 - Distribution of the genes studied in the kidney, hypothalamus (Hypo), gastrocnemius (Gastroc), lung and blood, according to their main function or pathway.	49

CAPÍTULO 3

Figure 1 - Graphic representation of the mRNA expression of glutathione synthetase (GSS) in the jejunum of broilers (mean±SEM; n=6). ^{a-b} Different letters indicate a statistical difference by test t with p<0.10.	78
Figure 2 - Graphic representation of the mRNA expression of (A.) betaine-homocysteine S-methyltransferase (BHMT), (B.) 5 methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase (MTR), (C.) 5 methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase reductase (MTRR) and (D.) cystathionine beta synthase (CBS) in the jejunum of broiler (mean±SEM; n=6). ^{a-c} Different letters indicate a statistical difference by teste t with p<0.10.	79
Figure 3 - Integrated model that describes the mechanism by which (A.) DL-methionine and (B.) DL-HMTBA alter expressions of genes related to methionine metabolism in jejunal enterocytes of broilers. The studied genes are represented in pink pentagons. Up arrows indicate: <i>up-regulation</i> , down arrows indicate: <i>down-regulation</i> . MAT1: Methionine Adenosyltransferase 1; BHMT: Betaine-homocysteine S-methyltransferase; MTR: 5 methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase; MTRR: 5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase reductase; CBS: Cystathionine beta synthase; GSS: Glutathione synthetase; SAM: S-Adenosyl methionine; SAH: S-Adenosyl-homocysteine; DMG: N, N-Dimethylglycine; THF: Tetrahydrofolate; GSH: Glutathione.	81

CAPÍTULO 4

Figure 1 - Graphic representation of the gene expression of glucose transporters, (A.) SGLT1, (B.) GLUT2 and (C.) GLUT5 in the jejunum of broilers (mean±SEM; n=6). ^{a-b} Different letters indicate a statistical difference by test t with p<0.10.	104
Figure 2 - Graphic representation of gene expression of system A transporters, (A.) SAT1, (B.) SAT2 and (C.) SAT3 in the jejunum of broilers (mean±SEM; n=6). ^{a-b} Different letters indicate a statistical difference by test t with p<0.10.	105

Figure 3 - Graphic representation of the gene expression of system y^+L transporters, (A.) y^+LAT1 and (B.) y^+LAT2 ; and system L transporters, (C.) $LAT1$, in the jejunum of broilers (mean \pm SEM; n=6). ^{a-c}Different letters indicate a statistical difference by test t with $p<0.10$.

..... 106

Figure 4 - Graphic representation of the gene expression of system $B^{0,+}$ transporters, (A.) B^0AT ; and system $b^{0,+}$ transporters, (B.) $b^{0,+}AT$ and (C.) $rBAT$, in the jejunum of broilers (mean \pm SEM; n=6). ^{a-c}Different letters indicate a statistical difference by test t with $p<0.10$

107

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Recomendações nutricionais de metionina e metionina + cistina para frangos de corte.....	23
Tabela 2 - Teor de metionina e metionina + cistina, total e digestível para aves, dos principais alimentos usados nas dietas de frango de corte.	25

CAPÍTULO 2

Table 1 - Experimental design and variables analyzed in the studies reviewed (N/A = information not available) ¹	43
---	----

CAPÍTULO 3

Table 1 - Feed composition and nutrient contents of diets formulated for broilers.	63
Table 2 - Experimental methionine levels.....	64
Table 3 - Primers used for quantitative real time PCR in <i>Gallus gallus domesticus</i>	66
Table 4 - Effect of increasing levels of methionine+cystine and replacement of DL-Met by DL-HMTBA in the diet on gene expression of genes of methionine metabolism of broilers from 8 to 42 days of age.	67
Table 5 - Effect of increasing levels of methionine+cystine and replacement of DL-Met by DL-HMTBA in the diet on the performance of broilers from 8 to 42 days of age.	70

CAPÍTULO 4

Table 1 - Feed composition and nutrient contents of diets formulated for broilers.	99
Table 2 - Primers used for quantitative real time PCR in <i>Gallus gallus domesticus</i>	100
Table 3 - Gene expression of glucose transporters in the jejunum of broilers.	101
Table 4 - Gene expression os systems A and y ⁺ L of methionine transporters in the jejunum of broilers.....	102
Table 5 - Gene expression os systems L, b ^{0,+} and B ^{0,+} of methionine transporters in the jejunum of broilers.	103

SUMÁRIO

CONSIDERAÇÕES INICIAIS	14
CAPÍTULO 1	16
Importância dos aminoácidos sulfurosos para frangos de corte e fontes utilizadas para suplementação	16
RESUMO	17
ABSTRACT	18
1 INTRODUÇÃO	19
2 REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1 Função nutricional dos aminoácidos sulfurosos	20
2.2 Níveis nutricionais de metionina para frangos de corte	21
2.3 Teor de metionina nos alimentos mais utilizados na dieta de frango	23
2.4 Metabolismo da metionina	25
2.5 DL-Metionina x DL-Metionina Hidróxi Análoga	27
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	30
REFERÊNCIAS	31
CAPÍTULO 2	36
Relação entre os aminoácidos sulfurosos e a expressão de genes em frangos de corte....	36
RESUMO	37
ABSTRACT	38
1 INTRODUÇÃO	39
2 METODOLOGIA	40
2.1 Estratégia de busca	40
2.2 Critérios pré-estabelecidos para exclusão	41
3 RESULTADOS	41
4 DISCUSSÃO	49
5 CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS	53
APÊNDICE A	56
CAPÍTULO 3	58
Methionine sources at different dietary levels alters the growth and expression of genes related to homocysteine remethylation in the jejunum of broilers	58
RESUMO	59
1 INTRODUÇÃO	60

2 MATERIAL E MÉTODOS	61
2.1 Manejo e alojamento.....	61
2.2 Animais, delineamento e dietas experimentais	62
2.3 Isolamento do mRNA, preparação do cDNA e análise do PCR em tempo real	64
2.4 Desempenho	66
2.5 Análises estatísticas	66
3 RESULTADOS	67
4 DISCUSSÃO	71
5 CONCLUSÃO	75
REFERÊNCIAS	75
CAPÍTULO 4	82
Methionine sources alter the expression of methionine transporters and glucose transporters in the jejunum of broilers	82
RESUMO	83
1 INTRODUÇÃO	83
2 MATERIAL E MÉTODOS	85
Manejo e alojamento	85
Animais, delineamento e dietas experimentais	86
Isolamento do mRNA, preparação do cDNA e análise do PCR em tempo real	87
Análise estatística	88
3 RESULTADOS	88
Transportadores de glicose	88
Transportadores de metionina	89
4 DISCUSSÃO	91
5 CONCLUSÃO	93
REFERÊNCIAS	94
CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES	108

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Os aminoácidos sulfurosos são importantes em diversos processos metabólicos para as aves, sendo fundamentais para a deposição de tecido muscular e para a produção de penas, além da produção de outros compostos fundamentais para a atividade antioxidante, divisão celular, produção energética, metilação do DNA, metabolismo de macromoléculas, entre outros, e por isso, a metionina é o primeiro aminoácido limitante para aves.

Para que se possa alcançar ótimos índices zootécnicos na avicultura industrial, a suplementação com fontes sintéticas de metionina afim de se atender as exigências de metionina+cistina se tornou usual e indispensável. No Brasil, a DL-Metionina (DL-Met) e a DL-Metionina Hidróxi Análoga (DL-HMTBA) são fontes amplamente utilizadas, devido ao fácil acesso no mercado brasileiro.

A DL-HMTBA é utilizada como substituto a DL-Met, devido ao custo reduzido em comparação a esta última, no entanto, por não possuir natureza aminoacídica, a DL-HMTBA precisa primeiramente ser convertida a aminoácido para depois ser metabolizada no organismo das aves. O intestino delgado é o primeiro local de metabolização pós absorção dessas fontes, com isso, surge a hipótese de que essas duas fontes de metionina atuam de formas distintas no metabolismo de aminoácidos sulfurosos e na expressão de transportadores jejunais, em função das diferenças químico-físicas das fontes.

Além disso, o nível dietético de aminoácidos sulfurosos é um dos fatores que altera o metabolismo da metionina, assim como altera a quantidade de transportadores de metionina no jejuno, no entanto, também surge a hipótese de que a depender da fonte de metionina utilizada, a interferência dos níveis de aminoácidos sulfurosos ocorrerá de forma diferente.

Assumindo essas proposições, esse trabalho foi dividido em quatro capítulos. O primeiro trata-se de uma revisão bibliográfica que serve de referencial teórico para embasar a construção da tese, na qual é abordado a importância dos aminoácidos sulfurosos para a avicultura de corte, discorrendo sobre as funções fisiológicas e metabólicas, assim como abordando os níveis nutricionais e as fontes comerciais desses aminoácidos, comentando sobre as diferenças entre as fontes.

O segundo capítulo, trata-se de uma revisão sistemática, que foi focada na busca de artigos que avaliam o efeito da suplementação de aminoácidos sulfurosos na expressão de genes em frangos de corte, na qual é possível observar quais os tecidos foram mais estudados e quais foram os genes mais avaliados pelos pesquisadores.

O terceiro capítulo é um artigo científico, que trata da avaliação do desempenho e das respostas dos genes envolvidos no metabolismo da metionina em células do jejuno de frangos de corte, submetidos a duas fontes de metionina (DL-Met e DL-HMBTA) e três níveis de metionina na dieta (deficiência, exigência e excesso).

O quarto e último capítulo, é um artigo científico que trata da avaliação das respostas da expressão de transportadores de metionina sódio dependente e sódio independente, também de transportadores de glicose em células do jejuno de frangos de corte, submetidos a duas fontes de metionina (DL-Met e DL-HMBTA) e três níveis de metionina na dieta (deficiência, exigência e excesso).

De maneira geral, esse trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar as vias de metilação, remetilação e transulfuração, e a expressão de transportadores de metionina e transportadores de glicose em células do jejuno de frangos de corte à medida em que se altera os níveis de metionina+cistina da dieta e se modifica a fonte de suplementação.

Trabalhos como este são importantes para melhor compreensão do metabolismo de aminoácidos sulfurosos, principalmente com a utilização de fontes de metionina tão usuais na avicultura brasileira. Logo, com este trabalho podemos inferir qual fonte é mais apropriada para a suplementação de aminoácidos sulfurosos, como também a influência dos níveis de metionina+cistina digestível.

CAPÍTULO 1

Referencial Teórico

Importância dos aminoácidos sulfurosos para frangos de corte e fontes utilizadas para suplementação

IMPORTÂNCIA DOS AMINOÁCIDOS SULFUROSOS PARA FRANGOS DE CORTE E FONTES UTILIZADAS PARA SUPLEMENTAÇÃO

RESUMO

A produção de frangos de corte passou por grandes avanços nas últimas décadas, muito desse avanço é advindo do desenvolvimento da nutrição animal. Nos últimos 60 anos as dietas deixaram de ser formuladas com base na proteína bruta e passou rapidamente de aminoácidos totais para aminoácidos digestíveis. A metionina é um aminoácido essencial para os animais, sendo o primeiro aminoácido limitante em dietas comerciais para frangos de corte, juntamente com a cisteína, formam os aminoácidos sulfurosos. Os processos metabólicos dos aminoácidos sulfurosos geram metabólitos fundamentais para diversos processos fisiológicos, como a síntese de tecidos corporais, funções antioxidantes, divisão celular, produção de taurina, ativação da mTORC1 e regulação da expressão de genes envolvidos no metabolismo de macromoléculas. Para a suplementação de metionina em dietas deficientes, usualmente é utilizado a DL-Metionina ou a DL-Metionina Hidróxi Análoga, esses possuem estruturas químicas e físicas diferentes, interferindo na absorção e posterior metabolismo das aves, a DL-Metionina é absorvida de forma ativa enquanto a DL-Metionina Hidróxi Análoga é absorvido de forma passiva, ambas são capazes de estimular o síntese proteica e o desenvolvimento de tecidos corporais, resultando em desempenho similares, mas existem indícios de que o estímulo da expressão de genes relacionados a deposição de proteína, ao ciclo da metionina e expressão de transportadores em frangos de corte é diferente, dependente da fonte de suplementação utilizada. Com isso, objetiva-se com essa revisão, abordar as funções nutricionais e fisiológicas dos aminoácidos sulfurosos, além dos efeitos das fontes mais usuais para suplementação no desenvolvimento corporal e na expressão de genes relacionados ao metabolismo de aminoácidos sulfurosos.

Palavras-chave: Aves. Cisteína. DL-HMTBA. DL-metionina. Metionina. Níveis nutricionais

IMPORTANCE OF SULFUR AMINO ACIDS FOR BROILERS AND SOURCES USED FOR SUPPLEMENTATION

ABSTRACT

The production of broilers has undergone great advances in the last decades, associated with the development of nutrition. In the last 60 years, diets have ceased to be formulated based on crude protein and have quickly moved from total amino acids to digestible and available amino acids. Methionine is an amino acid essential for animals, being the first limiting amino acid in commercial diets for broilers, together with cysteine, form the sulfur amino acids. The metabolic processes of sulfur amino acids generate fundamental metabolites for several physiological processes, such as the synthesis of body tissues, antioxidative functions, cell division, taurine production, activation of mTORC1 and regulation of the expression of genes involved in macromolecule metabolism. For the supplementation of methionine in deficient diets, DL-Methionine or DL-Methionine Hydroxy Analog is usually used, they have different chemical and physical structures, interfering in the absorption and subsequent metabolism of birds, DL-Methionine is actively absorbed while DL-Methionine Hydroxy Analog is passively absorbed, both are able to stimulate protein synthesis and the development of body tissues, resulting in similar performance, but there are indications that the stimulation of the expression of genes related to protein deposition, the methionine cycle and expression of transporters in broilers is different depending on the supplementation source used. Thus, the aim of this review is to address the nutritional and physiological functions of sulfur amino acids, in addition to the effects of the most common sources for supplementation on body development and the expression of genes related to the metabolism of sulfur amino acids.

Keywords: Birds. Cysteine. DL-HMTBA. DL-methionine. Methionine. Nutritional levels

1. INTRODUÇÃO

O uso de aminoácidos industriais para atendimento das exigências de aminoácidos essenciais é uma realidade na indústria avícola, permitindo aumentar a produtividade, reduzir os custos e diminuir a excreção de nitrogênio e fósforo, dois elementos associados com a poluição e eutrofização das águas. Esses avanços só puderam ser alcançados devido à variedade de estudos que foram desenvolvidos com a inclusão de aminoácidos industriais nas dietas das aves.

A metionina se destaca entre os aminoácidos essenciais pela importância fisiológica na formação das proteínas, penas, síntese de cisteína, taurina e glutatona. O S-Adenosil Metionina (SAM), um derivado da metionina, é o maior carregador de grupos metil para síntese de amins biogênicas e metilação de DNA (D'Mello 2003).

Os aminoácidos sulfurosos também estão relacionados com as funções antioxidativas, divisão, crescimento e diferenciação celular, ativação da mTORC1, além de regulação da expressão de genes envolvidos na lipogênese, glicólise e gliconeogênese (Cheng et al., 2014; Skiba-Cassy et al., 2015).

Em dietas comerciais para frangos de corte a metionina é o primeiro aminoácido limitante, sendo a suplementação da dieta com fontes sintéticas de metionina necessária para atender as exigências de metionina e 50% das exigências de cisteína pela transulfuração (D'Mello, 2003)

. Atualmente as fontes de metionina mais utilizadas são a DL-Metionina (DL-Met; 98% de metionina), na forma de pó, e a DL-Metionina Hidróxi Análoga (DL-HMTBA; 88% de metionina), na forma líquida. Semelhante a DL-Met, a DL-HMTBA possui um átomo de enxofre na mesma posição da metionina, porém tem um grupamento hidroxila no carbono alfa, no lugar da amina.

Essas diferenças estruturais e químicas têm influências na absorção e disponibilidade biológica das fontes de metionina. Enquanto a DL-Met é mais absorvida por transporte ativo sódio dependente, a DL-HMTBA é mais absorvida por transporte passivo, através do gradiente de concentração (Zhang et al., 2015). Os níveis dietéticos de metionina, deficiência ou excesso, também influenciam a resposta de diferentes vias metabólicas (Skiba-Cassy et al., 2015).

Objetivou-se com essa revisão, abordar a importância dos aminoácidos sulfurosos para a avicultura de corte, discorrendo sobre as funções fisiológicas e metabólicas, assim como abordando os níveis nutricionais e as fontes comerciais desse aminoácido.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Função nutricional dos aminoácidos sulfurosos

Aminoácidos sulfurosos são aqueles que possuem em sua estrutura química átomos de enxofre, a metionina, cujo nome é derivado do nome químico 2-amino-4-(metil-tiol) ácido butírico, e a cisteína, possuem uma molécula de enxofre em sua estrutura, a cisteína é instável em solução aquosa, sendo rapidamente oxidada, gerando a cistina através da formação de pontes dissulfeto, a cistina por sua vez é formada por duas moléculas de cisteína (D’Mello, 2003).

A principal função dos aminoácidos sulfurosos é a formação de tecido muscular, a metionina desenvolve papel importante no processo de iniciação da síntese proteica, o ribossomo 30S liga-se ao mRNA no códon de iniciação (AUG), formando o complexo de iniciação, o qual é identificado por uma molécula de tRNA que transporta metionina, sendo o mais comum para sinalizar o início da síntese de polipeptídeos (Lehninger, 2014).

Também tem sido estudada a relação entre a suplementação com metionina e a expressão de genes codificadores da mTORC, fornecimento de metionina nos níveis corretos estimulam a maior expressão de genes relacionados ao mTORC (Wen et al., 2014). A cisteína também participa da formação de proteínas, sendo incorporada no arranjo das cadeias polipeptídicas (D’Mello, 2003).

A metionina é conhecida como doadora de grupo metil universal, através da sua conversão em S-adensilmetiona (SAM), esta doa metil para metilação de moléculas importantes, como a metilação do DNA (Anderson Sant e Dolinoy, 2012), assim como metilação de outras moléculas como creatina, que tem a função de regenerar a adenosina trifosfato (ATP) no citoplasma celular (Brosnan et al., 2011).

Os aminoácidos sulfurosos também são utilizados para produção de glutathione peroxidase (GSH-Px), enzima chave na ação antioxidante enzimática contra radicais livres, durante a síntese de GSH-Px utiliza-se uma molécula de cisteína, esta última pode ter até 50% da sua exigência atendida através da metionina. Del Vesco et al. (2015) verificaram que a suplementação com metionina em frangos de corte aumentou a expressão de genes relacionados a cisteína, GSH e GSH-Px, mitigando os efeitos de estresse oxidativo.

Além disso, a metionina está relacionada com a síntese de poliaminas (espermidina e espermina), através da conversão da metionina em SAM e posterior descarboxilação da SAM, dando origem ao dSAM, este é direcionado para síntese de poliaminas que estão associadas a divisão, crescimento e proliferação celular (Lu et al., 2020).

Devido as suas funções na síntese proteica, síntese de GSH-Px e síntese de poliaminas, a metionina está correlacionada com a renovação do epitélio intestinal, em função da constante renovação celular decorrente das descamações naturais ocasionadas pelo atrito com o alimento e agressões por microorganismos, de fato, Ruan et al. 2018, observou que deficiência de metionina acarreta maiores danos na mucosa intestinal resultando em apoptose celular.

A cisteína por sua vez participa da formação da GSH-Px e da taurina, além disso, compõe a estrutura de proteínas queratinizadas, estando em alta quantidade na proteína das penas, pois estas são formadas por proteína queratinizadas (Nitsan et al., 1981). Segundo Vilar da Silva et al. (2019), deficiência de cisteína afeta negativamente o desenvolvimento do folículo primário das penas assim como a síntese de proteínas queratinizadas, ocasionando empenamento ruim e possível desclassificação das carcaças.

É certo que os aminoácidos sulfurosos desempenham diversas funções vitais para o organismo das aves, estando relacionados à produção de metabólitos secundários importantes, para que essas funções sejam desempenhadas, a metionina e cisteína passam por reações metabólicas específicas.

2.2 Níveis nutricionais de metionina para frangos de corte

Os aminoácidos sulfurosos desempenham diversas funções no organismo, sendo importantes para o desenvolvimento das aves. A exigência de aminoácidos sulfurosos está relacionada com a deposição muscular, produção de penas, imunidade e metabólitos secundários (Rao et al., 2011).

Deficiência de Met+Cys acarreta diversos problemas fisiológicos, resultando em pior desenvolvimento corpóreo, menor peso de peito (Corzo et al., 2006), redução da atividade de enzimas antioxidantes, acarretando danos na mucosa intestinal e maior apoptose dos enterócitos (Ruan et al., 2018), redução da atividade da IGF-I, o fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (Wen et al., 2014) e menor atividade da mTORC1, reduzindo a expressão de genes relacionados a síntese proteica (Skiba-Cassy et al., 2015).

Por outro lado, o excesso de Met+Cys aumenta a expressão de genes codificadores de enzimas relacionadas à lipogênese e gliconeogênese, como o ácido graxo sintase (FAS), glicose 6 fosfatase (G6Pase) e fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), aumentando os níveis de ácidos graxos no plasma sanguíneo e catabolismo do excesso de Met+Cys (Skiba-Cassy et al., 2015).

Em trabalho recente, Millecam et al. (2021) realizou estudo com frangos de corte macho (Ross 308), avaliando ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar, estimaram exigências de aminoácidos sulfurosos em 0,69, 0,66 e 0,62% nas fases inicial, crescimento e terminação; além disso, os pesquisadores avaliaram que o uso de L-Metionina reduz os valores de exigência, em comparação a DL-Met.

Considerando que as exigências de cisteína são atendidas pela interconversão de metionina em cisteína, as dietas comerciais são formuladas para atender as exigências de Met+Cys, porém é necessário atenção a relação ideal de Met:Cys e total de aminoácidos sulfurosos, Pacheco et al. (2018) recomendam a relação de Met:Cys/TSAA ideal em 52:48 para frangos de corte de 14 a 28 dias, melhorando a eficiência do uso de metionina.

A relação Met+Cys/Lisina também têm influências no nível adequado de suplementação de metionina, Goulart et al. (2011) recomendam a relação Met+Cys/Lisina para frangos de corte em 71, 70, 76 e 72%; para as exigências de Met+Cys os autores recomendam 0,873, 0,755, 0,748 e 0,661% para as fases pré inicial, inicial, crescimento e terminação.

De acordo com Chamruspollert et al. (2004), elevadas temperaturas reduzem as exigências de metionina, principalmente em situações com desbalanço dos aminoácidos na dieta. Aftab e Ashraf (2009) verificaram que o aumento do fornecimento de aminoácidos sulfurosos não resultou em melhoria do desempenho das aves, com isso recomendaram 0,65 e 0,60% de Met+Cys digestível para 4 a 21 e 22 a 42 dias, respectivamente.

Vários autores realizaram estudos para determinar as exigências de aminoácidos sulfurosos em frangos de corte, visando atender à exigência de Met+Cys proporcionando a quantidade necessária para manutenção das atividades fisiológicas em cada fase. Com base nesses estudos, as tabelas de exigências nutricionais trazem recomendações dos níveis dietéticos de Met+Cys (Tabela 1).

O fornecimento da quantidade correta de aminoácidos sulfurosos para frangos de corte permitirá desenvolvimento corporal adequado devido à atuação individual da metionina e da cisteína, assim como a ação do metabolismo integrado de aminoácidos sulfurosos que gera diversos metabólitos secundários importantes para as atividades fisiológicas.

Tabela 1. Recomendações nutricionais de metionina e metionina + cistina para frangos de corte.

NRC (1994)					
	0-3 sem	3-6 sem	6-8 sem		
%Met Total	0,50	0,38	0,32		
%Met+Cys Total	0,90	0,72	0,60		

Macho desempenho regular médio Rostagno et al. (2017)					
	1-7d	8-21d	22-33d	34-42d	43-46d
%Met Digestível	0,536	0,515	0,461	0,416	0,380
%Met+Cys Digestível	0,967	0,929	0,832	0,750	0,706

Macho desempenho médio superior Rostagno et al. (2017)					
	1-7d	8-21d	22-33d	34-42d	43-46d
%Met Digestível	0,548	0,535	0,506	0,437	0,396
%Met+Cys Digestível	0,989	0,966	0,914	0,790	0,716

Manual Cobb 500 para frangos médios e grandes (2022)					
	0-12d	13-28d	29-39d	40-49d	>50d
%Met Digestível	0,48	0,47	0,44	0,40	0,35
%Met+Cys Digestível	0,94	0,88	0,82	0,74	0,66

Manual Ross 308 (2022)					
	0-10d	11-20d	21-30d	31-40d	41-abate
%Met Digestível	0,53	0,49	0,47	0,45	0,43
%Met+Cys Digestível	0,96	0,89	0,84	0,82	0,78

Fonte: NRC (1994), Rostagno et al., (2017), Cobb-Vantress (2022), Ross Broiler (2022).

2.3 Teor de metionina nos alimentos mais utilizados na dieta de frango

Para formulação de dietas para frangos de corte é essencial conhecer o valor nutritivo dos alimentos (Brumano et al., 2006). A Met+Cys é essencial para frangos de corte em todas as

fases da vida, ao contrário de outros aminoácidos, porém ingredientes de origem vegetal são pobres em Met+Cys (Coneglian et al., 2010).

O Brasil apresenta uma grande variedade de alimentos que podem ser utilizados na dieta das aves, porém valor nutritivo desses alimentos variam de acordo com o as condições de cultivo, genética dos cultivares, fertilidade do solo, formas de armazenamento e processamento dos grãos, dificultando o trabalho dos nutricionistas (Scotta et al., 2016).

Ingredientes de origem animal são utilizados na alimentação de frangos devido ao seu alto valor proteico, porém variações do valor nutricional dessas fontes são mais proeminentes que dos ingredientes de origem vegetal, devido ao tipo de matéria prima, a proporção dessa matéria prima e a falta de padronização do processamento (Brumano et al., 2006).

Milho e soja são ingredientes mais utilizados na composição de dietas para frangos de corte, devido a disponibilidade desses ingredientes no mercado brasileiro e ao seu valor nutricional, mas durante ao período de entressafra é necessário o uso de alimentos alternativos que possam reduzir os custos de produção na avicultura (Leite et al., 2011).

Em dietas para aves compostas por milho e soja, a metionina é o primeiro aminoácido limitante, devido a sua importância para importantes funções fisiológicas, para o crescimento das penas e para atendimento do alto desempenho das linhagens genéticas mais produtivas (Wan et al. 2017)

O uso de alimentos alternativos como trigo, algodão e sorgo tem problemas devido a fatores antinutricionais como polissacarídeos não amiláceos, inibidores de proteases, tanino e gossipol (Knudsen, 2004). Muitos estudos são realizados para determinar o valor nutricional desses ingredientes, as Tabelas Brasileiras Para Aves e Suínos trazem um compilado do valor nutricional para diversos ingredientes (Tabela 2).

O farelo de algodão é um subproduto resultante da moagem do caroço de algodão no processo industrial para a extração do óleo para o consumo humano. O alto teor relativo de proteína bruta e o baixo custo do farelo de algodão o torna uma opção para a formulação de dietas para monogástricos (Barbosa e Gattás, 2004). O farelo de trigo é um subproduto da moenda de grãos de trigo, possui alto teor de fibra, o que limita seu uso na alimentação de aves (Araujo et al., 2008).

O farelo de soja tem sido utilizado como a principal fonte de proteína bruta e aminoácidos em dietas para frangos de corte (Freitas et al, 2011). O milho é o ingrediente adicionado em maior quantidade as dietas como fonte de energia, tornando esse alimento responsável por 20% da proteína bruta e 25% da metionina+cistina (Vieira et al., 2007). O glúten de milho é um

subproduto do milho, é uma rede de proteína que se encontra dentro do grão agregado ao amido, possui teor proteico em torno de 60% (Longo et al., 2005).

O sorgo aparece como substituto ao milho, sendo resistente a seca, porém possui o fator antinutricional tanino e baixa digestibilidade da PB, o que dificulta sua maior inclusão das dietas (Garcia et al., 2005). A farinha de carne e ossos é oriunda do resíduo de abatedouro, é produzida para inclusão na alimentação animal, é um alimento com alto teor PB, mas requer cuidados sanitários para a sua utilização (Teles et al., 2018).

