



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**  
**CAMPUS “PROF<sup>a</sup>. CINOBELINA ELVAS”**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**EXPRESSÃO GÊNICA, DESEMPENHO, PARÂMETROS  
FISIOLÓGICOS E COMPORTAMENTAIS EM FUNÇÃO DO  
BALANÇO DE ELETRÓLITOS DIETÉTICOS EM  
FRANGOS DE CORTE NA FASE DE 1 A 21 DIAS**

**ANDRÉ CAMPÊLO ARAUJO**

Bom Jesus – PI

2017

**ANDRÉ CAMPÊLO ARAUJO**

**EXPRESSÃO GÊNICA, DESEMPENHO, PARÂMETROS  
FISIOLÓGICOS E COMPORTAMENTAIS EM FUNÇÃO DO  
BALANÇO DE ELETRÓLITOS DIETÉTICOS EM  
FRANGOS DE CORTE NA FASE DE 1 A 21 DIAS**

Dissertação apresentada ao *Campus* Prof<sup>ª</sup> Cinobelina Elvas da Universidade Federal do Piauí, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, na área de Produção Animal (linha de pesquisa Melhoramento e Reprodução Animal), para obtenção do título de Mestre.

**Orientadora:** Katiene Régia Silva Sousa

**Co-Orientadora:** Leilane Rocha Barros Dourado

Bom Jesus – PI

2017

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Setorial de Bom Jesus  
Serviço de Processamento Técnico

A663e Araujo, André Campêlo.

Expressão gênica, desempenho, parâmetros fisiológicos e comportamentais em função do balanço de eletrólitos dietéticos em frangos de corte na fase de 1 a 21 dias. / André Campêlo Araujo. – 2017.

114 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Campus Prof.<sup>a</sup> Cinobelina Elvas, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de Produção Animal (Melhoramento e Reprodução Animal), Bom Jesus-Pi, 2017.

Orientação: “Prof.<sup>a</sup> Katiene Régia Silva Sousa”.

1. Aves. 2. Bioclimatologia. 3. Conversão alimentar.  
4. Etologia. 5. qRT-PCR. Título I.

CDD 636.5

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
CAMPUS "PROFª. CINOBELINA ELVAS"  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Expressão gênica, desempenho, parâmetros fisiológicos e comportamentais em função do balanço de eletrólitos dietéticos em frangos de corte na fase de 1 a 21 dias de idade

Autor: André Campêlo Araujo

Orientadora: Profª Drª. Katiene Régia Silva Sousa

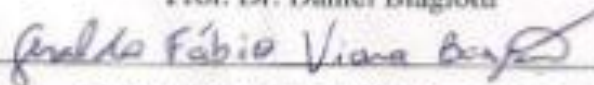
Co-orientadora: Profª Drª. Leilane Rocha Barros Dourado

Aprovada em: 17 de fevereiro de 2017

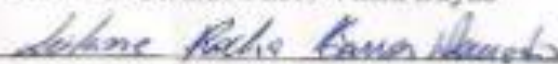
Banca Examinadora



Prof. Dr. Daniel Biagiotti



Prof. Dr. Geraldo Fábio Viana Bayão



Profª. Drª. Leilane Rocha Barros Dourado



Profª. Drª. Katiene Régia Silva Sousa

Bom Jesus-PI

2017

Aos meus pais, Antônio de Pádua Araujo Páscoa (*in memoriam*) e Maria da Cruz Campêlo Araujo, por sempre acreditarem que esse sonho era possível e fazerem de tudo para que eu chegasse até ele.

A minha esposa, Camila Constancio Campêlo, por estar ao meu lado sempre ajudando e incentivando em todos os momentos. EU TE AMO!

A minha família em geral.

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por permitir que este sonho fizesse parte de seus planos para mim.

Aos meus pais, irmãos, esposa e filhos, por serem meu pilar, meu sustento.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dra. Katiene Régia Silva Sousa, pela paciência, orientação e ensinamentos.

À Prof<sup>a</sup>. Dra Leilane Rocha Barros Dourado, pela coorientação, paciência e ensinamentos.

Aos colegas Jamile Silva, Janderson, Lorrane Ribeiro, Joseane Nunes e Johnny Iglesias, pela amizade e ajuda durante o período experimental.

Ao Grupo de Estudos em Nutrição e Produção de Aves e Suínos (GENPAS), pela ajuda na condução do experimento e análises laboratoriais.

À Universidade Federal do Piauí, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia pela oportunidade de realização do curso, pelas instalações e condições para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Colégio Técnico de Bom Jesus (CTBJ), pela disponibilização de instalações e condições para realização do experimento.

A Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), em especial, ao Laboratório de Patologia Molecular, pela estrutura e condições para análises laboratoriais.

À FAPEPI, pela bolsa a mim concedida.

Ao Centro Nacional de Pesquisa (CNPq), pelo financiamento parcial da pesquisa.

Ao Frei Erivelton Pereira Passos, meu padrinho, por sempre ajudar nas horas difíceis.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

“Uma mente que se abre a uma nova ideia nunca mais voltará ao mesmo tamanho”.

**Albert Einstein**

## **BIOGRAFIA**

ANDRÉ CAMPÊLO ARAUJO, filho de Antônio de Pádua Araujo Páscoa e Maria da Cruz Campêlo Araujo, nasceu em São Francisco do Maranhão no dia 19 de dezembro de 1991, no entanto, viveu a maior parte de sua vida em Floriano, estado do Piauí.

Cursou Bacharelado em Zootecnia na Universidade Federal do Piauí, *Campus* Professora Cinobelina Elvas, no período de 2010 a 2014.

Em março de 2015, iniciou o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal do Piauí, na área de Produção Animal – Melhoramento e Reprodução Animal, sob a orientação da Professora Dra. Katiene Régia Silva Sousa e co-orientação da Professora Dra. Leilane Rocha Barros Dourado.

Em fevereiro de 2017, submeteu-se à banca examinadora para defesa da Dissertação de Mestrado.



## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>xiii</b>
<b>RESUMO GERAL.....</b>	<b>xiv</b>
<b>GENERAL ABSTRACT.....</b>	<b>xv</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
1. ESTRESSE POR CALOR NA AVICULTURA.....	4
2. EQUILÍBRIO ÁCIDO-BÁSICO EM FRANGOS DE CORTE.....	7
2.1 Distúrbios relacionados ao equilíbrio ácido básico.....	9
3. NUTRIGENÔMICA E GENES RELACIONADOS COM O BALANÇO ELETROLÍTICO.....	10
3.1 Genes relacionados ao equilíbrio ácido-básico.....	11
3.2 Genes relacionados a absorção e transporte de nutrientes.....	13
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	15
<b>CAPÍTULO 2: BALANÇO ELETROLÍTICO DIETÉTICO PARA FRANGOS DE CORTE: DESEMPENHO ZOOTÉCNICO E EXPRESSÃO GÊNICA.....</b>	<b>23</b>
1. RESUMO.....	24
2. ABSTRACT.....	25
3. INTRODUÇÃO.....	26
4. METODOLOGIA.....	27
5. RESULTADOS.....	40
6. DISCUSSÃO.....	46
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

<b>CAPÍTULO 3: EXPRESSÃO GÊNICA, PARÂMETROS FISIOLÓGICOS, COMPORTAMENTAIS E DESEMPENHO DE FRANGOS DE CORTE SUBMETIDOS A NÍVEIS DE BALANÇO ELETROLÍTICO DIETÉTICO.....</b>	<b>56</b>
1. RESUMO.....	57
2. ABSTRACT.....	58
3. INTRODUÇÃO.....	59
4. METODOLOGIA.....	60
5. RESULTADOS.....	77
6. DISCUSSÃO.....	86
7. CONCLUSÃO.....	91
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>97</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ATP1A1 – Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase subunidade  $\alpha$  1
- ACTA1 – Actina  $\alpha$  1
- BED – Balanço Eletrolítico Dietético
- BEO – Balanço Eletrolítico do Organismo
- CHP1- Proteína homóloga da calcinerina 1
- EAAT3 – Trocador de aminoácidos excitatório 3
- HBMS – Hidroximetilbilano sintase
- HPRT1 – Hipoxantina fosforribosil transferase 1
- NHE1 – Trocador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 1
- NKCC1 – Cotransportador de ânions, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>
- NKCX3 – Cotransportador de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Ca<sup>+</sup>
- SLC1A1 – Carreador de solutos 1 A 1
- SLC5A1 – Carreador de solutos 5 A 1
- SLC9A1 – Carreador de solutos 9 A 1
- SLC12A2 - Carreador de solutos 12 A 2
- SLC7A6 – Carreador de solutos 7 A 6
- SLC7A7 – Carreador de solutos 7 A 7
- SLC24A3 – Carreador de solutos 24 A 3
- SLC26A4 – Carreador de solutos 26 A 4
- SLGT1 – Transportador de Na<sup>+</sup> e glicose 1
- UMA – Unidade de massa atômica
- y<sup>+</sup>LAT1 – Transportador de aminoácidos leves 1
- y<sup>+</sup>LAT2 – Transportador de aminoácidos leves 2

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2: BALANÇO ELETROLÍTICO DIETÉTICO PARA FRANGOS DE CORTE: DESEMPENHO ZOOTÉCNICO E EXPRESSÃO GÊNICA

Tabela 1. Médias das variáveis climáticas durante o período experimental.....	28
Tabela 2. 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.....	30
Tabela 3. 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.....	32
Tabela 4. Níveis de sódio ( $Na^+$ ), potássio ( $K^+$ ), cloro ( $Cl^-$ ) e relações entre os eletrólitos presentes nas dietas experimentais.....	33
Tabela 5. Localização celular (LC), vias metabólicas (VM) e processos biológicos (PB) dos genes utilizados no qRT-PCR.....	36
Tabela 6. Sequências de nucleotídeos, tamanho do amplicon (AMPL) e temperatura de anelamento (TA) dos <i>primers</i> utilizados para as reações de qRT-PCR.....	38
Tabela 7. Efeito dos níveis de balanço eletrolítico dietético (BED) sobre o desempenho de frangos de corte em estresse térmico cíclico natural.....	41

### Capítulo 3: EXPRESSÃO GÊNICA, PARÂMETROS FISIOLÓGICOS, COMPORTAMENTAIS E DESEMPENHO DE FRANGOS DE CORTE SUBMETIDOS A NÍVEIS DE BALANÇO ELETROLÍTICO DIETÉTICO.

Tabela 1. Médias, coeficientes de variação (CV), valores máximos (Max), valores mínimos (Min) das variáveis climáticas nos turnos: madrugada (1), manhã (2), tarde (3) e noite (4).....	62
Tabela 2. 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.....	65
Tabela 3. Valores da inclusão de $K_2CO_3$ , $NaHCO_3$ e $NH_4Cl$ para compor o balanço eletrolítico das dietas experimentais para frangos de corte em substituição ao inerte.....	67
Tabela 4. Níveis de sódio ( $Na^+$ ), potássio ( $K^+$ ), cloro ( $Cl^-$ ) e relações entre os eletrólitos presentes nas dietas experimentais.....	68

Tabela 5. Etograma desenvolvido para avaliação do comportamento das aves a partir dos seus estados de atividade, ócio e movimento agonístico.....	70
Tabela 6. Localização celular (LC), vias metabólicas (VM) e processos biológicos (PB) dos genes utilizados no qRT-PCR.....	73
Tabela 7. Sequências de nucleotídeos, tamanho do amplicon (AMPL) e temperatura de anelamento (TA) dos <i>primers</i> utilizados para as reações de qRT-PCR.....	75
Tabela 8. Efeito dos níveis de balanço eletrolítico sobre o desempenho zootécnico de frangos de corte durante a fase de 1 a 21 dias sob estresse térmico cíclico natural.....	78
Tabela 9. Efeito dos níveis de balanço eletrolítico dietético (BED) sobre parâmetros fisiológicos para frangos de corte sob estresse térmico cíclico natural.....	80
Tabela 10. Médias dos escores e frequências comportamentais em função dos níveis de balanço eletrolítico dietético (BED) de frangos de corte na fase de 1 a 21 dias sob estresse térmico cíclico natural.....	82

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 2: BALANÇO ELETROLÍTICO DIETÉTICO PARA FRANGOS DE CORTE: DESEMPENHO ZOOTÉCNICO E EXPRESSÃO GÊNICA

- Figura 1. Abundância relativa de mRNA ( $2^{-\Delta Ct}$ ) dos genes *ATP1A1*, *SLC1A1*, *SLC5A1*, *SLC7A6*, *SLC12A2* e *SLC26A4* no fígado de frangos de corte aos 21 dias alimentados com diferentes níveis de balanço eletrolítico dietético (BED).....43
- Figura 1. Abundância relativa de mRNA ( $2^{-\Delta Ct}$ ) dos genes *ATP1A1*, *SLC7A6* e *SLC26A4* no intestino de frangos de corte aos 21 dias alimentados com diferentes níveis de balanço eletrolítico dietético (BED).....44
- Figura 3. Abundância relativa de mRNA ( $2^{-\Delta Ct}$ ) dos genes *ATP1A1* e *SLC26A4* no rim de frangos de corte aos 21 dias alimentados com diferentes níveis de balanço eletrolítico dietético (BED).....45

### Capítulo 3: EXPRESSÃO GÊNICA, PARÂMETROS FISIOLÓGICOS, COMPORTAMENTAIS E DESEMPENHO DE FRANGOS DE CORTE SUBMETIDOS A NÍVEIS DE BALANÇO ELETROLÍTICO DIETÉTICO.

