

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS  
CURSO DE ZOOTECNIA  
MONOGRAFIA DE CONCLUSÃO DE CURSO

**EXPRESSÃO GÊNICA NO FÍGADO DE FRANGOS DE  
CORTE NA FASE DE 1 A 21 DIAS EM FUNÇÃO DO  
BALANÇO ELETROLÍTICO DIETÉTICO**

DISCENTE: Laryssa Vieira da Silva

ORIENTADORA: Profª Drª Katiene Régia Silva Sousa

CHAPADINHA-MA

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS  
CURSO DE ZOOTECNIA  
MONOGRAFIA DE CONCLUSÃO DE CURSO

**EXPRESSÃO GÊNICA NO FÍGADO DE FRANGOS DE  
CORTE NA FASE DE 1 A 21 DIAS EM FUNÇÃO DO  
BALANÇO ELETROLÍTICO DIETÉTICO**

Monografia apresentada ao curso de Zootecnia da Universidade Federal do Maranhão como requisito indispensável para Graduação em Zootecnia

DISCENTE: Laryssa Vieira da Silva

ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Katiene Régia Silva Sousa

CHAPADINHA-MA

2019

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Silva, Laryssa Vieira da.

Expressão gênica no fígado de frangos de corte na fase de 1 a 21 dias em função do balanço eletrolítico dietético / Laryssa Vieira da Silva. - 2019.

40 f.

Orientador(a): Katiene Régia Silva Sousa.

Monografia (Graduação) - Curso de Zootecnia,  
Universidade Federal do Maranhão, CHAPADINHA-MA, 2019.

1. Avicultura. 2. Estresse calórico. 3. Melhoramento genético. 4. Nutrigênomica. I. Sousa, Katiene Régia Silva. II. Título.

LARYSSA VIEIRA DA SILVA

**EXPRESSÃO GÊNICA NO FÍGADO DE FRANGOS DE CORTE NA FASE DE 1 A  
21 DIAS EM FUNÇÃO DO BALANÇO ELETROLÍTICO DIETÉTICO**

Monografia apresentada ao curso de Zootecnia da Universidade Federal do Maranhão como requisito indispensável para obtenção do título de bacharel em Zootecnia

Aprovado em: 13/ 12/ 2019

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Katiene Régia Silva Sousa  
Curso de Zootecnia-CCAA/UFMA

---

Prof<sup>º</sup>. Dr<sup>º</sup>. Alécio Matos Pereira  
Curso de Zootecnia-CCAA/UFMA

---

Prof<sup>º</sup>. Dr<sup>º</sup>. Marcos Antonio Delmondes Bomfim  
Curso de Zootecnia-CCAA/UFMA

CHAPADINHA-MA

2019

“Aos meus avós João Guilherme e Maria Vieira (*in memoriam*) e, a minha querida mãe Maria do Amparo que sempre serão grandes exemplos de dignidade e caráter para mim”.

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus** pela vida e por me dar forças para continuar todos os dias e por seus planos serem sempre maiores do que os meus sonhos.

Agradeço a minha mãe **Maria do Amparo** por ser mãe, amiga, educadora, guerreira e sinônimo de amor, a senhora é a mulher da minha vida.

A minha orientadora **Katiene Régia Silva Sousa** pela sua paciência, compreensão, disposição para ensinar..., muito obrigada por persistir.

Aos meus “Best’s” de turma, pelos momentos descontraídos e de sufoco (rsrs) **Maria das Neves, Rafael Carvalho, Louis Ramos, Gleydson, Helena Reis, Grazielle Oliveira, Alayne Cutrim, Daylaine Oliveira, Eluianne, Juliana, Luana França, José Neto, Genival Rocha e Arlan Araújo**. Foi inesquecível passar esses cinco anos na companhia de vocês.

Aos outros best’s que tive o prazer de conviver durante a minha graduação **Gabriela Oliveira, César Alves, Leonardo Miranda, Ygor Nascimento, Wanderson Araújo, Julyane Mendes, Isabel Silva, Nataline e Diana Carneiro**, vocês são incríveis.

Aos meus best’s **Júnior Aguiar, Wéllina Ribeiro, Laís Lourenço, Janaiane Ferreira, Wanderson Oliveira e Islana Pontes** pela amizade e apoio que sempre me deram desde ensino médio. Vocês são maravilhosos e sempre vou carregar vocês no meu coração e na vida.

Agradeço ao professor **Torres** pela oportunidade e por seus ensinamentos durante minha estada no grupo de Reprodução, no qual serviu como pilar para minha formação, assim como os seus integrantes **Héllyda Gomes, Itamara Gomes, Diego Ribeiro, Celso Barros, Joaquim Lima, Joaquim Henrique e Bento Douglas** que foram fundamentais, de coração-muito obrigada.

Aos professores do CCAA/UFMA-campus IV pelos seus conhecimentos e incentivo repassados em sala de aula que foram essenciais para meu aprendizado, em especial os professores **Zinaldo Firmino, Rosane Cláudia, Jefferson Siqueira, Marcos Bomfim, Alécio Matos, Henrique Parente e Felipe Barbosa**.

Aos **colegas, professores, funcionários da limpeza, técnicos, familiares, vizinhos e outras pessoas** pelas caronas que de forma direta ou indireta contribuíram para que esse sonho fosse realizado.

E por fim agradeço ao **CCAA/UFMA**, por ter proporcionado a oportunidade de ter cursado esse belíssimo curso **ZOOTECNIA**.

"É impossível viver sem fracassar em algo, a não ser que você viva tão cautelosamente que é como se você nem estivesse vivendo — o que também é um fracasso" (**J.K. Rowling**).

## RESUMO

O frango de corte atual tornou-se receptível a um grande número de variáveis que interfere de modo direto no equilíbrio ácido-básico (EAB) no qual tem interação direta com o balanço eletrolítico dietético (BED). Vários estudos tem comprovado o efeito do BED na criação de frangos de corte, porém, poucos foram encontrados relacionados à expressão de genes. Portanto, objetivou-se com este estudo avaliar a expressão de genes relacionados ao EAB, absorção e transporte de nutrientes no fígado de frangos de corte aos 21 dias com diferentes níveis de balanço eletrolítico. O experimento foi realizado no setor de Avicultura do Colégio Técnico de Bom Jesus, da Universidade Federal do Piauí, foram utilizados 245 pintos machos da linhagem Cobb. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco níveis de BED (110, 175, 240, 305 e 370 mEq/Kg) e 7 repetições de 7 aves cada. Foi feita a análise da expressão dos genes *ATP1A1*, *SLC1A1*, *SLC5A1*, *SLC7A6*, *SLC12A2* e *SLC26A4* no fígado de frangos de corte aos 21 dias de idade. Houve diferença na expressão dos transcritos ( $p < 0,05$ ) para os genes *ATP1A1*, *SLC1A1*, *SLC5A1*, *SLC7A6*, *SLC12A2* e *SLC26A4* nas amostras de fígado. O BED afeta a expressão gênica em frangos de corte aos 21 dias.

Palavras-chave: avicultura, estresse calórico, melhoramento genético, nutrigenômica



## ABSTRACT

Current broiler chicken has become receptive to a large number of variables that directly interfere with acid-base balance (EAB) in which it has direct interaction with dietary electrolyte balance (BED). Several studies have proven the effect of BED on broiler rearing, but few have been found related to gene expression. Therefore, the objective of this study was to evaluate the gene expression related to EAB, absorption and nutrient transport in the liver of broilers at 21 days with different levels of electrolyte balance. The experiment was carried out in the poultry sector of the Technical College of Bom Jesus, Federal University of Piauí. We used 245 male Cobb chicks. The experimental design was completely randomized with five levels (110, 175, 240, 305 and 370 mEq / kg) of BED and 7 replications of 7 birds each. The gene expression analysis of the *ATP1A1*, *SLC1A1*, *SLC5A1*, *SLC7A6*, *SLC12A2* and *SLC26A4* in the liver of broilers at 21 days of age was made. There was a difference in transcript expression ( $p < 0.05$ ) for the *ATP1A1*, *SLC1A1*, *SLC5A1*, *SLC7A6*, *SLC12A2* and *SLC26A4* genes in liver samples. The BED affects gene expression in broilers at 21 days.

Key words: poultry, heat stress, genetic improvement, nutrigenomics

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	14
2. OBJETIVO.....	15
3. REFERENCIAL TEÓRICO .....	15
3.1. Estresse por calor em frangos de corte.....	15
3.2 Equilíbrio ácido-básico em frangos de corte.....	16
3.3 Distúrbios relacionados ao desequilíbrio ácido básico .....	17
3.4 Nutrigenômica e genes relacionados ao balanço eletrolítico .....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	21
5. Análise da expressão gênica.....	25
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	30
7. CONCLUSÃO.....	35
REFERÊNCIAS.....	36

**LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

*ATP1A1* – Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase subunidade  $\alpha$  1

BED – Balanço Eletrolítico Dietético

BEO – Balanço Eletrolítico do Organismo

EAAT3 – Trocador de aminoácidos excitatório 3

*HPRT1* – Hipoxantina fosforribosil transferase 1

*SLC1A1* – Carreador de solutos 1 A 1

*SLC5A1* – Carreador de solutos 5 A 1

*SLC12A2* - Carreador de solutos 12 A 2

*SLC7A6* – Carreador de solutos 7 A 6

*SLC26A4* – Carreador de solutos 26 A 4

SLGT1 – Transportador de Na<sup>+</sup> e glicose 1

$\gamma$ <sup>+</sup>LAT2 – Transportador de aminoácidos leves 2

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Composição das dietas basais para fase pré-inicial (1 a 7 dias) e inicial (8 a 21 dias) de frangos de corte utilizada no experimento .....	23
Tabela 2. Valores da inclusão de $K_2CO_3$ , $NaHCO_3$ e $NH_4Cl$ para compor o balanço eletrolítico dietético (BED) das dietas experimentais para frangos de corte em substituição do inerte.....	24
Tabela 3. Níveis de sódio ( $Na^+$ ), potássio ( $K^+$ ), cloro ( $Cl^-$ ) e relações entre os eletrólitos presentes nas dietas experimentais.....	25
Tabela 4. Localização celular (LC), vias metabólicas (VM) e processos biológicos (PB) dos genes utilizados no qRT-PCR .....	27
Tabela 5. Sequências de nucleotídeos, tamanho do amplicon (AMPL) e temperatura de anelamento (TA) dos primers utilizados para as reações de qRT-PCR .....	28

**LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1. Expressão relativa de mRNA ( $2^{-\Delta Ct}$ ) do gene *ATP1A1*, no fígado de frangos de corte aos 21 dias alimentados com diferentes níveis de balanço eletrolítico dietético (BED) .....30
- Figura 2. . Expressão relativa de mRNA ( $2^{-\Delta Ct}$ ) do gene *SLC1A1*, no fígado de frangos de corte aos 21 dias alimentados com diferentes níveis de balanço eletrolítico dietético (BED) .....31
- Figura 3. Expressão relativa de mRNA ( $2^{-\Delta Ct}$ ) do gene *SLC5A1*, no fígado de frangos de corte aos 21 dias alimentados com diferentes níveis de balanço eletrolítico dietético (BED) .....32
- Figura 4. Expressão relativa de mRNA ( $2^{-\Delta Ct}$ ) do gene *SLC7A6*, no fígado de frangos de corte aos 21 dias alimentados com diferentes níveis de balanço eletrolítico dietético (BED) .....33
- Figura 5. Expressão relativa de mRNA ( $2^{-\Delta Ct}$ ) do gene *SLC12A2*, no fígado de frangos de corte aos 21 dias alimentados com diferentes níveis de balanço eletrolítico dietético (BED) .....34
- Figura 6. Expressão relativa de mRNA ( $2^{-\Delta Ct}$ ) do gene *SLC26A4*, no fígado de frangos de corte aos 21 dias alimentados com diferentes níveis de balanço eletrolítico dietético (BED) .....34

## 1. INTRODUÇÃO

A avicultura dentre os diversos sistemas de produção animal é o que tem mostrado os maiores índices de evolução nos últimos anos, sendo uma das atividades mais importantes para a economia brasileira. Isso é reflexo de resultantes avanços nas áreas de sanidade, nutrição, instalações e melhoramento genético (LOPES et al., 2015), tornando a indústria avícola um dos setores mais eficientes da agropecuária.

O frango de corte contemporâneo, geneticamente selecionado para máxima produção e metabolismo acelerado, tornou-se receptível a um grande número de variáveis, destacando-se, dentre elas, os fatores ambientais, que interferem diretamente na expressão do potencial genético, na eficiência de utilização de nutrientes e nos aspectos sanitários das aves (RIBEIRO, 2018). Dessa forma, o estresse por calor é um dos maiores obstáculos na criação de frangos de corte, sobretudo na região nordeste do Brasil, no qual predomina temperaturas elevadas e intensa radiação solar, apresentando uma série de restrições com relação à criação desses animais, pois eles são muito susceptíveis a variações de temperatura, ocasionando redução na produção (SILVA et al., 2015).

Além das condições ambientais, a dieta também pode influenciar o desempenho desses animais, pois interfere de modo direto no equilíbrio ácido-básico (EAB) (soma dos íons sódio ( $\text{Na}^+$ ), potássio ( $\text{K}^+$ ) e cloro ( $\text{Cl}^-$ )) afetando, principalmente, a saúde e a performance das aves (VIEITES et al., 2011). É fundamental a determinação dos níveis ideais dos íons sódio ( $\text{Na}^+$ ), potássio ( $\text{K}^+$ ) e cloro ( $\text{Cl}^-$ ) na ração para cada etapa de produção das aves, pois são essenciais à manutenção da pressão osmótica, no controle da passagem de nutrientes pela membrana celular, no EAB e metabolismo da água (De MATOS et al., 2009).

Segundo Gonçalves et al. (2009), existe uma interação complexa entre nutrição e genoma que afeta diretamente a função celular. Apesar de já está elucidado que a composição dos alimentos afeta a expressão de determinados genes e, em consequência, a expressão fenotípica (BERGMANN et al., 2006; GONÇALVES et al., 2009), pesquisas na área de nutrigenômica procuram orientar sobre a elaboração de dietas mais específicas considerando a composição nutricional dos

alimentos e saúde dos animais, visando melhorar as rotas metabólicas e, portanto, aumento da produção (GAYK HUMBERTO; VÂNIA MIRELLE, 2018).

## **2. OBJETIVO**

Avaliar a expressão dos genes *ATP1A1*, *SLC1A1*, *SLC5A1*, *SLC7A6*, *SLC12A2* e *SLC26A4*, relacionados ao equilíbrio ácido-básico, absorção e transporte de nutrientes no fígado de frangos de corte submetidos a rações com diferentes níveis de balanço eletrolítico.

## **3. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **3.1. Estresse por calor em frangos de corte**

As aves são classificadas como animais homeotérmicos, ou seja, têm a capacidade de manter o equilíbrio entre o calor que o metabolismo produz (termogênese) e a perda (termólise) para o ambiente externo (De FREITAS et al., 2017). Porém, este processo é considerado eficiente somente quando a temperatura ambiente se encontra dentro dos limites aceitáveis (LOPES et al., 2015).

A zona de termoneutralidade, ou zona de conforto térmico, é o ambiente com uma temperatura ideal para as aves, onde não há sensação de frio ou de calor, e o desempenho é otimizado em qualquer atividade (LOPES et al., 2015). Desta forma, é importante manter a temperatura ambiente dos aviários próxima das condições de conforto (ABREU; ABREU, 2011), pois animais fora da zona de termoneutralidade (estressados) respondem com alterações comportamentais, fisiológicas e bioquímicas, mostrando redução na produção, reprodução e na resistência do organismo (BRIDI, 2010).

Com base nessas informações, Gomes et al. (2016) relataram que condições de conforto térmico são difíceis de serem alcançadas em países de clima predominantemente tropical, como o Brasil, uma vez que a intensa radiação solar e, a temperatura ambiente são muito elevadas durante o ano. Do ponto de vista de Marchini (2007) e de Sevegnani (2005) essas variáveis são consideradas desfavoráveis à criação de frangos de corte, em razão de serem animais homeotérmicos, ocasionando em baixo desempenho zootécnico, crescimento abaixo

do previsto e o peso à idade de abate inferior quando comparado a animais criados em áreas com maior conforto térmico.

De acordo com Nascimento et al. (2011), a redução na cobertura de penas altera a faixa de conforto térmico das aves, tornando-as mais adaptadas a altas temperaturas. Neste ponto em específico, Navas et al. (2016) relataram que as aves são mais adeptas a ambientes frios, pois sua capacidade de reter calor é mais eficiente em comparação com a capacidade de dissipar calor. Além disso, o estresse por calor depende da fase de produção das aves, da idade, tamanho e diferentes instalações. Então, a resposta ao estresse térmico irá variar de maneiras específicas entre diferentes categorias.

Segundo Teixeira; Abreu (2011); Souza et al. (2002), o efeito do estresse térmico causado nas aves eleva a frequência respiratória, resultando em um aumento no nível de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) expirado, ocasionando em muitas perdas dos resultados zootécnicos, podendo provocar alcalose respiratória e, portanto, o desequilíbrio ácido-básico, prejudicando o desempenho da ave, caso não retorne ao equilíbrio homeostático. Souza et al. (2002) descreveram que para manter o equilíbrio ácido-básico da ave ocorre a diminuição da pressão parcial de  $\text{CO}_2$  ( $\text{pCO}_2$ ) levando à redução na concentração de ácido carbônico ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ) e hidrogênio ( $\text{H}^+$ ). Ademais, há uma diminuição na atividade da cadeia transportadora de elétrons, seguida por alta produção de espécies reativas de oxigênio (YANG, et al., 2010), alterando, portanto, a expressão de genes.

### **3.2 Equilíbrio ácido-básico em frangos de corte**

O equilíbrio do balanço eletrolítico (EAB) é definido como a alteração entre as cargas negativas e positivas, íons presentes nos alimentos que, ao serem absorvidos pelo trato digestório influenciam na manutenção da homeostase do organismo e altera o metabolismo e desempenho animal (De MATOS et al., 2009). Segundo Vieites (2003), o EAB no organismo das aves é muito enigmático, pois estes elementos químicos em quantidades elevadas ou insuficientes provocam reações orgânicas para compensar as alterações ocorridas, e é caracterizado pela procura constante do equilíbrio.



Os principais íons responsáveis pelo EAB, pela estabilidade osmótica e pelo metabolismo da água nos tecidos corporais são os íons monovalentes  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$  (MORAES, 2010; BORGES et al., 2002), devido ao fato da absorção desses íons ser elevada em relação aos demais (FERREIRA, 2005), logo esses necessitam estar em equilíbrio para garantir um metabolismo eficiente.

Considerando as necessidades nutricionais das aves, esses eletrólitos são exigidos em quantidades mínimas em sua alimentação, porém é essencial que a proporção entre eles esteja adequada (BORGES et al., 2002). Oliveira et al. (2010) enfatizaram que o  $\text{Na}^+$  e o  $\text{Cl}^-$  são íons importantes devido seus efeitos metabólicos e se fornecido em níveis adequados, a ave apresenta um ótimo crescimento e desenvolvimento ósseo e boa qualidade da cama. O  $\text{K}^+$  atua na transmissão do impulso nervoso para as fibras musculares durante o movimento de contração e funciona como complemento em diversas reações enzimáticas, na síntese de proteínas e no metabolismo de carboidratos, além de ser responsável por 50% da osmolaridade do fluido intracelular (VIEITES, 2004).