Tabela 2. Teor de metionina e metionina + cistina, total e digestível para aves, dos principais alimentos usados nas dietas de frango de corte.

	%PB	%Met Total	%Met+Cys Total	%Met Digestível Aves	%Met+Cys Digestível Aves
Farelo de algodão	37,8	0,58	1,22	0,46	0,87
Farelo de trigo	15,1	0,24	0,55	0,18	0,42
Farelo de soja	44,4	0,59	1,25	0,55	1,11
Farinha de carne e ossos	37,9	0,48	0,60	0,33	0,42
Glúten de milho	61,5	1,34	2,44	1,29	2,23
Milho	7,86	0,16	0,33	0,15	0,29
Sorgo baixo tanino	8,75	0,15	0,30	0,13	0,27

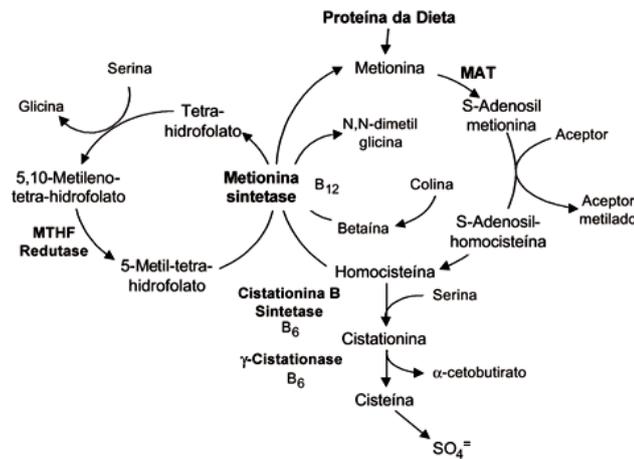
Fonte: Rostagno et al. (2017)

2.4 Metabolismo da metionina

A metionina possui um complexo metabolismo, passando por diversas reações bioquímicas para alcançar funções bioativas no organismo, essas reações podem ser divididas em três etapas, metilação, remetilação e transulfuração (Figura 1), D'Mello (2003) e Sakomura et al. (2014), descrevem bem como acontecem essas reações.

Na primeira etapa acontece a metilação, que consiste na doação de grupos metil pela metionina, inicialmente, a metionina é ativada pelo ATP, esta doa seu grupo adenosina formando a S-adenosil-L-metionina (SAM), esta reação é catalisada pela enzima metionina

adenosiltransferase (MAT). Após esse passo inicial, a SAM está apta para doar grupo metil para moléculas receptoras, como o DNA ou a creatina.



Fonte: Bydlowski et al. 1998

Figura 1. Vias da metilação, remetilação e transulfuração

Esta reação é catalisada pela enzima metil-transferase, após a doação do grupo metil, a SAM converte-se em S-adenosil-homocisteína (SAH) com ação da enzima glicina N-metiltransferase (GNMT), por fim, o grupo adenosina deixa a molécula SAH, esta reage com a água formando a homocisteína, sendo esta reação catalisada pela enzima adenosil-homocisteína-hidroxilase. Na etapa de metilação, a SAM além de doar grupos metil também pode ser convertida a poliaminas (espermina e espermidina), através da sua reação com a putrescina.

Na segunda etapa ocorre a remetilação, no qual a homocisteína é regenerada para metionina, para isso é necessário a ação de duas enzimas, a metionina sintase (MS) e betaína homocisteína metiltransferase (BHMT). Pela ação da metionina sintase, enzima dependente de vitamina B12, o 5-metil-tetra-hidrofolato doa um grupo metil para a homocisteína, que é convertida então em metionina.

Já a reação catalisada pela betaína homocisteína metiltransferase, o processo ocorre de maneira semelhante, entretanto, neste caso o grupo metil é doado pela betaína gerado pela colina, gerando metionina e dimetilglicina. O processo de remetilação é importante para a restauração da metionina, podendo esta ser utilizada na síntese proteica ou reiniciar o ciclo, com uma nova reação de metilação.

Pillai et al. (2006), analisando a expressão de enzimas, relataram que frangos de corte alimentados a vontade, sem restrição de vitaminas B6, B12 e ácido fólico, realizam a maior

parte da remetilação pela ação da enzima metionina sintase, utilizando a via do 5-metil-tetra-hidrofolato em comparação com a via da colina/betaína.

Na terceira etapa, ocorre a transulfuração, na qual a homocisteína é convertida em cisteína através de duas reações, a primeira reação é catalisada pela enzima cistationa- β -sintetase que converte a homocisteína em cistationa com o gasto de uma molécula de serina, sendo esta reação irreversível. Em seguida, a cistationa é convertida a cisteína, esta reação é catalisada pela enzima cistationa γ -liase, ambas as enzimas são ativas pela vitamina B6.

O processo de regulação dessas vias é minucioso, quando a metionina ou SAM estão em baixas quantidades as enzimas relacionadas à remetilação são estimuladas e as relacionadas a transulfuração são inibidas, em condições de quantidades normais ou excesso de metionina, as enzimas relacionadas à metilação e transulfuração são ativadas (Sbodio et al., 2019).

Segundo D'Mello (2003), 50% das exigências de cisteína são atendidas pela metionina através da transulfuração, por isso, a exigência de metionina e cisteína são dadas juntas, como aminoácidos sulfurosos, no entanto, Vilar da Silva et al. (2019) chamam a atenção para as exigências de aminoácidos sulfurosos, pois a deficiência de cisteína afetaria o empenamento, resultando em problemas na termorregulação e conseqüentemente problemas no crescimento, eficiência alimentar e bem-estar.

2.5 DL-Metionina x DL-Metionina Hidróxi Análoga

Fontes vegetais são pobres em metionina, para atendimento das exigências de aminoácidos sulfurosos é necessário realizar a suplementação via dieta, para isso, existem alguns produtos que podem ser utilizados como fonte de metionina, como a DL-Metionina (DL-Met; 98% de Met), na forma de pó, e seus análogo, a DL-Metionina Hidróxi Análoga (DL-HMTBA; 88% de Met), na forma líquida e a DL-Metionina Hidróxi Análoga Cálcica (DL-HMTBA-Ca; 84% de Met), na forma de pó.

Destas, a DL-Met e DL-HMTBA são as formas mais usuais de suplementação, devido a facilidade de encontrar esses produtos (Zhang et al., 2018), o valor econômico entre as fontes DL-HMTBA:DL-Met é de cerca de 81-86% (Vedenov e Pesti, 2010). A DL-Met é uma mistura racêmica dos isômeros D (50%) e L (50%) da metionina, a DL-HMTBA é análoga a DL-Met, também é uma mistura racêmica entre os isômeros D e L mas diferenciase da DL-Met por ter um grupo hidroxila (OH), no lugar de um grupo amina (NH₂).

Essas fontes de metionina são absorvidas e utilizadas de formas diferentes pelas aves, essas são capazes de utilizar apenas a forma L dos aminoácidos, por isso, a D-Met e ambos os isômeros da DL-HMTBA, precisam ser convertidos a L-Met, com ação de enzimas desaminases e transaminases (Zhang et al., 2018).

Para isso, a D-Met precisa ser desaminada, restando seu α -cetoácido, que será transaminado e convertido a L-Met, para a DL-HMTBA, ambos os isômeros são primeiro convertidos a α -cetoácido de metionina, e depois recebem o grupamento NH₂ no carbono alfa, se convertendo a L-Met através da ação enzimática, sendo esses processos de conversão eficazes. As enzimas que catalisam essas reações se encontram em maior quantidade no fígado e nos rins e em menor quantidade no intestino delgado, para atendimento do metabolismo esplâncnico (Vázquez-Añón et al., 2017).

Segundo Conde-Aguilera et al. (2016), ambas as fontes são capazes de fornecer metionina para o metabolismo das aves, não havendo diferenças para o desempenho das aves. Para Aggrey et al. (2017), as duas fontes de metionina estimulam os genes relacionados a metilação e lipogênese, no entanto, para a remetilação, quando suplementado com DL-Met, a doação do grupo metil ocorreu pela via da colina/betaína e quando suplementado com a DL-HMTBA ocorreu pela via 5-metil-tetra-hidrofolato.

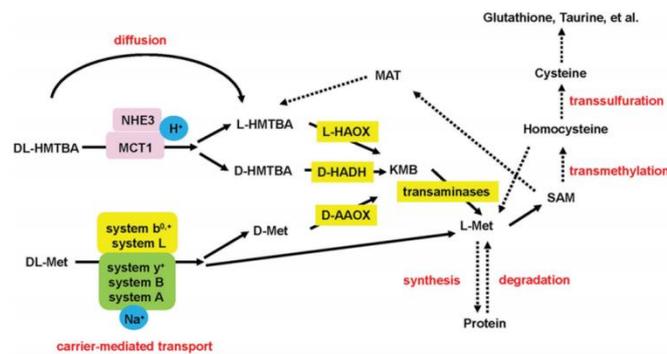
Yodseranee e Bunchasak (2012) relatam que em condições tropicais também não há diferença para o uso de DL-Met e DL-HMTBA em frangos de corte (1 a 35 dias). No entanto, Kim et al. (2019) trabalhando com frangos de corte (1 a 35 dias), verificaram que a DL-HMTBA em substituição de 100% a DL-Met, resulta em menor ganho de peso e pior conversão alimentar.

De acordo com Swennen et al. (2011) e Willemsen et al. (2011) a DL-HMTBA é mais eficaz no estímulo das funções oxidativas em situações de estresse por calor, estimulando a síntese de glutathione peroxidase. Porém, para Zelenka et al. (2013), a DL-HMTBA possui menor biodisponibilidade para frangos de corte.

A adição de metionina na dieta de frangos de corte também leva a melhora no balanço aminoacídico, promovendo o crescimento e síntese de proteínas, reduzindo a síntese de gordura e melhorando a conversão alimentar (Majdeddin et al., 2019). A suplementação de metionina tem efeito positivo na síntese de proteínas musculares, devido a sua ação na expressão de genes relacionados ao crescimento, como o IGF1 e GH (Del Vesco et al. 2015).

Existem muitos estudos sobre as diferenças entre a DL-Met e a DL-HMTBA no organismo das aves, avaliando as diferenças de absorção, transporte, conversão e

biodisponibilidade, Zhang et al. (2015) revisaram e resumiram as principais diferenças entre as duas fontes de metionina sintética (Figura 2).



Fonte: Zhang et al. (2015)

Figura 2. Absorção de DL-Met e DL-HMTBA em aves

A absorção da DL-Met em grande parte é dependente do transporte ativo e demanda energia, sendo absorvida contra seu gradiente de concentração, ambos os isômeros são absorvidos de igual forma, ao chegar no intestino delgado, a DL-Met pode ser absorvida por transportadores da membrana borda escova ou da membrana basolateral.

Os sistemas de transporte A (transportadores SAT1 e SAT2), B^{0,+} (transportador ATB^{0,+}) e y⁺L (transportadores y⁺LAT1 e y⁺LAT2) fazem parte do grupo de transportadores Na dependente, estando em maior quantidade no intestino delgado, os transportadores dos sistemas A e y⁺L estão localizados na membrana basolateral, enquanto o transportador ATB^{0,+} está localizado na membrana borda escova.

A DL-Met também pode ser absorvida por transportadores Na independente, através do transporte facilitado, utilizando os sistemas de transporte b^{0,+} (transportador b^{0,+}AT/rBAT) e L (transportador LAT1). Esses transportadores realizam transporte de aminoácidos neutros, catiônicos e hidrofóbicos em aves, podendo haver problemas na absorção de metionina devido a competição por transportadores.

A DL-HMTBA por sua vez é absorvida em grande parte por difusão, dependente de concentração, sendo absorvida mais rapidamente na porção proximal do intestino delgado, correspondendo ao duodeno e jejuno, no entanto, continua sendo absorvida por todo trato gastrointestinal. A DL-HMTBA também pode ser absorvida em menor quantidade por transportadores H⁺ dependente como o MCT1 e o NHE3 (Martín-Venegas et al., 2014).

Alguns autores também avaliaram os efeitos na expressão gênica de genes relacionados a deposição de proteína, ao ciclo da metionina e expressão de transportadores em frangos de

corte. Zhang et al. (2016) verificaram que as fontes de metionina afetam de forma diferente a expressão de transportadores, apenas L-Met e DL-Met estimularam a expressão de transportadores do sistema B^{0,+}, como o ATB^{0,+}, mas a L-Met, DL-Met e DL-HMTBA foram capazes de aumentar a expressão de MCT1, o que não era esperado.

Segundo Aggrey et al. (2017), as duas fontes de metionina estimulam os genes relacionados a metilação e lipogênese, no entanto, para a remetilação, quando suplementado com DL-Met, a doação do grupo metil ocorreu pela via da colina/betaína e quando suplementado com a DL-HMTBA ocorreu pela via 5-metil-tetra-hidrofolato. Zeitz et al. (2018) relatam que a DL-Met promove maior desenvolvimento da musculatura do peito, a DL-HMTBA por sua vez, não possui a capacidade de estimular a mTORC nos mioblastos.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A metionina é o primeiro aminoácido limitante para frangos de corte em dietas comerciais, devido a sua importância fisiológica, é requerido em grande quantidade, juntamente com a cisteína, expressando a exigência de aminoácidos sulfurosos; estão relacionados com síntese de tecidos corporais, funções antioxidativas, divisão celular, produção de taurina, ativação da mTORC1, regulação da expressão de genes envolvidos na lipogênese, glicólise e gliconeogênese, entre outras funções.

Os alimentos utilizados na composição de dietas para frangos de corte são pobres em metionina, para atender essa demanda, as aves geralmente são suplementadas com DL-Met, a DL-HMTBA surge com uma alternativa menos onerosa, no entanto, existem diferenças químicas e físicas entre essas fontes que resultarão em diferenças metabólicas.

REFERÊNCIAS

- AFTAB, U.; ASHRAF, M. Methionine+cystine requirement of broiler chickens fed low-density diets under tropical conditions. **Tropical Animal Health Production**, v. 41, p. 363–369, 2009.
- AGGREY, S.E, GONZÁLEZ-CÉRON, 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 Animal Physiology and Animal Nutrition**, p. 1-8, 2017. Doi: 10.1111/jpn.12779.
- ANDERSON, O.S.; SANT, K.E.; DOLINOY, D.C. Nutrition and epigenetics: an interplay of dietary methyl donors, one-carbon metabolism and DNA methylation. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, p. 853–859, 2012. Doi:10.1016/j.jnutbio.2012.03.003.
- ARAUJO, D.M.; SILVA, J.H.V.; MIRANDA, E.C.; ARAUJO, J.A.; COSTA, F.G.P.; TEIXEIRA, E.N.M. Farelo de trigo e complexo enzimático na alimentação de poedeiras semipesadas na fase de produção. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.5, p.843-848, 2008.
- BARBOSA, F.F.; GATTÁS, G. Farelo de algodão na alimentação de suínos e aves. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 1, n. 3, p.147- 156, 2004.
- BROSNAN, J.T.; SILVA, R.P.; BROSNAN, M.E. The metabolic burden of creatine synthesis. **Amino Acids**, v. 40, p. 1325–1331, 2011. Doi: 10.1007/s00726-011-0853-y.
- BRUMANO, G.; GOMES, P.C.; ALBINO, L.F.T.; ROSTAGNO, H.S.; GENEROSO, R.A.R.; SCHIMIDT, M. Composição química e valores de energia metabolizável de alimentos protéicos determinados com frangos de corte em diferentes idades. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.6, p.2297-2302, 2006.
- BYDLOWSKI, S.P.; MAGNANELLI, A.C.; CHAMONE, D.A.F. Hiper-homocisteinemia e doenças vaso-oclusivas. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 71, n. 1, p. 69-76, 1998.
- CHAMRUSPOLLERT, M.; PESTI, G.M.; BAKALLI, R.I. Influence of temperature on the arginine and methionine requirements of young broiler chicks. **Journal Applied of Poultry Research**, v. 13, p. 628–638, 2004.
- CHENG, S.C.; QUINTIN, J.; CRAMER, R.A.; SHEPARDSON, K.M.; SAEED, S.; KUMAR, V.; GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E.J.; MARTENS, J.H.A.; RAO, N.A.; AGHAJANIREFAH, A.; MANJERI, G.R.; LI, Y.; IFRIM, D.C.; ARTS, R.J.W.; VAN DER MEER, B.M.J.W.; DEEN, P.M.T.; LOGIE, C.; O'NEILL, L.A.; WILLEMS, P.; VAN DER VEERDONK, F.L.; VAN DER MEER, J.W.M.; NG, A.; JOOSTEN, L.A.B.; WIJMENGA, C.; STUNNENBERG, H.G.; XAVIER, R.J.; NETEA, M.G. mTOR- and HIF-1 α -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. **Science**, v. 345, p. 1579-1588, 2014. Doi: 10.1126/science.1250684.
- COBB-VANTRESS. Frangos de corte Cobb500: Suplemento de Desempenho e Nutrição. Brasil, 2022. 16 p.
- CONDE-AGUILERA, J.A., CHOLET, J.C.G.; LESSIRE, M.; MERCIER, Y.; TESSERAUD, S.; MILGEN, J. The level and source of free-methionine affect body composition and breast muscle traits in growing broilers. **Poultry Science**, v. 95, p. 2322–2331, 2016. Doi: <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pew105> .

CONEGLIAN, J.L.B.; VIEIRA, S.L.; BERRES, J.; FREITAS, D.M. Responses of fast and slow growth broilers fed all vegetable diets with variable ideal protein profiles. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.2, p.327-334, 2010.

CORZO, A.; KIDD, M.T.; DOZIER III, W.A.; SHACK, L.A.; BURGESS, S.C. Protein expression of *pectoralis major* muscle in chickens in response to dietary methionine status. **British Journal of Nutrition**, v. 95, p. 703–708, 2006. Doi: 10.1079/BJN20051716

D'MELLO, J.P.F. **Amino acids in animal nutrition**. 2 ed. London: CABI Publishing, 2003. 513p.

DEL VESCO, A.P.; GASPARINO, E.; GRIESER, D.O.; ZANCANELA, SOARES, M.A.M.; OLIVEIRA NETO, A.R. Effects of methionine supplementation on the expression of oxidative stress-related genes in acute heat stress-exposed broilers. **British Journal of Nutrition**, v. 113, 549–559, 2015. Doi:10.1017/S0007114514003535.

FREITAS, E.R.; LIMA, R.C.; SILVA, R.B.; SUCUPIRA, F.S.; MOREIRA, R.F.; LOPES, I.R.V. Substituição do farelo de soja pelo farelo de côco em rações contendo farelo da castanha de caju para frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, n.5, p.1006-1013, 2011.

GARCIA, R.G.; MENDES, A.A.; COSTA, C.; PAZ, I.C.L.A.; TAKAHASHI, S.E.; PELÍCIA, K.P.; KOMIYAMA, C.M.; QUINTEIRO, R.R. Desempenho e qualidade da carne de frangos de corte alimentados com diferentes níveis de sorgo em substituição ao milho. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.5, p.634-643, 2005.

GOULART, C.C.; COSTA, F.G.P.; SILVA, J.H.V.; SOUZA, J.G.; RODRIGUES, V.P.; OLIVEIRA, C.F.S. Requirements of digestible methionine + cystine for broiler chickens at 1 to 42 days of age. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, n.4, p.797-803, 2011.

KIM, D-K; AN, B-K.; OH, S.; KEUM, M-C.; LEE, S.; UM, J-S.; AYASAN, T.; LEE, K-W. Effects of different methionine sources on growth performance, meat yield and blood characteristics in broiler chickens. **Journal of Applied Animal Research**, v. 47, n. 1, p. 230-235, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1080/09712119.2019.1617719>.

KNUDSEN, K.E.B. Fiber and nonstarch polysaccharide content and variation in common crops used in broiler diets. **Poultry Science**, v. 93, p. 2380–2393, 2014. <http://dx.doi.org/10.3382/ps.2014-03902>

LEHNINGER, N.D.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica de Lehninger** [recurso eletrônico]. 6. ed., Porto Alegre: Artmed, 2014. 1250p.

LEITE, P.R.S.C.; LEANDRO, N.S.M.; STRINGHINI, J.H.; CAFÉ, M.B.; GOMES, N.A.; JARDIM FILHO, R.M. Desempenho de frangos de corte e digestibilidade de rações com sorgo ou milho e complexo enzimático. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, n.3, p.280-286, 2011.

LONGO, F.A.; MENTEN, J.F.M.; PEDROSO, A.A.; FIGUEIREDO, A.N.; RACANICCI, A.M.C.; GAIOTTO, J.B.; SORBARA, J.O.B. Diferentes fontes de proteína na dieta pré-inicial de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.1, p.112-122, 2005.

LU, J.; WEIL, J.; CERRATE, S.; COON, C. Developmental changes in physiological amino acids and hepatic methionine remethylation enzyme activities in E10-21 chick embryos and D1-49 broilers. **Journal Animal Physiology and Animal Nutrition**, p. 1-11, 2020. Doi: 10.1111/jpn.13390.

MAJDEDDIN, M.; GOLIAN, A.; KERMANSHAHI, H.; MICHIELS, J.; SMET, S. Effects of methionine and guanidinoacetic acid supplementation on performance and energy metabolites in

breast muscle of male broiler chickens fed corn-soybean diets. **British Poultry Science**, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1080/00071668.2019.1631447>.

MARTÍN-VENEGAS, R.; BRUFAU, M.T.; MAÑAS-CANO, O.; MERCIER, Y.; NONIS, M.K.; FERRER, R. Monocarboxylate transporter 1 is up-regulated in Caco-2 cells by the methionine precursor DL-2-hydroxy-(4-methylthio)butanoic acid. **The Veterinary Journal** **202**, p. 555–560, 2014. Doi: 10.1016/j.tvjl.2014.09.019.

MILLECAM, J.; KHAN, D.R.; DEDEURWAERDER, A.; SAREMI, B. Optimal methionine plus cystine requirements in diets supplemented with L-methionine in starter, grower, and finisher broilers. **Poultry Science**, v. 100, p. 910–917, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.11.023>

National Research Council – NRC. **Nutrient Requirements of Poultry**. National Academic Press, Washington, D.C, 1994. 176p.

NITSAN, Z.; DVORIN, A.; NIR, I. Composition and amino acid content of carcass, skin and feathers of the growing gosling. **British Poultry Science**, v. 22, n. 1, p. 79-84, 1981. Doi: 10.1080/00071688108447866.

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. **Veterinary Research**, v. 14:364, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1677-8>

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**, v. 85, p. 1729-1736, 2006.

RAO, S.V.R.; RAJU, M.V.L.N.; PANDA, A.K.; SAHARIA, P.; SUNDER, G.S. Effect of supplementing betaine on performance, carcass traits and immune responses in broiler chicken fed diets containing different concentrations of methionine. **Asian-Australasian Journal Animal Science**, v. 24, n. 5, p. 662-669, 2011. Doi: 10.5713/ajas.2011.10286.

ROSS BROILER. Nutrition Specifications All Plant Protein-Based Feeds. Aviagen, 2022. 6 p.

ROSTAGNO, H.S., ALBINO, L.F.T., DONZELE, J.L. ET AL., 2011. Tabelas brasileiras para aves e suínos (composição de alimentos e exigências nutricionais). 3. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, p 252.

RUAN, T.; LI, L.; LYU, Y.; LUO, Q.; WU, B. Effect of methionine deficiency on oxidative stress and apoptosis in the small intestine of broilers. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 66, n.1, p. 52–65, 2018. Doi: 10.1556/004.2018.006.

SAKOMURA, N.K.; SILVA, J.H.V.; COSTA, F.G.P.; FERNANDES, J.B.K.; HAUSCHILD, L. **Nutrição de não ruminantes**. Jaboticabal, SP: Funep, 2014. 678p.

SBODIO, J. SNYDER, S.H.; PAUL, B.D. Regulators of the transsulfuration pathway. **British Journal of Pharmacology**, v. 176, p. 583–593, 2019. Doi: 10.1111/bph.v176.4/issuetoc.

SCOTTA, B.A.; ALBINO, L.F.T.; BRUSTOLINI, P.C.; GOMIDE, A.P.C.; CAMPOS, P.F.; RODRIGUES, V.V. **Determinação da composição química e dos valores de energia metabolizável de alguns alimentos proteicos para frangos de corte**. *Ciência Animal Brasileira*, v.17, n.4, p. 501-508, 2016. DOI: [10.1590/1089-6891v17i421347](https://doi.org/10.1590/1089-6891v17i421347)

SKIBA-CASSY, S.; GEURDEN, I.; PANSEERAT, S.; SEILIEZ, I. Dietary methionine imbalance alters the transcriptional regulation of genes involved in glucose, lipid and amino acid metabolism in the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 454, p. 56–65, 2016. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2015.12.015.

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. **British Journal of Nutrition**, v. 106, p. 1845–1854, 2011. Doi:10.1017/S0007114511002558.

TELES, J.A.A.; SILVA JÚNIOR, F.F.; VILELA, S.O.; CUNHA, R.C.S.; SANTOS, M.L.T.; FURTADO, G.D.; SILVA, A.S. Avaliação microbiológica da farinha de carne e ossos utilizada na avicultura industrial no nordeste do Brasil. **Environmental Science**, v. 1, n. 1, p. 169-175, 2018.

VÁZQUEZ-AÑÓN, M., BERTIN, G.; MERCIER, Y.; REZNIK, G.; ROBERTON, J-L. Review of the chemistry, metabolism, and dose response of two supplemental methionine sources and the implications in their relative bioefficacy. **World's Poultry Science Journal**, v. 73, p. 1-12, 2017. Doi:10.1017/S0043933917000551.

VEDENOV, D.; PESTI, G.M. An economic analysis of a methionine source comparison response model. **Poultry Science**, v. 89, p. 2514–2520, 2010. Doi:10.3382/ps.2010-00640

VIEIRA, R.O.; RODRIGUES, P.B.; FREITAS, R.T.F.; NASCIMENTO, G.A.J.; SILVA, E.L.; HESPANHOL, R. Composição química e energia metabolizável de híbridos de milho para frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.4, p.832-838, 2007

VILAR DA SILVA, J.H.; GONZANDO-CERÓN, F.; HOWERTH, E.W.; REKAYA, R.; AGGREY, S.A. Alteration of dietary cysteine affects activities of genes of the transsulfuration and glutathione pathways, and development of skin tissues and feather follicles in chickens. **Animal Biotechnology**. Doi: <https://doi.org/10.1080/10495398.2019.1577253>.

WAN, J.; DING, X.; WANG, J.; BAI, 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**, v. 88, p. 2016-2024, 2017. Doi:10.1111/asj.12882.

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**, v. 96, p. 1707–1714, 2017. Doi: <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pew432>.

WILLEMSSEN, H.; SWENNEN, Q.; EVERAERT, N.; GERAERT, P.A.; MERCIER, Y.; STINCKENS, A.; DECUYPERE, E.; BUYSE, J. Effects of dietary supplementation of methionine and its hydroxy analog DL-2-hydroxy-4-methylthiobutanoic acid on growth performance, plasma hormone levels, and the redox status of broiler chickens exposed to high temperatures. **Poultry Science**, v. 90, p. 2311–2320, 2011. Doi: 10.3382/ps.2011-01353.

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 Production**, v. 44, p. 1957–1963, 2012. Doi 10.1007/s11250-012-0164-7.

ZEITZ, J.O.; MOHRMANN, S.; FEHSE, L.; MOST, E.; HELMBRECHT, A.; SAREMI, B.; EDER, K. Tissue and plasma antioxidant status in response to dietary methionine concentration and source in broilers. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, p. 1–13, 2018. Doi: 10.1111/jpn.12909.

ZELENKA, J.; HEGER, J.; MACHANDER, V.; WILTAFSKY, M.; LESTÁK, M. Bioavailability of liquid methionine hydroxy analogue-free acid relative to DL-methionine in broilers. **Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis**, v. LXI, n. 5, p. 1513-1520, 2013. Doi: 10.11118/actaun201361051513.

ZHANG, S.; GILBERT, E.R.; SAREMI, B.; WONG, E.A. Supplemental methionine sources have a neutral impact on oxidative status in broiler chickens. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, p. 1–10, 2018. Doi: 10.1111/jpn.12946.

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**, v. 0, p. 1-15, 2016. Doi: 10.3382/ps/pew253.

ZHANG, S.; WONG, E.A.; GILBERT, E.R. Bioavailability of different dietary supplemental methionine sources in animals. **Frontiers in Bioscience**, v. 7, p. 478-490, 2015.