- Figura 1. Distribuição da Temperatura do ar (°C), Umidade (%) e ITGU em função das horas do dia nas datas de coleta.....63
- Figura 2. Abundância relativa de mRNA ( $2^{-\Delta Ct}$ ) dos genes *CHP1* e *SLC26A4* no fígado de frangos de corte aos 21 dias alimentados com diferentes níveis de balanço eletrolítico dietético (BED).....84
- Figura 3. Abundância relativa de mRNA ( $2^{-\Delta Ct}$ ) do gene *SLC24A3* no intestino e rim de frangos de corte aos 21 dias alimentados com diferentes níveis de balanço eletrolítico dietético (BED).....85

## RESUMO GERAL

ARAUJO, A. C. Expressão gênica, desempenho, parâmetros fisiológicos, e comportamentais em função do balanço de eletrólitos dietéticos em frangos de corte na fase de 1 a 21 dias. 2017. 114 páginas. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal do Piauí, Bom Jesus, 2017.

A evolução da avicultura teve como resultado um frango de corte de crescimento rápido, no entanto, surgiram diversas dificuldades no que diz respeito ao metabolismo e manejo dessas aves. Tem-se evidenciado o efeito do balanço eletrolítico dietético (BED) sobre parâmetros produtivos, saúde e sanidade na criação de frangos de corte, entretanto, não foram encontrados estudos relacionados ao comportamento e expressão de genes em função do BED. Dessa forma, objetivou-se com este estudo avaliar o efeito de níveis de BED sobre o desempenho, expressão de genes relacionados ao equilíbrio ácido-básico, a absorção e ao transporte de nutrientes, além de parâmetros fisiológicos e comportamentais em frangos de corte na fase de 1 a 21 dias criados em estresse térmico cíclico natural. O experimento foi realizado no setor de Avicultura do Colégio Técnico de Bom Jesus – CTBJ, pertencente à Universidade Federal do Piauí, no município de Bom Jesus-PI. Utilizou-se 245 pintos machos da linhagem Cobb na fase de 1 a 21 dias de idade. 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. Foram avaliados o consumo de ração (CR), ganho de peso (GP), conversão alimentar (CA); parâmetros comportamentais a partir de um etograma com base na atividade, ociosidade e movimentos agonísticos; os parâmetros fisiológicos temperatura retal (TR), frequência respiratória (FR), frequência cardíaca (FC) e temperatura superficial média (TSM), e a análise da expressão dos genes *ATP1A1*, *CHP1*, *SLC1A1*, *SLC5A1*, *SLC7A6*, *SLC7A7*, *SLC9A1*, *SLC12A2*, *SLC24A3* e *SLC26A4* no fígado, intestino e rim por meio da metodologia RT-qPCR em tempo real. Houve efeito significativo ( $p < 0,05$ ) para a conversão alimentar aos 7 e 21 dias. Houve efeito significativo ( $p < 0,05$ ) dos níveis de BED sobre frequência respiratória e frequência cardíaca. Os comportamentos “Ativo”, “Comer”, e “Respiração Ofegante” apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em função do BED. Houve diferença de expressão ( $p < 0,05$ ) para os genes *ATP1A1*, *CHP1*, *SLC1A1*, *SLC5A1*, *SLC7A6*, *SLC9A1*, *SLC12A2* e *SLC26A4* no fígado; os genes *ATP1A1*, *SLC7A6*, *SLC24A3* e *SLC26A4* no intestino; e *ATP1A1*, *SLC9A1*, *SLC24A3* e *SLC26A4* no rim. O BED da dieta afeta a expressão de gênica e, conseqüentemente, o desempenho zootécnico, parâmetros fisiológicos e comportamentais de frangos de corte de 1 a 21 dias, sendo recomendados os níveis de 110 e 370 mEq/kg.

Palavras chave: aves, bioclimatologia, conversão alimentar, etologia, qRT-PCR

## GENERAL ABSTRACT

ARAUJO, A.C. Gene expression, performance, physiological and behavioral parameters as a function of dietary electrolyte balance in broilers from 1 to 21 days. 2017. 114 pages. Dissertation (Master in Animal Science) - Federal University of Piauí, Bom Jesus, 2017.

The evolution of poultry production resulted in a fast-growing broiler chicken, however, there were several difficulties regarding the metabolism and management of these birds. The effect of dietary electrolyte balance (BED) on productive parameters, health and sanity in broiler breeding has been evidenced, however, no studies related to the behavior and expression of genes as a function of BED have been found. Thus, the objective of this study was to evaluate the effect of BED levels on performance, expression of genes related to acid-base balance, nutrient uptake and transport, as well as physiological and behavioral parameters in broilers in the stage from 1 to 21 days under natural cyclic thermal stress. The experiment was carried out in the poultry sector of the Technical College of Bom Jesus - CTBJ, belonging to the Federal University of Piauí, in the municipality of Bom Jesus-PI. 245 male chicks of the Cobb strain were used in the 1 to 21 days age phase. The experimental design was completely randomized with five BED levels (110, 175, 240, 305 and 370 mEq / kg) and 7 replicates of 7 birds each. The following parameters were evaluated: dietary consumption (CR), weight gain (GP), food conversion (CA); behavioral parameters from an etogram based on activity, idleness and agonistic movements; physiological parameters respiratory rate (FR), heart rate (FC) and mean surface temperature (TSM) and analysis of the expression of the *ATP1A1*, *CHP1*, *SLC1A1*, *SLC5A1*, *SLC7A6*, *SLC7A7*, *SLC9A1*, *SLC12A2*, *SLC24A3* and *SLC26A4* genes in the liver, intestine and kidney by real-time RT-qPCR methodology. There was a significant effect ( $p < 0.05$ ) for feed conversion at 7 and 21 days. There was a significant ( $p < 0.05$ ) effect of BED levels on respiratory rate and heart rate. The behaviors "Active", "Eat", and "Breathing Breathing" presented significant difference ( $p < 0.05$ ) as a function of BED. There were differences in expression ( $p < 0.05$ ) for the *ATP1A1*, *CHP1*, *SLC1A1*, *SLC5A1*, *SLC7A6*, *SLC9A1*, *SLC12A2*, and *SLC26A4* genes in the liver; the *ATP1A1*, *SLC7A6*, *SLC24A3* and *SLC26A4* genes in the gut; and *ATP1A1*, *SLC9A1*, *SLC24A3*, and *SLC26A4* in the kidney. The BED affects the gene expression and, consequently, the zootechnical performance, physiological and behavioral parameters of broilers from 1 to 21 days, and levels of 110 and 370 mEq / kg are recommended.

Key words: birds, bioclimatology, ethology, feed conversion, qRT-PCR



## INTRODUÇÃO GERAL

Devido à dinâmica na cadeia produtiva da avicultura, os frangos de corte passaram por intensas mudanças no que diz respeito a manejo, instalações, nutrição e, principalmente, no melhoramento genético. Essas alterações tiveram como resultado um frango de corte de crescimento rápido e com menor conversão alimentar. Entretanto, as aves passaram a sofrer mais estresse com essas mudanças, principalmente no que diz respeito as condições ambientais.

As aves quando sofrem estresse térmico realizam alterações comportamentais e fisiológicas no sentido de minimizar o estresse (ESTEVEZ, 2007), no entanto, a eficiência destes ajustes é dependente da magnitude e da duração do estresse. Situações em que o ambiente é estressante por conta do calor podem afetar o equilíbrio ácido-básico (EAB) em frangos de corte devido à elevação da frequência respiratória, que aumenta o CO<sub>2</sub> expirado causando alcalose respiratória e, conseqüentemente, alterações do pH e balanço de eletrólitos do organismo (BEO) (VIEITES et al., 2011).

Além de fatores climáticos, a dieta também pode influenciar o desempenho produtivo das aves porque também interfere diretamente no EAB. A adoção de medidas como mudanças nas instalações e manipulação da dieta, ajudam a manter o EAB do organismo, e é de grande valia no sentido de otimizar o desempenho de frangos de corte submetidos a condições de temperaturas elevadas e superar os efeitos negativos do estresse térmico (BORGES et al., 2003).

Os íons sódio (Na<sup>+</sup>), potássio (K<sup>+</sup>) e cloro (Cl<sup>-</sup>) participam nas formulações das rações não só para atender suas exigências como minerais, mas também para promover o adequado BEO (ARAÚJO et al., 2011). A dieta pode interferir no BEO por meio do balanço eletrolítico dietético (BED), que é dado pela soma do Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> presentes na ração, podendo afetar o desempenho zootécnico e o estado de saúde das aves (VIEITES et al., 2011). O BEO pode ser entendido como a soma dos cátions e ânions presentes nos fluidos corporais, e é dado pela soma dos eletrólitos ingeridos e excretados pelos animais, sendo determinante no EAB (JUNQUEIRA et al., 2015).

Os eletrólitos fortes (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>) são minerais essenciais para aves por exercerem funções importantes no meio extra e intracelular (FREITAS et al., 2013). Estes íons podem interferir, além da manutenção do EAB, no crescimento, desenvolvimento ósseo, consumo de alimentos, resposta ao estresse térmico, na absorção e metabolismo de nutrientes (BORGES et al., 2007). Os componentes do BED também podem alterar a expressão de genes (GAL-GABER et al., 2003; HUANG et al., 2014b; LIANG et al., 2015), sendo

interessante pesquisas nesta área de estudo, considerando a possibilidade de alterações moleculares em função da ingestão de diferentes níveis de BED por frangos de corte.

Os nutrientes presentes na dieta podem interagir com o genoma (RODRIGUÉZ et al., 2007), e causar alterações na resposta de características de interesse zootécnico. Estudos na área de nutrigenômica procuram como evidenciar a influência dos nutrientes disponibilizados na dieta sobre as vias metabólicas e, principalmente, a homeostase do organismo (MULLER; KERSTEN, 2003). Nesta área de conhecimento, as ferramentas da genômica, como a análise da expressão gênica, são aplicadas nas pesquisas em nutrição com o intuito de obter maior compreensão do comportamento do genoma frente às diferentes estratégias nutricionais.

A determinação dos níveis ideais de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$  na ração para cada fase de produção das aves é de grande importância devido à participação do BED nas funções do organismo. No entanto, existem divergências sobre o nível de BED adequado para o melhor desempenho (VIEITES et al., 2011) e poucos estudos destacam esses minerais no aspecto conjunto sobre a expressão gênica, parâmetros fisiológicos e comportamentais de frangos de corte, tornando-se necessárias pesquisas aplicadas sobre os efeitos do BED nestas variáveis.

Dessa forma, objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito de níveis de BED sobre a expressão de genes relacionados ao EAB e à absorção e transporte de nutrientes, características de desempenho zootécnico, parâmetros fisiológicos e comportamentais de frangos de corte na fase inicial sob estresse térmico cíclico natural.