Borges et al. (2003) relataram que determinadas fontes de proteína, sobretudo as de origem animal, elevam a produção de ácidos orgânicos e, conseqüentemente, reduz o subsídio de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , aumentando a quantidade relativa de  $\text{Cl}^-$ .

### **3.3 Distúrbios relacionados ao desequilíbrio ácido básico**

O EAB é alterado pelo balanço cátion-ânion e é determinado pelo pH e pelas concentrações de bicarbonato no sangue. Portanto, o sistema sanguíneo é, sobretudo, sensível às mudanças de temperatura ambiental e representa um indicador fundamental das respostas fisiológicas das aves a agentes estressores (SOUSA JÚNIOR, 2006).

O distúrbio ácido-básico é comumente representado pela acidose e alcalose, sendo que a primeira indica redução no pH sanguíneo devido os altos níveis de  $\text{Cl}^-$ , já a alcalose indica aumento do pH dos fluidos corporais em consequência das altas proporções de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , podendo ser de origem respiratória ou metabólica, respectivamente (GONZALES; MENDONÇA JÚNIOR, 2006).

Além do descontrole no pH, qualquer desequilíbrio entre  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$  pode influenciar na ocorrência de problemas de pernas, das articulações e aumento na

umidade da cama (OLIVEIRA et al., 2010). Borges et al. (2003) acrescentaram que quando a temperatura ambiente aumenta, a concentração de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  diminui, enquanto que aumenta os níveis de  $\text{Cl}^-$ . BORGES et al. (2003) descreveram que esse aumento no íon  $\text{Cl}^-$ , diminui a eliminação de  $\text{H}^+$  e a reabsorção de  $\text{HCO}_3^-$  pelos rins. O oposto ocorre quando há excesso de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , no caso o rim prioriza a reabsorção de  $\text{H}^+$  (AYERS et al., 2015). Esse é o meio do organismo das aves fazer ajustes metabólicos para manter o pH dentro dos limites fisiológicos aceitáveis e isso ocorre a longo prazo (COSTA, 2011).

Segundo Costa (2011), além da regulação da concentração dos ânions e cátions para manter o pH, os fluidos do organismo contêm substâncias químicas que podem se unir com ácidos ou bases com o intuito de evitar mudanças bruscas no pH, estas substâncias são denominadas de tampões, sendo que as proteínas plasmáticas e o bicarbonato são tampões do espaço extracelular, enquanto a hemoglobina e os fosfatos estão no espaço intracelular. Esses tampões são responsáveis pela correção rápida das alterações de pH (CUNNINGHAM, 2008). Porém, o sistema  $\text{H}_2\text{CO}_3/\text{HCO}_3^-$  é o mais eficiente no tamponamento do pH (AYERS et al., 2015).

### **3.4 Nutrigenômica e genes relacionados ao balanço eletrolítico**

A nutrigenômica refere-se ao modo como certos nutrientes interagem com os genes de um sistema orgânico em particular, contribuindo com a síntese de proteínas de forma benéfica ao indivíduo (GONÇALVES et al., 2009). Hamilton (2019) descreve que a nutrigenômica ainda pode atuar como uma fonte epigenética, sendo esta descrita como modificações das funções genéticas que são herdadas e envolve a regulação de genes de forma mais ampla do que na sequência do DNA.

Segundo Fulan et al. (2009), em meados de 2000, a genômica se expandiu e ganhou repercussão mundial, o que resultou em um número significativo de espécies a terem seu genoma sequenciado. Atualmente, existem 45.396 projetos de sequenciamento de enorme potencial cadastrados no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), cada um aplicado a uma espécie diferente (NCBI, 2019).

O sequenciamento do genoma possibilitou esclarecer as funções dos genes e suas interações com os fatores ambientais (LIEBLE, 2002; SIMPSON, 2003 citado

por BONAPARTE et al., 2014); o que torna a nutrigenômica no conceito de ROLL, (2009) uma alternativa viável para interpretação dos resultados de informações genéticas, pois é possível verificar a condição nutricional de um animal a partir de um nutriente presente no organismo.

De acordo com Liang et al. (2015), a possibilidade da expressão de genes estarem relacionado ao balanço eletrolítico pode ser decisivo para o entendimento de como as concentrações de eletrólitos intervêm no metabolismo. A proteína transportadora  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase subunidade  $\alpha$  1 é codificada pelo gene *ATP1A1* e exerce a função molecular de ligação do ATP, ligação de íons metálicos, atividade de fosfatase, troca de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , ligação de hormônios esteroides, atua nos processos biológicos de homeostase de potássio, resposta celular a estímulos de hormônios esteroides e homeostase celular do  $\text{Na}^+$  (DUNBAR; CAPLAN, 2001; XIE; CAI, 2004). Em adição, possui também como função hidrólise de ATP (LIU et al., 2011), pois uma vez alterada, sugere estresse e, como consequência, possíveis respostas a condições desfavoráveis para o organismo.

Também interfere na repolarização da membrana, regulação negativa do processo de biossíntese de glicocorticóides, regulação positiva e negativa das contrações do coração, regulação positiva da contração do músculo estriado, absorção de  $\text{K}^+$ , desfosforilação de proteínas, regulação da pressão sanguínea e regulação da força das contrações do coração (LIU et al., 2011; SAWOSZ et al., 2012).

A proteína NKCC1 é codificada pelo gene *SLC12A2*, atuando como transportador  $\text{K}^+/\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ , atua também no transporte de amônio ( $\text{NH}_4^+$ ); homeostase do volume celular, homeostase e transporte transmembrana do  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ ; no crescimento do organismo multicelular; e transporte transepitelial de  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{Cl}^-$  (HAMANN et al., 2005). Zhang et al. (2012) ao estudarem associação genômica ampla (GWAS) em linhas divergentes de frangos de corte para o conteúdo e percentagem de gordura corporal afirmaram que o *SLC12A2* é um gene candidato para estas características. O gene *SLC26A4*, que codifica a proteína Pendrina, participa dos processos biológicos relacionados ao transporte do  $\text{HCO}_3^-$ ; transporte transmembrana do  $\text{Cl}^-$ ; regulação do pH intracelular; e regulação do potencial de membrana (KNAUF et al., 2001; KIM et al., 2009).

O gene *SLC1A1* codifica a proteína EAAT3 e faz parte do grupo de transportadores de aminoácidos. Dentre as funções dessa proteína estão o transporte de D-aspartato, L-glutamato e regulação da frequência cardíaca (BIANCHI et al., 2014). Para realizar suas funções a EAAT3 pode ser classificada como Na<sup>+</sup>/dependente, atuante na absorção e reabsorção de aminoácidos nos tecidos, sendo amplamente difundido nos órgãos do organismo (BAILEY et al., 2011). De acordo com Miska et al. (2015), o período pós-natal de frangos de corte tem efeito sobre a expressão do *SLC1A1* no fígado, sendo que ocorreu maior expressão com o aumento da idade.

A proteína SLGT1, codificada pelo gene *SLC5A1*, tem como principal função a atividade simporte de Na<sup>+</sup>/glicose e, transporte transmembrana de glicose e Na<sup>+</sup>. O NaHCO<sub>3</sub>, utilizado na correção do BED (DALL'STELLA, 2008), pode influenciar na atividade e/ou expressão do *SLC5A1* pela dependência do Na<sup>+</sup> (XIN; WANG, 2010).

Segundo Broer (2008), o gene *SLC7A6* codifica a proteína transportadora de aminoácido y<sup>+</sup>LAT2 e é responsável pelo transporte de aminoácidos para o sangue e pela captação desses aminoácidos para os tecidos (fígado, rim, cérebro, coração, músculo esquelético); e ainda atua na reabsorção de aminoácidos pelos néfrons no rim; regulação do volume celular; síntese da glutathiona (GSH); a disponibilização de aminoácidos para síntese proteica; e energia para o metabolismo (WAGNER et al., 2001).

A proteína y<sup>+</sup>LAT2 é dependente de Na<sup>+</sup> (BRÖER, 2008) atuando, particularmente, na troca de Na<sup>+</sup> de aminoácidos neutros de cadeia longa por aminoácidos básicos, porém há maior afinidade por glutamina e arginina (BRÖER et al., 2000). Em estudo feito por Miska et al. (2015) avaliou-se o efeito do desenvolvimento pré e pós-natal sobre a expressão gênica de vários transportadores de aminoácidos, dentre eles o y<sup>+</sup>LAT2, no fígado de frangos de corte e constataram efeito significativo para o estágio de desenvolvimento para o *SLC7A6*, com aumento da expressão relativa em função do tempo de vida.

Contudo, diante do cenário atual da avicultura que atinge novos níveis de produtividade, pesquisas de nutrigenômica são favoráveis na produção animal, pois as aves necessitam de respostas metabólicas coordenadas pela expressão de

genes específicos na presença ou ausência de nutrientes apropriados (AVEROUS et al., 2003). A alimentação representa até 70% do total dos custos de produção na atividade, sendo necessárias alternativas para reduzir o desperdício de nutrientes atrelado à poluição ambiental, assim como reduzir os gastos com a alimentação (ABREU et al., 2018).

#### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi realizado no setor de Avicultura do Colégio Técnico de Bom Jesus, da Universidade Federal do Piauí, e aprovado na Comissão de Ética sob o protocolo nº 075/15 no uso de animais do CEUA/UFPI. Foi utilizado 245 pintainhos machos da linhagem Cobb na fase de 1 a 21 dias em baterias metabólicas, constituídas por gaiolas de 1 x 1 x 0,5 m como unidades experimentais. Durante o período experimental foi aplicado um programa de luz de 23 horas (luz natural + artificial). Do 1º ao 14º dia, as aves foram aquecidas com lâmpadas incandescentes de 100 W durante às seis da tarde até às seis da manhã, com uma distância regulada em função do comportamento dos animais. Foram utilizadas cortinas de polietileno ao redor do galpão experimental, permanecendo fechadas nas horas mais frias.

A temperatura ( $20,92 \pm 0,48$  e  $35,50 \pm 0,99^\circ\text{C}$ , mínima e máxima, respectivamente) e umidade relativa do ar ( $23,47 \pm 1,01$  e  $63,33 \pm 1,15$  %, mínima e máxima, respectivamente) foram mensuradas com termo-higrômetro colocado dentro do galpão na altura média das aves. O índice de temperatura de globo e umidade ( $79,57 \pm 1,17$ ) foi obtido segundo Buffington et al. (1981), pelo uso da temperatura do globo negro posicionado na mesma altura do termo-higrômetro, e mensurada duas vezes ao dia, às nove e às três horas.

Foram formuladas duas dietas basais, a base de milho e farelo de soja, para atender as exigências nutricionais de frangos de corte na fase pré-inicial (1 a 7 dias) e inicial (8 a 21 dias), segundo Rostagno et al. (2011) (Tabela 1). As quantidades de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$  foram analisadas no milho (0,006249, 0,569885 e 0,101313 %, respectivamente) e no farelo de soja (0,14935, 2,280856 e 0,838903 %, respectivamente) no laboratório IBRA Nutrição Animal para o cálculo do BED na dieta basal. O BED das dietas basais e experimentais foi calculado de acordo com a fórmula proposta por Mongin (1981):

$BED = (\%Na^+ \times 100/22,990^*) + (\% K^+ \times 100/ 39,102^*) - (\%Cl^- \times 100/35,453^*)$ , em que \* = equivalente grama do  $Na^+$ ,  $K^+$  ou  $Cl^-$ , respectivamente.

Com um dia de idade, as aves foram pesadas e distribuídas de acordo com o peso médio ( $38,51 \pm 0,36$  g) em um delineamento inteiramente casualizado, com cinco níveis de BED (110, 175, 240, 305 e 370 mEq/Kg) e 7 repetições de 7 aves cada. Esses níveis foram obtidos pela inclusão de  $NaHCO_3$ ,  $K_2CO_3$  e  $NH_4Cl$  em substituição ao inerte (Tabela 2). Os níveis de  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Cl^-$  e as relações entre os eletrólitos estão na Tabela 3. A adição de  $NaHCO_3$  e  $K_2CO_3$  foi calculada de forma proporcional e gradativa até atingir a relação ideal de  $Na^+/K^+$  de 0,37 (Rostagno et al., 2011) no último nível de BED.

**Tabela 1.** Composição das dietas basais para fase pré-inicial (1 a 7 dias) e inicial (8 a 21 dias) de frangos de corte utilizada no experimento

Ingrediente (%)	1 a 7 dias	8 a 21 dias
Milho	56,7391	61,8085
Farelo de soja	33,4404	29,0490
Óleo de soja	2,4950	2,3515
Calcário	0,9131	0,9230
Fosfato bicálcio	1,9530	1,5623
Inerte (areia lavada)	1,5160	1,6150
Sal comum	0,5205	0,4964
Met-amino	0,2124	0,1488
Bio-lys®	0,6761	0,6114
L-Arginina	0,1941	0,1638
L-Treonina	0,1744	0,1403
L-Valina	0,1661	0,1299
Suplemento Vit-Min <sup>1</sup>	1,0000	1,0000
Total	100,00	100,00
<b>Composição calculada</b>		
Energia metabolizável (Kcal/Kg)	2950	3000
Proteína bruta (%)	20,5046	18,7766
Metionina + Cistina digestível (%)	0,9440	0,8460
Lisina digestível (%)	1,3100	1,1740
Arginina digestível (%)	1,4150	1,2680
Treonina digestível (%)	0,8520	0,7630
Triptofano digestível (%)	0,2230	0,2000
Valina digestível (%)	1,0090	0,9040
Fósforo disponível (%)	0,4700	0,3910
Cálcio (%)	0,9200	0,8190
Sódio (%)	0,2200	0,2100
Potássio (%)	0,9875	0,9002
Cloro (%)	0,6131	0,5697
Balanço eletrolítico (mEq/Kg)	175	161

<sup>1</sup>Fornece/kg de dieta pré-inicial: ácido fólico-200,00mg; biotina-10,00mg; clorohidroxiquinolina-7500,00mg; Zn-17,50g; vit.A-1680000UI; vit.B1-436,50mg; vit.B12-2400mcg; vit.B2-1200mg; vit.B6-624mg; vit.D3-400000UI; vit.E-3500UI; vit.K3-360mg; niacina-8399,00mg; nicarbazina-25,00g; ácido pantotênico-3120,00mg; colina-78,10g; Se-75,00mg; Fe-11,25g; Mn-18,74g; Cu-1997,00mg; I-187,00mg. Inicial: ácido fólico-199,00mg; biotina-10,00mg; clorohidroxiquinolina-7500,00mg; Zn-17,50g; vit.A-1680000,00UI; vit.B1-436,50mg; vit.B12-2400,00mcg; vit.B2-1200,00mg; vit.B6-624,00mg; vit.D3-400000,00UI; vit.E-3500,00UI; vit.K3-360,00mg; niacina-8400,00mg; monensina-25,00g; ácido pantotênico-3119,00mg; colina-80,71g; Se-75,00mg; FE-11,25g; Mn-18,74g; Cu-1996,00mg; I-187,47mg.

**Tabela 2.** Valores da inclusão de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaHCO<sub>3</sub> e NH<sub>4</sub>Cl para compor o balanço eletrolítico dietético (BED) das dietas experimentais para frangos de corte em substituição do inerte

1 a 7 dias						
BED (mEq/Kg)	Dieta Basal (Kg)	Inerte (Kg)	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (Kg)	NaHCO <sub>3</sub> (Kg)	NH <sub>4</sub> Cl (Kg)	Total (kg)
110	98,484	1,162	-	-	0,354	100,000
175	98,484	1,516	-	-	-	100,000
240	98,484	1,014	0,202	0,300	-	100,000
305	98,484	0,507	0,386	0,622	-	100,000
370	98,484	0,000	0,566	0,950	-	100,000
8 a 21 dias						
110	98,385	1,337	-	-	0,278	100,000
175	98,385	1,516	0,087	0,012	-	100,000
240	98,385	1,016	0,300	0,299	-	100,000
305	98,385	0,512	0,498	0,605	-	100,000
370	98,385	0,000	0,650	0,965	-	100,000

K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> – peso molecular (UMA) = 138,20; pureza: 99,0%.

NaHCO<sub>3</sub> – peso molecular (UMA) = 84,00; pureza: 99,0%.

NH<sub>4</sub>Cl – peso molecular (UMA) = 53,45; pureza: 99,5%.



**Tabela 3.** Níveis de sódio (Na<sup>+</sup>), potássio (K<sup>+</sup>), cloro (Cl<sup>-</sup>) e relações entre os eletrólitos presentes nas dietas experimentais

1 a 7 dias						
BED (mEq/Kg)	Na <sup>+</sup> (%)	K <sup>+</sup> (%)	Cl <sup>-</sup> (%)	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup>	(K <sup>+</sup> +Cl <sup>-</sup> )/Na <sup>+</sup>	(Na <sup>+</sup> +K <sup>+</sup> )/Cl <sup>-</sup>
110	0,220	0,988	0,844	0,22	8,33	1,43
175	0,220	0,988	0,613	0,22	7,28	1,97
240	0,302	1,102	0,613	0,27	5,68	2,29
305	0,391	1,207	0,613	0,32	4,66	2,60
370	0,480	1,308	0,613	0,37	4,00	2,91
8 a 21 dias						
110	0,210	0,900	0,751	0,22	7,86	1,48
175	0,213	0,949	0,570	0,22	7,12	2,04
240	0,292	1,070	0,570	0,27	5,62	2,39
305	0,376	1,182	0,570	0,32	4,66	2,73
370	0,475	1,268	0,570	0,37	3,87	3,06

BED: Balanço Eletrolítico Dietético.

### 5. Análise da expressão gênica

Ao final da fase de 21 dias, 4 animais de cada tratamento foram abatidos e coletadas amostras do fígado, que foram armazenadas em micro tubos de 2mL contendo RNAHolder® (*BioAgency* São Paulo, Brasil) para manter a integridade do RNA total e, posteriormente, armazenadas em freezer -80°C até a extração do RNA.

No Laboratório de Patologia Molecular da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), o RNA total foi extraído das amostras de 100 mg de tecido utilizando o Trizol® Reagente com o Pure Link® RNA Mini Kit (Ambion, Life Technologies, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. Foi adicionado a cada amostra homogeneizada 1 mL de Trizol. O lisado com Trizol foi incubado em temperatura ambiente. Adicionou-se 200 µL de clorofórmio ao lisado e foram misturados manualmente por 15s, depois as amostras foram incubadas por 2 min. Foram centrifugadas por 15 min a 12000g a 4°C. Transferiu-se 600 µL da fase

sobrenadante, que contém o RNA, para microtubos estéreis e adicionou-se volume igual de etanol 70%, em seguida, foram vortexados.