CAPÍTULO 2

Revisão Sistemática

Relação entre os aminoácidos sulfurosos e a expressão de genes em frangos de corte

RELAÇÃO ENTRE OS AMINOÁCIDOS SULFUROSOS E A EXPRESSÃO DE GENES EM FRANGOS DE CORTE

RESUMO

Aminoácidos sulfurosos são essenciais para o bom desenvolvimento das aves, em dietas comerciais a metionina é o primeiro aminoácido limitante, sendo necessária sua suplementação com fontes sintéticas, a DL-Metionina (DL-Met) e DL-Metionina Hidróxi Análoga (DL-HMTBA) são as fontes mais usuais. Objetivou-se com essa revisão sistemática apresentar um panorama dos estudos que avaliam a influência da suplementação com aminoácidos sulfurosos na expressão gênica em frangos de corte. Para isso, foi realizada uma busca completa em bases eletrônicas, usando uma combinação de palavras pelo método PICO (População, Interesse e Contexto) com termos relacionados a frangos de corte, metionina e expressão gênica. A busca foi realizada nas bases Scopus, Web of Science e PubMed através do acervo do Portal de Periódicos da CAPES. Os artigos resultantes foram exportados para um programa de gerenciamento de referências e submetido a vários critérios de seleção, que partiu de um total de 596 a 15 artigos. Todos os artigos que atenderam aos critérios de seleção foram publicados depois dos anos 2010, a América foi o continente com maior número de publicações, 10 artigos (66,7%). Os órgãos mais estudados foram o fígado (75%) e o músculo do peito (55%), com maior parte das investigações focadas na expressão de genes relacionados ao ciclo da metionina e atividade antioxidante. A partir desta revisão é possível obter um panorama dos estudos que avaliaram expressão gênica em frangos de corte, explorando quais variáveis foram avaliadas, quais os órgãos foram mais estudados e quais foram os genes alvo, servindo como ponto de partida para novas pesquisas científicas, visando avaliações que ainda não foram exploradas.

Palavras-chave: Ciclo da metionina. Expressão gênica. Fontes de metionina. Metionina. Nutrigenômica. Transportadores de metionina.

RELATIONSHIP BETWEEN SULFUR AMINO ACIDS AND GENE EXPRESSION IN BROILERS

ABSTRACT

Sulfur amino acids are essential for the good development of birds, in commercial diets methionine is the first limiting amino acid, requiring its supplementation with synthetic sources, DL-Methionine (DL-Met) and DL-Methionine Hydroxy Analog (DL-HMTBA) are the most common sources. The objective of this systematic review was to present an overview of the studies that evaluated the influence of supplementation with sulfur amino acids on gene expression in broiler chickens. For this, a complete search was performed in electronic databases, using a combination of words by the PICO method (Population, Interest and Context) with terms related to broiler chickens, methionine and gene expression. The search was carried out in the Scopus, Web of Science and PubMed databases through the collection of the CAPES Periodicals Portal. The resulting articles were exported to a reference management program and subjected to various selection criteria, which ranged from a total of 596 to 15 articles. All articles that met the selection criteria were published after the 2010s, America was the continent with the highest number of publications, 10 articles (66.7%). The most studied organs were the liver (75%) and breast muscle (55%), with most investigations focused on the expression of genes related to the methionine cycle and antioxidant activity. From this review it is possible to obtain an overview of the studies that evaluated gene expression in broilers, exploring which variables were evaluated, which organs were most studied and which were the target genes, serving as a starting point for new scientific research, aiming at assessments that have not yet been explored.

Keywords: Gene expression. Methionine cycle. Methionine sources. Methionine transporters. Methionine. Nutrigenomics.

1. INTRODUÇÃO

O uso de aminoácidos industriais para atendimento das exigências de aminoácidos essenciais é uma realidade na indústria avícola, permitindo aumentar a produtividade, reduzir os custos e diminuir a excreção de nitrogênio e fósforo, dois elementos associados com a poluição e eutrofização das águas. Esses avanços só puderam ser alcançados devido à variedade de estudos que foram desenvolvidos com a inclusão de aminoácidos industriais nas dietas das aves.

A metionina se destaca entre os aminoácidos essenciais pela importância fisiológica na formação das proteínas, penas, síntese de cisteína, taurina e glutatona. O S-Adenosil Metionina (SAM), um derivado da metionina, é o maior carregador de grupos metil para síntese de amins biogênicas e metilação de DNA (D'Mello 2003). Os aminoácidos sulfurosos também estão relacionados com as funções antioxidativas, divisão, crescimento e diferenciação celular, ativação da mTORC1, além de regulação da expressão de genes envolvidos na lipogênese, glicólise e gliconeogênese (Cheng et al., 2014; Skiba-Cassy et al., 2015).

Em dietas comerciais para frangos de corte a metionina é o primeiro aminoácido limitante, sendo a suplementação da dieta com fontes sintéticas de metionina necessária para atender as exigências de metionina e 50% das exigências de cisteína pela transulfuração (D'Mello, 2003). Atualmente as fontes de metionina mais utilizadas são a DL-Metionina (DL-Met; 98% de metionina), na forma de pó, e a DL-Metionina Hidróxi Análoga (DL-HMTBA; 88% de metionina), na forma líquida. Semelhante a DL-Met, a DL-HMTBA possui um átomo de enxofre na mesma posição da metionina, porém tem um grupamento hidroxila no carbono alfa, no lugar da amina.

Essas diferenças estruturais e químicas têm influências na absorção e disponibilidade biológica das fontes de metionina. Enquanto a DL-Met é mais absorvida por transporte ativo sódio dependente, a DL-HMTBA é mais absorvida por transporte passivo, através do gradiente de concentração (Zhang et al., 2015). Os níveis dietéticos de metionina, deficiência ou excesso, também influenciam a resposta de diferentes vias metabólicas (Skiba-Cassy et al., 2015).

Nutrigenômica é o campo de pesquisa que tem buscado elucidar como os nutrientes podem afetar os fatores de transcrição, expressão de RNA e proteínas, homeostase celular e produção de metabólitos, sendo uma ciência emergente em ciências animais (Benítez et al., 2017; Gilani et al., 2021). A demanda por frangos de corte tem aumentado nos últimos anos, a otimização da alimentação das aves é uma vertente importante para aumentar a produção, e isso não é possível sem considerar a pesquisa nutrigenômica (Banerjee et al., 2015).

Com isso, objetivou-se com essa revisão sistemática, abordar a influência da suplementação com aminoácidos sulfurosos na expressão gênica em diversos tecidos em frangos de corte, avaliando quais as demais variáveis foram estudadas, assim como as fontes e os níveis de aminoácidos sulfurosos empregados.

2. METODOLOGIA

A revisão sistemática foi realizada a partir de uma busca completa em bases eletrônicas de acesso a artigos científicos, afim de fazer um levantamento de estudos que avaliaram a ação da metionina na expressão de genes com diversas funções e em diferentes tecidos, tendo como animais de estudo frangos de corte. Esta revisão sistemática foi guiada por padrões dos itens de relatório de Principais Itens para Relatar Revisões Sistemáticas e Meta-análises (PRISMA) (Moher, 2009).

2.1 Estratégia de busca

Uma pesquisa bibliográfica abrangente foi realizada por meio de busca eletrônica. As seguintes bases de dados foram consultadas em outubro de 2022, sem restrição de tempo: Scopus, Web of Science e PubMed. A busca e acesso foi possível usando o acervo do Portal de Periódicos da CAPES (<https://www.periodicos.capes.gov.br/>).

As buscas foram realizadas sem restrição de idioma. A chave questão da pesquisa foi formulada usando o método PICO (População, Interesse e Contexto). Sendo palavras relacionadas com frangos a População (P), fontes de metionina o interesse (I) e expressão gênica e transportadores de nutrientes como contexto (Co). Foram utilizados algarismos booleanos para acessar combinações possíveis de busca. Dessa forma a busca consistiu em:

- P.: broiler or broilers or “meat chicken” or poultry or bird or birds
- I.: “source methionine” or “dl-met” or “dl methionine” or “dl-hmtba” or mha or “methionine hydroxy analog”
- Co.: “gene expression” or “nutrient transport*”

O resultado da busca foi revisado, exportado e todas as referências transferidas para o programa de gerenciamento EndNote X9®, em seguida os dados dos estudos incluídos foram transferidos e compilados no Microsoft Excel®.

2.2 Critérios pré-estabelecidos para exclusão

- P.: estudos que não utilizaram frangos de corte como animal modelo para o estudo. Estudos que utilizaram material biológico in vitro também foram excluídos.
- I.: estudos que não avaliaram a metionina como principal fonte de variação, ou que utilizaram fontes de metionina pouco usuais.
- Co.: estudos que não avaliaram expressão gênica.
- Tipo do trabalho: revisões bibliográficas, revisões sistemáticas (com o sem metanálise), resumos publicados e capítulos de livro.

3. RESULTADOS

A busca eletrônica identificou 596 artigos potencialmente relevantes, como pode ser visto na Figura 1. Destes, 15 foram selecionados e considerados elegíveis para serem revisados em profundidade.

A busca realizada na base Pub Med encontrou 18 artigos, na Web of Science 28 e na base Scopus 549, a maior parte (92,11%), totalizando 596 artigos. Destes, 22 foram removidos por serem duplicados, ou seja, estavam presentes em duas ou nas três bases. 574 artigos foram postos com potencial relevante e, portanto, foram revisados primeiro pelo título, em seguida pelo resumo e por fim, um último critério passível de observação com a leitura aprofundada dos artigos. Como resultado, foram incluídos 15 artigos para serem avaliados.

Obedecendo aos critérios de exclusão, apenas estudos com frangos de corte (*Gallus gallus domesticus*) foram aceitos, sendo consideradas a DL-Met, DL-HMTBA e L-Met como fontes de metionina. Foram consideradas todas as fases de criação, e por isso foram incluídos alguns artigos que apresentavam mais de um experimento, realizado em fases distintas. Dessa forma, a compilação dos dados foram avaliando os experimentos, somando 20 experimentos no total.

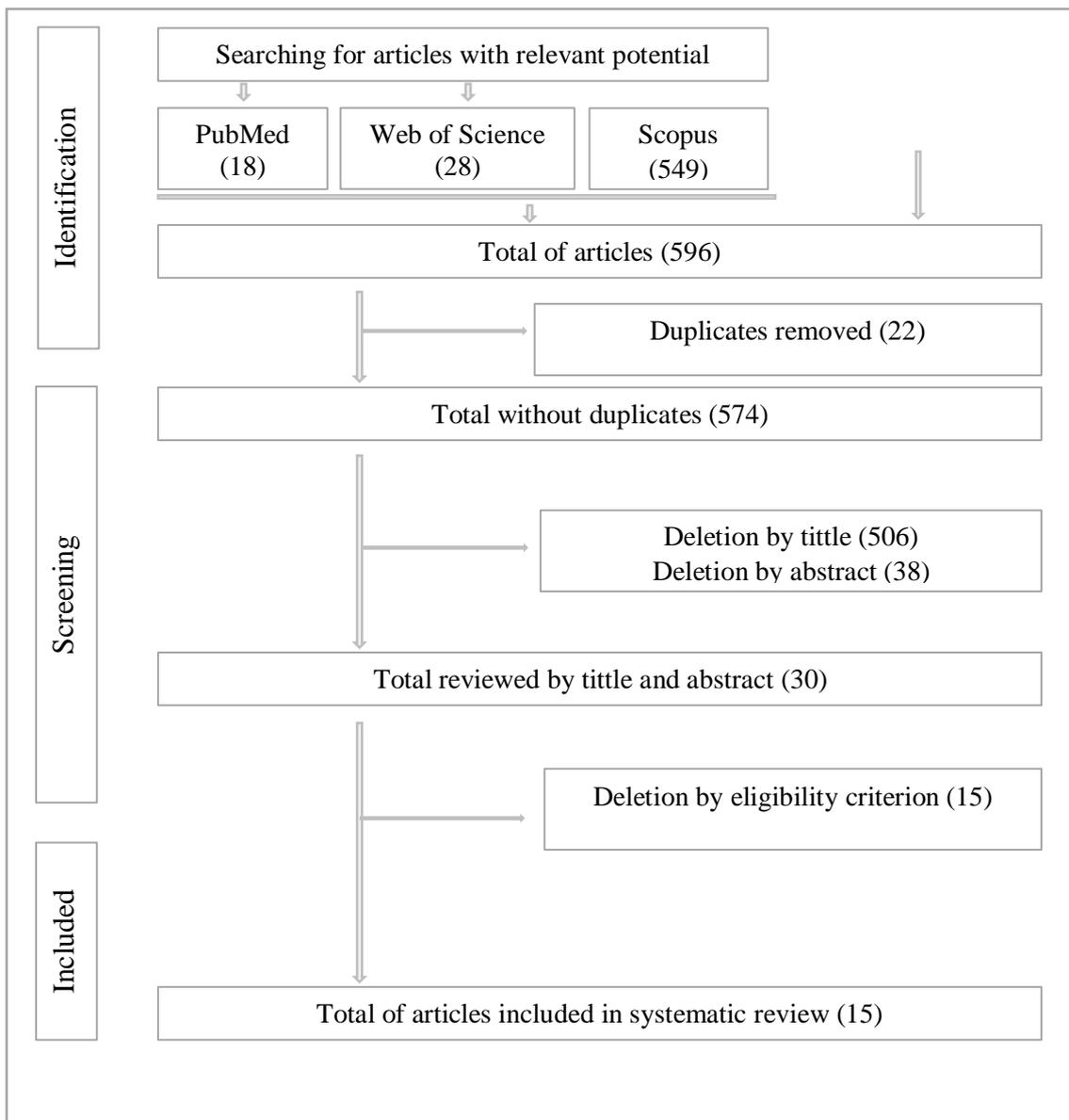


Figure 3. Flow diagram of studies selection process, to obtain the 15 reviewed documents.

As características principais dos estudos revisados estão apresentadas na Tabela 1, na qual é possível observar as fontes de suplementação utilizadas, os níveis de aminoácidos sulfurosos empregados no estudo, duração do experimento, genótipo e quantidade de aves e por fim as variáveis avaliadas no estudo. Dos 20 experimentos considerados, apenas 6 (ou 30%) realizam comparação entre as fontes de metionina.

Table 1. Experimental design and variables analyzed in the studies reviewed (N/A = information not available)¹.

Reference	Exp	Methionine source	Levels of TSAA (%)		Time (days)	N° birds	Genotype	Studied variables
			Control	Treatment				
Agrey et al. 2017	1	L-Met	0.84	0.57	14	300	Ross 708	Performance, carcass composition and gene expression
	2	L-Met x DL-Met x DL-HMTBA	-	0.73	14	300	Ross 708	Performance, carcass composition and gene expression
Del Vesco et al. 2013a	-	DL-Met x DL-HMTBA	-	0.59; 0.75	20	750	Cobb 500	Performance, antioxidant parameters and gene expression
Del Vesco et al. 2013b	-	DL-Met x DL-HMTBA	-	0.59; 0.75	20	750	Cobb 500	Performance, antioxidant parameters and gene expression
Del Vesco et al. 2015a	1	DL-Met	0.58	0.88; 1.57	21	180	Cobb 500	Performance, plasma analysis, antioxidant parameters and gene expression
	2	DL-Met	0.54	0.81; 1.53	21	180	Cobb 500	Performance, plasma analysis, antioxidant activity antioxidant parameters and gene expression
Del Vesco et al. 2015b	1	DL-Met	0.58	0.88; 1.57	21	180	Cobb 500	Performance, plasma analysis and gene expression
	2	DL-Met	0.54	0.81; 1.53	21	180	Cobb 500	Performance, plasma analysis and gene expression
Del Vesco et al. 2020	1	DL-Met	0.58	0.88	21	120	Cobb 500	Performance, antioxidant parameters and gene expression
	2	DL-Met	0.54	0.81	21	120	Cobb 500	Performance, antioxidant parameters and gene expression
Erfani et al. 2021	-	DL-Met x DL-HMTBA	0.85	0.85	42	400	Ross 308	Performance, intestine morphology, plasma analysis, antioxidant parameters and gene expression
Fagundes et al. 2020	-	DL-Met	0.49	0.28	19	102	Cobb 500	Performance, intestine morphology, apparent digestibility and gene expression
Gasparino et al. 2017	1	DL-HMTBA	0.58	0.88	21	240	Cobb 500	Performance, carcass composition, plasma analysis, antioxidant parameters and gene expression
	2	DL-HMTBA	0.54	0.81	21	240	Cobb 500	Performance, carcass composition, plasma analysis, antioxidant parameters and gene expression

Table 1. Continued.

Reference	Exp	Methionine source	Levels of TSAA (%)		Time (days)	N° birds	Genotype	Variables
			Control	Treatment				
Magnuson et al. 2020	-	DL-Met	G: 0.86 F: 0.78	G: 1.04 F: 0.83	32	560	Cornish cross	Performance, meat quality, plasma analysis, antioxidant parameters and gene expression
Peng et al. 2018	-	DL-Met	0.27 (Met)	0.48; 0.58 (Met)	21	360	Ross 308	Performance, plasma analysis and gene expression
Wang et al. 2018	-	DL-HMTBA	N/A	N/A	21	400	Arbor Acres	Performance, antioxidant parameters and gene expression
Wang et al. 2019	-	DL-Met x DL-HMTBA	N/A	N/A	21	480	Arbor Acres	Performance, antioxidant parameters and gene expression
Zeitz et al. 2018	-	-	-	S: 0.79 G: 0.65 F: 0.59	35	240	Cobb 500	Performance, carcass composition and gene expression
Zhang et al. 2018	-	DL-Met x L-Met x DL-HMTBA	S: 0.78 G: 0.70 F: 0.62	S: 1.01; 1.01; 0.78 G: 0.91; 0.91; 0.69 F: 0.85; 0.85; 0.62	26	240	Cobb 500	Performance and gene expression

¹Exp: experiment; DL-Met: DL-Methionine; DL-HMTBA: DL-Methionine Hydroxy Analog; L-Met: L-Methionine; S: starter phase; G: grower phase; F: finisher phase.

Em relação a área geográfica de produção dos artigos (Figura 2), a maior parte dos estudos foram realizados na América (66,7%), tendo o Brasil como principal representante com 6 estudos, seguido pelos Estados Unidos com 4 estudos. A Ásia é o segundo representante (26,7%), tendo a China com 3 estudos e o Irã com 1 estudo. Por fim a Europa (6,6%), representada pela Alemanha, com 1 estudo.

**Figure 4.** Countries of origin of the reviewed studies.

A frequência temporal de produção dos artigos (Figura 3), possibilita observar que 2018 foi o ano com maior publicação de estudos que avaliaram o efeito da suplementação de metionina na expressão de genes diversos em frangos de corte, no total foram 4 (ou 26,7%) artigos. Em 2020 foram publicados 3 (ou 20%) artigos, em 2013, 2015 e 2017 foram publicados 2 (ou 13,3%), cada, e em 2019 e 2021 foram publicados 1 (ou 6,7%) artigos.

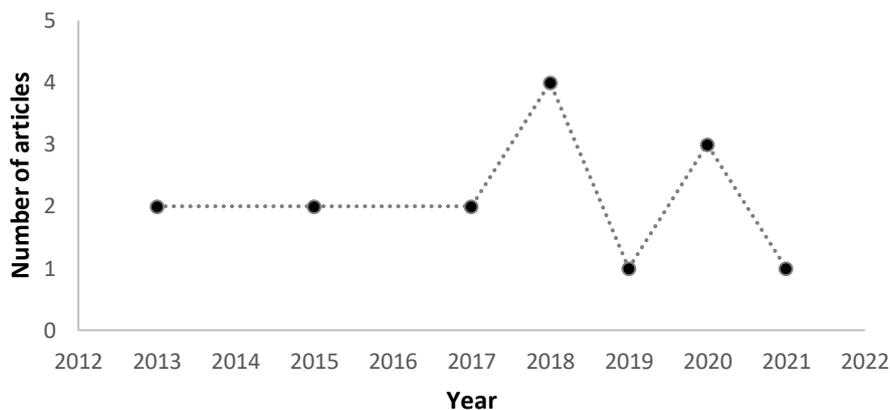


Figure 5. Time frequency of the reviewed studies.

As variáveis analisadas foram classificadas de acordo com ocorrência nos experimentos (Figura 4). As cinco variáveis com maior ocorrência foram: avaliações de desempenho e expressão gênica, presentes em 20 (ou 100%) experimentos; avaliação de parâmetros relacionados a atividade antioxidante presentes em 12 (ou 60%) experimentos, seguido da análise do plasma para quantificação de substâncias bioquímicas, estudados em 9 (ou 45%) experimentos, e por fim, composição de carcaça, presentes em 5 (ou 25%) experimentos.

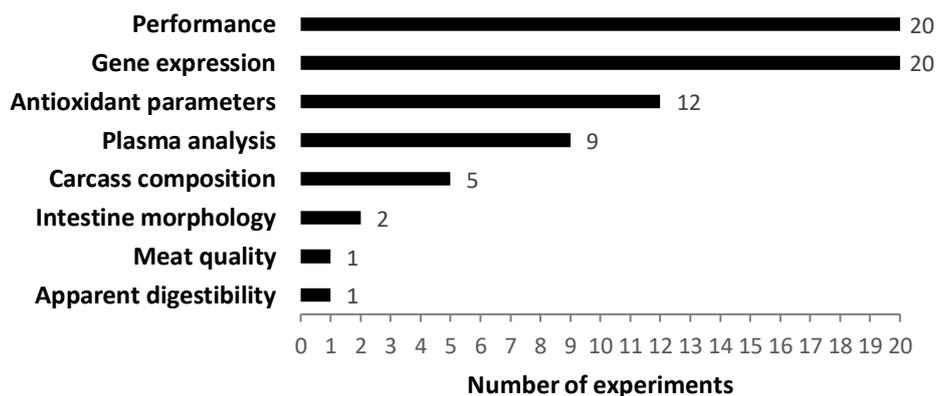


Figure 6. Variables analyzed in the 20 experiments reviewed.

Em relação a expressão gênica, os órgãos/tecidos estudados foram classificados de acordo com a ocorrência nos experimentos revisados (Figura 5). Os órgãos mais utilizados para as avaliações foram: fígado, sendo avaliado em 15 (ou 75%) experimentos; músculo do peito, avaliado em 11 (ou 55%) experimentos; e intestino delgado, avaliado em diferentes porções, sendo 5 (ou 25%) avaliações no íleo, e 4 (ou 20%) avaliações no duodeno e jejuno, cada.

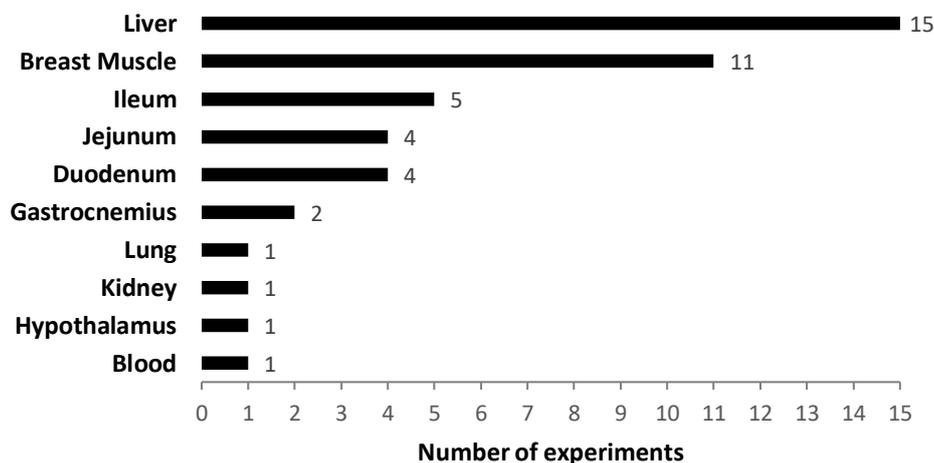


Figure 7. Organs or tissues studied in the 20 experiments reviewed.

Através dos dados revisados, foi possível realizar um contraste entre órgãos/tecidos e genes estudados, o que permitiu visualizar quais os genes foram mais estudados em cada órgão/tecido. Para o músculo do peito, os genes relacionados ao metabolismo de aminoácidos sulfurosos foram os mais estudados, com predominância dos genes CBS e BHMT (Figura 6). Em seguida, os genes relacionados a degradação de proteínas e a expressão de transportadores de aminoácidos.

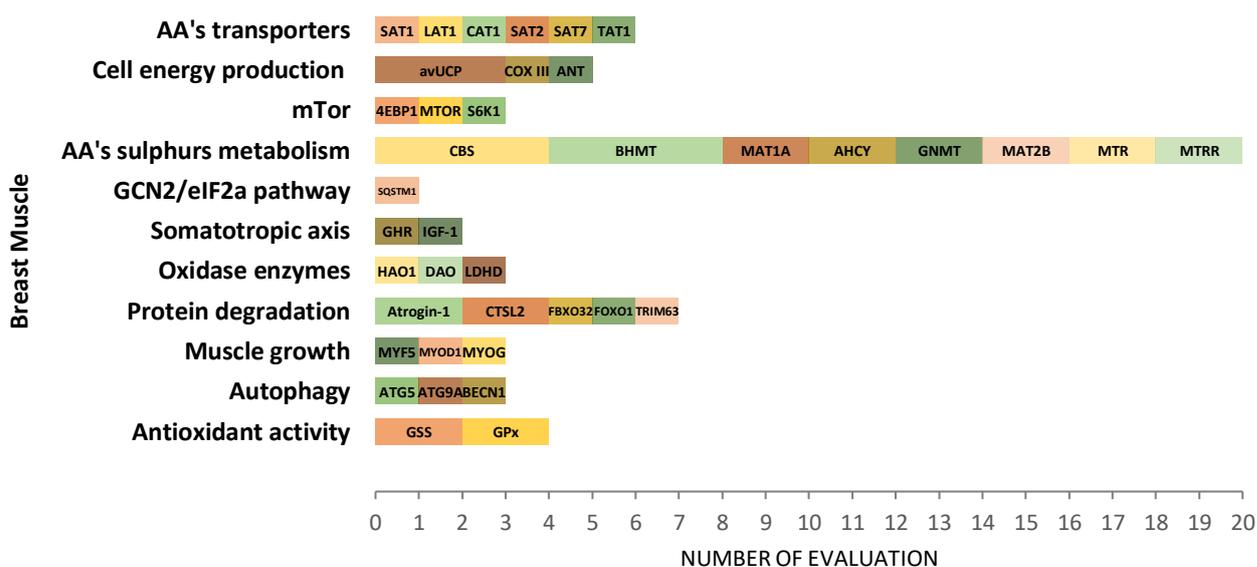


Figure 8. Distribution of the genes studied in the breast muscle, according to their main function or pathway.

Genes relacionados ao metabolismo de aminoácidos sulfurosos também foram os mais estudados no fígado (Figura 7), com predominância dos genes MAT1 e BHMT, a seguir genes relacionados a atividade antioxidante, com maior número de investigações para os genes MsrA e TRx. No fígado também houve grande número de avaliações de genes relacionados ao eixo somatotrófico, como os genes GRH e IGF-1.

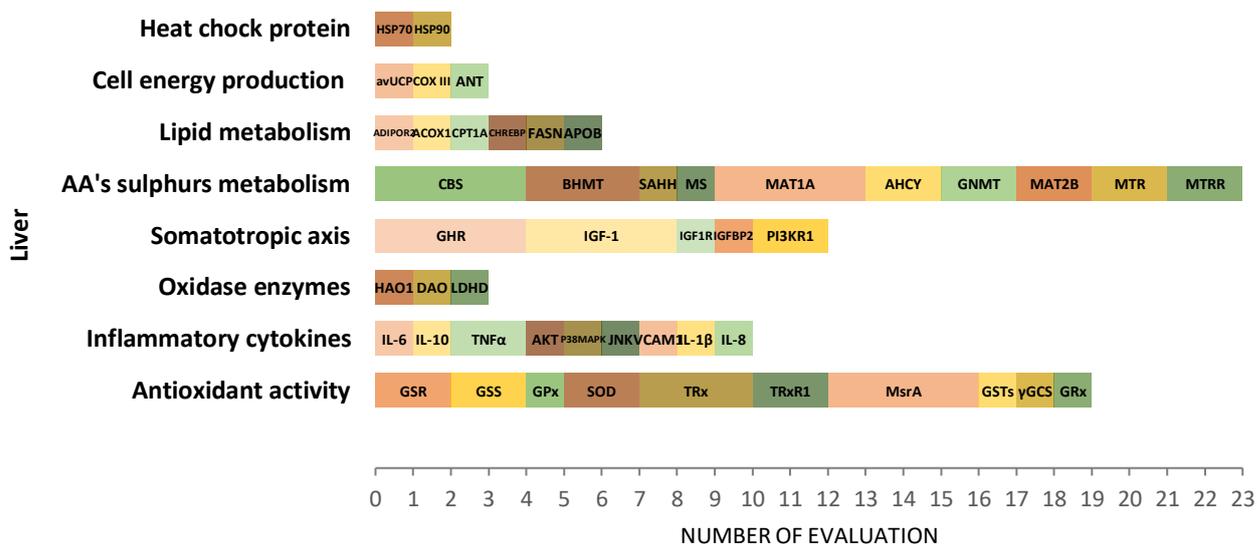


Figure 9. Distribution of the genes studied in the liver, according to their main function or pathway.