A dissertação foi desenvolvida sob o cadastro nº 006/2013, junto a Coordenadoria Geral de Projetos (CGP) da Universidade Federal do Piauí, aprovada pelo comitê de ética em experimentação animal da UFPI sob o protocolo n. 075/15 e estruturada conforme as normas para elaboração de dissertações do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (PPGZ) da UFPI da seguinte forma: INTRODUÇÃO GERAL; CAPÍTULO 01. Revisão Bibliográfica elaborada de acordo com as normas do PPGZ; CAPÍTULO 02 – artigo científico intitulado: “Balanço eletrolítico dietético para frangos de corte: Desempenho zootécnico e expressão gênica”, elaborado de acordo com as normas da revista Poultry Science; CAPÍTULO 03 – artigo científico intitulado: “Expressão gênica, parâmetros fisiológicos, comportamentais e desempenho zootécnico de frangos de corte alimentados com níveis de balanço eletrolítico dietético”, elaborado de acordo com da revista Journal of Agricultural Science; e CONSIDERAÇÕES FINAIS.

## **CAPÍTULO 1. REVISÃO DE LITERATURA**

Elaborada de acordo com as normas do PPGZ

## 1. ESTRESSE TÉRMICO POR CALOR NA AVICULTURA

Quando se trata do ambiente, para que ocorra a produção em nível ótimo é necessário que os animais se encontrem dentro da zona de conforto térmico. A zona de termoneutralidade, ou conforto térmico, é o intervalo de temperatura onde as aves podem realizar as trocas térmicas com o ambiente com o mínimo gasto energético com a termogênese ou a termólise. Nesse intervalo a energia líquida é utilizada de forma mais eficiente, visto que não ocorrem desvios para manutenção da homeotermia (FERRO et al., 2010).

A temperatura de conforto térmico das aves é de 32 a 35°C na primeira semana de idade, 29 a 32°C na segunda, 26 a 29°C na terceira, 23 a 26°C na quarta, 20 a 23°C na quinta e de 20°C na sexta semana, sendo que a umidade relativa deve estar entre 60 e 70 % (ABREU; ABREU, 2011). A partir do momento em que a temperatura ambiente ultrapassa a temperatura de conforto térmico das aves, tem-se início o estresse por calor; nessas condições a taxa metabólica é mínima e a homeotermia é mantida com um gasto maior de energia (TEXEIRA; ABREU, 2011).

O calor corporal originado nos processos metabólicos deve ser perdido para manter a homeostase, porém o ambiente pode dificultar o balanço térmico e, conseqüentemente, fazer com que ocorra aumento da temperatura corporal dando origem ao estresse por calor (LONGO et al., 2006). Os animais adquirem calor devido à energia de manutenção, que corresponde à energia necessária para o metabolismo basal, produção de calor pelo movimento, pela alimentação, para o crescimento e demais funções orgânicas normais (NASCIMENTO, 2010). Vários fatores como o peso, a idade, o estado fisiológico, a taxa de lotação, o nível de alimentação e a genética, bem como fatores relacionados ao ambiente, como a temperatura, a velocidade do vento, a umidade relativa do ar, o tipo de piso e energia radiante, influenciam diretamente no conforto térmico das aves (RAO et al., 2013; QUINTEIRO FILHO et al., 2010; TAN et al., 2010).

O aumento da temperatura corpórea faz com que eleve a frequência respiratória, levando a um aumento no nível de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) expirado, acarretando em perdas excessivas de CO<sub>2</sub> no plasma sanguíneo (TEIXEIRA; ABREU, 2011). O aumento da taxa respiratória pode causar a alcalose respiratória e, conseqüentemente, o desequilíbrio ácido-básico (DAB) (VIEITES et al., 2011). Durante a alcalose respiratória a pressão parcial de CO<sub>2</sub> (pCO<sub>2</sub>) diminui, levando à queda na concentração de ácido carbônico (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) e hidrogênio (H<sup>+</sup>) livre, o que leva a um aumento na excreção de

bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) e retenção de  $\text{H}^+$  pelo rim, na tentativa da ave de manter o EAB (BROSSI et al., 2009).

Em casos de estresse mais severo, o ajuste renal não é suficiente para compensar o DAB (ALLAHVERDI et al., 2013). Além disso, há a redução na atividade da cadeia respiratória mitocondrial, seguida por maior produção de espécies reativas de oxigênio, alterando, portanto, a expressão de genes (YANG et al., 2010), acarretando em prejuízos fisiológicos e produtivos, tais como, taxa de crescimento diminuída em função da queda do consumo alimentar (QUINTERO-FILHO et al., 2010), diminuição da produção de calor metabólico, redução do rendimento de carcaça, além de afetar a qualidade da carne (ZHANG et al., 2012b).

A principal consequência a fatores estressantes são respostas fisiológicas e comportamentais negativas, podendo resultar em sérios problemas de saúde, bem-estar e de imunidade animal, além de prejuízos no próprio desempenho das aves (ESTEVEZ, 2007). Durante o estresse térmico, as aves alteram seu comportamento para auxiliar na manutenção da temperatura corpórea e manter-se dentro de limites normais. Elas aumentam a sua superfície corporal mantendo as asas abertas e afastadas do corpo, eriçam as penas e intensificam a circulação periférica (RETELATTO et al., 2008). Esses tipos de ajustes comportamentais podem ocorrer rapidamente e a um custo menor que os ajustes fisiológicos (PEREIRA et al., 2005).

O comportamento normal das aves tem como referência o comportamento de suas ancestrais, entretanto, Campos (2000) comentou que o comportamento das aves vem mudando em função das condições de alojamento. Os comportamentos de limpar as penas, espojamento, sentar, arrepiar penas, abrir asas, prostrar, correr, espreguiçar, ciscar, ingerir água, ingerir alimento dentre outros, podem ter reflexos diretos do ambiente sobre a ave (PEREIRA et al., 2005).

Alguns autores ao estudarem o comportamento de aves utilizaram respostas como nível de agressão e de frustração para estimar o bem-estar destes animais (MARÍA et al., 2004; PEREIRA et al., 2006). Densidades de estocagem superiores a 16 aves/m<sup>2</sup> levaram a compressão dos frangos e suprimiram a oportunidade de manifestação de comportamentos, tais como, ocioso, beber água e bicar o chão (BOKKERS et al., 2011). Simitzis et al. (2012) observaram redução na atividade locomotora das aves submetidas à densidade de criação de 13 aves/m<sup>2</sup> em comparação à 6 aves/m<sup>2</sup>. Carvalho et al. (2013) estudaram o efeito de níveis de selênio dietético de fontes diferentes sobre o comportamento de frangos de corte na fase inicial em condições de estresse térmico, e verificaram que houve efeito do

mineral sobre o ato de comer, ficar com o bico aberto, ciscar, esticar membros e tomar banho de poeira.

No que diz respeito aos fatores fisiológicos relacionados ao estresse térmico em aves, uma série de mecanismos termorregulatórios, como elevação da frequência respiratória e fluxo sanguíneo por exemplo, atuam em quatro unidades funcionais diferentes do organismo: receptor, controlador, efetor e passivo. A resposta ao estresse térmico é realizada pelo sistema efetor, atuante na manutenção da homeotermia após a percepção dos estímulos pelos receptores, que estão integrados ao sistema nervoso central (MACARI; FURLAN, 2001).

Os receptores estão distribuídos nas superfícies das células e, portanto, apresentam-se amplamente pela superfície do animal, tendo como principal função captar os estímulos que serão levados, através dos nervos, ao hipotálamo. O hipotálamo recebe os estímulos dos receptores, possuindo os neurônios responsivos pelo calor e pelo frio, atuando na tradução do estímulo e determinando a resposta, constituindo-se como centro controlador (YAHAV et al., 2011).

O sistema passivo é constituído pelo sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático, que atuam na vasoconstrição e vasodilatação periférica, atuantes principalmente, no fluxo sanguíneo. O sistema efetor é constituído por nervos e glândulas que atuam na secreção de hormônios importantes na alteração do comportamento e da fisiologia da ave em condições de estresse (MACARI; FURLAN, 2002).

Em condições de estresse, as aves podem responder com alterações fisiológicas, relacionadas às mudanças no eixo do estresse. As principais mudanças estão relacionadas ao aumento no ritmo cardíaco, níveis séricos de corticosterona e catecolaminas; hipertrofia ou atrofia da adrenal; imunossupressão; variação nas concentrações de hormônios reprodutivos e do crescimento; além de mudanças neuroquímicas (FREEMAN et al., 1984).

Thaxton e Puvadolpirod (2000) avaliaram as respostas adaptativas frente à condição de estresse em aves e determinaram que ocorre redução no ganho de peso; aumento nas concentrações séricas de glicose, proteínas totais, triglicerídeos, lipoproteínas, lipídio hepático; redução no peso relativo dos principais órgãos do sistema imune (timo, baço e bursa de Fabricius); aumento do peso relativo do fígado e na relação entre heterófilos e linfócitos, sendo este último um indicativo de estresse crônico (HECKERT et al., 2002).

O estado de estresse por calor afeta também o estado oxidativo das células, eleva a peroxidação lipídica e a produção de radicais livres nos tecidos, sendo esse desequilíbrio

resultante em disfunção celular e, conseqüentemente, afeta a saúde do organismo (MAINI et al., 2007).

## 2. EQUILÍBRIO ÁCIDO-BÁSICO EM FRANGOS DE CORTE

O EAB no organismo das aves é dado pela manutenção das quantidades de ácidos e bases nos fluidos corporais e é mantido por vários mecanismos complexos. Quando ocorre o DAB uma série de reações são realizadas pelo organismo no sentido de compensar as alterações sofridas, caracterizando uma busca permanente pelo equilíbrio (BROSSI et al., 2009). Neste contexto, o balanço de alguns minerais está envolvido numa série de eventos fisiológicos relacionados ao EAB, podendo influenciar no desempenho produtivo das aves (MORAES, 2010).

O BEO também pode ser entendido como equilíbrio iônico dos fluidos corporais que regulam o EAB para a manutenção da homeostase orgânica (MINAFRA et al., 2009). A concentração do  $H^+$  livre no organismo depende da ação de substâncias que podem ceder íons  $H^+$  em uma solução, denominadas de ácidos, e de substâncias capazes de captar íons  $H^+$  nas soluções, que são denominadas bases. Dessa maneira, a concentração de hidrogênio livre nos líquidos corporais é resultado do equilíbrio entre ácidos e bases (DALL' STELLA, 2008).

Os principais íons responsáveis pela manutenção osmótica, pelo equilíbrio ácido-básico e pelo balanço hídrico nos tecidos corporais são os cátions sódio ( $Na^+$ ) e potássio ( $K^+$ ) e o ânion cloro ( $Cl^-$ ) (MORAES, 2010), devido ao fato da absorção desses íons ser superior em relação aos demais e estes elementos químicos precisam estar equilibrados para garantir um bom funcionamento do metabolismo (FERREIRA, 2005).

O  $Na^+$  e o  $Cl^-$  são os principais íons que compõem o fluido extracelular, enquanto o  $K^+$  corresponde ao principal cátion do fluido intracelular. É sabido que a regulação osmótica é obtida por meio da homeostasia destes íons e, em condições normais, os conteúdos de água e eletrólitos são mantidos dentro de limites estreitos (SILVA et al., 2015). Porém, a perda desses eletrólitos ( $Na^+$  ou  $K^+$ ), sem alterar o conteúdo da água corporal, reduz a osmolalidade destes fluidos (DALL' STELLA, 2008).

Borges et al. (2007) afirmaram que o  $K^+$  está envolvido em muitos processos metabólicos, incluindo o antagonismo arginina-lisina, condução nervosa, excitação, contração muscular, síntese de proteínas teciduais, manutenção da homeostasia intracelular, reações enzimáticas e no EAB. Da mesma forma que o  $K^+$ ; os eletrólitos  $Na^+$  e

Cl<sup>-</sup> tem atividades em processos metabólicos basais como absorção de monossacarídeos e aminoácidos, excitação nervosa e muscular, secreções no trato gastrointestinal, síntese proteica, entre outras (MURAKAMI et al., 2001; OLANREWAJU et al., 2007).

Os eletrólitos podem ser definidos como elementos químicos que dissociados tem a capacidade de transmitir impulsos elétricos em soluções (JUNQUEIRA et al., 2015). A suplementação de eletrólitos tanto na água de bebida (AGUIAR; LOPES; RIBEIRO, 2015) quanto nas rações (VIEITES et al., 2011) vem sendo utilizada por criadores por frangos de corte, no sentido de tentar diminuir os efeitos do estresse térmico em regiões de clima quente, pois corrige o desequilíbrio ácido-básico (DAB) (LOPES et al., 2015).