Transferiu-se de 700 µl das amostras para a coluna, depois as mesmas foram centrifugadas a 12000g por 15 s em temperatura ambiente. Foram descartados os sobrenadantes e reinseridos nas colunas. Em seguida, foram repetidos os dois últimos passos. Foram adicionados 350 µl de *Wash Buffer I*. Os sobrenadantes e tubos de coleta foram descartados, e as colunas foram inseridas em novos tubos de coleta. As amostras de RNA foram tratadas com 80 µL do mix *Pure Link® DNase* e incubados por 15 min para posterior adição de 350 µl de *Wash Buffer I*. Em seguida, foram centrifugados a 12000g por 15 s, em temperatura ambiente.

Acrescentou-se 500 µl de *Wash Buffer II* com etanol 70% na coluna. As amostras foram centrifugadas a 12000g por 15 s em temperatura ambiente, para posterior descarte do eluído. Repetiu-se este passo, e em seguida foram centrifugadas a 12000g por 1 min em temperatura ambiente. As colunas foram inseridas em tubos de eluição e foram adicionados 50 µl de água pura livre de RNase e DNase ao centro da coluna e foram incubadas em temperatura ambiente por 1 min. Centrifugou-se a coluna com os tubos de eluição por 2 min a 12000g em temperatura ambiente. Em seguida, foram armazenadas as amostras de RNA purificadas. O RNA total isolado das amostras foi quantificado por espectrofotometria em aparelho *Picodrop*. A integridade do RNA foi verificada em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo.

A síntese da primeira fita do DNA complementar (cDNA) foi feita com o Kit *GoScript Reverse Transcription System* (Promega, Biotecnologia do Brasil LTDA). As reações foram feitas com 5 µg de RNA por reação, 0,5 µg do *primer* oligo (dT)<sub>15</sub> e água pura livre de nuclease, de acordo com as recomendações do fabricante. Em seguida, as amostras foram aquecidas a 70°C por 5 min, depois foram resfriadas em gelo por 5 min para serem centrifugadas por 10 s. Ainda no gelo, foram adicionados os mix que continham *GoScript™ 5X Reaction Buffer*, *MgCl<sub>2</sub>* (1mM), *PCR Nucleotide Mix* (0,5 mM), *Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor*, *GoScript™ Reverse Transcriptase* e água pura livre de nucleases. As concentrações de cDNA das amostras foram estimadas por espectrofotometria (*Picodrop*), e os cDNAs foram estocados a -20°C até o uso na reação de RT-PCR em tempo real.

Na Tabela 4 estão as informações sobre os genes, que foram obtidas a partir de dados do UNIPROT (<http://www.uniprot.org/>), GeneCards (<http://www.genecards.org/>) e KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>).

**Tabela 4.** Localização celular (LC), vias metabólicas (VM) e processos biológicos (PB) dos genes utilizados no qRT-PCR

Gene	Ontologia dos genes		
	LC	VM	PB
<i>ATP1A1</i>	Membrana	Ligação de ATP	Homeostase do Na <sup>+</sup> e K <sup>+</sup>
		Ligação de íons metálicos	Resposta celular a hormônios esteroides e glicocorticoides
		Atividade de fosfatase	
<i>SLC1A1</i>	Membrana	Transporte de cisteína	Transporte de D-aspartato e L-glutamato
		Simporte de glutamato/ Na <sup>+</sup>	
<i>SLC5A1</i>	Membrana	Simporte de glicose/Na <sup>+</sup>	Absorção e transporte de glicose e Na <sup>+</sup>
<i>SLC7A6</i>	Membrana	Transporte de aminoácidos/ Na <sup>+</sup>	Transporte de aminoácidos básicos de cadeia curta
		Transporte de NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Homeostase do Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> e Cl <sup>-</sup>
<i>SLC12A2</i>	Membrana	Simporte de K <sup>+</sup> /Cl <sup>-</sup>	Crescimento do organismo multicelular
		Simporte de Na <sup>+</sup> /Cl <sup>-</sup>	
		Transporte de HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Transporte de HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
<i>SLC26A4</i>	Membrana	Antiporte anion/anion	Homeostase do Cl <sup>-</sup>
		Atividade nos canais de Cl <sup>-</sup>	Regulação do pH celular

A análise da expressão dos genes *ATP1A1*, *SLC1A1*, *SLC5A1*, *SLC7A6*, *SLC12A2* e *SLC26A4* foram realizadas utilizando-se a metodologia de qRT-PCR em tempo real. Os *primers* utilizados para amplificação dos fragmentos dos genes estudados e dos controles endógenos foram desenhados por meio do programa *PrimerQuest* ([www.idtdna.com/Scitools/Applications/PrimerQuest](http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/PrimerQuest)) fornecido pela

Integrated DNA Technologies Inc (Coralville, IA) a partir de sequências de nucleotídeos obtidas do banco de dados do *GeneBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) que podem ser visualizados na Tabela 5.

**Tabela 5.** Sequências de nucleotídeos, tamanho do amplicon (AMPL) e temperatura de anelamento (TA) dos primers utilizados para as reações de qRT-PCR

Gene (NCBI #ID)	Sequência de Oligonucleotídeos	AMPL (pb)	TA (°C)
<i>ATP1A1</i> (NM_205521.1)	F: ACTGTGATGGGCCGTATTG R: CTCCAGTGATGAGGTGGATAAAG	100	62
<i>SLC1A1</i> (XM_424930)	F: GTGTTTCTGGGAAGATTGGTTTG R: TGAGGCACTCCAGGTTTAATG	112	62
<i>SLC5A1</i> (NM_001293240)	F: GCTGCGGACATCTCTGTTATT R: GCCAGAAAGAATCCACCTACTG	107	62
<i>SLC7A6</i> (NM_001005832)	F: GTCTTTGGAGCTCTCTGCTATG R: AGTGAGGTCCACAAACGAATAA	122	62
<i>SLC12A2</i> (XM_004949378)	F: GATGTCACTATGGGCTGATGAA R: CAGATGACAGAGTGGCTGAAA	102	62
<i>SLC26A4</i> (XM_004934754.2)	F: CCGTCTGTGGAGACAGAATAAA R: GCCAGCAAGTAATCCCAAATC	97	62
<i>HPRT1</i> <sup>1</sup> (NM_204848)	F: GTGATTGGCGATGATGAACAAG R: GCCCATGAGGGATATAGACTTTC	97	62
<i>ACTA1</i> <sup>1</sup> (NM_001031063)	F: CCTCCTTGGAGAAGAGCTATGA R: CAATGAAGGAAGGCTGGAAGAG	102	62
<i>HMBS</i> <sup>1</sup> (XM_015298075)	F: GCTGCTGGACTGAAGAGAAT R: CACGAACCTCCACTGCTAAA	109	62

*ATP1A1* – ATPase transportadora de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> subunidade  $\alpha$  1, *SLC1A1* – ETAA3 (transportador de aminoácidos excitatório 3), *SLC5A1* – SLGT1 (transportador soluto/glicose 1), *SLC7A6* –  $\gamma^+$  LAT 2 (transportador de aminoácidos de cadeia leve 2), *SLC12A12*-NKCC1 (cotransportador de ânions, Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>) e *SLC26A4* – Pendrina. <sup>1</sup>Genes referência.

As reações foram efetuadas em termociclador *ABI Prism 7500 Sequence Detection Systems* (*Applied Biosystems*, Foster City, C.A., EUA), a partir do método de Quantificação Relativa utilizando o sistema de fluorescência SYBR Green com SYBR® Green Master Mix (*Applied Biosystems*), de acordo com as instruções do fabricante.

As amplificações foram: a 95°C durante 5 min, 40 ciclos de amplificação a 95°C por 15 s, anelamento a 62°C durante 60 s. Ao final dos 40 ciclos de amplificação, um passo adicional com elevação gradual da temperatura de 60°C a 94°C foi utilizado para a obtenção da curva de dissociação.

Antes da quantificação pelo qRT-PCR, foi calculada a eficiência de cada gene com o intuito de escolher a melhor combinação de concentração de cDNA e de primer nas reações subsequentes. A eficiência foi calculada pela fórmula:  $E = 10^{(-1/slope)}$  (Pfaffl, 2004). Escolheram-se os resultados obtidos com maiores eficiências de amplificação como adequadas para serem usadas nas reações finais de qRT-PCR em tempo real (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Todas as reações foram feitas em duplicatas e o coeficiente de variação dos valores de Ct das replicatas dentro da amostra foi baixo, < 5%, indicando acurácia e replicável aceitável.

Três controles endógenos foram testados: *HPRT1*, *ACTA1* e *HMBS*, e o escolhido para ser utilizado no fígado foi o *HPRT1*, por mostrar maior eficiência e menos variação entre os tratamentos (dados não mostrados) no tecido estudado de acordo com o software NormFinder (ANDERSEN et al., 2004).