O intestino delgado é dividido em três porções, a primeira porção é o duodeno, havendo mais investigações sobre o metabolismo de sulfurosos para essa porção e em seguida avaliações acerca de transportadores de aminoácidos, para as demais porções, jejuno e íleo, os transportadores de aminoácidos foram os genes mais estudados, com destaque para o íleo (Figura 8). Os genes relacionados com atividades antioxidantes também tiveram expressividade nas investigações realizadas no intestino delgado, ocorrendo observações nas três porções.

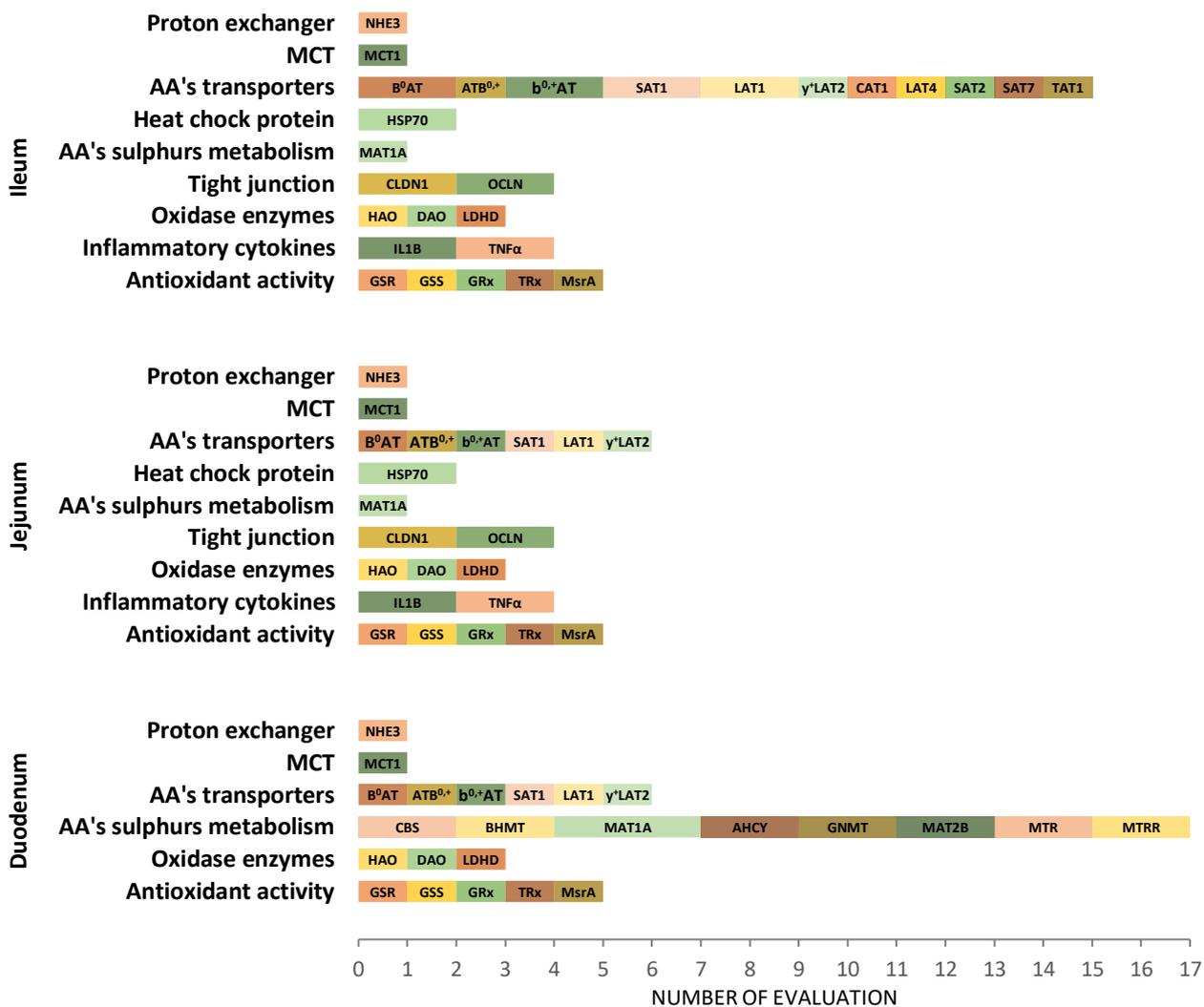


Figure 10. Distribution of the genes studied in the small intestine, according to their main function or pathway.

Os demais órgãos/tecidos tiveram menor quantidade de avaliações (Figura 9), o hipotálamo foi avaliado quanto aos transportadores de aminoácidos, o sangue para a expressão de proteína de choque térmico (HSP70), no músculo gastrocnemius foi investigado a expressão de genes relacionados ao metabolismo de aminoácidos sulfurosos, assim como o pulmão, neste último também foram investigados genes relacionados a atividade antioxidante.

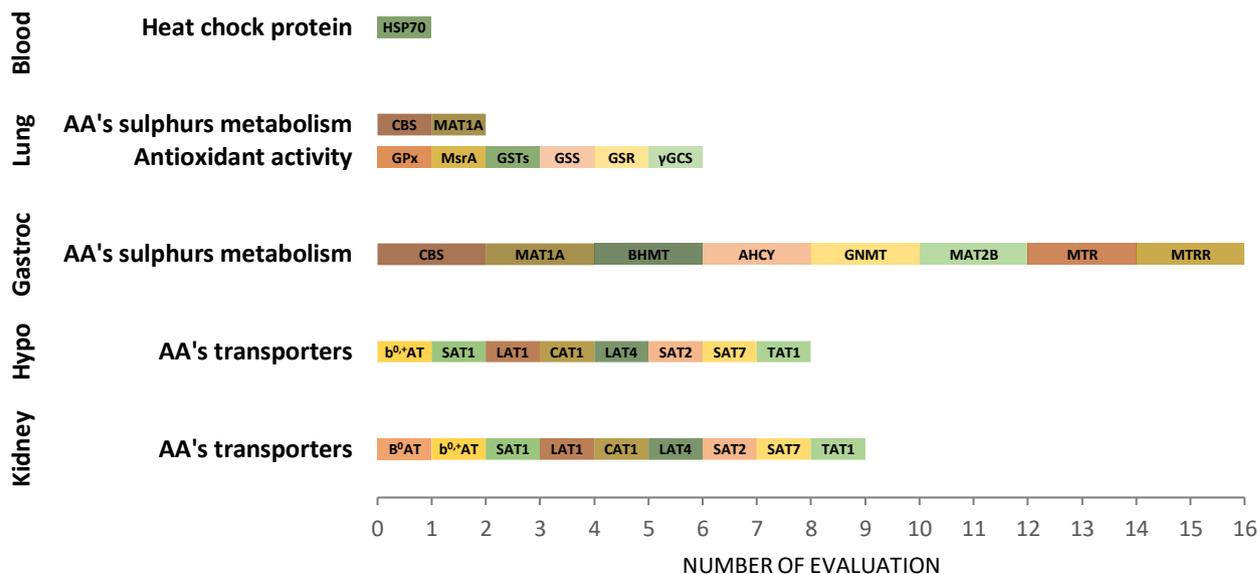


Figure 11. Distribution of the genes studied in the kidney, hypothalamus (Hypo), gastrocnemius (Gastroc), lung and blood, according to their main function or pathway.

A descrição de todos os genes avaliados nos 20 experimentos está disposta no apêndice A.

4. DISCUSSÃO

Novas ferramentas na pesquisa têm permitido que nutricionistas avalie a interação entre nutrientes dietéticos e genes, e assim desenvolver melhores estratégias nutricionais, para isso, técnicas de microarranjo de DNA e reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) são as mais usuais (Banerjee et al., 2015). O emprego dessas técnicas se tornou mais comum nos últimos anos, esses avanços estão atrelados a diminuição dos custos das análises e maior acessibilidade aos equipamentos e reagentes (Benítez et al., 2017).

Para essa revisão, os trabalhos encontrados foram produzidos depois dos anos 2010, possivelmente relacionado a maior aplicação das técnicas de nutrigenômica, permitindo mais estudos que avaliam a relação entre a metionina e a expressão de genes. Além disso, países localizados nas Américas apresentaram maior quantidade de estudos, seguidos pela Ásia.

Os maiores produtores mundiais de carne de frango são EUA, China e Brasil (USDA, 2022). Os altos níveis de produção estimulam pesquisas voltadas à cadeia da carne de frango, e as pesquisas permitem aumentar os índices zootécnicos, tornando-se um sistema de retroalimentação. Os aminoácidos sulfurosos (SAA) possuem como principal função a formação de tecido muscular, por isso, estudos com SAA são importantes dentro da avicultura.

Os SAA participam de diversas rotas metabólicas, o ciclo da metionina é a principal rota de metabolização de aminoácidos sulfurosos, a L-Met é convertida a S-adenosilmetiona (SAM), com ação das enzimas metionina adenosiltransferases (MATs). A SAM é o principal doador de metil para metilação de moléculas importantes (Anderson, Sant e Dolinoy, 2012).

A SAM converte-se em S-adenosil-homocisteína (SAH) com ação da enzima glicina N-metiltransferase (GNMT), por fim, a SAH é hidrolisada, formando a homocisteína, sendo esta reação catalisada pela enzima adenosil-homocisteína-hidroxilase (AHCY) (Aggrey et al., 2017). De acordo com D'Mello (2003), homocisteína pode ser remetilada a L-Met por duas vias: com a ação da metionina sintase (MS) e 5-metil-tetra-hidrofolato (MTR), que doa um grupo metil para a homocisteína através da vitamina B12, que então é convertida a metionina.

Já a reação catalisada pela betaína homocisteína metiltransferase (BHMT), o processo ocorre de maneira semelhante, entretanto, neste caso o grupo metil é doado pela betaína gerado pela colina. Dependendo da relação SAM/SAH, a homocisteína pode seguir para a via da transulfuração, na qual a homocisteína é convertida em cisteína através de duas reações, a primeira reação é catalisada pela enzima cistationina- β -sintetase (CBS) que converte a homocisteína em cistationa, e em seguida, a cistationa é convertida a cisteína, com ação da enzima cistationina γ -liase (CSE).

Essas reações foram as mais estudadas nos artigos revisados, com maior parte das investigações ocorrendo no fígado, músculo do peito e duodeno. O fígado e o intestino delgado desempenham papéis importantes no metabolismo de nutrientes, o intestino delgado é responsável pela digestão e absorção de nutrientes que são posteriormente metabolizados no fígado (Kim et al., 2022).

Os AAS também são importantes para produção de metabólitos antioxidantes, o que justifica terem sido a segunda classe de compostos mais estudados nos artigos revisados. Para a formação da glutathiona (GSH) a cisteína reage com o glutamato, com ação da enzima γ -glutamil-cisteína-sintetase. Devido a importância da cisteína para a formação da glutathiona, a deficiência de aminoácidos sulfurosos pode levar a déficit no sistema de defesa antioxidante do organismo (Zeitz et al., 2018).

Outras classes de enzimas redox foram investigadas no fígado e no intestino delgado, enzimas dos complexos da tiorredoxina e da glutarredoxina, também conhecidas como enzimas tioltransferase. São enzimas formadas a partir da cisteínas, elas contêm no estado reduzido dois tióis redox-ativos que formam uma ligação dissulfeto na oxidação na atividade redox (Arnhold, 2020).

Transportadores de aminoácidos foram amplamente investigados no intestino delgado, principalmente no íleo, os rins, hipotálamo e músculo do peito também foram considerados em estudos que avaliaram os transportadores de aminoácidos. A absorção de metionina em grande parte é dependente de transporte ativo e demanda energia, sendo absorvida contra o gradiente de concentração, podendo ser absorvida por transportadores da membrana borda escova e membrana basolateral (Zhang et al., 2015).

Nos artigos revisados, os sistemas de transporte mais estudados foram o sistema A (transportadores SAT1, SAT2 e SAT7), $B^{0,+}$ (transportadores $ATB^{0,+}$ e B^0AT), $b^{0,+}$ (transportador $b^{0,+}AT$), y^+L (transportador y^+LAT2) e L (transportadores LAT1 e LAT4). No geral, são transportadores que realizam o transporte de aminoácidos neutros, catiônicos e hidrofóbicos em aves.

A DL-HMTBA é absorvida em grande parte por difusão, mas também pode ser absorvida em menor quantidade por transportadores de monocarboxilato H^+ dependente, como o MCT1, dependente do trocador de próton NHE3 (Martín-Venegas et al., 2014). Wang et al. (2019) investigaram a expressão de MCT1 e NHE3 no intestino delgado, comparando duas fontes de metionina (DL-Met e DL-HMTBA).

A influência dos níveis de suplementação de metionina sobre a expressão de alguns genes, baixos níveis de metionina reduziram a expressão de genes relacionados ao eixo somatotrófico, produção de energia celular no fígado de frangos de corte (Del Vesco et al., 2013a,b) e metabolismo de lipídeos (Peng et al., 2018). Além disso, diferentes fontes de metionina (DL-Met e DL-HMTBA) alteraram a expressão de genes relacionados a via da mTOR, crescimento muscular e autofagia (Zeitz et al., 2018).

As citocinas inflamatórias foram investigadas em aves em situações de estresse por calor, sendo suplementadas com metionina, demonstrando que a suplementação de metionina pode contribuir para a produção desses compostos na tentativa de restabelecer a ação do sistema imunológico, e tentar minimizar os efeitos deletérios do estresse térmico (Del Vesco et al., 2020).

5. CONCLUSÃO

Estudos avaliando a influência da metionina na expressão gênica em frangos são recentes, dos últimos 10 anos, a maioria se concentrou em análises no fígado, músculo do peito e intestino delgado, com investigações de genes relacionados ao ciclo da metionina, atividade antioxidante e transportadores de aminoácidos. A partir desta revisão é possível obter um panorama dos

estudos que avaliaram expressão gênica em frangos de corte, explorando quais variáveis foram avaliadas, quais os órgãos foram mais estudados e quais foram os genes alvo, subsidiando novas pesquisas científicas, visando avaliações que ainda não foram exploradas.

REFERÊNCIAS

- AGGREY, S.E; GONZÁLEZ-CÉRON, 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 Animal Physiology and Animal Nutrition**, p. 1-8, 2017. <https://doi.org/10.1111/jpn.12779>
- ANDERSON, O.S.; SANT, K.E.; DOLINOY, D.C. Nutrition and epigenetics: an interplay of dietary methyl donors, one-carbon metabolism and DNA methylation. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, p. 853–859, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.03.003>
- ARNOLD, J. Oxidation and reduction of biological material. In: **Amino acids in animal nutrition**. 1 ed. Academic Press, 2020. 55-97p. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816388-7.00003-6>
- BANERJEE, G.; PAL, R.; RAY, A.K. Applications of Nutrigenomics in Animal Sectors: A Review. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 10, n. 9, p. 489-499, 2015. <https://dx.doi.org/10.3923/ajava.2015.489.499>
- BENÍTEZ, R.; NÚÑES, Y.; ÓVILO, C. Nutrigenomics in farm animals. **Journal of Investigative Genomics**, v. 4, n. 1: 00059, 2017. <https://doi.org/10.15406/jig.2017.04.00059>
- CHENG, S.C.; QUINTIN, J.; CRAMER, R.A.; SHEPARDSON, K.M.; SAEED, S.; KUMAR, V.; GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E.J.; MARTENS, J.H.A.; RAO, N.A.; AGHAJANIREFAH, A.; MANJERI, G.R.; LI, Y.; IFRIM, D.C.; ARTS, R.J.W.; VAN DER MEER, B.M.J.W.; DEEN, P.M.T.; LOGIE, C.; O'NEILL, L.A.; WILLEMS, P.; VAN DER VEERDONK, F.L.; VAN DER MEER, J.W.M.; NG, A.; JOOSTEN, L.A.B.; WIJMENGA, C.; STUNNENBERG, H.G.; XAVIER, R.J.; NETEA, M.G. mTOR- and HIF-1 α -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. **Science**, v. 345, p. 1579-1588, 2014. <https://doi.org/10.1126/science.1250684>
- D'MELLO, J.P.F. **Amino acids in animal nutrition**. 2 ed. London: CABI Publishing, 2003. 513p.
- DEL VESCO, A.P.; GASPARINO, E.; GRIESER, D.O.; ZANCANELA, SOARES, M.A.M.; OLIVEIRA NETO, A.R. Effects of methionine supplementation on the expression of oxidative stress-related genes in acute heat stress-exposed broilers. **British Journal of Nutrition**, v. 113, 549–559, 2015a. <https://doi.org/10.1017/s0007114514003535>
- DEL VESCO, A.P.; GASPARINO, E.; GRIESER, D.O.; ZANCANELA, V.; VOLTOLINI, D. M.; KHATLAB, A.S.; GUIMARÃES, S.E.F.; SOARES, M.A.M.; OLIVEIRA NETO, A.R. Effects of methionine supplementation on the expression of protein deposition-related genes in acute heat stress-exposed broilers. **Plos one**, v. 10, n. 2, p. 1-11, 2015b. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115821>
- DEL VESCO, A.P.; GASPARINO, E.; OLIVEIRA NETO, A.R.; GUIMARÃES, S.E.F.; MARCATO, S.M.M.; VOLTOLINI, D.M. Dietary methionine effects on IGF-I and GHR mRNA expression in broilers. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 4, p. 6414-6423, 2013b. <http://dx.doi.org/10.4238/2013>
- DEL VESCO, A.P.; GASPARINO, E.; OLIVEIRA NETO, A.R.; ROSSI, R.M.; SOARES, M.A.M.; SILVA, S.C.C. Effect of methionine supplementation on mitochondrial genes expression in the breast muscle and liver of broilers. **Livestock Science**, v. 151, p. 284–291, 2013a. <http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2012.11.005>
- DEL VESCO, A.P.; KHATLAB, A.S.; SANTANA, T.P.; POZZA, P.C.; SOARES, M.A.M.; BRITO, C.O.; BARBOSA, L.T.; GASPARINO, E. Heat stress effect on the intestinal epithelial function of broilers fed methionine supplementation. **Livestock Science**, v. 240:104152, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2020.104152>

ERFANI, M.; EILA, N.; ZAREI, A.; NOSHARY, A. The effects of vitamin C and methionine hydroxy analog supplementation on performance, blood parameters, liver enzymes, thyroid hormones, antioxidant activity of blood plasma, intestine morphology, and HSP70 gene expression of broilers under heat stress. **Tropical Animal Health and Production**, v. 53:296, 2021.

<https://doi.org/10.1007/s11250-021-02738-8>

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**, v. 99, p. 67-75, 2020. <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pez588>

GASPARINO, E.; DEL VESCO, A.P.; KHATLAB, A.S.; ZANCANELA, V.; GRIESER, D.O.; SILVA, S.C.C. Effects of methionine hydroxy analogue supplementation on the expression of antioxidant-related genes of acute heat stress-exposed broilers. **Animal**, v. 12, n. 5, p. 931-939, 2017. <https://doi.org/10.1017/s1751731117002439>

GILANI, S.M.H.; RASHID, Z.; GALANI, S.; ILYAS, S.; SAHAR, S.; HASSAN, Z.; AL-GHANIM, K.; ZEHRA, S.; AZHAR, A.; AL-MISNED, F.; AHMED, Z.; AL-MULHAM, N.; MAHBOOB, S. Growth performance, intestinal histomorphology, gut microflora and ghrelin gene expression analysis of broiler by supplementing natural growth promoters: A nutrigenomics approach. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, p. 3438–3447, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.03.008>

KIM, D.Y.; LIM, B.; KIM, J.M.; KIL, D.Y. Integrated transcriptome analysis for the hepatic and jejunal mucosa tissues of broiler chickens raised under heat stress conditions. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 13, n. 79, 2022. <https://doi.org/10.1186/s40104-022-00734-y>

MAGNUSON, A.D.; LIU, G.; SUN, T.; TOLBA, S.A.; XI, L.; WHELAN, R.; LEI, X.G. Supplemental methionine and stocking density affect antioxidant status, fatty acid profiles, and growth performance of broiler chickens. **Journal of Animal Science**, V. 98, n. 4, 2020. <https://doi.org/10.1093/jas/skaa092>

MARTÍN-VENEGAS, R.; BRUFAU, M.T.; MAÑAS-CANO, O.; MERCIER, Y.; NONIS, M.K.; FERRER, R. Monocarboxylate transporter 1 is up-regulated in Caco-2 cells by the methionine precursor DL-2-hydroxy-(4-methylthio)butanoic acid. **The Veterinary Journal** 202, p. 555–560, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.09.019>

MOHER, D. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the prisma statement. **Annals of Internal Medicine**, v. 151, n. 4, p. 264, 18 ago. 2009.

PENG, J.L.; BAI, S.P.; WANG, J.P.; DING, X.M.; ZENG, Q.F.; ZHANG, K.Y. Methionine deficiency decreases hepatic lipid exportation and induces liver lipid accumulation in broilers. **Poultry Science**, v. 0, p. 1-9, 2018. <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pey317>

SKIBA-CASSY, S.; GEURDEN, I.; PANSERAT, S.; SEILIEZ, I. Dietary methionine imbalance alters the transcriptional regulation of genes involved in glucose, lipid and amino acid metabolism in the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 454, p. 56–65, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.12.015>

USDA, 2022. **Livestock and Poultry: World Markets and Trade**. United States Department of Agriculture. 18p.

WANG, J.; YANG, G.; ZHANG, K.; DING, X.; BAI, S.; ZENG, Q. Effects of dietary supplementation of DL-2-hydroxy-4(methylthio) butanoic acid on antioxidant capacity and its related gene expression in lung and liver of broilers exposed to low temperature. **Poultry Science**, v. 0, p. 1-9, 2018. <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pey371>

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**, v. 5, p. 241-247, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2019.06.007>

ZEITZ, J.O.; MOHRMANN, S.; FEHSE, L.; MOST, E.; HELMBRECHT, A.; SAREMI, B.; EDER, K. Tissue and plasma antioxidant status in response to dietary methionine concentration and source in broilers. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, p. 1–13, 2018. <https://doi.org/10.1111/jpn.12909>

ZHANG, S.; GILBERT, E.R.; NOONAN, K.J.T.; SAREMI, B.; WONG, E.A. Gene expression and activity of methionine converting enzymes in broiler chickens fed methionine isomers or precursors. **Poultry Science**, v. 97, n. 2053–2063, 2018. <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pey037>

ZHANG, S.; WONG, E.A.; GILBERT, E.R. Bioavailability of different dietary supplemental methionine sources in animals. **Frontiers in Bioscience**, v. 7, p. 478-490, 2015.

APÊNDICE A

Lista dos genes apresentados na revisão.

Code name	Gene name	Main function/pathway
4EBP1	Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1	mTOR
ACOX1	Acyl-coenzyme A oxidase 1	Lipid metabolism
ADIPOR2	Adiponectin receptor 2	Lipid metabolism
AHCY	S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase	AA's sulphurs metabolism
AKT	Protein kinase b	Inflammatory cytokines
ANT	Adenine nucleotide translocase	Cell energy production
APOB	Polipoprotein B	Lipid metabolism
ATB ^{0,+}	-	AA's transporters
ATG5	Autophagy-related 5	Autophagy
ATG9A	Autophagy-related 9A	Autophagy
Atrogin-1	-	Protein degradation
avUCP	Avian uncoupling protein	Cell energy production
b ^{0,+} AT	-	AA's transporters
B ⁰ AT	-	AA's transporters
BECN1	Beclin 1 (ATG6)	Autophagy
BHMT	Betaine-homocysteine S-methyltransferase	AA's sulphurs metabolism
CAT1	-	AA's transporters
CBS	Cystathionine beta synthase	AA's sulphurs metabolism
CHREBP	Carbohydrate response element-binding protein	Lipid metabolism
CLDN1	Claudin1	Tight junction
COX III	Cytochrome c oxidase subunit III	Cell energy production
CPT1A	Carnitine palmitoyltransferase	Lipid metabolism
CTSL2	Cathepsin	Protein degradation
DAO	D-amino acid oxidase	Oxidase enzymes
FASN	Fatty acid synthase	Lipid metabolism
FBXO32	F-box only protein 32 (atrogin-1)	Protein degradation
FOXO1	Forkhead box protein O1	Protein degradation
GHR	Growth hormone receptor	Somatotropic axis
GNMT	Glycine N-methyltransferase	AA's sulphurs metabolism
GPx	Glutathione peroxidase	Antioxidant activity
GRx	Glutaredoxin	Antioxidant activity
GSR	Glutathione reductase	Antioxidant activity
GSS	Glutathione synthetase	Antioxidant activity
GSS	Glutathione synthetase	Antioxidant activity
GSTs	Glutathione-S transferase	Antioxidant activity
HAO1	L-2-hydroxy acid oxidase	Oxidase enzymes
HSP70	Heat shock protein 70 kDA	HSP
HSP90	Heat shock protein 90 kDA	HSP
IGF-1	Insulin like growth factor 1	Somatotropic axis
IGF1R	Insulin-like growth factor 1 receptor	Somatotropic axis
IGFBP2	Insulin-like growth factor-binding protein 2	Somatotropic axis
IL-10	Interleukin 10	Inflammatory cytokines
IL-1 β	Interleukin-1 β	Inflammatory cytokines
IL-6	Interleukin 6	Inflammatory cytokines
IL8	Interleukin-8	Inflammatory cytokines
JNK	c-Jun N-terminal kinase	Inflammatory cytokines
LAT1	-	AA's transporters
LAT4	-	AA's transporters
LDHD	D-2-hydroxy acid dehydrogenase	Oxidase enzymes
MAT1A	Methionine adenosyltransferase 1, alpha	AA's sulphurs metabolism
MAT2B	Methionine adenosyltransferase 1, beta	AA's sulphurs metabolism
MCT1	Monocarboxylate transporter 1	MCT
MS	Methionine synthase	AA's sulphurs metabolism
MsrA	Methionine sulfoxide reductase A	Antioxidant activity

Continuação.