Para tal finalidade, a suplementação é feita com a adição de compostos alcalinos para elevar o BEO e a adição de compostos ácidos a fim de reduzir o BEO, dependendo da necessidade de cada caso. Dentre os compostos alcalinos, os mais utilizados na suplementação são: o bicarbonato de potássio (KHCO<sub>3</sub>), o bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) e o carbonato de potássio (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), e dentre os compostos ácidos destacam-se o cloreto de potássio (KCl), o cloreto de amônio (NH<sub>4</sub>Cl) e o cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>) (DALL' STELLA, 2008).

A inclusão de eletrólitos na dieta de aves teve uma atenção especial desde o trabalho realizado por Mogin (1981), que descreveu de forma detalhada e precisa a influência dos eletrólitos dietéticos Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> e relação (K<sup>+</sup>+Cl<sup>-</sup>)/Na<sup>+</sup> sobre a homeostase e o crescimento das aves. Vários autores estudaram o efeito de dietas com o princípio da inclusão de eletrólitos, dietas catiônicas e aniônicas, sobre vários parâmetros produtivos e fisiológicos, além de estabelecer várias outras relações entre os minerais presentes na ração (MINAFRA et al., 2009; VIETES et al., 2011).

Vieites et al. (2005) afirmaram que o uso de NH<sub>4</sub>Cl e K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> utilizados na correção do BED influenciou o desempenho, rendimento de carcaça e a umidade da cama em frangos de corte aos 42 dias de idade. Minafra et al (2009) verificaram que o BED afetou os parâmetros sanguíneos e a concentração sérica de metabólitos em aves. Vieites et al. (2011) recomendaram níveis de BED de 270 a 300 mEq/Kg para o melhor crescimento de frangos de corte criados em clima quente na fase inicial e final utilizando NH<sub>4</sub>Cl e K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

Estudos de ressonância magnética nuclear demonstraram ainda que a estrutura dos ácidos nucleicos tem respostas sequência-dependente das concentrações fisiológicas de K<sup>+</sup> e Na<sup>+</sup> (HEDDI et al., 2007), e alteram a organização dos duplexes e quadruplexes de DNA e RNA (HALDER; HARTIG, 2011; HUANG et al., 2014a; MURAT et al., 2014; ARACHCHILAGE et al., 2015).



A manipulação incorreta do BED pode afetar profundamente a homeostase do animal, pela influência no material genético e execução das funções orgânicas corporais, podendo acarretar danos prejudiciais ao desempenho e principalmente ao estado de saúde das aves. Dessa forma, estudos em diferentes componentes biológicos que procurem integrar informações no sentido de elucidar divergências em resultados experimentais se tornam relevantes (VIEITES et al., 2011).

## 2.1 Distúrbios relacionados ao desequilíbrio ácido-básico

Os principais distúrbios relacionados ao DAB são representados pela alcalose e acidose, que podem ser respiratória ou metabólica, dependendo da origem das alterações fisiológicas. Em casos que ocorrem estímulos para o aumento da frequência respiratória, como o estresse térmico, as aves podem entrar em um quadro de alcalose respiratória (ABREU; ABREU, 2011). O estresse térmico nas aves, provocando alterações no equilíbrio ácido-básico, podem causar óbito dos animais, dependendo do tempo de exposição ao estresse (VIEITES et al., 2011).

Perdas significativas na  $p\text{CO}_2$  podem diminuir a quantidade de  $\text{H}_2\text{CO}_3$  presente no plasma, fazendo com que ocorra um aumento da base conjugada, nesse caso o  $\text{HCO}_3^-$ , em relação ao ácido, caracterizando a alcalose de origem respiratória. Em casos opostos que estimulam o aumento da  $p\text{CO}_2$ , como a redução da área pulmonar por exemplo, ocorre a acidose respiratória (DEVLIN; MATZKE, 2014).

Condições de origem metabólica que não tem origem direta nos níveis de  $p\text{CO}_2$ , em que os níveis de  $\text{Cl}^-$  (íon acidogênico) estão elevados, o pH sanguíneo diminui, caracterizando a acidose metabólica, em contrapartida, quando há um aumento nas proporções de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  (íons alcalinizantes) em relação ao  $\text{Cl}^-$ , o pH dos fluidos corporais aumenta, caracterizando alcalose metabólica (ATHERTON, 2009). Nesses casos, os processos metabólicos são voltados, prioritariamente, para a regulação homeostática em detrimento dos processos produtivos, e o rim tem o papel primordial nesses ajustes fisiológicos (JUNQUEIRA et al., 2015).

Quando ocorre excesso de ácidos ou bases no plasma, o rim realiza o ajuste da taxa de excreção/reabsorção desses metabólitos, com o intuito de manter as concentrações dentro de níveis adequados e retornar ao EAB (OLIVEIRA; PESSA, 2013). Em caso de excesso de base, o rim atua na reabsorção de  $\text{H}^+$  e excreção de  $\text{HCO}_3^-$ , no caso de excesso de ácidos ocorre o oposto e é priorizada a reabsorção de  $\text{HCO}_3^-$ . Existem outros tampões

que atuam na manutenção deste equilíbrio (proteínas, fosfatos orgânicos e inorgânicos e a hemoglobina, por exemplo), mas o sistema  $H^+/HCO_3^-$  é o mais efetivo no tamponamento do pH (AYERS et al., 2015).

Modificações anormais na concentração do  $H^+$  podem causar acentuadas mudanças na velocidade das reações químicas das células. Problemas como a má qualidade da casca do ovo, a má adaptação ao estresse térmico, o baixo desempenho dos animais, o antagonismo lisina-arginina e a discondroplasia tibial podem ser desencadeados ou piorados pelo DAB nas aves (VIEITES et al., 2004).

A conversão da Vitamina D3 na sua forma biologicamente ativa (1,25-diidroxicolecalciferol) sofre influências negativas da acidose metabólica. A conversão ocorre por um processo de hidroxilação, no qual a vitamina D3 é convertida no fígado em 25-hidroxicolecalciferol e, em seguida, a 1,25-diidroxicolecalciferol no rim, e quando há um quadro de acidose ocorre a redução da hidroxilação no rim (TRIPKOVIC et al., 2012). As consequências desse processo podem acarretar uma má mineralização dos ossos, que se torna mais evidente quando há deficiência considerada de  $K^+$  na dieta das aves (LANGLEY et al., 2003).

### 3. NUTRIGENÔMICA E GENES RELACIONADOS AO BALANÇO ELETROLÍTICO

A nutrigenômica é uma ciência que busca elucidar como os nutrientes podem regular a expressão gênica (RODRIGUÉZ et al., 2007). A dieta é um fator ambiental que pode agir de forma direta na regulação da expressão de genes, por proporcionar os nutrientes necessários para as funções celulares (MUTCH; WAHLI; WILLIAMSON, 2005). Assim, é relevante a compreensão de quais nutrientes podem ser bioativos e como ocorre a regulação da expressão gênica por eles (GONSALVES et al., 2009).

A publicação da primeira versão completa do genoma da galinha (*Gallus gallus domesticus*) revelou a presença de 1 bilhão de pares de base e aproximadamente 20-23.000 genes, possibilitando uma grande quantidade de informações para estudos posteriores (HILLIER et al., 2004). A determinação do padrão de expressão de genes ativos em determinados processos biológicos do organismo é fundamental para o entendimento do papel de agentes externos sobre o genoma, além da influência direta na homeostase do animal (ROSA, 2007). O fato de ser possível a alteração na expressão de genes relacionados ao equilíbrio ácido-básico pode ser determinante na compreensão de como as concentrações de eletrólitos interferem no metabolismo (LIANG et al., 2015).

Kim et al. (2009a) estudaram o efeito da suplementação de ácido linoleico conjugado (CLA) na dieta de frangos de corte sobre a expressão de genes relacionados ao metabolismo dos lipídeos. Esses autores verificaram que a suplementação com CLA aumentou a quantidade de mRNA da *Fatty Acid Sintase* (FAS) e *Acetil Coenzyme A Carboxilase* (ACC) no fígado, além de promover acúmulo de CLA no músculo.

A suplementação de magnésio em dietas para frangos de corte correlacionou-se positivamente com a quantidade de mRNA da enzima catalase no fígado de frangos de corte e, conseqüentemente, com a atividade desta enzima, que é importante no sistema antioxidante das células (LIU et al., 2007). Takahashi et al. (2008) ao suplementarem a dieta de frangos de corte com glicina observaram que houve alteração na expressão de genes relacionados a resposta inflamatória no baço e fígado, sugerindo que as resposta inflamatórias podem ser moduladas pela ingestão de glicina.

Estudos de nutrigenômica são promissores na produção animal, pelo fato de ser possível melhorar o desempenho zootécnico e a saúde dos animais (GONSALVES et al., 2009). A dieta pode representar custos na ordem de 70 a 80 % na produção, sendo necessárias medidas que permitam utilizar os alimentos de forma mais precisa e eficiente (BERCHIELLI et al., 2006).

### 3.1 Genes relacionados ao equilíbrio ácido básico

O gene *ATPIA1* codifica a proteína transportadora  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase subunidade  $\alpha$  1, que possui a função molecular de ligação de 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). O *ATPIA1* também possui a função de quebra de ATP (LIU et al., 2011), que se for alterada pode indicar estresse e uma possível resposta a condições desfavorável para o organismo.

Além das funções já descritas, o *ATPIA1* interfere também 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). Alarcon (2015) encontrou efeito significativo para alteração na expressão do gene *ATPIA1*

com aumento em função da idade (período de 7, 21 e 42 dias) no intestino de frangos de corte suplementados com óleos essenciais e probióticos.

A proteína homóloga da calcineurina B1, codificada pelo gene *CHPI*, tem como principais processos biológicos a: resposta celular ao pH ácido, regulação do pH intracelular, acoplamento da membrana, organização da membrana, regulação negativa da cascata de sinalização da calcineurina-NFAT, regulação negativa da atividade do fator de transcrição NF-*kappa*B, regulação negativa da atividade da fosfatase, regulação negativa da auto-fosforilação de proteínas (MATSUSHITA et al., 2007; SCHALCH et al., 2009).

Dentre as funções do *CHPI* estão: a regulação negativa da importação de proteínas no núcleo, regulação negativa da atividade da proteína quinase, regulação negativa da fosforilação proteica, regulação negativa da ubiquitinação de proteínas, regulação positiva da glicosilação de proteínas, regulação positiva da orientação da proteína para membrana, regulação positiva do transporte de proteínas, regulação positiva da atividade anti-próton do sódio, exportação de proteínas a partir do núcleo e estabilização de proteínas. (SADAIE et al., 2004; SCHALCH et al., 2011).

Matsushita et al. (2007) ao estudarem os efeitos da deficiência do gene *CHPI* em culturas de células transgênicas de frangos observaram dificuldade na ligação de cálcio, alteração nas trocas de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , alterações de pH, diminuição na resposta ao pH ácido e diminuição dos níveis de NHE1 (proteína que atua na troca  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , codificada pelo gene *SLC9A1*). Assim, as alterações nos níveis de RNAm do *CHPI* estão diretamente relacionadas ao equilíbrio ácido-básico, que segundo Ayers et al. (2015) é denotada principalmente pela mudança no pH.

O gene *SLC12A2* codifica a proteína NKCC1, que é um transportador  $\text{K}^+/\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ , e atua no: transporte de amônio ( $\text{NH}_4^+$ ), homeostase do volume celular, homeostase e transporte transmembrana do  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , além do crescimento do organismo multicelular e transporte trans-epitelial de  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{Cl}^-$  (HAMANN et al., 2005). Zhang et al. (2012a) ao estudarem assinaturas de seleção e 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 ambas as características estudadas.

A proteína NCKX, codificada pelo gene *SLC24A3*, possui funções moleculares relacionada a: atividade antiporte do  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+/\text{Na}^+$ ; transporte transmembrana de  $\text{Ca}^{2+}$ , homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$  e transporte transmembrana de  $\text{Na}^+$  (VISSER et al., 2007; LYTTON, 2007).