A análise estatística dos dados de Ct para cada nível de BED foi realizada utilizando a macro %QPCR\_MIXED macro SAS® (<https://www.msu.edu/~steibelj/JP-files/QPCR.html>) desenvolvida para gerar as rotinas no SAS PROC MIXED adequadas para analisar os dados de qRT-PCR, assumindo efeitos aleatórios independentes para os genes alvos e de referência em cada réplica biológica (STEIBEL et al., 2009). A comparação dos valores de  $\Delta Ct$  entre os tratamentos foi feita usando a função CONTRAST do proc GLM utilizando o teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

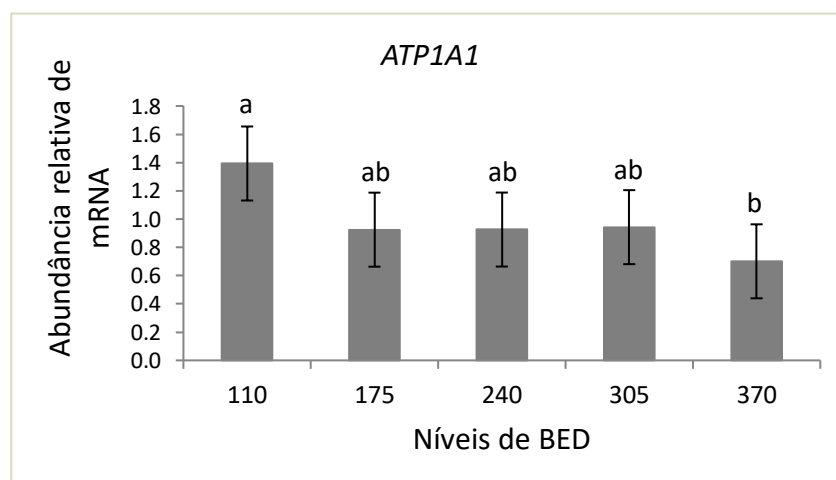
Foi utilizado o seguinte modelo:

$$Y_{gijk} = TG_{gi} + S_j + TS_{ij} + GS_{gj} + e_{gijk}$$

onde,  $Y_{gijk}$  = Ct obtido do g-ésimo gene na k-ésima réplica da j-ésima amostra no i-ésimo Tratamento;  $TG_{gi}$  = é o efeito do i-ésimo Tratamento no g-ésimo gene,  $TG_{gi} \sim N(0, \sigma_{gi}^2)$ ;  $S_j$  = é o efeito aleatório da j-ésima amostra,  $S_j \sim N(0, \sigma_j^2)$ ;  $TS_{ij}$  = efeito aleatório do i-ésimo Tratamento na j-ésima amostra,  $TS_{ij} \sim N(0, \sigma_{ij}^2)$ ;  $GS_{gj}$  = efeito aleatório específico do g-ésimo gene na j-ésima amostra  $GS_{gj} \sim N(0, \sigma_{gj}^2)$ ;  $e_{gijk}$  = resíduo experimental,  $e_{gijk} \sim N(0, \sigma_e^2)$ .

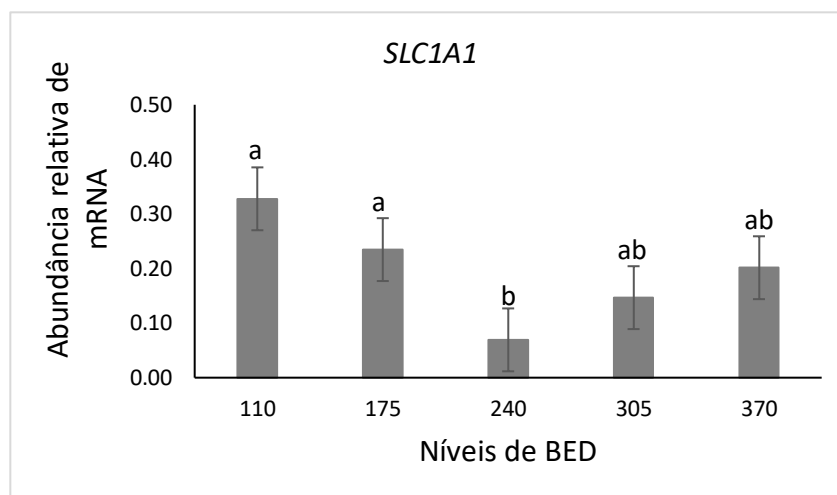
## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme apresentado na figura 1, houve efeito significativo ( $p < 0,05$ ) dos níveis de BED sobre a expressão do gene *ATP1A1*, no fígado de frangos de corte aos 21 dias de idade. Sendo que este gene foi mais expresso no nível de 110 mEq/Kg, quando comparado ao maior nível de BED. O nível de 110 mEq/Kg não apresentava a relação  $Na^+/K^+$  ideal de acordo com Rostagno *et al.* (2011), no entanto, neste nível a maior expressão do gene *ATP1A1* (Figura 1) pode ter minimizado o efeito do desequilíbrio da concentração destes íons, atuando como mecanismo compensatório. No nível de 370 mEq/Kg foi atendida a relação  $Na^+/K^+$  culminando em menor diferença de expressão do gene *ATP1A1*, provavelmente pela menor necessidade de ajustes moleculares.



**Figura 1.** Expressão relativa de mRNA ( $2^{-\Delta Ct}$ ) do gene *ATP1A1*, no fígado de frangos de corte aos 21 dias alimentados com diferentes níveis de balanço eletrolítico dietético (BED)

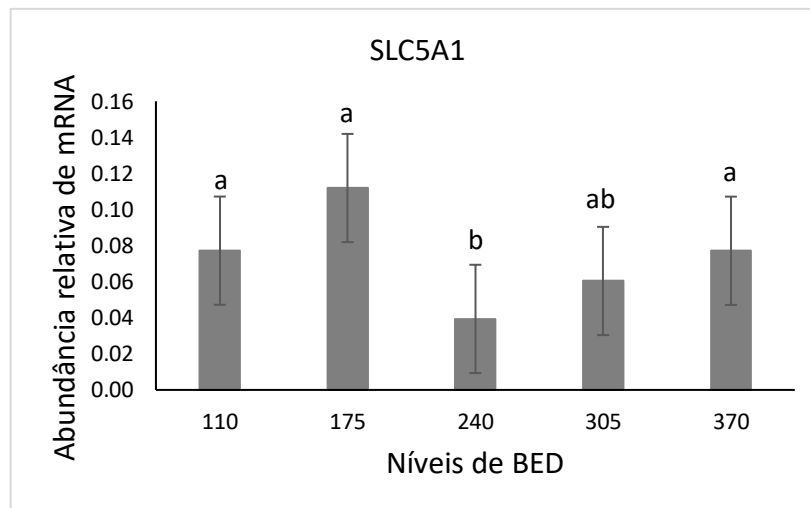
O *SLC1A1* apresentou diferença significativa, com maior expressão nos níveis de 110 e 175 mEq/Kg em relação ao nível de 240 mEq/Kg (Figura 2). Essa maior expressão, pode estar relacionada com a melhor utilização de aminoácidos, pois de acordo com Graczyk et al. (2016), a partir de uma análise de entropia, pesquisaram associações entre SNPs desse gene e eficiência alimentar, e é expresso no trato gastrointestinal, apresentando importante função na conversão alimentar de frangos. É uma das principais funções da proteína EAAT3, codificada pelo *SLC1A1*, é o transporte de aminoácidos (BIANCHI et al., 2014). Além disso, a expressão do *SLC1A1* no fígado é influenciada pelo estágio de desenvolvimento de frangos de corte até os 21 dias (MISKA et al., 2015).



**Figura 2.** . Expressão relativa de mRNA ( $2^{-\Delta Ct}$ ) do gene *SLC1A1*, no fígado de frangos de corte aos 21 dias alimentados com diferentes níveis de balanço eletrolítico dietético (BED)

Conforme ilustrado na figura 3, o gene *SLC5A1*, no nível de 240 mEq/Kg proporcionou menor quantidade de mRNA, indicando que houve um possível prejuízo no metabolismo da glicose, pois a SGLT1, proteína codificada pelo *SLC5A1*, é um transportador de glicose dependente de  $\text{Na}^+$  e realiza esse processo pelo mecanismo simporte (XIN; WANG, 2011). BARFULL et al. (2002), ao estudarem o efeito do desenvolvimento pós-natal em galinhas White Leghorn, observaram uma diminuição na expressão do *SLC5A1* em função da idade, culminando com menor quantidade de glicose circulante resultando em prejuízos no metabolismo energético.

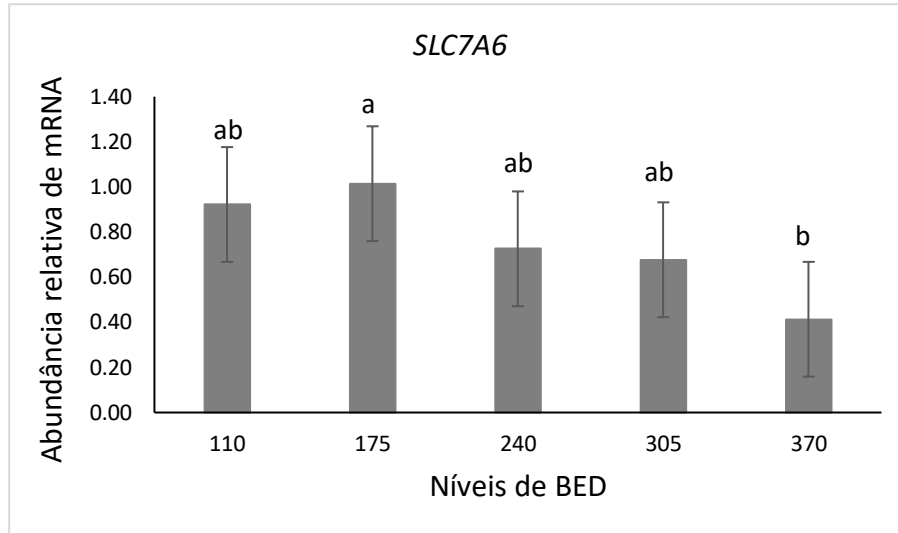
O fígado é um órgão de intensa atividade metabólica e a glicose é o principal substrato energético para o organismo. A maioria dos estudos que avaliaram a expressão do gene *SLC5A1* na avicultura se restringe a estudar apenas o intestino dos frangos, no intuito de evidenciar a absorção de glicose. No entanto, foi observado que a diminuição da quantidade de mRNA do *SLC5A1* no fígado também pode estar relacionada a prejuízos no metabolismo energético.