Code name	Gene name	Main function/pathway
MTOR	Mechanistic target of rapamycin; MYF5: myogenic factor 5	mTOR
MTR	5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase	AA's sulphurs metabolism
MTTR	5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase reductase	AA's sulphurs metabolism
MYF5	Myogenic factor 5	Muscle growth
MYOD1	Myogenic differentiation 1	Muscle growth
MYOG	Myogenin	Muscle growth
NHE3	Sodium-hydrogen exchanger 3	Proton exchanger
OCLN	Occludin	Tight junction
P38MAPK	P38 mitogen-activated protein kinase	Inflammatory cytokines
PI3KR1	Phosphatidylinositol 3-kinase, regulatory 1	Somatotropic axis
S6K1	Ribosomal p70 S6 Kinase	mTOR
SAHH	S-adenosylhomocysteine hydrolase	AA's sulphurs metabolism
SAT1	-	AA's transporters
SAT2	-	AA's transporters
SAT7	-	AA's transporters
SOD	Superoxide dismutase	Antioxidant activity
SQSTM1	Sequestosome 1 (p62)	GCN2/eIF2a pathway
TAT1	-	AA's transporters
TNF α	Tumor necrosis factor-alpha	Inflammatory cytokines
TRIM63	Tripartite motif containing 63 (MURF1, muscle RING-finger protein-1)	Protein degradation
TRx	Thioredoxin	Antioxidant activity
TRxR1	Thioredoxin reductase	Antioxidant activity
VCAM1	Vascular cell adhesion molecule-1	Inflammatory cytokines
γ^+ LAT2	-	AA's transporters
γ -GCS	γ -glutamylcysteine synthetase	Antioxidant activity

CAPÍTULO 3

Artigo 1

Methionine sources at different dietary levels alters the growth and expression of genes related to homocysteine remethylation in the jejunum of broilers

Formatado de acordo com as normas da revista científica “Plos One”

1 **Resumo**

2 Os aminoácidos sulfurosos são essenciais para o bom desenvolvimento de frangos de
3 corte e são requeridos durante toda a vida da ave, desempenhando funções fisiológicas
4 importantes, sendo fundamentais estudos que busquem compreender as ações dos
5 aminoácidos sulfurados no organismo das aves. O presente estudo avaliou a influência da
6 suplementação de aminoácidos sulfurosos utilizando DL-Metionina (DL-Met) e DL-
7 Metionina hidróxi análoga (DL-HMTBA), no desempenho e na expressão de genes
8 relacionados ao metabolismo de metionina, no jejuno de frangos de corte. Foram
9 utilizados 450 frangos de corte machos (Cobb-700 *slow feathering*), distribuídos em
10 delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial (2x3), sendo duas fontes de
11 metionina (DL-Met e DL-HMTBA) e três níveis de metionina (deficiência, exigência e
12 excesso). Foram avaliadas a expressão de RNAm dos genes MAT1, MTR, BHMT,
13 MTRR, CBG e GSS, e dados de desempenho como o consumo de ração, ganho de peso,
14 conversão alimentar. A DL-HMTBA aumentou a expressão de BHMT ($p=0,0072$) e
15 MTRR ($p=0,0003$) no jejuno das aves. A deficiência de metionina aumentou a expressão
16 de BHMT ($p=0,0805$) e MTRR ($p=0,0018$). Maior expressão de GSS foram observadas
17 em aves que foram suplementadas com DL-HMTBA ($p=0,0672$). As aves alimentadas
18 com DL-HMTBA apresentaram pior ganho de peso ($p=0,0117$) e maior conversão
19 alimentar ($p=0,0170$); a deficiência de metionina acarretou em maior consumo de ração
20 ($p=0,0214$), menor ganho de peso ($p<0,0001$) e conseqüentemente maior conversão
21 alimentar ($p<0,0001$). A partir das informações encontradas com esse trabalho,
22 recomenda-se realizar a suplementação de aminoácidos sulfurosos com DL-Met no nível
23 de atendimento da exigência.

24 **Palavras-chave:** DL-Methionine; DL-HMTBA; Methionine metabolism; Nutritional
25 levels.

1. Introdução

26 Os aminoácidos sulfurosos são essenciais para o crescimento e
27 desenvolvimento de frangos de corte durante toda a vida da ave e por isso são amplamente
28 estudados. A metionina desempenha funções fisiológicas importantes no organismo das
29 aves, sendo doadora de grupo metil para reações de metilação de moléculas importantes,
30 como, por exemplo, o DNA [1]. Também é utilizada para produção de glutathione
31 peroxidase (GSH-Px), enzima chave na ação antioxidante enzimática contra radicais
32 livres [2].

34 A suplementação com metionina em frangos de corte aumenta a expressão de
35 genes relacionados a síntese de cisteína, GSH e GSH-Px, mitigando os efeitos de estresse
36 oxidativo [3]. Além disso, a metionina também está relacionada com a síntese de
37 poliaminas (espermidina e espermina), que estão associadas a divisão, crescimento e
38 proliferação celular [4].

39 Para desempenhar as funções bioativas no organismo, a metionina possui um
40 complexo metabolismo, passando por diversas reações bioquímicas que podem ser
41 divididas em três etapas: metilação, remetilação e transulfuração. Na metilação ocorre a
42 conversão da metionina em S-adenosilmetionina (SAM), esta reação é catalisada pelas
43 enzimas metionina adenosiltransferases (MAT), e em seguida a SAM é convertida a S-
44 adenosil-homocisteína (SAH) [5].

45 A SAH pode seguir por duas vias, pode ser convertida a homocisteína através da
46 via da transulfuração, com ação da enzima cistationa- β -sintetase (CBS), sendo esta reação
47 irreversível [6]. Ou ocorre a remetilação, no qual a homocisteína é regenerada para
48 metionina, com ação da enzima metionina sintase (MS) e um doador de um grupo metil,
49 que pode vir por duas vias [7].

50 A via da colina/betaína, que necessita da ação da enzima betaína homocisteína
51 metiltransferase (BHMT), ou pela via do tetra hidrofolato, que necessita da ação das

52 enzimas 5-metiltetrahidrofolato-homocisteína metiltransferase (MTR) e 5-
53 metiltetrahidrofolato-homocisteína metiltransferase redutase (MTRR) [5].

54 Fontes vegetais são pobres em metionina, e para o atendimento das exigências de
55 aminoácidos sulfurosos faz-se necessário realizar a suplementação via dieta. A DL-
56 Metionina (DL-Met; 98% de metionina), na forma de pó, e seu análogo, a DL-Metionina
57 Hidróxi Análoga (DL-HMTBA; 88% de metionina), na forma líquida, são as fontes mais
58 usuais utilizadas para a suplementação [2].

59 Essas fontes de metionina são absorvidas e utilizadas de formas diferentes pelas
60 aves, que são capazes de utilizar apenas a forma L dos aminoácidos, por isso, a D-Met e
61 ambos os isômeros da DL-HMTBA, precisam ser convertidos a L-Met, com ação de
62 enzimas desaminases e transaminases [2]. Essas enzimas se encontram em maior
63 quantidade no fígado e nos rins e em menor quantidade no intestino delgado, para
64 atendimento do metabolismo esplâncnico [8]. A L-Met é transportada no jejuno de
65 frangos por quatro sistemas de transporte, que fazem o transporte do lúmen intestinal
66 para o interior do enterócito [9].

67 Devido a importância dos aminoácidos sulfurosos para o bom funcionamento do
68 organismo das aves, é importante a condução de estudos que avaliem o metabolismo
69 desses aminoácidos. Com isso, objetivou-se com esse estudo, investigar os efeitos da
70 suplementação de aminoácidos sulfurosos em frangos de corte, com o uso de duas fontes
71 de metionina e em diferentes níveis nutricionais, no desempenho e na expressão de genes
72 relacionados ao metabolismo de metionina, no jejuno de frangos de corte.

73 **2. Material e métodos**

74 **2.1 Manejo e alojamento**

75 Os protocolos experimentais foram executados de acordo com os preceitos e as
76 normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal

77 (CONCEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da
78 Universidade Federal da Paraíba (CEUA-UFPB) com protocolo de nº 075/2017.

79 O período experimental foi de 42 dias, sendo utilizados 450 frangos de corte
80 machos, da Linhagem Cobb-700 (*slow feathering*), com 1 dia de idade. As aves foram
81 adquiridas em incubatório comercial, vacinadas contra as doenças de Marek e Gumboro.
82 Até o 7º dia de idade, os pintainhos foram mantidos em círculos de proteção e ao oito dia
83 de idade foram pesados e distribuídos em grupos de 15 animais (0,185 + 0,001 kg de
84 peso) por unidade experimental em boxes com área de 1,5 m², equipados com
85 comedouros tubulares e bebedouros pendulares, com oferta de água e ração à vontade.

86 Foi utilizada maravalha para cobertura do piso dos boxes e o aquecimento das
87 aves foi realizado com lâmpadas infravermelhas, mantendo os valores de temperatura e
88 umidade relativa do ar na faixa de termoneutralidade de acordo com a idade das aves. O
89 programa de luz seguido foi de 18 horas de luz (natural+artificial) e 6 h de escuridão.

90 2.2 Animais, delineamento e dietas experimentais

91 O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em
92 esquema fatorial 2x3, com duas fontes (DL-Met e DL-HMTBA) e três níveis de
93 Met+CysD, sendo um nível deficiente, com redução de 0,25 da exigência, outro nível
94 considerado na exigência, e o último nível com excesso de 0,25 da exigência, totalizando
95 seis tratamentos, cada um com cinco repetições de 15 aves. O experimento ocorreu nas
96 fases inicial (8 a 21 dias), crescimento (21 a 33 dias) e terminação (34 a 42 dias). Três
97 dietas referências foram formuladas para cada fase do estudo de acordo com as
98 recomendações de [10], atendendo-se as exigências das aves, exceto os níveis de
99 Met+CysD que ficaram abaixo do recomendado (Tabela 1).

101 **Table 3.** Feed composition and nutrient contents of diets formulated for broilers.

Ingredients, %	DL-Methionine			DL-HMTBA		
	Initial (8-21d)	Growth (22-33d)	Final (34-42d)	Initial (8-21d)	Growth (22-33d)	Final (34-42d)
Corn (7.88%)	56.716	62.175	62.506	56.716	62.175	62.506
Soybean meal (45%)	35.775	30.132	28.685	35.775	30.132	28.685
Soy oil	3.291	3.692	4.500	3.291	3.692	4.500
Dicalcium phosphate (18.1%)	1.558	1.353	1.151	1.558	1.353	1.151
Limestone	0.945	0.889	0.759	0.945	0.889	0.759
DL-Methionine (98%)	0.062	0.060	0.014	-	-	-
DL-HMTBA (88%)	-	-	-	0.070	0.068	0.016
L-Lysine HCl (78.4%)	0.245	0.308	0.315	0.245	0.308	0.315
L-Threonine (99%)	0.084	0.103	0.144	0.084	0.103	0.144
L-Arginine (99%)	0.000	0.058	0.191	0.000	0.058	0.191
L-Valine (99%)	0.000	0.086	0.084	0.000	0.086	0.084
L-Tryptophan (99%)	0.000	0.000	0.024	0.000	0.000	0.024
Starch	0.400	0.400	0.400	0.400	0.400	0.400
Salt	0.491	0.338	0.743	0.491	0.338	0.743
Choline chloride (60%)	0.100	0.070	0.100	0.100	0.070	0.100
Vitamin premix ¹	0.050	0.050	0.100	0.050	0.050	0.100
Mineral premix ²	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050
Cocciostat ³	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
Bacitracin zinc	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015
Antioxidant ⁴	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010
Inert ⁵	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Calculated energy and nutrients content, %						
ME (kcal/kg)	3050.00	3150.00	3200.00	3050.00	3150.00	3200.00
Crude protein	20.98	19.00	18.40	20.98	19.00	18.40
Calcium	0.841	0.758	0.663	0.841	0.758	0.663
Available phosphor	0.401	0.354	0.309	0.401	0.354	0.309
Methionine	0.343	0.318	0.266	0.343	0.318	0.266
Methionine+Cystine	0.630	0.580	0.520	0.630	0.580	0.520
Threonine	0.791	0.735	0.750	0.791	0.735	0.750
Tryptofan	0.236	0.206	0.220	0.236	0.206	0.220
Lysine	1.217	1.131	1.100	1.217	1.131	1.100
Valine	0.891	0.880	0.850	0.891	0.880	0.850
Arginine	1.327	1.221	1.300	1.327	1.221	1.300
Sodium	0.210	0.150	0.310	0.210	0.150	0.310
Chlorine	0.345	0.254	0.495	0.345	0.254	0.495
Potassium	0.819	0.732	0.706	0.819	0.732	0.706

102 Mogin number (mEq/kg): Initial: 203.59; Growth: 180.63; Final: 176.07.

103 ¹Vitamin premix: Vit A 1.000.000 UI; Vit D3 1.700.000 UI; Vit E 20.000 mg; Vit K3 2.000 mg; Vit B1

104 2.000 mg; Vit B2 4.000 mg; Vit B6 2.000 mg; Vit B12 10.000 mcg; Niacin 20.000 mg; Pantothenate acid

105 10.000 mg; Biotin 25 mg; Folic acid 500 mg; ²Mineral premix: Selenium 250 mg; Manganese 75.000 mg;

106 Zinc 70.000 mg; Iron 50.000 mg; Copper 8.500 mg; Iodine 1.500 mg; Cobalt 200 mg. ³Salinomycin sodium

107 salt 12g. ⁴Butylated hydroxytoluene (BHT) 200 ppm. ⁵Kaolin.

108 As dietas referências em cada fase, foram suplementadas para atender à exigência

109 ou o excesso de Met+CysD com DL-Met (98%) ou DL-HMTBA (88%), essa última fonte

110 foi adicionada na base equimolar da DL-Met, ambas em substituição ao inerte, as dietas

111 foram isonitrogênicas e isoenergéticas. Os níveis de substituição equimolar da DL-Met
 112 pela DL-MHA-FA foram 0 e 100%, os níveis dietéticos experimentais estão apresentados
 113 na tabela 2.

114 **Table 4.** Experimental methionine levels.

Phase	Levels	DL-Methionine (98%)		DL-HMTBA (88%)	
		%Met diet	%Addition level	%Met diet	%Addition level
Initial (8-21d)	Less 0.25	0.63	0.062	0.63	0.070
	Requirement	0.88	0.317	0.88	0.360
	Plus 0.25	1.13	0.572	1.13	0.645
Growth (22-33d)	Less 0.25	0.58	0.060	0.58	0.068
	Requirement	0.83	0.315	0.83	0.354
	Plus 0.25	1.08	0.570	1.08	0.641
Final (34-42d)	Less 0.25	0.52	0.014	0.52	0.016
	Requirement	0.77	0.269	0.77	0.303
	Plus 0.25	1.02	0.524	1.02	0.590

115 2.3 Isolamento do mRNA, preparação do cDNA e análise do 116 PCR em tempo real

117 Aos 43 dias de experimento foram coletadas as amostras de jejuno de 5 por
 118 tratamento, de forma aleatória, afim de se investigar genes do metabolismo de metionina.
 119 As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido, o RNAm total foi extraído com uso
 120 do reagente Trizol® (*Invitrogen, Carlsbad CA, USA*), purificado com RNeasy Mini Kit
 121 (*Qiagen, Valencia CA, n° 74.104*) e tratados com inibidor de RNase, de acordo com as
 122 recomendações dos fabricantes. O RNA foi suspenso em água tratada com dietil
 123 pirocarbonatado (*DEPC water, Sigma Aldrich®*), e a concentração e a pureza do RNA
 124 foram determinadas utilizando as relações de absorvância 260/280 e 260/230 em
 125 espectrofotômetro (*Colibri*) e armazenados a -80 °C.

126 Um total de 2µg de RNAm foram transcritos de forma reversa com o kit de High-
 127 Capacity cDNA RT (*Thermo Fischer, n°. 4368814*) seguindo o protocolo analítico padrão do
 128 kit, o qual recomenda as seguintes condições: 25°C por 10 minutos, 37° por 120 minutos, 85°
 129 por 5 minutos e 4°C, ao total de 4 horas. Tais condições foram executadas em termociclador

130 de reação em cadeia de polimerase (PCR) convencional. Em seguida, tomou-se 1µL de cDNA
131 como modelo padrão em uma mistura de 20µl para qPCR contendo 1µL de cada primer
132 (*forward* e *reverse* a partir de 10µM) e 2X Fast SYBR Green Master Mix (Agilent
133 Technologies®).

134 Os ciclos da reação de cadeia em polimerase em tempo real (RT-PCR) foram
135 realizados no termociclador Stragene mx3000p (Agilent Technologies®), sendo 95°C durante
136 20 segundos, seguida por 40 ciclos de 95°C por 3 segundos e 60°C por 30 segundos e 95°C a
137 15 segundos, 60°C a 1 minuto e por último, 95°C por 15 segundos. Além disso, ao final de
138 cada reação, a curva da temperatura de fusão de cada reação da RT-PCR foi determinada.

139 As análises de RT-PCR de cada uma das 5 amostras foram executadas em
140 triplicatas. A expressão gênica relativa foi calculada com base no método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [11], e
141 foram normalizados pela expressão do gene da *β-actina* em cada amostra, como gene de
142 referência. Os números de acessos no *GenBank*, os *primers forward* e *reverse* dos genes
143 usados no estudo estão disponíveis na Tabela 3.

144 **Table 5.** Primers used for quantitative real time PCR in *Gallus gallus domesticus*.

Gene symbol ¹	GenBank ID	Description/Function	Forward/Reverse primer
MAT1	NM_001199519.2	Catalyzes the transfer of adenosine from ATP to methionine, forming SAM.	TCATACCAGTGCCTGTCCAT CACACGATCCTTCAGGGTTT
MTR	XM_046914306.1	Catalyzes the final step in methionine biosynthesis from homocysteine.	TACACCGGCACATATCAGGA CCAGACCTGACAGCAGCATA
BHMT	XM_414685.7	Catalyzes the transfer of a methyl group from trimethylglycine to produce methionine.	GGTGCTTCCATTGTTGGAGT CAGGTGGGCTTTCAGCTTAG
MTRR	XM_004935129.5	Regenerates MTR to a functional state.	ATTGATGGTCTTTGGCTTGC AACATGTGGGTCTGCACTGA
CBS	XM_416752.7	Catalyzes the first step of the transsulfuration pathway, from homocysteine to cystathionine.	CTGGGATCTTGAAACCTGGA ACAGCGGTAACCCTTCACTG
GSS	XM_425692.8	Catalyzes the reaction of cysteine to glutathione.	TTGCTGGGCTGTACTCACTG CTCCTTCTCGCTGTGGTTTC
β -Actin	L_08165.1	-	ACCCCAAAGCCAACAGA CCAGAGTCCATCACAATACC

145 ¹MAT1: methionine adenosyltransferase 1; MTR: 5-methyltetrahydrofolate-homocysteine
 146 methyltransferase; BHMT: betaine-homocysteine S-methyltransferase; MTRR: 5-
 147 methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase reductase; CBS: cystathionine beta
 148 synthase; GSS: glutathione synthetase.

149 2.4 Desempenho

150 Foram mensurados o consumo de ração e o ganho de peso das aves em cada
 151 parcela experimental e as pesagens ocorreram no início e final do experimento (8 a 42
 152 dias). A conversão alimentar foi calculada utilizando-se a quantidade de ração consumida
 153 pelos frangos em cada parcela dividida pelo ganho de peso.

154 2.5 Análises estatísticas

155 As pressuposições de normalidade foram verificadas pelo teste de Shapiro-Wilk.
 156 Os dados de desempenho e expressão gênica foram submetidos à análise variância. De
 157 acordo com o modelo estatístico a abaixo:

158
$$Y_{ij}(k) = \mu + S_i + N_j + S_x N_{ij} + e_{ij}(k)$$

159 Onde, $Y_{ij}(k)$ = valor observado para variável estudada; μ = média geral; S_i = efeito
160 i -ésimo da fonte de metionina; N_j = efeito da j -ésimo dos níveis de metionina; $S_x N_{ij}$ =
161 efeito da interação entre as fontes de metionina e os níveis de metionina e e_{ij} = erro
162 experimental.

163 Após o teste ANOVA, os dados de expressão gênica foram submetidos ao teste t ,
164 as diferenças foram significativas quando $p \leq 0,10$, os dados de desempenho foram
165 submetidos ao teste de Tukey, as diferenças foram significativas quando $p \leq 0,05$. As
166 análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o PROC GLM do SAS (Version 9.1,
167 SAS Inst. Inc., Cary, NC).

168 **3. Resultados**

169 Os dados de expressão gênica estão apresentados na Tabela 4. Analisando os
170 efeitos das fontes utilizadas nesse estudo, na expressão de genes do metabolismo de
171 metionina no jejuno de frangos de corte, a DL-HMTBA aumentou a expressão dos genes
172 BHMT ($p=0,0072$), MTRR ($p=0,0003$), e GSS ($p=0,0672$) (Fig 1).

173 **Table 6.** Effect of increasing levels of methionine+cystine and replacement of DL-Met
174 by DL-HMTBA in the diet on gene expression of genes of methionine metabolism of

175 broilers from 8 to 42 days of age.

Main effects ¹	MAT1	MTR	BHMT	MTRR	CBS	GSS
Source						
DL-Met	0.743±0.082	0.985±0.068	0.708±0.094 ^b	0.733±0.040 ^b	0.977±0.116	0.892±0.048 ^b
DL-HMTBA	0.706±0.080	0.930±0.138	1.087±0.114 ^a	1.313±0.186 ^a	1.118±0.091	1.091±0.097 ^a
<i>P value</i>	0.7643	0.6995	0.0072	0.0003	0.3179	0.0672
Level						
Less 0.25	0.713±0.110	0.824±0.100	1.083±0.158 ^a	1.403±0.270 ^a	0.918±0.133	1.057±0.093
Requirement	0.775±0.112	0.875±0.056	0.705±0.093 ^b	0.937±0.094 ^b	1.042±0.080	0.868±0.075
Plus 0.25	0.684±0.075	1.174±0.189	0.905±0.142 ^a	0.728±0.054 ^b	1.182±0.158	1.050±0.116
<i>P value</i>	0.8253	0.1058	0.0805	0.0018	0.3155	0.2617
Source x Level						
DL-Met						
Less 0.25	0.743±0.155	1.029±0.133 ^{ab}	0.791±0.170 ^{bc}	0.741±0.042 ^b	0.610±0.127 ^b	0.911±0.105
Requirement	0.790±0.158	0.965±0.046 ^{ab}	0.771±0.168 ^c	0.727±0.099 ^b	1.153±0.077 ^a	0.917±0.092
Plus 0.25	0.695±0.140	0.960±0.163 ^{ab}	0.561±0.163 ^c	0.730±0.069 ^b	1.167±0.277 ^a	0.849±0.063
DL-HMTBA						
Less 0.25	0.683±0.171	0.618±0.097 ^b	1.374±0.219 ^a	2.066±0.381 ^a	1.227±0.156 ^a	1.202±0.138
Requirement	0.760±0.174	0.785±0.092 ^b	0.639±0.090 ^c	1.146±0.109 ^b	0.930±0.131 ^{ab}	0.819±0.124
Plus 0.25	0.674±0.072	1.388±0.335 ^a	1.249±0.123 ^{ab}	0.726±0.090 ^b	1.197±0.182 ^a	1.251±0.198
<i>P value</i>	0.9908	0.0560	0.0332	0.0021	0.0549	0.1377

176 ^{a-c}Different letters in the same column indicate a statistical difference by test t with $p < 0.10$.

177 ¹Each value represents the average of 6 repetitions. Mean±SEM.

178 **Fig 1.** Graphic representation of the mRNA expression of glutathione synthetase (GSS)
 179 in the jejunum of broilers (mean±SEM; n=6). ^{a-b}Different letters indicate a statistical
 180 difference by test t with $p < 0.10$.

181 Observando os efeitos dos níveis dietéticos de metionina, a deficiência de
 182 metionina resultou na maior expressão do gene MTRR ($p=0,0018$), em comparação aos
 183 demais níveis. Também houve menor expressão do gene BHMT ($p=0,0805$), no nível em
 184 que a exigência de metionina foi atendida.

185 Houve efeito de interação entre as fontes e os níveis de metionina, para os genes
 186 BHMT ($p=0,0332$), MTRR ($p=0,0021$), MTR ($p=0,0560$) e CBS ($p=0,0549$). A maior
 187 expressão do gene MTR ocorreu na condição de suplementação com DL-HMTBA em
 188 excesso, e a menor expressão foi para a suplementação com DL-HMTBA nos níveis
 189 deficiente de metionina e no atendimento da exigência (Fig 2).

190 **Fig 2.** Graphic representation of the mRNA expression of (A.) betaine-homocysteine S-
 191 methyltransferase (BHMT), (B.) 5 methyltetrahydrofolate-homocysteine
 192 methyltransferase (MTR), (C.) 5-methyltetrahydrofolate-homocysteine
 193 methyltransferase reductase (MTRR) and (D.) cystathionine beta synthase (CBS) in the
 194 jejunum of broilers (mean \pm SEM; n=6). ^{a-c}Different letters indicate a statistical difference
 195 by test t with p<0.10.

196 Para o gene BHMT, houve maior expressão do gene no nível de deficiência e
 197 excesso de metionina com o uso da DL-HMTBA, e ocorreu menor expressão gênica com
 198 o uso da DL-Met em todos os níveis testados e também no atendimento da exigência com
 199 a DL-HMTBA (Fig 2). O uso dessa fonte no nível deficiente também aumentou a
 200 expressão de MTRR, em comparação com os demais níveis testados com DL-HMTBA e
 201 DL-Met (Fig 2).

202 O uso de DL-Met no nível deficiente de metionina resultou na menor expressão
 203 gênica do CBS quando comparado ao atendimento da exigência com a DL-HMTBA, os
 204 demais níveis aumentaram a expressão desse gene no jejuno de frangos de corte (Fig 2).
 205 As expressões gênicas mais afetadas pelos níveis nutricionais e pelas fontes de metionina
 206 foram as dos genes relacionados ao processo de remetilação, que consiste na conversão
 207 de homocisteína a metionina, seja pela via tetra hidrofolato ou pela via da colina-betaína,
 208 além disso, a conversão de homocisteína a cisteína também foi afetada pelas fontes de
 209 variação desse estudo (Fig 3).

210 **Fig 3.** Integrated model that describes the mechanism by which (A.) DL-methionine and
 211 (B.) DL-HMTBA alter expressions of genes related to methionine metabolism in jejunal
 212 enterocytes of broilers. The studied genes are represented in pink pentagons. Up arrows
 213 indicate: *up-regulation*, down arrows indicate: *down-regulation*. MAT1:
 214 Methionine Adenosyltransferase 1; BHMT: Betaine-homocysteine S-methyltransferase; MTR: 5

215 methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase; MTRR: 5-methyltetrahydrofolate-homocysteine
 216 methyltransferase reductase; CBS: Cystathionine beta synthase; GSS: Glutathione synthetase; SAM: S-
 217 Adenosyl methionine; SAH: S-Adenosyl-homocysteine; DMG: N, N-Dimethylglycine; THF:
 218 Tetrahydrofolate; GSH: Glutathione.

219 Os dados de consumo de ração, ganho de peso e conversão alimentar estão
 220 apresentados na Tabela 5. As fontes de metionina utilizadas no estudo não influenciaram
 221 o consumo de ração das aves, mas os níveis dietéticos de metionina tiveram efeito
 222 ($p=0,0214$); as aves que receberam dieta deficiente em metionina aumentaram o seu
 223 consumo de ração.

224 **Table 7.** Effect of increasing levels of methionine+cystine and replacement of DL-Met
 225 by DL-HMTBA in the diet on the performance of broilers from 8 to 42 days of age.

Main effects ¹	Feed intake (g/bird)	Weight gain (g/bird)	Feed conversion (g/g/bird)
Source			
DL-Met	4715.150±27.580	2994.950±35.484 ^a	1.578±0.021 ^b
DL-HMTBA	4708.380±26.411	2942.530±27.854 ^b	1.602±0.018 ^a
<i>P value</i>	0.8460	0.0117	0.0170
Level			
Less 0.25	4781.230±31.695 ^a	2814.030±15.111 ^c	1.699±0.008 ^a
Requirement	4659.780±31.873 ^b	2995.170±17.091 ^b	1.556±0.010 ^b
Plus 0.25	4694.280±26.184 ^b	3097.020±25.480 ^a	1.516±0.007 ^c
<i>P value</i>	0.0214	<.0001	<.0001
Source x Level			
DL-Met			
Less 0.25	4791.861±44.446	2827.951±27.700 ^c	1.694±0.011
Requirement	4621.970±41.807	2995.826±15.132 ^b	1.543±0.018
Plus 0.25	4731.614±34.933	3161.065±27.394 ^a	1.497±0.010
DL-HMTBA			
Less 0.25	4770.602±48.984	2800.118±12.649 ^c	1.703±0.014
Requirement	4697.598±46.370	2994.509±32.497 ^b	1.568±0.007
Plus 0.25	4656.942±35.195	3032.965±21.572 ^b	1.535±0.003
<i>P value</i>	0.2142	0.0309	0.4664

226 ^{a-c}Different letters in the same column indicate a statistical difference by test t with $p<0.05$.

227 ¹Each value represents the average of 6 repetitions. Mean±SEM.

228 Porém, apesar do maior consumo de ração, as aves tratadas com a dieta deficiente
 229 em metionina não conseguiram converter o alto consumo de ração em ganho de peso
 230 vivo, apresentando o menor ganho de peso entre os três níveis dietéticos ($p<0,0001$), e
 231 com isso, a pior conversão alimentar ($p<0,0001$). As aves tratadas com dieta com excesso

232 de metionina, apresentaram o maior ganho de peso e menor conversão alimentar
233 ($p < 0,0001$).