O gene *SLC26A4*, que codifica a proteína Pendrina, participa principalmente de 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., 2009b).

O gene *SLC9A1* codifica uma proteína que faz parte da classe dos trocadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  denominada NHE1, importante na resposta ao pH ácido; homeostase do sódio; regulação positiva da atividade antiporte da  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ; da hipertrofia do músculo cardíaco; da proteína NFAT dentro do núcleo; da força de contração do coração; do promotor da transcrição da RNA polimerase II; transporte transmembrana do  $\text{K}^+$ ; regulação do pH intracelular; resposta ao estiramento muscular; e entrada do  $\text{Na}^+$  através da membrana plasmática (BAUMGARTNER et al., 2004; ALEXANDER et al., 2011).

Magalhaes et al. (2011) demonstraram em culturas de células de frangos que substâncias eletrolíticas e antibióticas podem alterar as funções normais do *SLC9A1* e tornar as células mais sensíveis a mudanças no pH, com potencial influência sobre as funções celulares básicas. Ainda segundo os mesmos autores, essa resposta tem efeito sobre a atividade da NHE1 e na fosforilação e desfosforilação de proteínas. Matsushita et al. 2007 também associaram menor atividade e prejuízos nas trocas de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  em células transgênicas de frangos sob condições anormais (função deficiente do gene *CHP1*).

## 5.2 Genes relacionados ao absorção e transporte de nutrientes

A proteína EAAT3 é codificada pelo gene *SLC1A1* e faz parte da família de transportadores de aminoácidos. Entre as atividades dessa proteína estão o: transporte de D-aspartato, L-glutamato e regulação da frequência cardíaca (BIANCHI et al., 2014). A EAAT3 pode ser classificada como  $\text{Na}^+$ -dependente e atua na absorção e reabsorção de aminoácidos nos tecidos, sendo o gene que a codifica amplamente difundido nos órgãos do organismo (BAILEY et al., 2011).

O desenvolvimento pós-natal de frangos de corte tem efeito sobre a expressão do *SLC1A1* no duodeno, jejuno, íleo e fígado, sendo que ocorre maior expressão com o aumento da idade (MISKA et al., 2015). O *SLC1A1* de frangos de corte é expresso diferentemente de acordo com linha genética, fase de vida, segmento do intestino delgado e pode haver interações na expressão desse gene entre a fase da vida e o local do intestino amostrado (GILBERT et al., 2007). Estudos afirmam que a distribuição da EAAT3 também pode ter papel no suporte de energia nas células do intestino, estimulando a

proliferação celular, sendo mais abundantes nas criptas que nos vilos (ROME et al., 2002; IWANAGA et al., 2005).

O gene *SLC5A1* codifica a proteína SGLT1, que tem como principal função molecular a atividade simporte de Na<sup>+</sup>/glicose, além de atuar nos processos biológicos de transporte transmembrana de glicose e Na<sup>+</sup> (XIN; WANG, 2010). Como o NaHCO<sub>3</sub> é frequentemente utilizado na correção do BED (DALL'STELLA, 2008), a maior quantidade de substrato Na<sup>+</sup> pode influenciar na atividade e/ou expressão do *SL5A1* pela dependência desse mineral na sua atividade (XIN; WANG, 2010).

Gilbert et al. (2007) encontraram efeito significativo para o aumento da expressão do gene *SLC5A1* em função da idade e maiores quantidades de RNAm deste gene foram encontradas no jejuno do que no duodeno e íleo. Barfull et al. (2002) afirmaram que os níveis de RNAm do *SLC5A1* diminuíram em frangas White Leghorn após o nascimento, culminando em menor quantidade de glicose circulante, conseqüentemente, prejuízos no metabolismo energético.

Os genes *SLC7A7* e *SLC7A6* codificam os transportadores de aminoácidos y<sup>+</sup>LAT1 e y<sup>+</sup>LAT2, respectivamente, e estão relacionados a funções como a absorção de aminoácidos no intestino delgado, transporte de aminoácidos para o sangue, captação dos aminoácidos do sangue para os tecidos (fígado, rim, cérebro, coração, músculo esquelético), 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).

As proteínas y<sup>+</sup>LAT1 e y<sup>+</sup>LAT2 são dependentes de Na<sup>+</sup> (BRÖER, 2008) e atuam, principalmente, na troca de Na<sup>+</sup> e aminoácidos neutros de cadeia grande por aminoácidos básicos (TORRENTS et al., 1998), sendo o y<sup>+</sup>LAT2 com maior afinidade por glutamina e arginina (BRÖER et al., 2000). Miska et al. (2015) estudaram o efeito do desenvolvimento pré e pós-natal sobre a expressão gênica de vários transportadores de aminoácidos, dentre eles o y<sup>+</sup>LAT1 e y<sup>+</sup>LAT2, no intestino e fígado de frangos de corte e constataram efeito significativo do estágio de desenvolvimento para o *SLC7A7* e *SLC7A6* em ambos os tecidos estudados, com aumento da expressão relativa em função da idade.

Sun et al. (2015) ao estudarem o efeito da elevação da temperatura ambiente de 24 para 32°C sobre a expressão de transportadores de aminoácidos no jejuno de frangos de corte, concluíram que o estresse térmico diminui significativamente a quantidade de RNAm do y<sup>+</sup>LAT1, CAT1 e r-BAT. Estes afirmaram que efeito semelhante pode ocorrer em outros transportadores de aminoácidos e outros nutrientes, como glicose e lipídeos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

AGUIAR V. S. L.; LOPES J. C. O.; RIBEIRO M. N. Balanço eletrolítico e redução de proteína bruta de dietas para aves e suínos estressados pelo calor. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v. 110, p. 192-200, 2015.

ALARCON, M. F. F. **Uso de probiótico e óleos essenciais na ração sobre a microbiota intestinal, atividade de enzimas digestivas e a expressão de genes relacionados aos processos de digestão e absorção de nutrientes em frangos**. 128 f. 2015. Tese (Doutorado em Zootecnia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, São Paulo, Jabotical, SP, 2015.

ALEXANDER, R. T.; JAUMOUILLE, V.; YEUNG, T.; FURUYA, W.; PELTEKOVA, I.; BOUCHER, A.; ZASLOFF, M.; ORLOWSKI, J.; GRINSTEIN, S. Membrane surface charge dictates the structure and function of the epithelial Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. **Embo Journal**, v. 30, p. 679–691, 2011.

ALLAHVERDI, A.; FEIZI, A.; TAKHTFOOLADI, H. A.; NIKPIRAN, H. Effects of heat stress on acid-base imbalance, plasma calcium concentration, egg production and egg quality in commercial layers. **Global Veterinaria**, v. 10, p. 203-207, 2013.

ARACHCHILAGE, G. M.; DASSANAYAKE, A. C.; BASU, S. A Potassium Ion-Dependent RNA Structural Switch Regulates Human Pre-miRNA 92b Maturation. **Chemical Biology**, v. 22, p. 262–272, 2015.

ARAÚJO, G. M.; VIEITES, F. M.; BARBOSA, A. A.; CARAMORI JUNIOR, J. G.; SANTOS, A. L.; MORAES, G. H. K.; ABREU, J. G.; MULLER, E. S. Variação aniônica da dieta sobre características ósseas de frangos de corte: resistência à quebra, composição orgânica e mineral. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, p. 954-961, 2011.

ATHERTON, J. C. Role of the kidney in acid–base balance. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, v. 10, p. 276-278, 2009.

AYERS, P.; DIXON, C.; MAYS, A. Acid-Base Disorders: Learning the Basics. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 30, p. 14-30, 2015.

BAILEY, C. G.; RYAN, R. M.; THOENG, A. D.; NG, C.; KING, K.; VANSLAMBROUCK, J. M.; AURAY-BLAIS, C.; VANDENBERG, R. J.; BROER, S.; RASKO, J. E. Loss-of-function mutations in the glutamate transporter SLC1A1 cause human dicarboxylic aminoaciduria. **Journal of Clinical Investigation**, v. 121, p. 446-53, 2011.

BARFULL, A.; GARRIGA, C.; MITFANS, M.; PLANAS, J. Ontogenetic expression and regulation of Na<sup>+</sup>-D-glucose cotransporter in jejunum of domestic chicken. **American Journal of Physiology**, v. 282, p. 559–564, 2002.

BAUMGARTNER, M.; PATEL, H.; BARBER, D. L. Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchanger NHE1 as plasma membrane scaffold in the assembly of signaling complexes. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 287, p. 844–850, 2004.

BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de Ruminantes**. FUNEP, Jaboticabal-SP. Prol Editora Gráfica, 2006.

- BIANCHI, M. G.; BARDELLI, D.; CHIU, M.; BUSSOLATI, O. 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.
- BOKKERS, E. A. M.; DE BOER, I. J. M.; KOENE, P. Space needs of broilers. **Animal Welfare**, v. 20, p. 623-632, 2011.
- BORGES, S. A.; MAIORKA, A.; SILVA, A. V. F. Heat stress physiology and electrolytes for broilers. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 33, p. 975-981, 2003.
- BORGES, S. A.; SILVA, A. V. F.; MAIORKA, A. Acid-base balance in broilers. **World's Poultry Science Journal**, v. 63, p. 73-81, 2007.
- BRÖER, A.; WAGNER, C.; LANG, F.; BRÖER, S. The heterodimeric amino acid transporter 4F2hc/y1LAT2 mediates arginine efflux in exchange with glutamine. **Biochemical Journal**, v. 349, p. 787-795, 2000.
- BRÖER, S. Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. **Physiology Review**, v. 88, p. 249-286, 2008.
- BROSSI, C.; CONTRERAS-CASTILHO, C. J.; AMAZONAS, E. A.; MENTEN, J. F. M. Estresse térmico durante o pré-abate em frangos de corte. **Ciência Rural**, v. 39, p. 1296-1305, 2009.
- CAMPOS, E. J. O comportamento das aves. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 2, p. 93-113, 2000.
- CARVALHO, G. B.; LOPES, J. B.; SANTOS, N. P. S.; REIS, N. B. N.; CARVALHO, W. F.; SILVA, S. F.; CARVALHO, D. A.; SILVA, E. M.; SILVA, S. M. Comportamento de frangos de corte criados em condições de estresse térmico alimentados com dietas contendo diferentes níveis de selênio. **Revista Brasileira Saúde Produção Animal**, v. 14, p. 785-797, 2013.
- DALL'STELLA, R. **Balço 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.
- DEVLIN, J. W.; MATZKE, G. R. Acid-base disorders. In: DIPIRO, J. T.; TALBERT, R. L.; YEE, G. C.; MATZKE, G. R.; WELLS, B. G.; POSEY, L. **Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach**. 9th ed. New York, NY: McGraw-Hill; 2014, p.797-814.
- 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.
- ESTEVEZ, I. Density allowances for broilers: Where to set the limits? **Poultry Science**, v. 86, p. 1265-1272, 2007.
- FERRO, F. R. A.; CAVALCANTI NETO, C. C.; TOLEDO FILHO, M. R.; FERRI, S. T. S.; MONTALDO, Y. C. Efeito do estresse calórico no desempenho reprodutivo de vacas leiteiras. **Revista Verde**, v. 5, p. 01-25, 2010.
- FREEMAN, B. M.; KETTLEWELL, P. J.; MANNING, A. C.; BERRY, P. S. Stress of transportation for broilers. **Veterinary Record**, v. 114, p. 286-288, 1984.
- FREITAS, E. R.; XAVIER, R. P. S.; JERÔNIMO DO NASCIMENTO, G. A.; RODRIGUES, A. M.; QUEIROZ, M. G. R.; RAQUEL, D. L.; LIMA, R. C. Níveis de cloro da ração sobre parâmetros sanguíneos e ósseos de codornas italianas destinadas à



produção de carne. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, p. 1808-1814, 2013.

GAL-GARBER, O.; MABJEESH, S. J.; SKLAN, D.; UNI, Z. Nutrient transport in the small intestine: Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase expression and activity in the small intestine of the chicken as influenced by dietary sodium. **Poultry Science**, v. 82, p. 1127-1133, 2003.

GILBERT, E. R.; LI, H.; EMMERSON, D. A.; WEBB JUNIOR, K. E.; WONG, E. A. Developmental Regulation of Nutrient Transporter and Enzyme Mrna Abundance in the Small Intestine of Broilers. **Poultry Science**, v. 86, p. 1739–1753, 2007.