**Figura 3.** Expressão relativa de mRNA ( $2^{-\Delta Ct}$ ) do gene *SLC5A1*, no fígado de frangos de corte aos 21 dias alimentados com diferentes níveis de balanço eletrolítico dietético (BED)

Houve efeito significativo ( $p < 0,05$ ) dos níveis de BED sobre a expressão do gene *SLC7A6* no qual a maior expressão foi no nível de 175 mEq/Kg quando comparado ao nível de 370 mEq/Kg (figura 4). Este resultado para a expressão do *SLC7A6* ocorreu, provavelmente, pela menor disponibilidade de substrato nos menores níveis BED (110, 175, 240 mEq/Kg), que pode ter sinalizado para a célula maior necessidade da atividade deste gene regulando positivamente sua expressão. Além disso, assim como o gene *SLC1A1*, o *SLC7A6* tem sido identificado como o principal transportador intestinal de aminoácidos ácidos, além de codificar o transportador de aminoácido  $\gamma$ -LAT2, que tem a função de fazer a troca de  $\text{Na}^+$  e aminoácidos neutros de cadeia longa por aminoácidos básicos, sendo classificado como  $\text{Na}^+$ /dependente (MISKA et al., 2015).

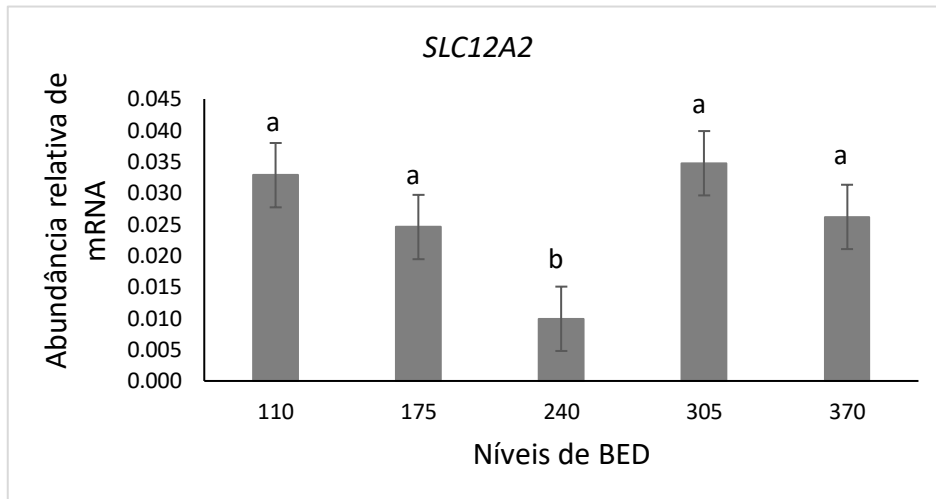




**Figura 4.** Expressão relativa de mRNA ( $2^{-\Delta Ct}$ ) do gene *SLC7A6*, no fígado de frangos de corte aos 21 dias alimentados com diferentes níveis de balanço eletrolítico dietético (BED)

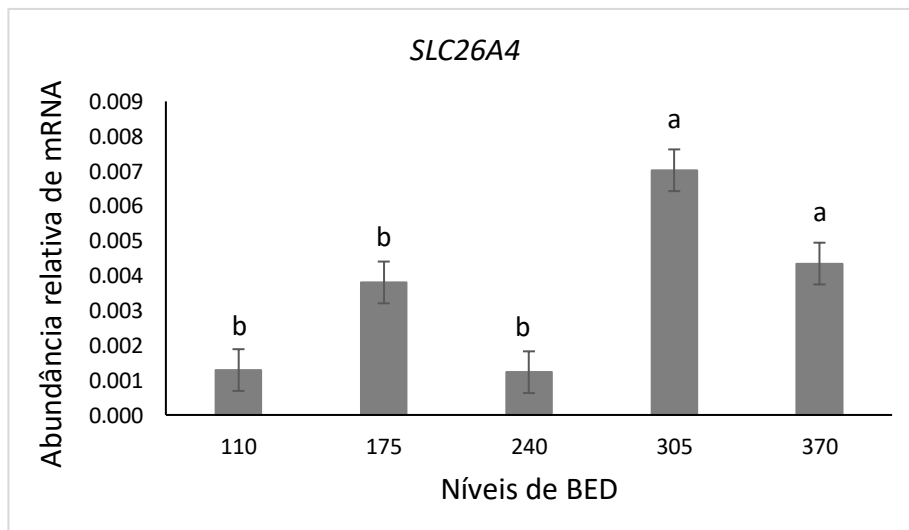
No que se refere à figura 5, houve efeito significativo na expressão do gene *SLC12A2* no qual mostrou a menor média observada no nível de 240 mEq/Kg em relação a todos os demais tratamentos, demonstrando que este nível de BED prejudicou a atividade deste gene nos hepatócitos das aves. Este gene atua na homeostase celular, transporte de  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ , crescimento do organismo multicelular (HAMANN et al., 2005) e está relacionado ao conteúdo de gordura abdominal em frangos de corte (ZHANG et al., 2012).

Aves de corte com maiores taxa de crescimento sempre tem sido relacionados com aumento no conteúdo de gordura abdominal e Zhang et al. (2012) afirmaram que o *SLC12A2* é um gene candidato para esta característica. Então nível de 240 mEq/Kg regulou negativamente a expressão do *SLC12A2*.



**Figura 5.** Expressão relativa de mRNA ( $2^{-\Delta Ct}$ ) do gene *SLC12A2*, no fígado de frangos de corte aos 21 dias alimentados com diferentes níveis de balanço eletrolítico dietético (BED)

Conforme apresentado na figura 6, o gene *SLC26A4* foi mais expresso nos níveis 305 e 370 mEq/Kg, supondo uma possível relação a manutenção do EAB, pois de acordo com Kim et al. (2009) este gene atua no transporte de ânions ( $\text{HCO}_3^-$  e  $\text{Cl}^-$ ) e na regulação do pH intracelular. Os nutrientes ao serem absorvidos seguem para o fígado, que é um órgão de intensa atividade metabólica, e os níveis mais elevados de BED (305 e 370 mEq/Kg) regularam positivamente o gene *SLC26A4*. Esse ocorrido sugere que o fígado pode ter efeito na regulação do EAB, sendo necessárias mais pesquisas a respeito para elucidar essa resposta.



**Figura 6.** Expressão relativa de mRNA ( $2^{-\Delta Ct}$ ) do gene *SLC26A4*, no fígado de frangos de corte aos 21 dias alimentados com diferentes níveis de balanço eletrolítico dietético (BED)

Os íons disponibilizados que possui funções específicas durante o estresse térmico por calor, como o  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , presentes em maior quantidade no nível de 370 mEq/Kg pela inclusão de  $\text{NaHCO}_3$  e  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , respectivamente, atuaram benéficamente no perfil de expressão dos genes estudados. Deste modo, a formulação de ração utilizando os conceitos de nutrigenômica pode ser relevante na formulação de dietas para frangos de corte.

A inclusão de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  em dietas pode promover acidose metabólica por acidificar o pH do sangue (Minafra et al., 2009), além de ser um mecanismo compensatório, pois pode corrigir a alcalose respiratória (Ayers et al., 2015), pois é um dos problemas na avicultura de corte em regiões quentes. O nível de 110 mEq/Kg, que possui a inclusão de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , pode ter favorecido ajustes na expressão genica em função da inclusão do composto acidogênico,  $\text{Cl}^-$ .

## **7. CONCLUSÃO**

O BED afeta a expressão dos transcritos dos genes *ATP1A1*, *SLC1A1*, *SLC5A1*, *SLC7A6*, *SLC12A2* e *SLC26A4*. As mudanças ocorridas na expressão genica em função do BED necessitam serem mais exploradas em campo e em interação com outros fatores para poder compreender como os frangos respondem a manipulação de eletrólitos e, conseqüentemente, melhorar a produtividade.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, V. M. N.; ABREU, P. G. Os desafios da ambiência sobre os sistemas de aves no Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p. 1-14, 2011.
- ANDERSEN, C. L et al. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Canc. Res.** 64:5245-5250. 2004.
- AVEROUS, J et al. Recent Advances in the Understanding of Amino Acid Regulation of Gene Expression. **Journal of Nutrition**, v.133, p.2040S-2045S, 2003.
- AYERS, P et al. Acid-Base Disorders: Learning the Basics. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 30, p. 14-30, 2015.
- BAILEY, C. G et al. Loss-of-function mutations in the glutamate transporter SLC1A1 cause human dicarboxylic aminoaciduria. **Journal of Clinical and Investigation**, v. 121, p. 446-53, 2011.
- BARFULL, A et al. Ontogenetic expression and regulation of Na<sup>+</sup>-D-glucose cotransporter in jejunum of domestic chicken. **Am. J. Physiol.** 282:559-564. 2002.
- BERGMANN MM et al. Bioethics in human nutrigenomics research: European Nutrigenomics Organisation workshop report. **British Journal of Nutrition**, 95, 1024-1027 (2006).
- BIANCHI, M. G et al. Changes in the expression of the glutamate transporter EAAT3/EAAC1 in health and disease. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, p. 2001-2015, 2014.
- BONAPARTE, T. B. et al. Capítulo 19-Princípios da nutrigenômica e seu emprego na nutrição animal do futuro. **Bruno Borges Deminicis & Carla Braga Martins**, p. 201, 2014.
- BORGES, SA et al. Efeito da Proteína Bruta e de Diferentes Balanços Eletrolíticos das Dietas Sobre o Desempenho de Frangos no Período Inicial. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**. Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, v. 4, n. 2, p. 155-161, 2002. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/9557>>.
- BORGES, SA et al. Fisiologia do estresse calórico e a utilização de eletrólitos em frangos de corte. **Ciência Rural**, p. 975-981, 2003.
- BRÖER, A et al. The heterodimeric amino acid transporter 4F2hc/y1LAT2 mediates arginine efflux in exchange with glutamine. **Biochemical Journal**, v. 349, p. 787-795, 2000.