234 As fontes de metionina influenciam significativamente o ganho de peso
235 ($p = 0,0117$), a DL-Met promoveu maior ganho de peso, e por consequência, menor
236 conversão alimentar ($p = 0,0170$), uma vez que o consumo de ração das aves foi igual, não
237 sofrendo influência das fontes de metionina.

238 Houve efeito de interação entre as fontes e os níveis de metionina, para a variável
239 de ganho de peso. As aves que receberam dietas suplementadas com DL-Met e com
240 excesso dietético de metionina, apresentaram maior ganho de peso ($p = 0,0309$), no
241 entanto, essa variação não foi suficiente para alterar a conversão alimentar, esta última
242 não apresentou efeito de interação entre os fatores estudados.

243 **4. Discussão**

244 Os resultados visualizados no desempenho das aves são decorrentes das diferenças
245 bioquímicas das fontes e dos diferentes níveis de metionina, que influíram de formas
246 diferentes no metabolismo da metionina. A enzima MAT1 tem por função catalisar a
247 conversão de L-Met em SAM, todos os tratamentos foram capazes de estimular a
248 expressão MAT1 da mesma forma, sem diferenças entre si. Outros autores também não
249 encontraram diferenças para a expressão de MAT1 no fígado de matrizes de frangos de
250 corte, alimentadas com DL-Met ou DL-HMTBA, em diferentes níveis de metionina [6].

251 Por outro lado, a DL-Met e a DL-HMTBA ativaram ambas as vias de remetilação,
252 principalmente em condições de deficiência de metionina. Alguns autores avaliando o
253 duodeno de frangos de corte, observaram que quando as aves foram alimentadas com DL-
254 Met a via da colina-betaína foi mais estimulada, com maior expressão de BHMT,
255 enquanto a DL-HMTBA estimulou mais a via do tetra hidrofolato, com maior expressão
256 dos genes MTR e MTRR [12].

257 Porém, nesse estudo, foi observado que a DL-HMTBA estimulou mais a via do
258 tetra hidrofolato do que a via da colina-betaína. Autores demonstraram que a via do tetra
259 hidrofolato é a principal via de remetilação da metionina em frangos de corte, enquanto
260 a via da colina-betaína é uma via secundária, sendo usada em menor escala [13].

261 Devido a sua natureza não aminoacídica, o uso de DL-HMTBA como fonte de
262 metionina, pode levar o organismo das aves a liberar sinais de deficiência de metionina
263 [6]. O que pode estar relacionado com a maior expressão de BHMT com o uso de DL-
264 HMTBA, a sinalização de deficiência de metionina aumentou a utilização da via
265 secundária de regeneração de metionina.

266 A SAM é um regulador alostérico do ciclo da metionina e do ciclo do folato,
267 baixos níveis de SAM levam ao aumento da atividade da via do tetra hidrofolato,
268 aumentando a remetilação de homocisteína e conseqüentemente restaurando os níveis
269 normais de metionina [14]. Em situações de deficiência de metionina, como observado
270 nesse estudo, no tratamento com deficiência de metionina, houve aumento da expressão
271 de MTRR, efeito observado com mais proeminência para as aves alimentadas com DL-
272 HMTBA.

273 Porém o mesmo efeito não foi observado para o gene MTR, em que houve maior
274 expressão para aves alimentadas com DL-HMTBA em condição de excesso de metionina,
275 o que reforça a hipótese de que a DL-HMTBA acarreta sinais de deficiência de metionina.
276 A SAM também é regulador da transulfuração, quando em baixos níveis, a transulfuração
277 é inibida, para conservação de homocisteína para a remetilação [12].

278 No entanto, alguns verificaram que baixos níveis de aminoácidos sulfurosos
279 estimularam a via da transulfuração, para atender as exigências de cistina [15]. Nesse
280 estudo foi observado que a DL-HMTBA estimulou a transulfuração em todos os níveis,

281 enquanto a DL-Met diminuiu a expressão gênica de CBS, quando suplementado em
282 níveis deficientes de metionina.

283 Outros autores encontraram efeitos semelhantes, maior expressão gênica de CBS
284 no fígado, no pectoralis major e no gastrocnemius de frangos alimentados com DL-
285 HMTBA, exceto o duodeno, que apresentou maior expressão de CBS para frangos de
286 corte alimentados com DL-Met [12]. A biossíntese de GSH ocorre a partir de três
287 aminoácidos, sendo eles a cisteína, o ácido glutâmico e a glicina, sendo necessário
288 também a ação da enzima GSS [3].

289 A GSH está relacionada a atividade antioxidante, reduzindo os efeitos dos radicais
290 livres (peróxidos) oriundos do metabolismo ou de fontes externas [16]. Fatores
291 estressantes podem levar a produção de radicais livres, e consequentemente aumentar os
292 níveis de GSH, para mitigar os efeitos deletérios. Deficiência de metionina pode ser um
293 fator estressante, que leve ao aumento da produção de GSH [12].

294 Alguns estudos avaliando a suplementação com DL-Met e DL-HMTBA em
295 frangos de corte, concluíram que a DL-HMTBA promove melhoria da atividade
296 antioxidante devido a menor peroxidação lipídica e a melhor taxa de GSH-reduzido:GSH-
297 total [17,18]. Autores concluíram que não há ganhos para atividade antioxidante de
298 frangos alimentados com DL-HMTBA [16]. Nesse estudo, a DL-HMTBA promoveu
299 maior expressão do gene GSH, reiterando a possibilidade dessa fonte promover sinais de
300 deficiência de metionina em frangos de corte.

301 Para alguns autores, ambas as fontes são capazes de fornecer metionina para o
302 metabolismo de frangos de corte em crescimento (1 a 25 dias), não havendo diferenças
303 para o desempenho das aves, no entanto, os autores verificaram que a deficiência de
304 metionina acarreta em perdas no desempenho, independente da fonte utilizada [19].

305 Outros relatam que em condições tropicais também não há diferença para o uso de DL-
306 Met e DL-HMTBA em frangos de corte (1 a 35 dias) [20].

307 No entanto, pesquisadores trabalhando com frangos de corte (1 a 35 dias),
308 verificaram que a DL-HMTBA em substituição de 100% a DL-Met, resulta em menor
309 ganho de peso e pior conversão alimentar, semelhante aos resultados encontrados no
310 presente estudo [21]. A suplementação de metionina tem efeito positivo na síntese de
311 proteínas musculares, devido a sua ação na expressão de genes relacionados ao
312 crescimento, como o IGF1 e GH [22].

313 A adição de metionina na dieta de frangos de corte também leva a melhora no
314 balanço aminoacídico, promovendo o crescimento e síntese de proteínas, reduzindo a
315 síntese de gordura e melhorando a conversão alimentar [7]. De fato, nesse estudo, o
316 aumento dos níveis de metionina na dieta, aumentou o ganho de peso e melhorou a
317 conversão alimentar das aves.

318 Outros pesquisadores encontraram resultados semelhantes com frangos de corte
319 (1 a 42 dias), na qual dietas deficientes em metionina pioraram o desempenho das aves,
320 porém não apresentou grandes diferenças para os tratamentos com fornecimento de
321 metionina na exigência e em excesso [23]. No presente estudo, o excesso de metionina,
322 levou a melhor ganho de peso quando as aves eram alimentadas com DL-Met, o que pode
323 estar relacionado a absorção dessas fontes.

324 No jejuno de frangos, a DL-Met é absorvida por transportadores específicos dos
325 sistemas $b^{0,+}$ e L (sódio independente), e dos sistemas y^+ , B e A (sódio dependente), que
326 agem contra o gradiente de concentração; enquanto que a DL-HMTBA é absorvida
327 principalmente por difusão, dependente do gradiente de concentração no jejuno de
328 frangos, podendo acontecer saturação [24,8].

329 Alguns autores observaram em estudo com frangos de corte (1 a 28 dias), acima
330 dos níveis de exigência, que a DL-HMTBA em comparação com a DL-Met, promove
331 resultados superiores no desempenho das aves [25]. Essa diferença estaria associada a
332 absorção e/ou taxa metabólica da DL-HMTBA, que promove melhores respostas de
333 crescimento em níveis acima do recomendado para os aminoácidos sulfurosos. O oposto
334 também é válido, a DL-HMTBA piora o desempenho das aves em situações de
335 deficiência de metionina.

336 4. Conclusão

337 A suplementação com DL-HMTBA acarreta em leve piora no desempenho de
338 frangos de corte, em comparação a suplementação com DL-Met. Ambas as fontes de
339 metionina estudadas nesse trabalho estimularam as vias de remetilação da metionina,
340 porém a DL-HMTBA estimulou mais a via do tetra hidrofolato, com maior expressão dos
341 genes BHMT e MTRR. Além disso, as aves alimentadas com DL-HMTBA apresentaram
342 sinais de deficiência de metionina.

343 5. Referências

- 344 1. Anderson OS, Sant KE, Dolinoy DC. Nutrition and epigenetics: an interplay of
345 dietary methyl donors, one-carbon metabolism and DNA methylation. *J Nutr*
346 *Biochem* 2012; 23: 853–859. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.03.003>
- 347 2. Zhang S, Gilbert ER, Saremi B, Wong EA. Supplemental methionine sources
348 have a neutral impact on oxidative status in broiler chickens. *J Anim Physiol Anim*
349 *Nutr.* 2018; 1–10. <https://doi.org/10.1111/jpn.12946>
- 350 3. Del Vesco AP, Gasparino E, Grieser DO, Zancanela V, Soares MAM, Oliveira
351 Neto AR. Effects of methionine supplementation on the expression of oxidative
352 stress-related genes in acute heat stress-exposed broilers. *Br J Nutr.* 2015; 113:
353 549–559. <https://doi.org/10.1017/s0007114514003535>
- 354 4. Lu J, Weil J, Cerrate S, Coon C. Developmental changes in physiological amino
355 acids and hepatic methionine remethylation enzyme activities in E10-21 chick
356 embryos and D1-49 broilers. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 2020; 1-11.
357 <https://doi.org/10.1111/jpn.13390>
- 358 5. D’Mello JPF. Amino acids in animal nutrition. 2nd ed. London: CABI Publishing;
359 2003. 513p.

- 360 6. Wan J, Ding X, Wang J, Bai S, Peng H, Luo Y, et al. Dietary methionine source
361 and level affect hepatic sulfur amino acid metabolism of broiler breeder hens.
362 *Anim Sci J.* 2017; 88: 2016-2024. <https://doi.org/10.1111/asj.12882>
- 363 7. Majdeddin M, Golian A, Kermanshahi H, Michiels J, Smet S. Effects of
364 methionine and guanidinoacetic acid supplementation on performance and energy
365 metabolites in breast muscle of male broiler chickens fed corn-soybean diets. *Br*
366 *Poult Sci.* 2019. <https://doi.org/10.1080/00071668.2019.1631447>
- 367 8. Vázquez-Añón M, Bertin G, Mercier Y, Reznik G, Robertson JL. Review of the
368 chemistry, metabolism, and dose response of two supplemental methionine
369 sources and the implications in their relative bioefficacy. *Worlds Poult Sci J.*
370 2017; 73: 1-12. <https://doi.org/10.1017/S0043933917000551>
- 371 9. Soriano-García JF, Torras-Llort M, Ferrer R, Moretó M. Multiple pathways for L-
372 methionine transport in brush-border membrane vesicles from chicken jejunum. *J*
373 *Physiol.* 1998; 509 (Pt 2): 527–539. <https://doi.org/10.1111%2Fj.1469-7793.1998.527bn.x>
- 374
375 10. Rostagno HS, Albino LFT, Donzele JL, Gomes JL, Oliveira RF, Lopes, DC, et al.
376 Tabelas brasileiras para aves e suínos (composição de alimentos e exigências
377 nutricionais). 3rd ed. MG: Editora UFV; 2011. 252p.
- 378 11. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-
379 time quantitative pcr and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods.* 2001; 25: 402-408.
380 <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- 381 12. Aggrey SE, González-Céron F, Rekaya R, Mercier Y. Gene expression
382 differences in the methionine remethylation and transsulphuration pathways
383 under methionine restriction and recovery with D,L-methionine or D,L-HMTBA
384 in meat-type chickens. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 2017; 1-8.
385 <https://doi.org/10.1111/jpn.12779>
- 386 13. Pillai PB, Fanatico AC, Blair ME, Emmert JL. Homocysteine remethylation in
387 broilers fed surfeit choline or betaine and varying levels and sources of methionine
388 from eight to twenty-two days of age. *Poult Sci.* 2006; 85: 1729-1736.
389 <https://doi.org/10.1093/ps/85.10.1729>
- 390 14. Froese DS, Fowler B, Baumgartner MR. Vitamin B₁₂, folate, and the methionine
391 remethylation cycle-biochemistry, pathways, and regulation. *J Inherit Metab Dis.*
392 2019; 42: 673–685. <https://doi.org/10.1002/jimd.12009>
- 393 15. Vilar da Silva JH, Gonzando-Cerón F, Howerth EW, Rekaya R, Aggrey SA.
394 Alteration of dietary cysteine affects activities of genes of the transsulfuration and
395 glutathione pathways, and development of skin tissues and feather follicles in
396 chickens. *Anim Biotechnol.* 2020; 31(3): 203-208.
397 <https://doi.org/10.1080/10495398.2019.1577253>
- 398 16. Zeitz JO, Mohrmann S, Fehse L, Most E, Helmbrecht A, Saremi B, et al. Tissue
399 and plasma antioxidant status in response to dietary methionine concentration and
400 source in broilers. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 2018; 1–13, 2018.
401 <https://doi.org/10.1111/jpn.12909>
- 402 17. Swennen Q, Geraert PA, Mercier Y, Everaert N, Stinckens A, Willemsen H, et al.
403 Effects of dietary protein content and 2-hydroxy-4-methylthiobutanoic acid or
404 DL-methionine supplementation on performance and oxidative status of broiler
405 chickens. *Br J Nutr.* 2011; 106: 1845–1854.
406 <https://doi.org/10.1017/s0007114511002558>
- 407 18. Willemsen H, Swennen Q, Everaert N, Geraert PA, Mercier Y, Stinckens A, et al.
408 Effects of dietary supplementation of methionine and its hydroxy analog DL-2-

- 409 hydroxy-4-methylthiobutanoic acid on growth performance, plasma hormone
410 levels, and the redox status of broiler chickens exposed to high temperatures. *Poult*
411 *Sci.* 2011; 90: 2311–2320. <https://doi.org/10.3382/ps.2011-01353>
- 412 19. Conde-Aguilera JA, Cholet JCG, Lessire M, Mercier Y, Tesseraud S, Milgen J.
413 The level and source of free-methionine affect body composition and breast
414 muscle traits in growing broilers. *Poult Sci.* 2016; 95: 2322–2331.
415 <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pew105>
- 416 20. Yodseranee R, Bunchasak C. Effects of dietary methionine source on productive
417 performance, blood chemical, and hematological profiles in broiler chickens
418 under tropical conditions. *Trop Anim Health Prod.* 2012; 44: 1957–1963.
419 <https://doi.org/10.1007/s11250-012-0164-7>
- 420 21. Kim DK, An BK, Oh S, Keum MC, Lee S, Um JS, et al. Effects of different
421 methionine sources on growth performance, meat yield and blood characteristics
422 in broiler chickens. *J Appl Anim Res.* 2019; 47 (1): 230-235.
423 <https://doi.org/10.1080/09712119.2019.1617719>
- 424 22. Del Vesco AP, Gasparino E, Grieser DO, Zancanela V, Voltolini DM, Khatlab
425 AS, et al. Effects of methionine supplementation on the expression of protein
426 deposition-related genes in acute heat stress-exposed broilers. *PLoS One.* 2015;
427 10 (2): 1-11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115821>
- 428 23. Wen C, Jiang XY, Ding LR, Wang T, Zhou YM. Effects of dietary methionine on
429 growth performance, meat quality and oxidative status of breast muscle in fast-
430 and slow-growing broilers. *Poult Sci.* 2017; 96: 1707–1714.
431 <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pew432>
- 432 24. Zhang S, Wong EA, Gilbert ER. Bioavailability of different dietary supplemental
433 methionine sources in animals. *Front Biosci.* 2015; 7: 478-490.
434 <https://doi.org/10.2741/e744>
- 435 25. Agostini PS, Dalibard P, Mercier Y, Van der Aar P, Van de Klis JD. Comparison
436 of methionine sources around requirement levels using a methionine efficacy
437 method in 0 to 28 day old broilers. *Poult Sci.* 2016; 95: 560–569.
438 <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pev340>

Figuras

Figura 1

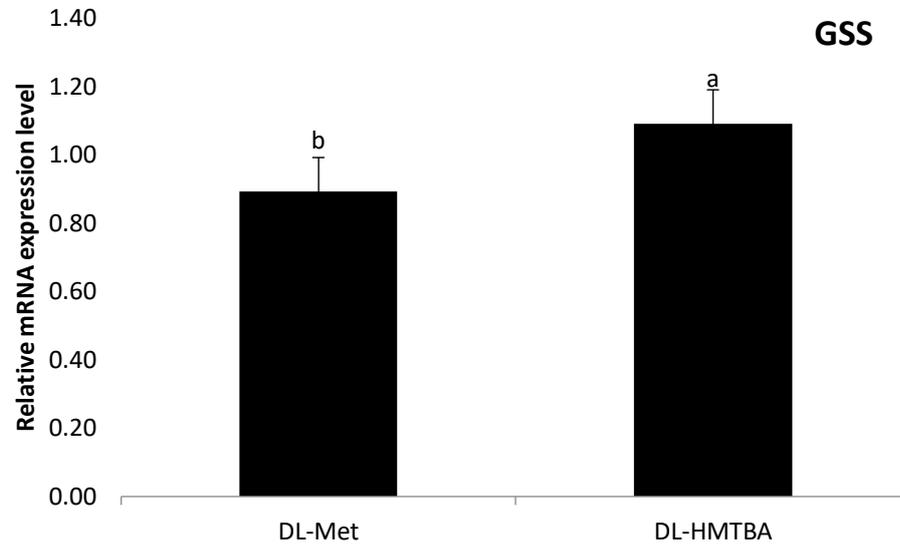
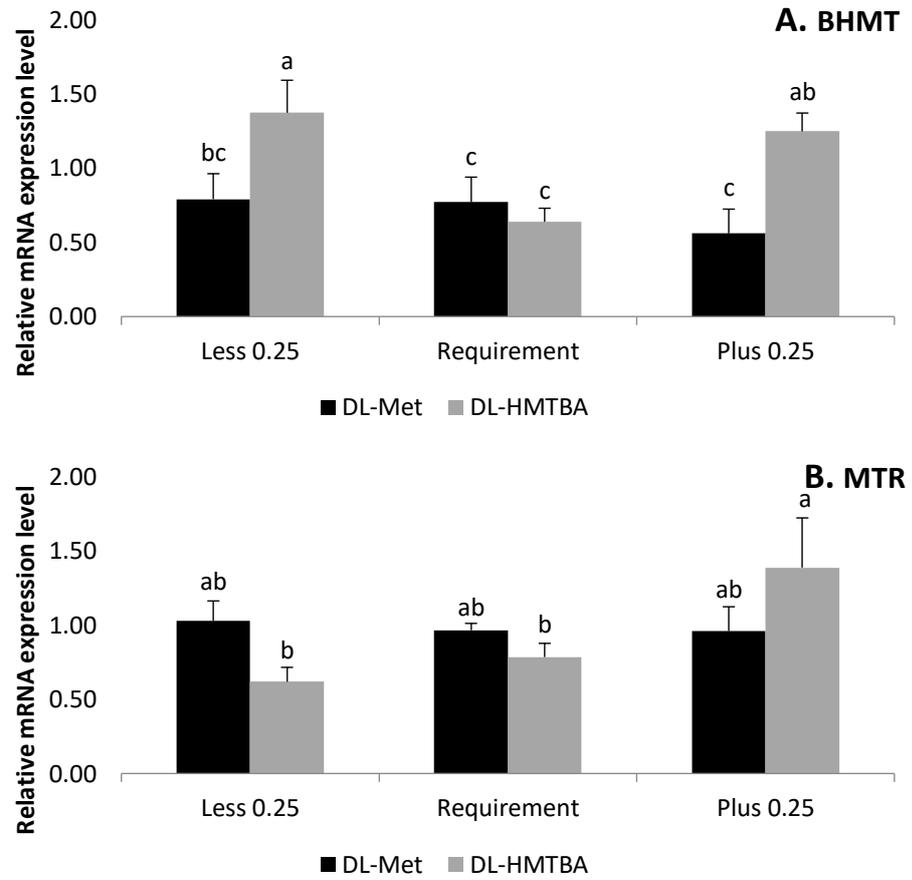


Figura 2



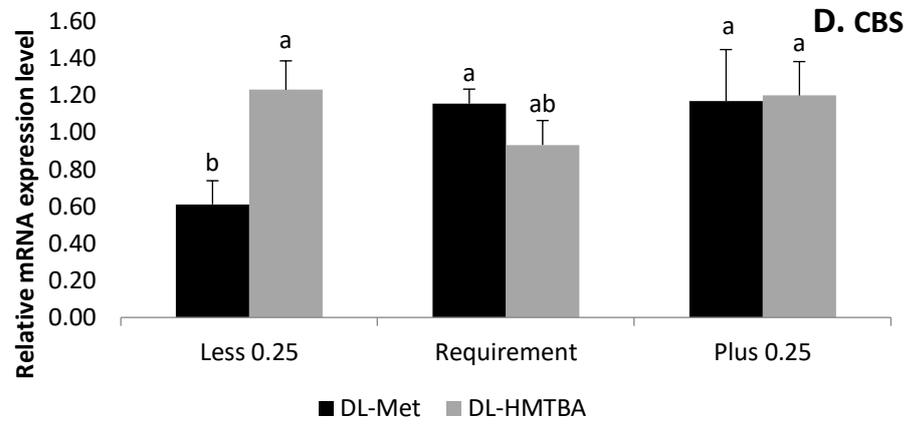
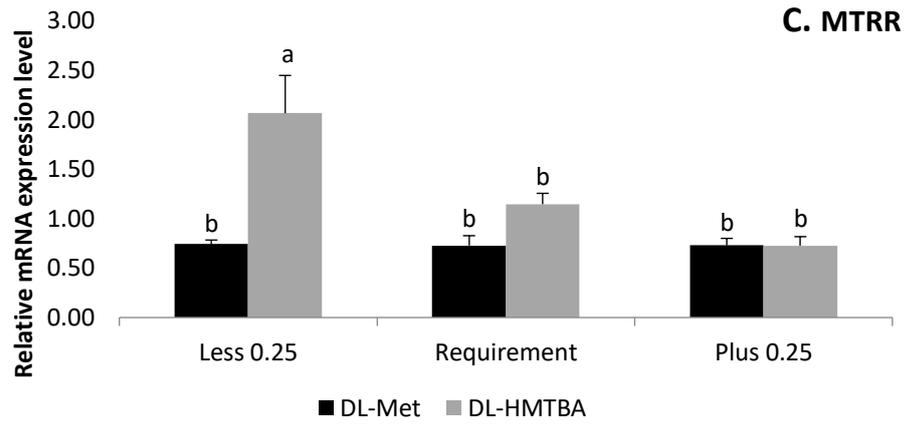
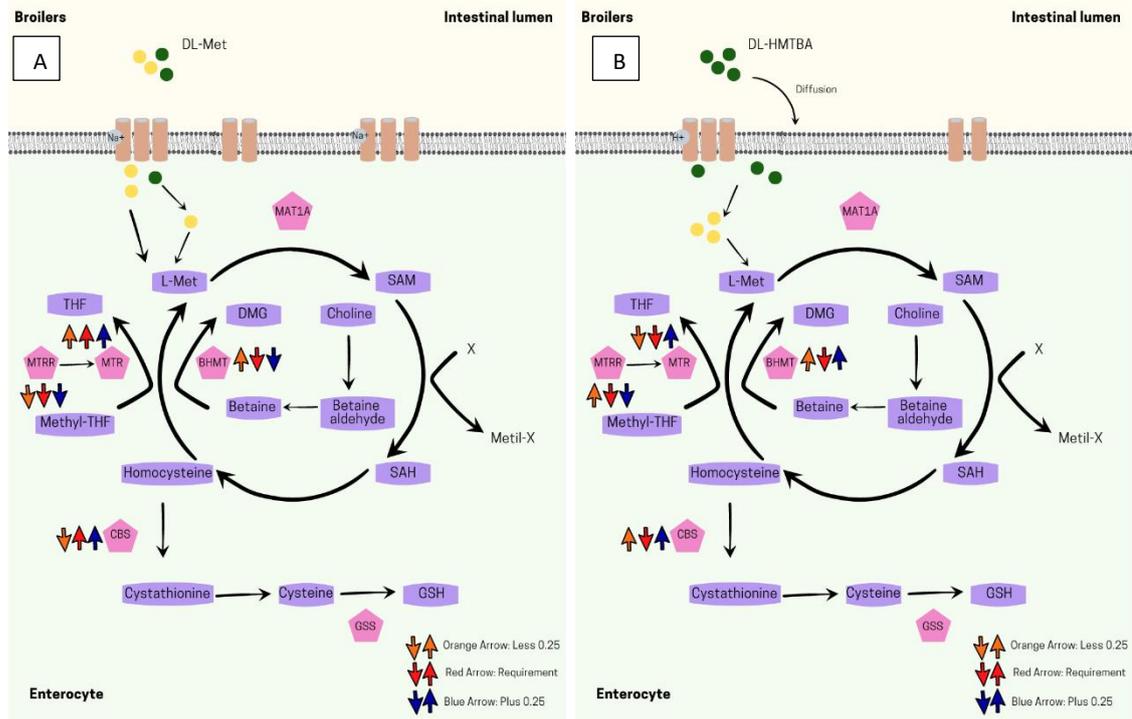


Figura 3



CAPÍTULO 4

Artigo 2

Methionine sources alters the expression of methionine transporters and glucose transporters in the jejunum of broilers

Formatado de acordo com as normas da revista científica “British Poultry Science”

RESUMO

1. Metionina é um aminoácido essencial para frangos de corte, sendo necessária sua suplementação na dieta, sendo a suplementação de aminoácidos sulfurosos comumente realizada com DL-Metionina (DL-Met) ou DL-Metionina Hidroxi Análoga (DL-HMTBA).
2. Avaliou-se nesse estudo o efeito de duas fontes de metionina (DL-Met e DL-HMTBA) suplementadas em três níveis de Met+CysD (deficiência, exigência e excesso) sobre a expressão de transportadores de metionina e transportadores de glicose.
3. Para isso, utilizou-se 450 frangos de corte machos (Cobb-700 *slow feathering*), distribuídos em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial (2x3). Foram avaliados a expressão de RNAm dos transportadores de glicose (SGLT1, GLUT2 e GLUT5), e transportadores de metionina (SAT1, SAT2, SAT3, ATB^{0,+}, y⁺LAT1, y⁺LAT2, LAT1, B⁰AT, b^{0,+}AT e rBAT).
4. O uso de DL-HMTBA aumentou a expressão de SGLT1 (p=0,0065), SAT1 (p=0,0167) e y⁺LAT2 (p<0,0001). A deficiência de metionina resultou em maior expressão de SGLT1 (p=0,0004), GLUT5 (p=0,0001), SAT2 (p=0,0064), y⁺LAT2 (p=0,0677) e rBAT (p=0,0800). O uso de DL-Met aumentou a expressão de LAT1 (p=0,0420).
5. A DL-HMTBA quando em deficiência aumentou a expressão de transportadores de metionina e glicose. Recomenda-se suplementar DL-Met na exigência e a DL-HMTBA acima da exigência.

KEYWORDS: gene expression, glucose transporters, levels methionine, methionine transporters, source methionine

INTRODUÇÃO

A metionina é rotineiramente adicionada a dieta de frangos para atender as exigências de aminoácidos sulfurosos, sendo essencial para o bom desempenho das aves, realizando diversas

funções fisiológicas, participa da formação de proteínas teciduais, precursor de compostos antioxidantes e aminoácidos sulfurosos, participa da formação de poliaminas, é doador de grupos metil, atua na regulação de genes envolvidos na glicólise e lipólise, entre outras funções (Cheng et al., 2014; Skiba-Cassy et al. 2015; Ingenbleek and Hideo 2013).