GONSLAVES, F. M.; CORRÊA, M. N.; ANCIUTI, M. A.; GENTILINI, F. P.; ZANUSSO, J. T.; RUTZ, F. Nutrigenômica: situação e perspectivas na alimentação animal. **Revista Portuguesa Ciência Veterinária**, v. 104, p. 5-11, 2009.

HALDER, K.; HARTIG, J. S. RNA quadruplexes, **Metal Ions in Life Science**, v. 9, p. 125–139, 2011.

HAMANN, S.; HERRERA-PEREZ, J. J.; BUNDGAARD, M.; ALVAREZ-LEEFMANS, F. J.; ZEUTHEN, T. 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.

HECKERT, R. A.; ESTEVEZ, I.; RUSSEK-COHEN, E.; PETTIT-RILEY, R. Effects of density and perch availability on the immune status of broilers. **Poultry Science**, v. 81, p. 451–457, 2002.

HEDDI, B.; FOLOPPE N.; HANTZ, E.; HARTMANN, B. The DNA structure responds differently to physiological concentrations of K(+) or Na(+). **Journal of Molecular Biology**, v. 368, p. 1403–1411, 2007.

HILLIER, L. W.; MILLER, W.; BIRNEY, E.; WARREN, W.; HARDISON, R. C.; PONTING, C. P.; BORK, P.; BURT, D. W.; GROENEN, M. A. M.; DELANY, M. E. DODGSON, J. B. Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution, **Nature**, v. 432, p. 695-716, 2004.

HUANG, H.; SUSLOV, N. B.; LI, N. S.; SHELKE, S. A.; EVANS, M. E.; KOLDOBSKAYA, Y.; RICE, P. A.; PICCIRILLI, J. A. A G-quadruplex-containing RNA activates fluorescence in a GFP-like fluorophore. **Nature Chemical Biology**, v. 10, p. 686-691, 2014a.

HUANG, J.; CUI, H.; PENQ, X.; FANQ, J.; ZUO, Z.; DENG, J.; WANQ, X.; WU, B. Downregulation of TLR4 in 7 mRNA, expression. Levels in broiler's spleen caused by diets supplemented with nickel chloride. **Biological Trace Element Research**, v.158, p.353-358, 2014b.

IWANAGA, T.; GOTO, M.; WATANABE, M. Cellular distribution of glutamate transporters in the gastrointestinal tract of mice. An immunohistochemical and in situ hybridization approach. **Biomedical Reside**, v. 26, p. 271–278, 2005.

JUNQUEIRA, J. R. C.; BALARIN, M. R. S.; FLAIBAN, K. K. M. C.; BARBOSA, D. S.; LISBOA, J. A. N. Efeito alcalinizante de soluções eletrolíticas intravenosas com concentrações elevadas de lactato de sódio infundidas em bezerros sadios. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, p. 15-24, 2015.

KIM, J. H.; JEONG, W. S.; KIM, I. H.; KIM, H. J.; KIM, S. H.; KANG, G. H.; LEE, H.; YON, H. G.; HAM, H.; KIM, Y. J. Effect of an oil byproduct from conjugated linoleic acid (CLA) purification on CLA accumulation and lipogenic gene expression in broilers. **Journal of Agricultural and Food Chemical**, v. 57, p. 2397-2404, 2009a.

- KIM, Y. H.; PHAM, T. D.; ZHENG, W.; HONG, S.; BAYLIS, C.; PECH, V.; BEIERWALTES, W. H.; FARLEY, D. B.; BRAVERMAN, L. E.; VERLANDER, J. W.; WALL, S. M. Role of pendrin in iodide balance: going with the flow. **American Journal of Physiology- Renal Physiology**, v. 297, p. 1069–1079, 2009b.
- KNAUF, F.; YANG, C. L.; THOMSON, R. B.; MENTONE S. A, GIEBISCH G, ARONSON P. S. 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.
- LANGLEY, G.; CANADA, T.; DAY, L. Acid-base disorders and nutrition support treatment. **Nutricion in Clinical Practice**, v. 18, p. 259-261, 2003.
- LIANG, S. S.; OUYANG, H. J.; LIU, J.; CHEN, B.; NIE, Q. H.; ZHANG, X. Q. 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.
- LIU, Y.; GUO, Y.; WANG, Z.; NIE, W. Effects of source and level of magnesium on catalase activity and its gene expression in livers of broiler chickens. **Archives of Animal Nutrition**, v.61, p.292-300, 2007.
- LIU, Y.; LI, D.; LI, H.; ZHOU, X.; WANG, G. 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.
- LONGO, F. A.; SAKOMURA, N. K.; RABELLO, C. B. B.; FIGUEIREDO, A. N.; FERNANDES, J. B. K. Exigências energéticas para manutenção e para o crescimento de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, p. 119-125, 2006.
- LOPES, J. C. O.; RIBEIRO, M. R.; LIMA, V. B. S. Estresse por calor em frangos de corte. **Nutritime Revista Eletrônica**, v. 12, p. 4478-4487, 2015.
- LYTTON, J. Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchangers: three mammalian gene families control Ca<sup>2+</sup> transport. **Biochemical Journal**, v. 406, p. 365–382, 2007.
- MACARI, M.; FURLAN, R. L. *Ambiência na produção de aves em clima tropical/ editado por Iran José de Oliveira da Silva; Série engenharia Agrícola, Construções Rurais, Volume 1; Piracicaba, SP. 2001. 200p.*
- MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. Jaboticabal: F U N E P / U N E S P, 2002. 296p.
- MAGALHAES, M. A. O.; LARSON, D. R.; MADER, C. C.; BRAVO-CORDERO, J. J.; GIL-HENN, H.; OSER, M.; CHEN, X.; KOLESKE, A. J.; COODELIS, J. Cortactin phosphorylation regulates cell invasion through a pH-dependent pathway. **The Journal of Cell Biology**, v. 195, p. 903-920, 2011.
- MAINI, S.; RASTOGI, S. K.; KORDE, J. P.; MADAN, A. K.; SHUKLA, S. K. Evaluation of oxidative stress and its amelioration through certain antioxidant in broiler during summer. **Poultry Science**, v. 44, p. 339-347, 2007.
- MARÍA, G. A.; ESCÓS, J.; ALADOS, C. L. Complexity of behavioural sequences and their relation to stress conditions in chickens (*Gallus gallus domesticus*): a non-invasive technique to evaluate animal welfare. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 86, p. 93-104, 2004.

- MATSUSHITA, M.; SANO, Y.; YOKOYAMA, S.; TAKAI, T.; INOUE, H.; MITSUI, K.; TODO, K.; OHMORI, H.; KANAZAWA, H. Loss of calcineurin homologous protein-1 in chicken B lymphoma DT40 cells destabilizes Na/H exchanger isoform-1 protein. **American Journal of Physiology**, v. 293, p. 246-C254, 2007.
- MINAFRA, C. S.; MORAES, H. K.; LOPES, A. C. C.; LOPES JÚNIOR, C. O.; VIEITES, F. M.; RESENDE, C. S. M.; VIU, M. O Balanço eletrolítico e protéico dietéticos sobre as aminotransferases hepáticas, renais e séricas e teores séricos de magnésio e cloro de frangos de corte. **Ciência Animal Brasileira**. v. 10, p. 425-437, 2009.
- MISKA, K. B.; FETTERER, R. H.; WONG, E. A. 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**, v. 40, p. 285-294, 1981.
- MORAES, G. H. K.; RODRIGUES, A. C. P.; SILVA, F. A.; ROSTAGNO, H. S.; MINAFRA, C. S.; BIGONHA, S. M. Efeitos do ácido L-glutâmico e da vitamina K na composição bioquímica parcial de fêmures de frangos de corte. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 39, p. 796-800, 2010.
- MULLER, M.; KERSTEN, S. Nutrigenomics: Goals and strategies. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, p. 315-322, 2003.
- MURAKAMI, A. E.; OVIEDO-RONDÓN, E. O.; MARTINS, E. N.; PEREIRA, M. S.; SCAPINELLO, C. Sodium and chloride requirements of growing broiler chickens (twenty-one to forty-two days of age) fed corn soy bean diets. **Poultry Science**, v. 80, p. 289-294, 2001.
- MURAT, P.; ZHONG, J.; LEKIEFFRE, L.; COWIESON, N. P.; CLANCY, J. L.; PREISS, T.; BALASUBRAMANIAN, S.; KHANNA, R.; TELLAM, J. G quadruplexes regulate Epstein-Barr virus–encoded nuclear antigen 1 mRNA translation. **Nature Chemical Biology**, v. 10, p. 358–364, 2014.
- MUTCH, D. M.; WAHLI, W.; WILLIAMSON, G. Nutrigenomics and nutrigenetics: the emerging faces of nutrition. **The FASEB Journal**, v. 19, p. 1602-1616, 2005.
- NASCIMENTO, S. T. **Determinação do balanço de calor em frangos de corte por meio das temperaturas corporais**. 149 f. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2010.
- OLANREWaju, H. A., THAXTON, J. P., DOZIER III, W. A., BRANTON, S. L. Electrolyte Diets, Stress, and Acid-Base Balance in Broiler Chickens. **Poultry Science**. v. 86, p. 1363-1371, 2007.
- OLIVEIRA, G. A.; PESSA, S. L. R. Revisão dos aspectos operacionais e os estressores relacionados à fase de pré-abate de frangos. **Revista Técnico Científica**, v. 1, p. 1-10, 2013.
- PEREIRA D. F.; NÄÄS, I. A.; ROMANINI, C. E. B.; SALGADO, D. D.; PEREIRA, G. O. T. Broiler breeder behavior and egg production as function of environmental temperature. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 9, p. 9-16, 2006.
- PEREIRA, D. F.; NÄÄS, I. A.; ROMANINI, C. E. B.; SALGADO, D. D.; PEREIRA, G. O. T. Indicadores de bem-estar baseados em reações comportamentais de matrizes pesadas. **Engenharia Agrícola**, v. 25, p. 308-314, 2005.

- QUINTEIRO FILHO, W. M.; RIBEIRO, A.; FERRAZ DE PAULA, V.; PINHEIRO, M. L.; SAKAI, M.; SÁ, L. R. M.; FERREIRA, A. J. P.; PALERMO NETO, J. Heat stress impairs performance parameters, induces intestinal injury, and decreases macrophage activity in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 89, p. 1905-1914, 2010.
- RAO, S. V. R.; PRAKASH, B.; RAJU, V. L. N.; PANDA, A. K.; POONAM, S.; MURTHY, O. K. Effect of supplementing organic selenium on performance, carcass traits, oxidative parameters and immune responses in commercial broiler chickens. **Journal of Animal Science**, v. 26, p. 247-252, 2013.
- RESTELATTO, R.; MENDES, A. S.; POSSENT, M. A.; PAIXÃO, S. J. Aplicação dos conceitos de calorimetria na produção de frangos de corte. **Brazilian Journal of Biosystems Engineering**, v. 2, p. 99-108, 2008.
- RODRÍGUEZ, M. S.; MUNOZ, L. M.; CASIERI, R. C. Nutrigenómica, obesidad y salud pública. **Revista Española de Salud Pública**, v. 81, p. 475-487, 2007.
- ROME, S.; BARBOT, L.; WINDSOR, E.; KAPEL, N.; TRICOTTET, V.; HUNEAU, J.-F.; REYNES, M.; GOBERT, J.-G.; TOME, D. The regionalization of PepT1, NBAT, and EAAC1 transporters in the small intestine of rats are unchanged from birth to adulthood. **Journal of Nutrition**, v. 132, p. 1009–1011, 2002.
- ROSA, G. J. M. Delineamento de experimentos em genética genômica. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 211-218, 2007.
- SADAIE, M.; IIDA, T.; URANO, T.; NAKAYAMA, J-I. A chromodomain protein, Chp1, is required for the establishment of heterochromatin in fission yeast. **EMBO Journal**, v. 23, p. 3825–3835, 2004.
- SAWOSZ, F.; PINEDA, L.; HOTOWY, A.; HYTTEL, P.; SAWOSZ, E.; SZMIDT, M.; NIEMIEC, T.; CHWALIBOG, A. 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.
- SCHALCH, T.; JOB, G.; SHANKER, S.; PARTRIDGE, J. F.; JOSHUA-TOR, L. The Chp1-Tas3 core is a multifunctional platform critical for gene silencing by RITS. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 18, p.1351–1357, 2011.
- SCHALCH, T.; JOB, G.; NOFFSINGER, V. J.; SHANKER, S.; KUSCU, C.; JOSHUA-TOR, L.; PARTRIDGE J. F. High-affinity binding of Chp1 chromodomain to K9 methylated histone H3 is required to establish centromeric heterochromatin. **Molecular Cell**, v. 34, p. 36–46, 2009.
- SILVA, R. C.; RODRIGRES, L. R.; RODRIGUES, V. P.; ARRUDA, A. S.; SOUZA, B.B. Análises do efeito do estresse térmico sobre produção, fisiologia e dieta de aves. **Agropecuária Científica No Semiárido**. v. 11, p. 22-26, 2015.
- SIMITZIS, P. E.; KALOGERAKI, E.; GOLIOMYTIS, M.; CHARISMIADOU, M. A.; TRIANTAPHYLLOPOULOS, K.; AYOUTATI, A.; NIFOROU, K.; HAGERTHEODORIDES, A. L.; DELIGEORGIS, S.G. Impact of stocking density on broiler growth performance, meat characteristics, behavioural components and indicators of physiological and oxidative stress. **British Poultry Science**, v. 53, p. 721–730, 2012.
- SUN, X.; ZHANG, H.; SHEIKHAHMADI, A.; WANG, Y.; JIAO, H.; LIN, H.; SONG, Z. Effects of heat stress on the gene expression of nutrient transporters in the jejunum of broiler chickens (*Gallus gallus domesticus*). **International Journal of Biometeorology**, v. 59, p. 127-135, 2015.