BRÖER, S; et al. Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. **Physiology Review**, v. 88, p. 249–286, 2008.

BUFFINGTON, D. E., et al. Black globe-humidity index (BGHI) as comfort equation for dairy cows. **Transation of the ASAE**, 24:711-714 1981.

COSTA, F. B. Análogos de metionina e balanço eletrolítico em dietas de frango. (Dissertação de Mestrado, Ciências Veterinárias) **Universidade do Federal do Paraná**.- Curitiba, 2011.

CUNNINGHAM, J. G. Fisiologia Veterinária. Ed. **Elsiever Saunders**, 718 p, 2008.

DALL'STELLA, R. Balanço eletrolítico e relações de aminoácidos sulfurados e lisina digestíveis para frangos de corte. 76 f. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). **Universidade Federal do Paraná**, Curitiba, PR, 2008.

DE FREITAS, H. B. et al. Estresse por calor sobre o desempenho e aproveitamento de nutrientes em aves e suínos, 2017.

DE MATOS, M.B, et al. Balanço eletrolítico e redução da proteína bruta da ração sobre parâmetros fisiológicos e sanguíneos de frangos de corte no calor. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 31, n. 3, 2009.

DE OLIVEIRA, M. C. et al. Efeito do balanço eletrolítico da ração sobre parâmetros ósseos e da cama de frango. **Biotemas**, v. 23, n. 1, p. 203-209, 2010.

DUNBAR, L. A.; CAPLAN, M. J. Ion pumps in polarized cells: sorting and regulation of the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>- and H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 29617–29620, 2001.

FERREIRA, R. A. Maior Produção com Melhor Ambiente para aves, suínos e bovinos. 1 Ed. **Viçosa: Aprenda Fácil**, 2005, p.371.

GOMES, A.R.A. et al. Estresse por calor na produção de frangos de corte. **PUBVET**, Londrina, V. 6, N. 34, Ed. 221, Art. 1469, 2012.

GONÇALVES, F. M. et al. Nutrigenômica: situação e perspectivas na alimentação animal. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 104, p. 569-572, 2010.

GONZALES, E.; et al. Problemas locomotores em frangos de corte: In: **VII Simpósio Brasil Sul de Avicultura**, 2006. Chapecó. Anais... Chapecó-SC: Núcleo de Médicos Veterinários, p. 79-84, 2006.

GRACZYK, M. et al. The search for SNPs and genes associated with the feed conversion ratio using entropy analysis. **Act. Fytotec. Zoo**. 19:93-95. 2016.

HAMANN, S. et al. Water permeability of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> cotransporters in mammalian epithelial cells. **Journal of Physiology**, v. 568, p. 123–135, 2005.

JÚNIOR, F. N. D. S. Bicarbonato de sódio associado ao cloreto de amônio em rações para frangos de corte sob condições naturais de estresse calórico. 2006. 101 f. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Piauí.

KIM JH, et al. Effect of an oil byproduct from conjugated linoleic acid (CLA) purification on CLA accumulation and lipogenic gene expression in broilers. **Agric. Food. Chem.** 2009, 57(6):2397-404.

KIM, Y. H. et al. Role of pendrin in iodide balance: going with the flow. **American Journal of Physiology- Renal Physiology**, v. 297, p. 1069–1079, 2009b.

KNAUF, F. et al. Identification of a chloride-formate exchanger expressed on the brush border membrane of renal proximal tubule cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, v. 98, p. 9425–9430, 2001.

LIANG, S. S. et al. Expression of the variants transcripts of the potassium channel tetramerization domain-containing 15 (KCTD15) gene and their association with fatness traits in chickens. **Domestic Animals Endocrinology**, v. 50, p. 65-71, 2015.

LIEBLE DC. Introduction to proteomics. Tools for the new biology. Totowa: Humana Press; 2002. LIN, C. S., HSU, C. W. Differentially transcribed genes in skeletal muscle of Duroc and Toyuan pigs. *Journal of Animal Science* 83: 2075-2086. Lipke, P.N. and Ovalle, R. (1998). Cell wall architecture in yeast: New structure and new challenges. **Journal of Bacteriology** 180(15): p. 3735-3740, 2005.

LIU, Y. et al. A novel SNP of the ATP1A1 gene is associated with heat tolerance traits in dairy cows. **Molecular Biology Reports**, v.38, p.83–88, 2011.

LIVAK, K. J., E T. D. SCHMITTGEN. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. **Meth.** 25:402-408. 2001.

LOPES, J. C. O. et al. Estresse por calor em frangos de corte. **Nutritime Revista Eletrônica**, v. 12, p. 4478-4487, 2015.

MARCHINI, C.F.P et al. Frequência respiratória e temperatura cloacal em frangos de corte submetidos à temperatura ambiente cíclica elevada. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v.12, n.1, p.41- 46, 2007. Disponível em: Acesso em: 05/04/2019

MINAFRA, C. S. et al. O Balanço eletrolítico e protéico dietéticos sobre as aminotransferases hepáticas, renais e séricas e teores séricos de magnésio e cloro de frangos de corte. **Ciênc. An. Bras.** 10:425-437. 2009.

MISKA, K. B et al. mRNA expression of amino acid transporters, aminopeptidase, and the di- and tri-peptide transporter PepT1 in the intestine and liver of posthatch broiler chicks. **Poultry Science**, v. 94, p. 1323–1332, 2015.

MONGIN, P. Recent advances in dietary anion-cation balance: application in poultry. *Procedure Nutrition Society*, 40:285-294. 1981.

MORAES, M. T. T. Balanço eletrolítico para codornas japonesas (*coturnix coturnix japonica*) na fase de produção. 59 f. 2010. **Dissertação** (Mestrado em Nutrição e Alimentação Animal). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

NASCIMENTO G.R., PEREIRA D.F, NÄÄS I.A. et al. Índice fuzzy de conforto térmico para frangos de corte. **Eng. Agríc.**, Jaboticabal, v.31, n.2, p.219-229, mar./abr. 2011.

NAVAS, T. O. et al. Estresse por calor na produção de frangos de corte. **Revista Nutritime**, v.13, n. 1, p. 4550-4557, 2016.

NIE, Q. et al. High diversity of the chicken growth hormone gene and effects on growth and carcass traits. **Journal of heredity**, v. 96, n. 6, p. 698-703, 2005.

PFÄFFL, M. W. Quantification strategies in real-time PCR. Pages 87-112 in S. A. Bustin ed, A-Z of quantitative PCR. **International University Line** (IUL) La Jolla, CA, USA. 2004.

RIBEIRO, MABELL NERY. Vitamina C e selênio em dietas para frangos de corte no período 1 a 21 dias de idade/Mabell Nery Ribeiro-2018. 76f.

ROLL, B. NUTRIGENÔMICA NA PRODUÇÃO DE AVES E SUÍNOS.

ROSTAGNO, H. S. et al. Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais (3ª ed.). **Universidade Federal de Viçosa** 2011.

SAWOSZ, F. et al. Nano-nutrition of chicken embryos. The effect of silver nanoparticles and glutamine on molecular responses, and the morphology of pectoral muscle. **International Journal of Nanomedicine**, v. 2, p. 29-45, 2012.

SEVEGNANI, K.B. et al. Zootecnia de precisão: análise de imagens no estudo do comportamento de frangos de corte em estresse térmico. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 9, n.1, p.115-119, 2005. Disponível em: Acesso em: 05/04/2019.

SOUZA, B. B. et al. Efeito da suplementação de cloreto de potássio na dieta sobre o equilíbrio ácido-básico e o desempenho de frangos de corte no verão. **Ciência e agrotecnologia**, v.26, n.6, p.1297-1304, 2002.

STEIBEL, J. P. et al. A powerful and flexible linear mixed model framework for the analysis of relative quantification RT-PCR data. **Genomic**. 94:146-152. 2009.

SWENSON, M.J.; REECE, W.O. Dukes – Fisiologia dos Animais Domésticos. Ed. **Guanabara & Koogan**, 11. ed., 856p, 1993.

TEIXEIRA, M. P. F.; ABREU, M. L. T. Vitamina C em rações de frango de corte. **Revista Eletrônica Nutritime**. v.8, n.2, p.1489-1498, 2011.

VIEITES, F. M. Balanço eletrolítico e níveis de proteína bruta em rações para frangos de corte de um a 42 dias. 143 f. 2003. **Tese** (Doutorado em) Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, Minas Gerais, Brasil, 2003.

VIEITES, F. M. et al. Balanço eletrolítico e níveis de proteína bruta sobre parâmetros sanguíneos e ósseos de frangos de corte aos 21 dias de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.6, p.1520-1530, 2004.

VIEITES, FLÁVIO MEDEIROS et al. Variação catiônica na dieta sobre o peso absoluto, rendimento de carcaça e cortes nobres de frangos de corte na região sul de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 10, n. 3, 2009.

WAGNER, C. A et al. Function and structure of heterodimeric amino acid transporters. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 281, p. 1077–1093, 2001.

XIE, Z.; CAI, T. Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>--ATPase-mediated signal transduction: from protein interaction to cellular function. **Molecular Interventions**, v. 3, p. 157–68, 2004.

XIN, B.; WANG, H. Multiple sequence variations in SLC5A1 gene are associated with glucose-galactose malabsorption in a large cohort of Old Order Amish. **Clinical Genetics**, v. 79, p. 86–91, 2010.

YANG, L.; TAN, G.Y.; FU, Y.Q. et al. Effects of acute heat stress and subsequent stress removal on function of hepatic mitochondrial respiration, ROS production and lipid peroxidation in broiler chickens. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v.151, n.2, p.204-208, 2010.

ZHANG, H. et al. Selection signature analysis implicates the PC1/PCSK1 region for chicken abdominal fat content. **Plos One**, v. 7, p. 1-14, 2012a.