O transporte de metionina no intestino delgado é feito através dos sistemas A, B^{0,+}, b^{0,+}, L, y^{+L}, sendo a maioria dos transportadores encontrados na membrana basolateral, com exceção dos transportadores que pertencem aos sistemas B^{0,+}, b^{0,+}, estes estão localizados na membrana apical, além disso, a maioria dos transportadores são dependentes de sódio, com exceção dos transportadores que pertencem aos sistemas b^{0,+} e L, estes são sódio independente (Zhang et al. 2015).

A suplementação de metionina é realizada majoritariamente com o uso da DL-Metionina (DL-Met), na forma de pó, e DL-Metionina Hidroxi Análoga (DL-HMTBA), na forma líquida, com amplo uso nas empresas integradoras (Agostini et al., 2016), estes são compostos com diferenças químicas e físicas, resultando em algumas diferenças na absorção e utilização dessas fontes (Zhang et al., 2018a).

Em estudo meta-analítico, Uddin et al. (2022) verificaram que não existem diferenças no ganho de peso diário de aves de corte suplementadas com DL-Met ou DL-HMTBA. No entanto, para Zhang et al. (2018b), as fontes de metionina podem levar a diferentes efeitos fisiológicos, refletindo no uso de diferentes vias metabólicas.

Diferenças também são relatadas nos transportadores de metionina (Zhang et al., 2017), na qual a DL-HMTBA não afeta a expressão de transportadores de maneira semelhante a DL-Met. Esta última fonte elevou a expressão de ATB^{0,+} e B⁰AT, aumentando a absorção de metionina e outros aminoácidos neutros e catiônicos. A suplementação com DL-Met tem potencial para aumentar o transporte apical de Met, enquanto a DL-HMTBA aumenta o transporte basolateral de Met no intestino delgado de suínos (Romanet et al., 2021).

Além disso, o nível de suplementação de metionina também influencia no desempenho das aves, e animais alimentados com dietas deficientes em metionina apresentam pior ganho de peso e conversão alimentar (Pokoo-Aikins et al., 2021). Por outro lado, a suplementação com metionina resulta em melhor desempenho, em comparação com dieta basal sem suplementação de metionina (Agostini, et al., 2016).

Ademais, a restrição de metionina dietética aumenta a sensibilidade a insulina, trazendo papel benéfico para a homeostase de glicose (Yin et al., 2018). Existem também evidências de que a relação entre a glicose e a metionina pode ser um mecanismo geral para coordenar o estado nutricional de uma célula (Zou et al., 2020). Dada a importância desses nutrientes, é importante estudos que visem avaliar a relação metabólica entre eles.

Sendo assim, objetivou-se no estudo, avaliar os efeitos da DL-Met e da DL-HMTBA na expressão gênica de transportadores relacionados ao transporte de metionina e glicose no jejuno de frangos de corte.

MATERIAL E MÉTODOS

Manejo e alojamento

Os protocolos experimentais foram executados de acordo com os preceitos e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA-UFPB) com protocolo de nº 075/2017.

As análises foram conduzidas no Laboratório de Avicultura do Centro de Ciências Humanas, Sociais e Agrárias da Universidade Federal da Paraíba (CCHSA/UFPB), Campus III, localizado na cidade de Bananeiras, Paraíba, Brasil. As análises de expressão gênica foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular, localizado no Centro de Ciências Agrárias (CCA/UFPB), Campus II, na cidade de Areia, Paraíba, Brasil.

O período experimental foi de 42 dias, sendo utilizados 450 frangos de corte machos, da Linhagem Cobb-700 (*slow feathering*), com 1 dia de idade. As aves foram adquiridas em incubatório comercial, vacinadas contra as doenças de Marek e Gumboro. Até o 7º dia de idade, os pintainhos foram mantidos em círculos de proteção e ao oitavo dia de idade foram pesados e distribuídos em grupos de 15 animais (0,185 ± 0,001 kg de peso) por unidade experimental em boxes com área de 1,5 m², equipados com comedouros tubulares e bebedouros pendulares, com oferta de água e ração à vontade.

Foi utilizado maravalha para cobertura do piso dos boxes e o aquecimento das aves foi realizado com lâmpadas infravermelhas, mantendo os valores de temperatura e umidade relativa do ar na faixa de termoneutralidade de acordo com a idade das aves. O programa de luz seguido foi de 18 horas de luz (natural+artificial) e 6 h de escuridão.

Animais, delineamento e dietas experimentais

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x3, com duas fontes (DL-Met e DL-HMTBA) e três níveis de Met+CysD, sendo um nível deficiente, com redução de 0,25 da exigência, outro nível considerado na exigência, e o último nível com excesso de 0,25 da exigência, totalizando seis tratamentos, cada um com cinco repetições de 15 aves. O experimento ocorreu nas fases inicial (8 a 21 dias), crescimento (21 a 33 dias) e terminação (34 a 42 dias). Três dietas referências foram formuladas para cada fase do estudo de acordo com as recomendações de Rostagno et al. (2011), atendendo-se as exigências das aves, exceto os níveis de Met+CysD que ficaram abaixo do recomendado (Tabela 1).

Tabela 1 aqui

As dietas referências em cada fase, foram suplementadas para atender à exigência ou o excesso de Met+CysD com DL-Met (98%) ou DL-HMTBA (88%), essa última fonte foi adicionada na

base equimolar da DL-Met, ambas em substituição ao inerte, as dietas foram isonitrogênicas e isoenergéticas. Os níveis de substituição equimolar da DL-Met pela DL-MHA-FA foram 0 e 100%, os níveis dietéticos experimentais foram: 0,63; 0,88 e 1,13 para a fase inicial, 0,58; 0,83 e 1,08 para a fase de crescimento e 0,52; 0,77 e 1,02 para a fase de terminação.

Isolamento do mRNA, preparação do cDNA e análise do PCR em tempo real

As amostras de jejuno (5 por tratamento) foram maceradas em nitrogênio líquido, o RNAm total foi extraído com uso do reagente Trizol® (*Invitrogen, Carlsbad CA, USA*), purificado com RNeasy Mini Kit (*Qiagen, Valencia CA, nº 74.104*) e tratados com inibidor de RNase, de acordo com as normas dos fabricantes. O RNA foi suspenso em água tratada com dietil pirocarbonatado (*DEPC water, Sigma Aldrich®*), e a concentração e a pureza do RNA foram determinadas utilizando as relações de absorvância 260/280 e 260/230 em espectrofotômetro (*Colibri*) e armazenados a -80 °C.

Um total de 2µg de RNAm 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 foram executadas em triplicatas. A expressão gênica relativa foi calculada com base no método 2- $\Delta\Delta C_t$ (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 aqui

Análise estatística

As pressuposições de normalidade foram verificadas pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados foram submetidos à análise variância. De acordo com o modelo estatístico a abaixo:

$$Y_{ij}(k) = \mu + S_i + N_j + S_x N_{ij} + e_{ij}(k)$$

Onde, $Y_{ij}(k)$ = valor observado para variável estudada; μ = média geral; S_i = efeito i-ésimo da fonte de metionina; N_j = efeito da j-ésimo dos níveis de metionina; $S_x N_{ij}$ = efeito da interação entre as fontes de metionina e os níveis de metionina e e_{ij} = erro experimental.

Após o teste ANOVA, os dados foram submetidos ao teste t, as diferenças foram significativas quando $p \leq 0,10$. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o PROC GLM do SAS (Version 9.1, SAS Inst. Inc., Cary, NC).

RESULTADOS

Transportadores de glicose

Os dados referentes aos transportadores de glicose estão dispostos na Tabela 3. A DL-HMTBA aumentou a expressão de transportadores de glicose sódio dependente como o SGLT1 ($p=0,0065$) (Figura 1). Além disso, o nível de metionina também afetou a expressão de transportadores, em situações de deficiência de metionina, houve maior expressão do transportador SGLT1 ($p=0,0004$) e em situações de excesso de metionina, houve menor expressão de GLUT5 ($p=0,0001$).

Tabela 3 e Figura 1 aqui

Houve efeito de interação entre as fontes e os níveis de metionina na expressão gênica do transportador SGLT1 ($p=0,0208$), com o uso de DL-Met, à medida que foi aumentando o nível de metionina foi reduzindo a expressão do SGLT1, enquanto o uso de DL-HMTBA em níveis deficiente de metionina resultou em maior expressão do SGLT1 (Figura 1).

Para os transportadores de glicose sódio independente houve interação entre os fatores estudados ($p=0,0806$), a DL-Met aumentou a expressão de GLUT2 quando suplementada em excesso, enquanto a DL-HMTBA promoveu efeito contrário, com redução da expressão de GLUT2, e aumento da expressão desse transportador na deficiência de metionina (Figura 1).

Para o GLUT5, ocorreu efeito de interação entre os níveis e as fontes de metionina ($p=0,0889$), a deficiência de metionina aumentou a expressão desse gene, enquanto o excesso de metionina promoveu o efeito contrário, porém esse resultado foi mais evidente com o uso de DL-HMTBA (Figura 1).

Transportadores de metionina

Os dados de expressão de transportadores de metionina, sódio dependente, estão dispostos na Tabela 4. As fontes de metionina afetaram a expressão dos transportadores SAT1 ($p=0,0167$) e y^+ LAT2 ($p<.0001$); a DL-HMTBA proporcionou maior expressão desses transportadores (Figuras 2 e 3). Em relação aos níveis de metionina, a deficiência de metionina aumentou a expressão de SAT2 ($p=0,0064$) e de y^+ LAT2 ($p=0,0677$).

Tabela 4 e Figuras 2 e 3 aqui

Ocorreu efeito de interação entre as fontes e os níveis de metionina para os transportadores SAT3 ($p=0,0291$) e y^+ LAT1 ($p=0,0108$); para o SAT3, o uso de DL-Met quando suplementado em excesso aumentou a expressão desse transportador (Figura 2), o efeito contrário foi visualizado com o uso de DL-HMTBA, o uso dessa fonte em excesso diminuiu da expressão do SAT3 (Figura 2).

Para o y^+ LAT1, o emprego de DL-Met na condição de deficiência reduziu a expressão desse transportador, enquanto a maior expressão foi encontrada para essa mesma fonte com a suplementação atendendo a exigência das aves (Figura 3). Houve interação entre os fatores estudados para os transportadores SAT2 ($p=0,0650$) e y^+ LAT2 ($p=0,0897$).

A maior expressão do transportador SAT2 foi visto com o uso da DL-HMTBA na deficiência de metionina (Figura 2). Efeito semelhante foi encontrado para o transportador y^+ LAT2, níveis deficientes de metionina com o uso de DL-HMTBA aumentou a expressão desse transportador, a menor expressão desse gene foi visualizada com a fonte de DL-Met suplementada em excesso (Figura 3).

Os dados de transportadores de metionina, sódio independente, estão dispostos na Tabela 5. As fontes de metionina afetaram a expressão do transportador LAT1 ($p=0,0420$), a DL-Met aumentou a expressão desse transportador (Figura 3). Os níveis de metionina influenciaram a expressão de rBAT ($p=0,0800$). Aves que receberam dietas deficientes em metionina apresentaram menor expressão de rBAT no jejuno (Figura 4).

Tabela 5 e figura 4 aqui

Houve efeito de interação entre as fontes e os níveis de metionina para a expressão dos transportadores $b^{0,+}$ AT ($p=0,0005$), B^0 AT ($p=0,0319$) e rBAT ($p=0,0124$). A deficiência de metionina com o uso de DL-Met diminuiu a expressão de $b^{0,+}$ AT, porém com o uso de DL-HMTBA o efeito foi contrário, ocorreu maior expressão desse transportador. A diminuição da expressão de $b^{0,+}$ AT, com o uso de DL-HMTBA só foi visualizada quando suplementado em excesso (Figura 4).

Quanto ao transportador B^0 AT, o emprego da DL-HMTBA em deficiência promoveu maior expressão desse transportador em comparação aos demais tratamentos (Figura 4). O mesmo

efeito foi visualizado para o transportador rBAT, onde uso de DL-HMTBA atrelado a deficiência de metionina proporcionou destaque em relação aos demais (Figura 4).

Para o transportador LAT1 houve interação entre os fatores estudados ($p=0,0989$), houve diferença no padrão de expressão gênica desse transportador quando suplementando em excesso, dependendo da fonte de metionina utilizada. Para a DL-Met houve maior expressão desse transportador, em comparação com o uso de DL-HMTBA que promoveu o efeito contrário, menor expressão desse transportador (Figura 3).

DISCUSSÃO

O aumento de monossacarídeos no lúmen intestinal aumenta a expressão de transportadores de glicose, e os níveis elevados de glicose, galactose e frutose induzem o aumento de SGLT1 e GLUT2, enquanto a frutose é capaz de elevar os níveis de GLUT5 (Thorens, 1996). De fato, Shirazi-Beechey et al. (2011) verificaram em estudo com suínos que a superfície apical das células do intestino possui grande capacidade absorptiva de glicose, através do SGLT1, porém quando os níveis de carboidratos excedem 50% da dieta, a expressão de SGLT1 aumenta.

A relação metabólica da glicose com outros nutrientes também pode interferir na absorção desse nutriente, a metionina, por exemplo, é importante na regulação do estado metabólico da célula, a restrição de glicose reduz o nível de metionina intracelular. Essa relação entre glicose e metionina pode ser um mecanismo geral para coordenar o estado nutricional e a tradução/crescimento de uma célula (Zou et al. 2020). Além disso, o transporte de metionina é demanda gasto de energia, o aumento da quantidade de transportadores de aminoácido acarreta em maior gasto energético.

No presente estudo, a deficiência de metionina resultou em maior expressão de transportadores de glicose, principalmente quando foi utilizada a DL-HMTBA como fonte de aminoácidos sulfurosos. Tal aumento da expressão gênica desses transportadores pode indicar que o organismo das aves aumentou a absorção de glicose afim de regular o desajuste do estado

nutricional da célula causado pela deficiência de metionina. No entanto, mais estudos são necessários para verificar a relação entre esses dois nutrientes.

Existem diferenças relatadas quanto aos mecanismos para absorção celular, transporte, metabolismo e bioeficiência das duas fontes de metionina, a DL-HMBTA é absorvida principalmente por difusão e pelo transportador MCT1, enquanto a DL-Met é absorvida por vários sistemas de transportadores (Wang et al., 2019; Zhang et al., 2017).

Os transportadores localizados na membrana basolateral (MB) do enterócito têm por principal função fazer o transporte de aminoácidos do interior da célula epitelial para o sangue (Zhang et al., 2017). Estão localizados na MB do enterócito o sistema A (SAT1, SAT2 e SAT3), sódio dependente, que realiza o transporte de aminoácidos neutros; o sistema y^+L (y^+LAT1 e y^+LAT2), sódio dependente, possui uma subunidade pesada 4F2hc, que realiza o transporte de aminoácidos neutros e básicos; e o sistema L (LAT1), sódio independente, que possui uma subunidade pesada 4F2hc, que realizando o transporte de aminoácidos neutros, ramificados e aromáticos (To, Masagounder e Loewen, 2021).

Neste estudo, a DL-HMTBA aumentou a expressão gênica de SAT1 e y^+LAT2 , porém, a DL-Met aumentou a expressão de LAT1. Esses dados estão em conformidade com outros trabalhos, Zhang et al. (2017) e Wang et al. (2019), os quais observaram aumento da expressão de SAT1 no jejuno de frangos que receberam dietas com DL-HMTBA, porém discordantes para o transportador LAT1.

Esses resultados indicam que houve maior fluxo de aminoácidos entre os enterócitos e os vasos sanguíneos, no entanto, o aumento da expressão de transportadores da membrana basolateral não está associada com aumento da absorção de metionina (Romanet et al., 2020). Além disso, transportadores do sistema A desempenham papel sinalizador para a mTORC, tendo implicações na fase inicial da tradução do mRNA (Peyrollier et al., 2000).

A deficiência de metionina aumentou a expressão de transportadores da MB, SAT2 e y^+ LAT2, e de rBAT, que está localizado na membrana apical (MA), sendo sódio independente e atuando junto com a subunidade leve $b^{0,+}$ AT. A mesma atua na realização do transporte de aminoácidos neutros e catiônicos. Esses resultados diferem de Zhang et al. (2017) e Fagundes et al. (2020), que encontraram maior expressão gênica de transportadores localizados na MA do jejuno de frangos de corte, quando ocorreu deficiência de metionina, principalmente o transportador $b^{0,+}$ AT.

Os transportadores localizados na MA fazem o transporte de metionina do lúmen intestinal para o interior dos enterócitos, principalmente com a ação do transportador heterodímero rBAT/ $b^{0,+}$ AT (To, Masagounder e Loewen, 2021). Em estudos com suínos, Romanet et al. (2021) verificaram que a suplementação com DL-Met aumentou a expressão de transportadores da MA, enquanto a DL-HMTBA aumentou a expressão de transportadores da MB, efeito semelhante foi encontrado nesse estudo.

A absorção de ambas as fontes de metionina é dependente de tempo e concentração para serem absorvidas com eficiência no intestino delgado, não havendo diferenças na eficácia da absorção (Richards et al., 2005). No presente estudo, a DL-HMTBA, quando suplementada em níveis deficientes, aumentou a expressão gênica de transportadores de metionina da MB, como o SAT1 e o y^+ LAT2, porém não existem evidências de que houve maior absorção dessa fonte.

CONCLUSÃO

A deficiência de metionina acarreta em redução da expressão gênica de alguns transportadores de metionina na membrana basolateral das células do jejuno. A DL-HMTBA quando deficiente, resulta em maior expressão gênica de transportadores de metionina, e de glicose no jejuno de frangos de corte, enquanto a DL-Met não trouxe grandes diferenças na expressão gênica de transportadores de glicose e metionina. Recomenda-se que a DL-Met deve ser suplementada no nível da exigência e a DL-HMTBA deve ser suplementada acima da exigência.

REFERÊNCIAS

- Agostini, P. S., P. Dalibard, P. Y. Mercier, P. Van der Aar, and J. D. Van de Klis. 2016. “Comparison of methionine sources around requirement levels using a methionine efficacy method in 0 to 28 day old broilers.” *Poultry Science* 95: 560–569. [doi:http://dx.doi.org/10.3382/ps/pev340](http://dx.doi.org/10.3382/ps/pev340)
- Cheng, S. C., J. Quintin, R. A. Cramer, K. M. Shepardson, S. Saeed, V. Kumar, E. J. Giamarellos-Bourboulis, J. H. A. Martens, N. A. Rao, A. Aghajani-refah, G. R. Manjeri, Y. Li, D. C. Ifrim, R. J. W. Arts, B. M. J. W. Van der Veer, P. M. T. Deen, C. Logie, L. A. O’Neill, P. Willems, F. L. Van de Veerdonk, J. W. M. Van der Meer, A. Ng, L. A. B. Joosten, C. Wijmenga, H. G. Stunnenberg, R. J. Xavier, and M. G. Netea. 2014. “mTOR- and HIF-1 α -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity.” *Science* 345: 1579-1588. [doi:https://doi.org/10.1126/science.1250684](https://doi.org/10.1126/science.1250684)
- Fagundes, N.S., M. C. Milfort, S. M. Williams, M. J. Da Costa, A. L. Fuller, J. F. Menten, R. Rekaya, and S. E. Aggrey. 2020. “Dietary methionine level alters growth, digestibility, and gene expression of amino acid transporters in meat-type chickens.” *Poultry Science* 99: 67-75. [doi:http://dx.doi.org/10.3382/ps/pez588](http://dx.doi.org/10.3382/ps/pez588)
- Ingenbleek, Y. and H. Kimura. 2013. “Nutritional essentiality of sulfur in health and disease.” *Nutrition Reviews* 71 (7): 413–432. [doi:https://doi.org/10.1111/nure.12050](https://doi.org/10.1111/nure.12050)
- Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. “Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the 2- $\Delta\Delta$ CT method.” *Methods* 25 (4): 402-408. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609>

Peyrollier, K., E. Hajduch, A. S. Blair, R. Hyde, and H. S. Hundal. 2000. "L-Leucine availability regulates phosphatidylinositol 3-kinase, p70 S6 kinase and glycogen synthase kinase-3 activity in L6 muscle cells: evidence for the involvement of the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway in the L-leucine-induced up-regulation of System A amino acid transport." *Biochemistry Journal* 350: 361-368.

Pokoo-Aikins, A., J. R. Timmons, B. R. Min, W. R. Lee, S. N. Mwangi, and C. Chen. 2021. "Effects of feeding varying levels of DL-Methionine on live performance and yield of broiler chickens." *Animals* 11:2839. [doi:https://doi.org/10.3390/ani11102839](https://doi.org/10.3390/ani11102839)

Richards, J. D., C. A. Atwell, M. Vázquez-Añón, and J. J. Dibner. 2005. "Comparative in vitro and in vivo absorption of 2-Hydroxy-4(Methylthio)Butanoic Acid and methionine in the broiler chicken." *Poultry Science* 84: 1397-1405. [doi:https://doi.org/10.1093/ps/84.9.1397](https://doi.org/10.1093/ps/84.9.1397)

Romanet, S., J. R. Aschenbach, R. Pieper, J. Zentek, J. K. Htoo, R. A. Whelan, and L. Mastrototaro. 2020. "Dietary supplementation of DL-Methionine potently induces sodium-dependent L-Methionine absorption in porcine jejunum ex vivo." *The Journal of Nutrition* 150 (7): 1782-1789. [doi:https://doi.org/10.1093/jn/nxaa115](https://doi.org/10.1093/jn/nxaa115)

Romanet, S., J. R. Aschenbach, R. Pieper, J. Zentek, J. K. Htoo, R. A. Whelan, and L. Mastrototaro. 2021. "Expression of proposed methionine transporters along the gastrointestinal tract of pigs and their regulation by dietary methionine sources." *Genes & Nutrition* 16: 14. [doi:https://doi.org/10.1186/s12263-021-00694-4](https://doi.org/10.1186/s12263-021-00694-4)

Rostagno, H. S., L. F. T. Albino, J. L. Donzele, P. C. Gomes, R. F. Oliveira, D. C. Lopes, A. S. Ferreira, S. L. T. Barreto, and R. F. Euclides. 2011. "Tabelas brasileiras para aves e suínos (composição de alimentos e exigências nutricionais). In: Exigências nutricionais para frangos de corte." 3. ed. Viçosa, MG: Editora UFV; pp 107-124.

Shirazi-Beechey, S. P., A. W. Moran, D. J. Batchelor, K. Daly, and M. Al-Rammahi. 2011. "Glucose sensing and signalling; regulation of intestinal glucose transport." *Proceedings of the Nutrition Society* 70: 185-193. doi:<https://doi.org/10.1017/S0029665111000103>

Skiba-Cassy, S., I. Geurden, S. Panserat, and I. Seiliez. 2016. "Dietary methionine imbalance alters the transcriptional regulation of genes involved in glucose, lipid and amino acid metabolism in the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." *Aquaculture* 454: 56–65. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.12.015>

Thorens, B. Glucose transporters in the regulation of intestinal, renal, and liver glucose fluxes. 1996. *American Journal of Physiology* 270 (4): G541-543. doi:<https://doi.org/10.1152/ajpgi.1996.270.4.G541>

To, V. P. T. H., K. Masagounder, and M. E. Loewen. 2021. "Critical transporters of methionine and methionine hydroxy analogue supplements across the intestine: What we know so far and what can be learned to advance animal nutrition." *Comparative Biochemistry and Physiology* 255 (A): 110908. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2021.110908>.

Uddin, M. E., H. J. Van Lingen, P. G. Silva-Pires, D. I. Batonon-Alavo, F. Rouffineau, and E. Kebreab. 2022. "Evaluating growth response of broiler chickens fed diets supplemented with synthetic DL-methionine or DL-hydroxy methionine: a meta-analysis." *Poultry Science* 101: 101762. doi:<https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.101762>

Wang, Y., X. Yin, D. Yin, Z. Lei, T. Mahmood, and J. Yuan. 2019. "Antioxidant response and bioavailability of methionine hydroxy analog relative to DL-methionine in broiler chickens." *Animal Nutrition* 5: 241-247. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aninu.2019.06.007>

Yin, J., W. Ren, S. Chen, Y. Li, H. Han, J. Gao, G. Liu, X. Wu, T. Li, S. W Kim, and Yin, Y. 2018. “Metabolic regulation of methionine restriction in diabetes.” *Molecular Nutrition & Food Research* 62: 10:e1700951. [doi:https://doi.org/10.1002/mnfr.201700951](https://doi.org/10.1002/mnfr.201700951)

Zhang, S., E. R. Gilbert, K. J. T. Noonan, B. Saremi, and E. A. Wong. 2018a. “Gene expression and activity of methionine converting enzymes in broiler chickens fed methionine isomers or precursors.” *Poultry Science* 97: 2053–2063. [doi:http://dx.doi.org/10.3382/ps/pey037](http://dx.doi.org/10.3382/ps/pey037)

Zhang, S., E. R. Gilbert, B. Saremi, and E. A. Wong. 2017. “Physiological and biochemical aspects of methionine isomers and a methionine analogue in broilers.” *Poultry Science* 96: 425-439. [doi:http://dx.doi.org/10.3382/ps/pew253](http://dx.doi.org/10.3382/ps/pew253)

Zhang, S., E. R. Gilbert, B. Saremi, and E. A. Wong. 2018b. “Supplemental methionine sources have a neutral impact on oxidative status in broiler chickens.” *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 1–10. [doi:https://doi.org/10.1111/jpn.12946](https://doi.org/10.1111/jpn.12946)

Zhang, S., E. A. Wong, and Gilbert, E. R. 2015. “Bioavailability of different dietary supplemental methionine sources in animals.” *Frontiers in Bioscience* 7: 478-490. [doi:https://doi.org/10.2741/e744](https://doi.org/10.2741/e744)

Zou, K., S. Rouskin, K. Dervishi, M. A. McCormick, A. Sasikumar, C. Deng, Z. Chen, M. Kaeberlein, R. B. Brem, M. Polymenis, B. K. Kennedy, J. S. Weissman, J. Zheng, Q. Ouyang, and H. Li. 2020. “Life span extension by glucose restriction is abrogated by methionine supplementation: Cross-talk between glucose and methionine and implication of methionine as a key regulator of life span.” *Science Advances* 6: eaba1306. [doi:https://doi.org/10.1126/sciadv.aba1306](https://doi.org/10.1126/sciadv.aba1306)

Figure 1. Graphic representation of the gene expression of glucose transporters, **(A.)** SGLT1, **(B.)** GLUT2 and **(C.)** GLUT5 in the jejunum of broilers (mean±SEM; n=6). ^{a-b}Different letters indicate a statistical difference by test t with p<0.10.

Figure 2. Graphic representation of gene expression of system A transporters, **(A.)** SAT1, **(B.)** SAT2 and **(C.)** SAT3 in the jejunum of broilers (mean±SEM; n=6). ^{A-B}Different letters indicate a statistical difference between levels by test t with p<0.10. ^{a-b}Different letters indicate a statistical difference by test t with p<0.10.

Figure 3. Graphic representation of the gene expression of system y⁺L transporters, **(A.)** y⁺LAT1 and **(B.)** y⁺LAT2; and system L transporters, **(C.)** LAT1, in the jejunum of broilers (mean±SEM; n=6). ^{a-c}Different letters indicate a statistical difference by test t with p<0.10.

Figure 4. Graphic representation of the gene expression of system B^{0,+} transporters, **(A.)** B⁰AT; and system b^{0,+} transporters, **(B.)** b^{0,+}AT and **(C.)** rBAT, in the jejunum of broilers (mean±SEM; n=6). ^{a-c}Different letters indicate a statistical difference by test t with p<0.10.

Tabelas

Table 1. Feed composition and nutrient contents of diets formulated for broilers.