- TAKAHASHI, K.; AOKI, A.; TAKIMOTO, T. AKIBA, Y. Dietary supplementation of glycine modulates inflammatory response indicators in broiler chickens. **British Journal of Nutrition**, v.100, p.1019-1028, 2008.
- TAN, G. Y. L.; YANG, L.; FU, Y. Q.; FENG, J. H.; ZHANG, M. H. Effects of different acute high ambient temperatures on function of hepatic mitochondrial respiration, antioxidative enzymes, and oxidative injury in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 89, p. 115- 122, 2010.
- TEIXEIRA, M. P.F.; ABREU, M. L. T. Vitamina C em rações de frango de corte. **Revista Eletrônica Nutritime**. v. 8, p. 1489-1498, 2011.
- THAXTON, J. P.; PUVADOLPIROD, S. Model of physiological stress in chickens: Quantitative evaluation. **Poultry Science**, v. 79, p. 391-395, 2000.
- TORRENTS, D.; ESTEVEZ, R.; PINEDA, M.; FERNANDEZ, E.; LLOBERAS, J.; SHI, Y. B.; ZORZANO, A.; PALACIN, M. Identification and characterization of a membrane protein (y1L amino acid transporter- 1) that associates with 4F2hc to encode the amino acid transport activity y1L. A candidate gene for lysinuric protein intolerance. **Journal of Biology and Chemical**, v. 273, p. 32437–32445, 1998.
- TRIPKOVIC, L.; LAMBERT, H.; HART, K.; SMITH, C. P.; BUCCA, G.; PENSON, S.; CHOPE, G.; HYPPÖNEN, E.; BERRY, J.; VIETH, R.; LANHAM-NEW, N. Comparison of vitamin D2 and vitamin D3 supplementation in raising serum 25-hydroxyvitamin D status: a systematic review and meta-analysis. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 95, p. 1357-1364, 2012.
- VIEITES, F. M.; FRAGA, A. L.; SOUZA, C. S.; ARAÚJO, G. M.; VARGAS JÚNIOR, J. G.; NUNES, R. V.; CORRÊA, G. S. S. Desempenho de frangos de corte alimentados com altos valores de balanço eletrolítico em região de clima quente. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, p. 441-447, 2011.
- VIEITES, F. M.; MORAES, G. H. K.; ALBINO, L. F. T.; ROSTAGNO, H. S.; ATENCIO, A.; VARGAS JUNIOR, J. G. Balanço Eletrolítico e Níveis de Proteína Bruta sobre o Desempenho, o Rendimento de Carcaça e a Umidade da Cama de Frangos de Corte de 1 a 42 dias de Idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, p. 1990-1999, 2005.
- VIEITES, F. M.; MORAES, G. H. K; ALBINO, L. F. T.; ROSTAGNO, H. R.; DONZELE, J. L.; VARGAS JUNIOR, J. G.; ATENCIO, A. Balanço eletrolítico e níveis de proteína bruta sobre o desempenho de pintos de corte de 1 a 21 dias de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, p. 2076-2085, 2004.
- VISSER, F.; VALSECCHI, V.; ANNUNZIATO, L.; LYTTON, J. Analysis of ion interactions with the K<sup>+</sup>-dependent Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> Exchangers NCKX2, NCKX3, and NCKX4: identification of Thr-551 as a key residue in defining the apparent K<sup>+</sup> affinity of NCKX2. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 4453–4462, 2007.
- WAGNER, C. A.; LANG, F.; BRÖER, S. 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 sequwnce 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, 2011.

YAHAV, S.; DRUYAN, S.; RUSAL, M.; SHINDER, D. Diurnally cycling temperature and ventilation affect young turkeys performance and sensible heat loss. **Journal of Thermal Biology**, v. 36, p. 334-339, 2011.

YANG, L.; TAN, G. Y.; FU, Y. Q.; FENG, J. H.; ZHANG, M. H. 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, p. 204-208, 2010.

ZHANG, H.; HU, X.; WANG, Z.; ZHANG, Y.; WANG, S.; WANG, N.; MA, L.; LENG, L.; WANG, S.; WANG, Q.; WANG, Y.; TANG, Z.; LI, N.; DA, Y.; LI, H. Selection signature analysis implicates the PC1/PCSK1 region for chicken abdominal fat content. **Plos One**, v. 7, p. 1-14, 2012a.

ZHANG, L.; ZHANG, H.J.; QIAO, X.; YUE, H.Y.; WU, S.G.; YAO, J.H.; QI, G.H. Effect of monochromatic light stimuli during embryogenesis on muscular growth, chemical composition, and meat quality of breast muscle in male broilers. **Poultry Science**, v.91, p.1026-1031, 2012b.

**Capítulo 2. Balanço eletrolítico dietético para frangos de corte: Desempenho  
zootécnico e expressão gênica**

Elaborado de acordo com as normas da Revista Poultry Science

(<https://academic.oup.com/ps>)

# GENÉTICA E GENÔMICA

## Balanço eletrolítico dietético para frangos de corte: Desempenho zootécnico e expressão gênica

André Campêlo Araujo\*<sup>1</sup> e Katiene Régia Silva Sousa #

\*<sup>1</sup>Universidade Federal do Piauí – UFPI, *Campus* Prof<sup>a</sup> Cinobelina Elvas, Bom Jesus, PI, Brasil, andrefuturo7@hotmail.com; #Universidade Federal do Maranhão – UFMA, *Campus* de Chapadinha, Chapadinha, MA, Brazil.

### RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito de níveis de balanço eletrolítico dietético (BED) sobre o desempenho e a expressão de genes relacionados ao equilíbrio ácido-básico a absorção e ao transporte de nutrientes em frangos de corte na fase inicial criados em condições de estresse térmico cíclico natural. Utilizou-se 245 pintos machos da linhagem Cobb na fase de 1 a 21 dias de idade em um delineamento experimental inteiramente casualizado com cinco níveis de BED (110, 175, 240, 305 e 370 mEq/Kg) com 7 repetições de 7 aves cada. Foram avaliados o consumo de ração (CR), ganho de peso (GP) e a conversão alimentar (CA) aos 7 e 21 dias e analisada a expressão dos genes *ATP1A1*, *SLC1A1*, *SLC5A1*, *SLC7A6*, *SLC7A7*, *SLC12A2* e *SLC26A4* no fígado, intestino e rim por meio da metodologia de qRT-PCR aos 21 dias. Houve efeito significativo ( $p < 0,05$ ) apenas para a CA tanto aos 7 quanto aos 21 dias. Houve diferença de expressão ( $p < 0,05$ ) para os genes *ATP1A1*, *SLC1A1*, *SLC5A1*, *SLC7A6*, *SLC12A2* e *SLC26A4* no fígado, para *ATP1A1*, *SLC7A6* e *SLC26A4*, no intestino e *ATP1A1* e *SLC26A4*, no rim. O BED afeta a expressão de genes relacionados ao equilíbrio ácido-básico, absorção e transporte de nutrientes e a conversão alimentar de frangos de corte de 1 a 21 dias. O nível de 370 mEq/Kg melhorou a conversão alimentar aos 7 dias e os níveis de 110 e 370 mEq/Kg podem ser utilizados para diminuir conversão alimentar aos 21 dias.

**Palavras chave:** avicultura, balanço cátion-ânion, genômica funcional, nutrição, qRT-PCR



32 **ABSTRACT**

33           The objective was to evaluate the effect of dietary electrolyte balance (BED) on the  
34 performance and expression of genes related to the acid-base balance and nutrient uptake and  
35 transport in early-stage broilers raised under natural cyclic thermal stress. A total of 245 male  
36 Cobb chicks from 1 to 21 days old were used in a completely randomized experimental  
37 design with five BED levels (110, 175, 240, 305 and 370 mEq/kg) with 7 replicates of 7 birds  
38 each. The ration intake (CR), weight gain (GP) and feed conversion (CA) were evaluated at 7  
39 and 21 days and the expression of the *ATPIA1*, *SLC1A1*, *SLC5A1*, *SLC7A6*, *SLC7A7*,  
40 *SLC12A2* and *SLC26A4* genes in the liver, intestine and kidney were analyzed by the qRT-  
41 PCR methodology to 21 days of age. There was a significant effect ( $p < 0,05$ ) only for CA at 7  
42 days and at 21 days. There was a difference in expression ( $p < 0,05$ ) for the *ATPIA1*, *SLC1A1*,  
43 *SLC5A1*, *SLC7A6*, *SLC12A2* and *SLC26A4* genes in the liver, for *ATPIA1*, *SLC7A6* and  
44 *SLC26A4* in the intestine and *ATPIA1* and *SLC26A4* in the kidney. BED affects the  
45 expression of genes related to acid-base balance, nutrient uptake and transport and feed  
46 conversion of broilers from 1 to 21 days. The 370 mEq/kg level improved feed conversion at  
47 7 days and levels of 110 and 370 mEq / kg could be used to decrease feed conversion at 21  
48 days.

49

50 **Key words:** cation-anion balance, functional genomics, nutrition, poultry, qRT-PCR

51

## INTRODUÇÃO

A avicultura constitui-se em uma atividade que representa enorme papel na produção de alimentos, sendo relevante tanto no âmbito econômico como social. Os indicadores econômicos alcançados pela avicultura devem-se, principalmente, por ganhos na área de melhoramento genético, nutrição e manejo em geral, configurando alta dinâmica no ciclo produtivo (Leinonen et al., 2016). Entretanto, o desempenho e o bem-estar das aves pode ser prejudicado por agentes estressantes, destacando-se o estresse térmico (Yahav et al., 2011).

O calor em excesso prejudica as trocas térmicas entre as aves e as instalações, e como consequência o estresse térmico é instaurado, podendo afetar o balanço de eletrólitos do organismo (BEO) e o equilíbrio ácido-básico (EAB) (Oliveira e Pessa, 2013). O EAB é o balanço adequado entre ácidos e bases presentes no organismo e mantém uma estreita relação com a regulação do pH dos fluidos, sendo crítico nas funções fisiológicas e no metabolismo celular (Hamm et al., 2015) e determinante no estado de saúde e para o desempenho das aves (Vieites et al., 2005).

O BEO pode ser entendido como a relação entre os eletrólitos que atuam efetivamente no gradiente osmótico do organismo, sendo determinante no EAB (Brossi et al., 2009). Os eletrólitos são definidos como elementos químicos que tem a capacidade de transmitir impulsos elétricos em soluções quando dissociados das substâncias (Junqueira et al., 2015), e os principais são o sódio ( $\text{Na}^+$ ), o potássio ( $\text{K}^+$ ) e o cloro ( $\text{Cl}^-$ ) (Freitas et al., 2013). Um fator determinante para o BEO é o balanço eletrolítico dietético (BED), que é obtido pela soma dos eletrólitos presentes na ração (Vieites et al., 2011).