Ingredients, %	DL-Methionine			DL-HMTBA		
	Initial (8-21d)	Growth (22-33d)	Final (34-42d)	Initial (8-21d)	Growth (22-33d)	Final (34-42d)
Corn (7.88%)	56.716	62.175	62.506	56.716	62.175	62.506
Soybean meal (45%)	35.775	30.132	28.685	35.775	30.132	28.685
Soy oil	3.291	3.692	4.500	3.291	3.692	4.500
Dicalcium phosphate (18.1%)	1.558	1.353	1.151	1.558	1.353	1.151
Limestone	0.945	0.889	0.759	0.945	0.889	0.759
DL-Methionine (98%)	0.062	0.060	0.014	-	-	-
DL-HMTBA (88%)	-	-	-	0.070	0.068	0.016
L-Lysine HCl (78.4%)	0.245	0.308	0.315	0.245	0.308	0.315
L-Threonine (99%)	0.084	0.103	0.144	0.084	0.103	0.144
L-Arginine (99%)	0.000	0.058	0.191	0.000	0.058	0.191
L-Valine (99%)	0.000	0.086	0.084	0.000	0.086	0.084
L-Tryptophan (99%)	0.000	0.000	0.024	0.000	0.000	0.024
Starch	0.400	0.400	0.400	0.400	0.400	0.400
Salt	0.491	0.338	0.743	0.491	0.338	0.743
Choline chloride (60%)	0.100	0.070	0.100	0.100	0.070	0.100
Vitamin premix ¹	0.050	0.050	0.100	0.050	0.050	0.100
Mineral premix ²	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050
Cocciostat ³	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
Bacitracin zinc	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015
Antioxidant ⁴	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010
Inert ⁵	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Calculated energy and nutrients content, %						
ME (kcal/kg)	3050.00	3150.00	3200.00	3050.00	3150.00	3200.00
Crude protein	20.98	19.00	18.40	20.98	19.00	18.40
Calcium	0.841	0.758	0.663	0.841	0.758	0.663
Available phosphor	0.401	0.354	0.309	0.401	0.354	0.309
Methionine	0.343	0.318	0.266	0.343	0.318	0.266
Methionine+Cystine	0.630	0.580	0.520	0.630	0.580	0.520
Threonine	0.791	0.735	0.750	0.791	0.735	0.750
Tryptofan	0.236	0.206	0.220	0.236	0.206	0.220
Lysine	1.217	1.131	1.100	1.217	1.131	1.100
Valine	0.891	0.880	0.850	0.891	0.880	0.850
Arginine	1.327	1.221	1.300	1.327	1.221	1.300
Sodium	0.210	0.150	0.310	0.210	0.150	0.310
Chlorine	0.345	0.254	0.495	0.345	0.254	0.495
Potassium	0.819	0.732	0.706	0.819	0.732	0.706

Mogin number (mEq/kg): Initial: 203.59; Growth: 180.63; Final: 176.07.

¹Vitamin premix: Vit A 1.000.000 UI; Vit D3 1.700.000 UI; Vit E 20.000 mg; Vit K3 2.000 mg; Vit B1 2.000 mg; Vit B2 4.000 mg; Vit B6 2.000 mg; Vit B12 10.000 mcg; Niacin 20.000 mg; Pantothenate acid 10.000 mg; Biotin 25 mg; Folic acid 500 mg; ²Mineral premix: Selenium 250 mg; Manganese 75.000 mg; Zinc 70.000 mg; Iron 50.000 mg; Copper 8.500 mg; Iodine 1.500 mg; Cobalt 200 mg. ³Salinomycin sodium salt 12g. ⁴Butylated hydroxytoluene (BHT) 200 ppm. ⁵Kaolin.

Table 2. Primers used for quantitative real time PCR in *Gallus gallus domesticus*.

SLC Name	Gene	GenBank ID	Description/Function	Forward/Reverse primer
SLC5A1	SGLT1	XM_046928028.1	Na ⁺ dependent glucose and galactose transporter	GTGAAGACCCAGGATGCCTA TTCCTCTTCCTCCTTGCTCA
SLC2A2	GLUT2	NM_207178.2	Na ⁺ independent glucose, galactose and fructose transporter	TCGTGCCCATGTATGTGAGT TGAGGATGCCTGTGACGATA
SLC2A5	GLUT5	XM_004947446.5	Na ⁺ independent fructose transporter	CTTCCTCTTGCGCTGGTAAC CATGTATGGGGCTGGAGAGT
SLC38A1	SAT1	NM_001199603.3	Na ⁺ dependent neutral amino acid transporter 1	GGAAACAGGCTGCATGGTAT CGTACCATGCCGAAAAAGTT
SLC38A2	SAT2	NM_001305439.2	Na ⁺ dependent neutral amino acid transporter 2	GCCATGGCTAACACTGGAAT CCAGAAGCAGCAAGTTTTCC
SLC38A3	SAT3	XM_040681903.2	Na ⁺ dependent neutral amino acid transporter 3	TTTGACGTGCTGATCCTCTG GATGGAGGGAGCAAAAATGA
SLC6A14	ATB ^{0,+}	XM_003641135.6	Na ⁺ and Cl ⁻ dependent neutral and cationic amino acid	GTGGAGGATGTGCTGGTTTT AGCCATAAGTGGGAGCTGAA
SLC7A7	y ⁺ LAT1	XM_418326.8	Na ⁺ independent cationic and Na ⁺ dependent neutral amino acid	TACAGCGCTTCCTACGGACT ACAATGGATGCTCCCAACTC
SLC7A6	y ⁺ LAT2	XM_015292302.4	Na ⁺ independent cationic and Na ⁺ dependent neutral amino acid	TTGGAAGGAACCAAATCGAG TAGAGTGGCACAACCACGAG
SLC7A5	LAT1	NM_001030579.3	Na ⁺ independent branched-chain and aromatic amino acid transporter	TGCTCTACGCCTTCTCCAAT GCAGCCACATCATACCAATG
SLC7A9	b ^{0,+} AT	NM_001199133.2	Na ⁺ independent cationic amino acid transporter	GCATCTTTGTTTCCCCAAAA GTGCACCTAGTGTGCCAGA
SLC6A19	B ⁰ AT	XM_419056.8	Na ⁺ dependent neutral amino acid transporter	TATCCCCCTGCTTCATCTTG CACCTTTCAGGGTAGGGTGA
SLC3A1	rBAT	XM_004935370.5	Heavy chain corresponding to the b ^{0,+} transport system	TGAAGGGCTTACCAATGGAG CTTGGCTGCTGGTGTGTCAGTA
-	β-Actin	L_08165.1	-	ACCCCAAAGCCAACAGA CCAGAGTCCATCACAATACC

Table 3. Gene expression of glucose transporters in the jejunum of broilers.

Main effects ¹	SGLT1	GLUT2	GLUT5
Source			
DL-Met	1.124±0.133 ^b	1.058±0.096	1.091±0.092
DL-HMTBA	1.548±0.137 ^a	1.144±0.122	1.078±0.132
<i>P value</i>	0.0065	0.5592	0.9148
Level			
Less 0.25	1.781±0.217 ^a	1.281±0.185	1.383±0.157 ^a
Requirement	1.233±0.076 ^b	0.991±0.064	1.205±0.070 ^a
Plus 0.25	0.995±0.121 ^b	1.031±0.116	0.666±0.074 ^b
<i>P value</i>	0.0004	0.2314	0.0001
Source x Level			
DL-Met			
Less 0.25	1.364±0.328 ^b	1.020±0.189 ^b	1.221±0.230 ^{ab}
Requirement	1.319±0.120 ^b	0.963±0.079 ^b	1.209±0.089 ^{ab}
Plus 0.25	0.689±0.051 ^c	1.190±0.218 ^{ab}	0.844±0.092 ^{bc}
DL-HMTBA			
Less 0.25	2.197±0.177 ^a	1.541±0.298 ^a	1.545±0.213 ^a
Requirement	1.147±0.091 ^{bc}	1.018±0.108 ^{ab}	1.201±0.116 ^{ab}
Plus 0.25	1.300±0.156 ^b	0.873±0.042 ^b	0.488±0.055 ^c
<i>P value</i>	0.0208	0.0806	0.0889

^{a-c}Different letters in the same column indicate a statistical difference by test t with $p < 0.10$.

¹Each value represents the average of 6 repetitions. Mean±SEM

Table 4. Gene expression of systems A and y⁺L of methionine transporters in the jejunum of broilers.

Main effects ¹	SAT1	SAT2	SAT3	y ⁺ LAT1	y ⁺ LAT2
Source					
DL-Met	1.148±0.072 ^b	1.133±0.065	1.119±0.107	1.370±0.094	0.866±0.068 ^b
DL-HMTBA	1.730±0.222 ^a	1.386±0.188	0.975±0.067	1.358±0.116	1.436±0.114 ^a
<i>P value</i>	0.0167	0.1415	0.2354	0.9275	<0.0001
Level					
Less 0.25	1.610±0.250	1.661±0.226 ^a	1.071±0.099	1.310±0.131	1.344±0.177 ^a
Requirement	1.250±0.069	1.136±0.062 ^b	0.982±0.092	1.450±0.129	1.121±0.053 ^b
Plus 0.25	1.457±0.276	0.983±0.135 ^b	1.088±0.140	1.333±0.131	0.988±0.151 ^b
<i>P value</i>	0.4459	0.0064	0.7380	0.6721	0.0677
Source x Level					
DL-Met					
Less 0.25	1.023±0.120	1.244±0.117 ^b	1.090±0.190 ^{ab}	1.066±0.098 ^c	0.898±0.166 ^{bc}
Requirement	1.201±0.094	1.159±0.113 ^b	0.879±0.115 ^{ab}	1.744±0.147 ^a	1.013±0.078 ^{bc}
Plus 0.25	1.220±0.159	0.997±0.101 ^b	1.388±0.205 ^a	1.301±0.112 ^{abc}	0.686±0.056 ^c
DL-HMTBA					
Less 0.25	2.197±0.351	2.077±0.376 ^a	1.052±0.085 ^{ab}	1.554±0.205 ^{ab}	1.789±0.176 ^a
Requirement	1.298±0.106	1.113±0.063 ^b	1.084±0.141 ^{ab}	1.155±0.133 ^{bc}	1.229±0.044 ^b
Plus 0.25	1.694±0.538	0.969±0.264 ^b	0.788±0.093 ^b	1.365±0.250 ^{abc}	1.289±0.248 ^b
<i>P value</i>	0.1683	0.0650	0.0291	0.0108	0.0897

^{a-c}Different letters in the same column indicate a statistical difference by test t with p<0.10.

¹Each value represents the average of 6 repetitions. Mean±SEM.

Table 5. Gene expression of systems L, b^{0,+} and B^{0,+} of methionine transporters in the jejunum of broilers.

Main effects ¹	LAT1	b ^{0,+} AT	rBAT	B ⁰ AT	ATB ^{0,+}
Source					
DL-Met	1.204±0.117 ^a	1.152±0.096	1.146±0.106	1.142±0.096	1.352±0.116
DL-HMTBA	0.897±0.088 ^b	1.203±0.115	1.466±0.217	1.372±0.152	1.190±0.134
<i>P value</i>	0.0420	0.6850	0.1357	0.1813	0.3415
Level					
Less 0.25	1.083±0.105	1.280±0.145	1.653±0.293 ^a	1.354±0.158	1.469±0.176
Requirement	1.062±0.140	1.124±0.055	1.136±0.104 ^b	1.132±0.057	1.252±0.090
Plus 0.25	1.007±0.159	1.128±0.163	1.130±0.171 ^b	1.286±0.219	1.093±0.172
<i>P value</i>	0.9059	0.5032	0.0800	0.5503	0.2039
Source x Level					
DL-Met					
Less 0.25	1.135±0.118 ^{ab}	0.929±0.109 ^c	1.071±0.201 ^b	0.931±0.115 ^b	1.302±0.250
Requirement	1.089±0.271 ^{ab}	1.088±0.063 ^{bc}	1.002±0.104 ^b	1.064±0.084 ^b	1.391±0.155
Plus 0.25	1.388±0.206 ^a	1.441±0.225 ^{ab}	1.365±0.223 ^b	1.431±0.218 ^{ab}	1.365±0.223
DL-HMTBA					
Less 0.25	1.031±0.183 ^{ab}	1.632±0.178 ^a	2.235±0.450 ^a	1.777±0.161 ^a	1.636±0.250
Requirement	1.035±0.116 ^{ab}	1.161±0.094 ^{bc}	1.269±0.173 ^b	1.200±0.073 ^{ab}	1.113±0.062
Plus 0.25	0.625±0.102 ^b	0.815±0.165 ^c	0.896±0.241 ^b	1.141±0.394 ^b	0.821±0.226
<i>P value</i>	0.0989	0.0005	0.0124	0.0319	0.1091

^{a-c}Different letters in the same column indicate a statistical difference by test t with p<0.10.

¹Each value represents the average of 6 repetitions. Mean±SEM.

Figura 1

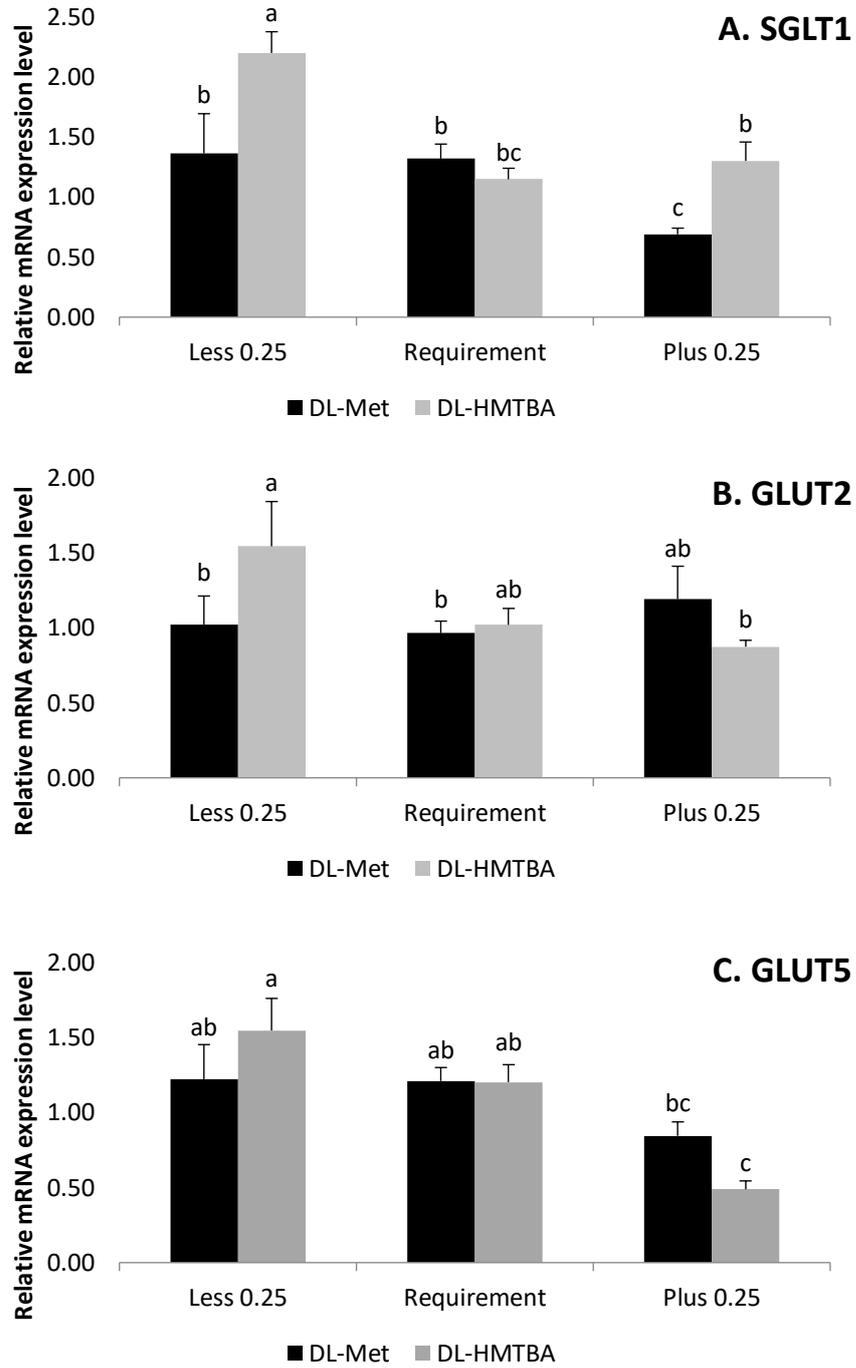


Figura 2

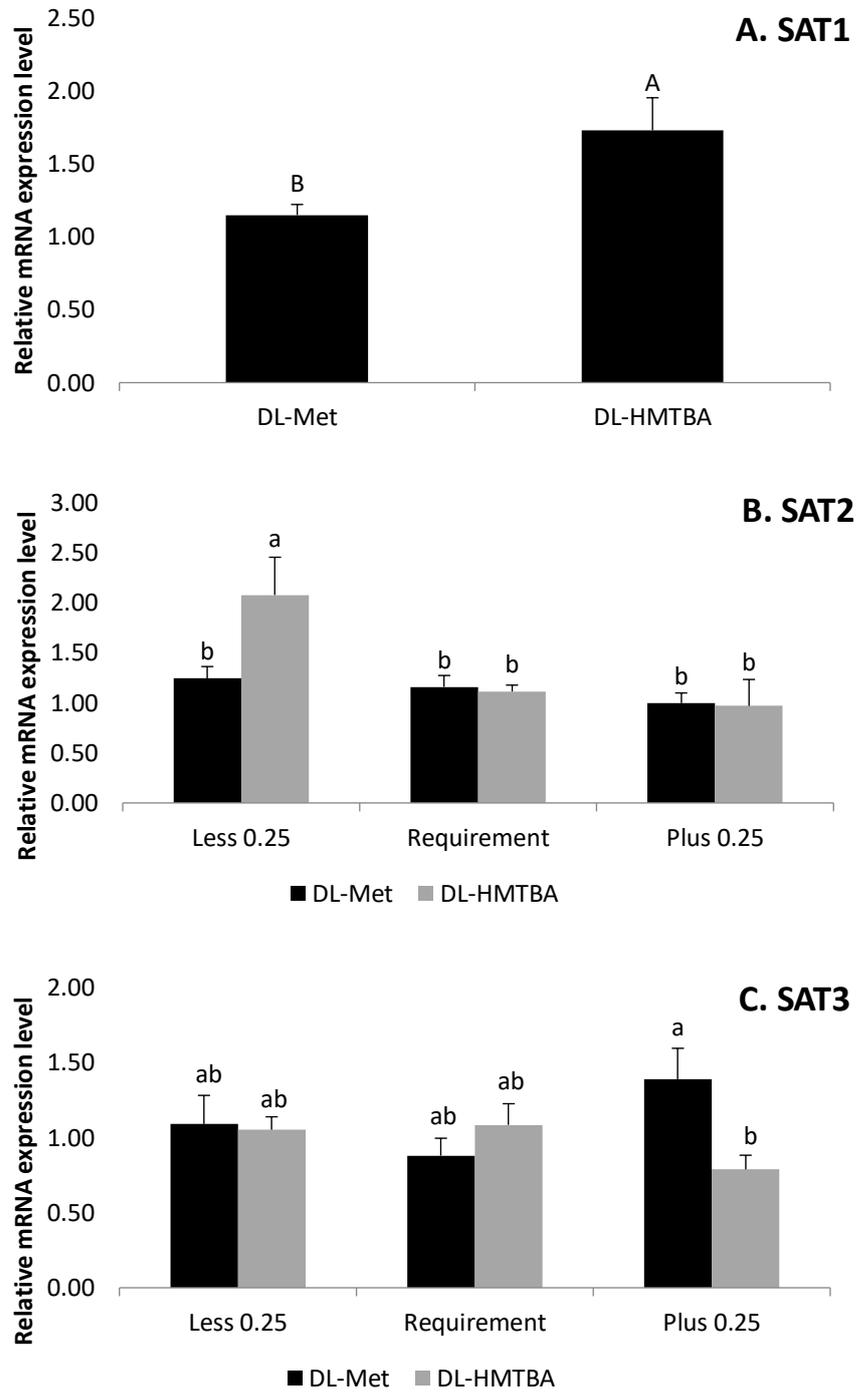


Figura 3

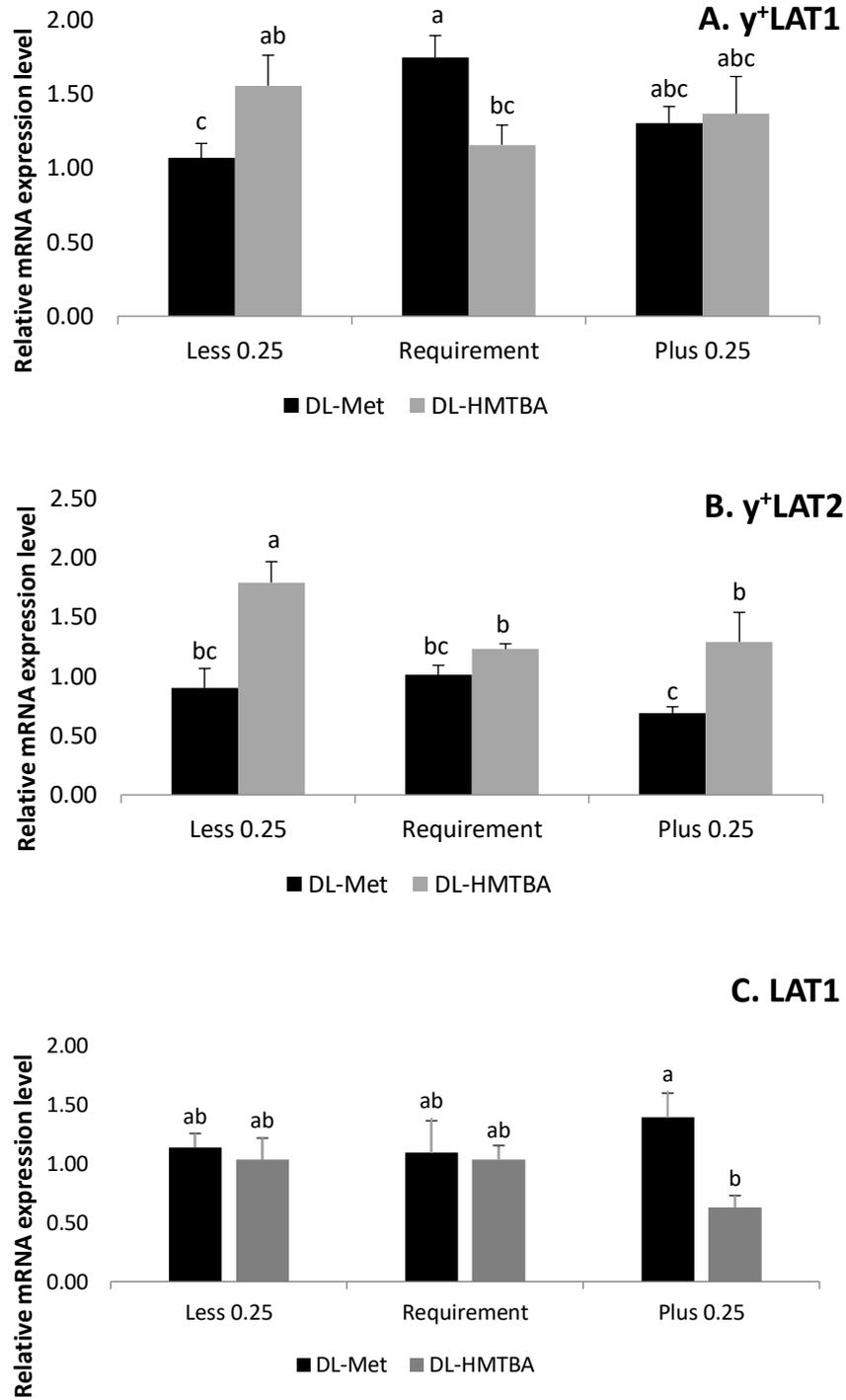
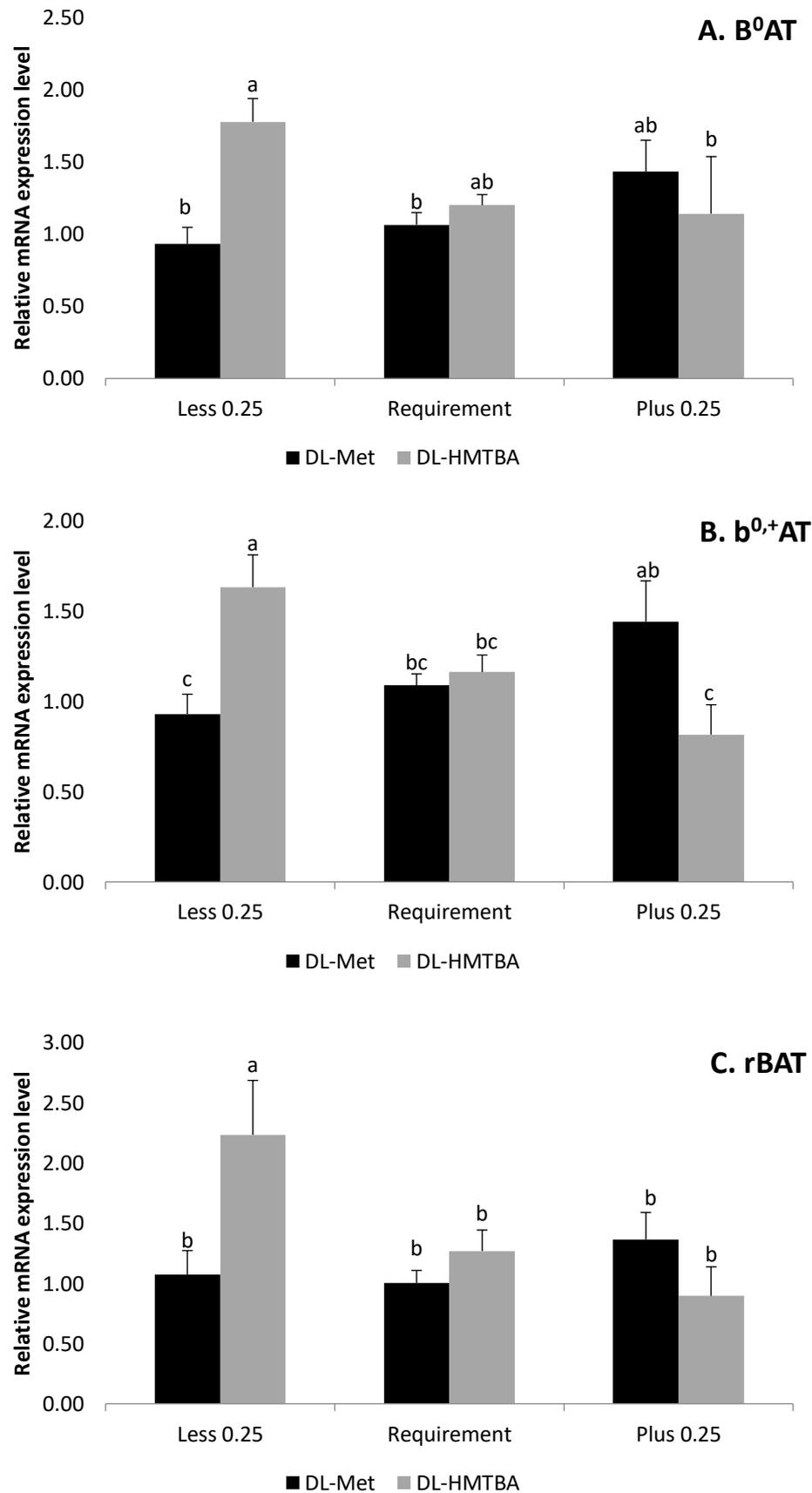


Figura 4



CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES

A partir desse trabalho é possível fazer algumas inferências, as fontes de metionina (DL-Met e DL-HMTBA) e os diferentes níveis de metionina avaliados nesse estudo influenciam de forma diferente o metabolismo dos aminoácidos sulfurosos e a quantidade de transportadores jejunais de metionina e glicose em frangos de corte.

Em função da sua natureza não aminoacídica, a DL-HMTBA desencadeia sinais de deficiência de metionina no organismo das aves, aumentando a quantidade de transportadores jejunais. Além disso, no processo de remetilação da metionina, DL-HMTBA estimula mais a via do tetra hidrofolato.

Também foi possível verificar a relação entre a suplementação de metionina e a expressão de transportadores de glicose em frangos de corte, na qual a deficiência de metionina resultou em maior expressão de transportadores de glicose, indicando relação entre esses nutrientes e sendo esta relação influenciada pelo estado nutricional da célula, cabendo mais investigações acerca desse tema.

Com os resultados alcançados nesse estudo é possível recomendar a suplementação de aminoácidos sulfurosos utilizando ambas as fontes, com ligeiro aumento do nível de suplementação quando utilizada a DL-HMTBA. Entender a relação nutrigenômica entre a metionina e a genes relacionados ao metabolismo e absorção de aminoácidos sulfurosos pode ajudar na construção de planos alimentares mais eficientes, levando em consideração fatores externos, como a fonte utilizada e o nível de suplementação.