Vários autores tem relatado o efeito do BED sobre o desempenho de crescimento (Vieites et al., 2011), parâmetros sanguíneos (Minafra et al., 2009), parâmetros ósseos (Oliveira et al., 2010), parâmetros fisiológicos (Matos et al., 2009) e qualidade da cama (Vieites et al., 2005) em frangos de corte, no entanto, poucos estudos relacionados a expressão gênica de frangos suplementados com eletrólitos (Gal-Garber et al., 2003; Huang et al., 2014).

Alguns alimentos, denominados bioativos, possuem nutrientes que podem interagir com o genoma, produtos gênicos e sistemas enzimáticos, podendo alterar o metabolismo e influenciar a expressão de genes (Trujillo et al., 2006). Neste caso, o estudo de como os nutrientes interferem na expressão gênica se torna relevante e a nutrigenômica constitui-se como principal ferramenta.

O foco da nutrigenômica em estudos com animais de produção é evidenciar como as estratégias nutricionais podem influenciar o estado de saúde e o desempenho dos animais

86 (Gonsalves et al., 2009), por meio da mudança em determinados processos biológicos, pois  
87 podem ser alterados pelos componentes da dieta (Trujillo et al., 2006), neste caso, diferentes  
88 níveis de BED podem influenciar na resposta de genes relacionados com BEO e na absorção e  
89 transporte de nutrientes, conseqüentemente, no desempenho de frangos de corte.

90 Dos eletrólitos relevantes no BED, o  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  podem regular a expressão de genes  
91 (Gal-Garber et al., 2003; Huang et al., 2014), no entanto, não foram encontrados trabalhos  
92 relacionados a regulação de genes pelo  $\text{K}^+$  nem utilizando o conceito de BED. Gal-Garber et  
93 al. (2003) observaram diferença na expressão do gene *ATP1A1* com a elevação do nível de  
94  $\text{Na}^+$  usando cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ) na dieta de frangos de corte, culminando com alterações  
95 no desempenho de crescimento. Huang et al. (2014) ao avaliarem o efeito da inclusão de  
96 cloreto de níquel ( $\text{NiCl}_2$ ) na dieta de frangos de corte observaram regulação negativa da  
97 expressão de receptores da família TLR (sensores da resposta imune), importantes na resposta  
98 adaptativa ao estresse térmico (Huang, 2017).

99 O bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ), carbonato de potássio ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ ) e cloreto de  
100 amônio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) são substâncias que são utilizadas na correção do BED (Vieites et al., 2011),  
101 no entanto não foram encontradas pesquisas que avaliaram o impacto da inclusão desses sais  
102 sobre a expressão de genes em frangos de corte. Dessa forma, objetivou-se avaliar o efeito de  
103 níveis de BED obtidos pela combinação de  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$  e  $\text{NH}_4\text{Cl}$  sobre a expressão  
104 genes relacionados ao equilíbrio ácido-básico (*ATP1A1*, *SLC12A2* e *SLC26A4*), a absorção e  
105 ao transporte de nutrientes (*SLC1A1*, *SLC5A1*, *SLC7A6* e *SLC7A7*) e o desempenho de  
106 crescimento em frangos de corte na fase de 1 a 21 dias criados sob estresse térmico cíclico  
107 natural.

108

109

## METODOLOGIA

### Local e condições experimentais

110 A pesquisa foi cadastrada no Comitê de Ética em Experimentação Animal e foi  
111 aprovada sob o protocolo n° 075/15 na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI).  
112 O trabalho foi realizado no setor de Avicultura do Colégio Técnico de Bom Jesus, pertencente  
113 à Universidade Federal do Piauí (UFPI), no município de Bom Jesus-PI, que está localizado  
114 na latitude 09°04'28" Sul e longitude 44°21'31" Oeste, estando a uma altitude de 277 metros.  
115 O clima da região é do tipo semiárido (seco e quente) com estação chuvosa no verão (Alvares  
116 et al., 2014).

117  
118 Utilizou-se 245 pintos machos da linhagem Cobb na fase de 1 a 21 dias em baterias  
119 metabólicas, constituídas por gaiolas de 1 x 1 x 0,5m como unidades experimentais. Durante

120 o período experimental adotou-se um programa de luz de 23 horas (luz natural + artificial).  
121 Do 1° ao 14° dia as aves foram aquecidas com lâmpadas incandescentes de 100 W durante às  
122 seis da tarde até às seis da manhã, com uma distância regulada em função do comportamento  
123 dos animais. Foram utilizadas cortinas de polietileno ao redor do galpão experimental,  
124 permanecendo fechadas nas horas mais frias.

125 A temperatura do ar e a umidade relativa foram mensuradas com termo-higrômetro  
126 colocado dentro do galpão na altura média das aves. O Índice de Temperatura de Globo e  
127 Umidade (ITGU) foi obtido segundo Buffington et al. (1981), pelo uso da temperatura do  
128 globo negro posicionado na mesma altura do termo-higrometro, e medida duas vezes ao dia,  
129 às 09:00 e às 15:00 horas (Tabela 1).

130

131 Tabela 1. Médias das variáveis climáticas durante o período experimental.

Fase	Temperatura		Umidade		ITGU
	Min	Máx	Min	Máx	
1 a 7	22,48 ± 1,31	35,77 ± 0,83	24,00 ± 3,00	61,28 ± 2,05	79,75 ± 0,82
1 a 21	20,92 ± 2,03	35,51 ± 0,99	23,47 ± 3,41	63,33 ± 5,10	79,39 ± 1,51
Média	21,70 ± 1,67	35,64 ± 0,92	23,74 ± 3,20	62,31 ± 3,58	79,57 ± 1,17

132 Min = mínimo, Max = máximo.

133

134 **Dietas experimentais**

135 Foram formuladas duas dietas basais, a base de milho e farelo de soja, para atender as  
136 exigências nutricionais de frangos de corte na fase pré-inicial (1 a 7 dias) e inicial (8 a 21  
137 dias) segundo Rostagno et al. (2011) (Tabela 2). As quantidades de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> foram  
138 analisadas no milho (0,006249, 0,569885 e 0,101313 %, respectivamente) e no farelo de soja  
139 (0,14935, 2,280856 e 0,838903 %, respectivamente) no laboratório IBRA Nutrição Animal  
140 para o cálculo do BED na dieta basal. O BED das dietas (basal e experimentais) foi calculado  
141 de acordo com a fórmula proposta por Mongin (1981):

142 
$$\text{BED} = (\% \text{Na}^+ \times 100/22,990^*) + (\% \text{K}^+ \times 100/ 39,102^*) - (\% \text{Cl}^- \times 100/35,453^*),$$
 em  
143 que \* = equivalente grama do Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ou Cl<sup>-</sup>, respectivamente.

144 Com um dia de idade as aves foram pesadas e distribuídas de acordo com o peso  
145 médio (38,51±0,36 g) em um delineamento inteiramente casualizado, com cinco níveis de  
146 BED (110, 175, 240, 305 e 370 mEq/Kg) e 7 repetições de 7 aves cada. Esses níveis foram  
147 obtidos pela inclusão de NaHCO<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e NH<sub>4</sub>Cl em substituição ao inerte (Tabela 3). Os  
148 níveis de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> e as relações entre os eletrólitos estão na Tabela 4. A adição de  
149 NaHCO<sub>3</sub> e K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> foi calculada de forma proporcional e gradativa até atingir a relação ideal  
150 de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> de 0,37 (Rostagno et al., 2011) no último nível de BED.

151

152 Tabela 2. Composição das dietas basais para fase pré-inicial (1 a 7 dias) e inicial (8 a 21 dias)  
 153 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
Composição calculada		
Energia metabolizável (Kcal/Kg)	2950	3000
Proteína bruta (%)	20,5046	18,7766
Metinionina + 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

154 <sup>1</sup>Fornece/kg de dieta pré-inicial: ácido fólico-200,00mg; biotina-10,00mg;  
155 clorohidroxiquinolina-7500,00mg; Zn-17,50g; vit.A-1680000UI; vit.B1-436,50mg; vit.B12-  
156 2400mcg; vit.B2-1200mg; vit.B6-624mg; vit.D3-400000UI; vit.E-3500UI; vit.K3-360mg;  
157 niacina-8399,00mg; nicarbazina-25,00g; ácido pantotênico-3120,00mg; colina-78,10g; Se-  
158 75,00mg; Fe-11,25g; Mn-18,74g; Cu-1997,00mg; I-187,00mg. Inicial: ácido fólico-  
159 199,00mg; biotina-10,00mg; clorohidroxiquinolina-7500,00mg; Zn-17,50g; vit.A-  
160 1680000,00UI; vit.B1-436,50mg; vit.B12-2400,00mcg; vit.B2-1200,00mg; vit.B6-  
161 624,00mg; vit.D3-400000,00UI; vit.E-3500,00UI; vit.K3-360,00mg; niacina-8400,00mg;  
162 monensina-25,00g; ácido pantotênico-3119,00mg; colina-80,71g; Se-75,00mg; FE-11,25g;  
163 Mn-18,74g; Cu-1996,00mg; I-187,47mg.  
164



165 Tabela 3. Valores da inclusão de  $K_2CO_3$ ,  $NaHCO_3$  e  $NH_4Cl$  para compor o balanço  
 166 eletrolítico dietético (BED) das dietas experimentais para frangos de corte em substituição do  
 167 inerte.

1 a 7 dias						
BED (mEq/Kg)	Dieta Basal (Kg)	Inerte (Kg)	$K_2CO_3$ (Kg)	$NaHCO_3$ (Kg)	$NH_4Cl$ (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

168  $K_2CO_3$  – peso molecular (UMA) = 138,20; pureza: 99,0%.

169  $NaHCO_3$  – peso molecular (UMA) = 84,00; pureza: 99,0%.

170  $NH_4Cl$  – peso molecular (UMA) = 53,45; pureza: 99,5%.

171

172 Tabela 4. Níveis de sódio (Na<sup>+</sup>), potássio (K<sup>+</sup>), cloro (Cl<sup>-</sup>) e relações entre os eletrólitos  
 173 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

174 BED: Balanço Eletrolítico Dietético.

175

176 **Dados de desempenho**

177 Para o desempenho foram avaliados o consumo de ração (CR), ganho de peso (GP) e a  
178 conversão alimentar (CA). O CR foi determinado pela diferença entre a quantidade fornecida  
179 de ração e as sobras dos comedouros, sendo os valores obtidos corrigidos pela mortalidade  
180 dos animais (Sakomura e Rostagno, 2016). O GP foi obtido pela pesagem dos animais em  
181 jejum de 12 horas ao final de cada fase e, posteriormente, foi feita a diferença com o peso  
182 médio inicial da fase. A CA foi obtida pela relação entre o CR e o GP.

183

184 **Análise da expressão gênica**

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

189 No Laboratório de Patologia Molecular da Universidade Estadual do Maranhão  
190 (UEMA), o RNA total foi extraído de amostras de 100 mg de cada tecido utilizando o Trizol®  
191 Reagente com o Pure Link® RNA Mini Kit (Ambion, Life Technologies, USA) de acordo  
192 com as recomendações do fabricante. Foram pesados 100 mg de cada amostra e  
193 homogeneizados com 1 mL de Trizol. O lisado com Trizol foi incubado em temperatura  
194 ambiente. Adicionou-se 200 µL de clorofórmio ao lisado e foram misturados manualmente  
195 por 15 s, depois as amostras foram incubadas por 2 min. Foram centrifugadas por 15 min a  
196 12000g a 4°C. Transferiu-se 600 µL da fase sobrenadante, que contém o RNA, para  
197 microtubos estéreis e adicionou-se volume igual de etanol 70%, em seguida, foram  
198 vortexados.

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

207 Adicionou-se 500 µl de *Wash Buffer II* com etanol 70% na coluna. As amostras foram  
208 centrifugadas a 12000g por 15 s em temperatura ambiental, para posterior descarte do eluído.  
209 Repetiu-se este passo, e em seguida foram centrifugadas a 12000g por 1 min em temperatura

210 ambiente. As colunas foram inseridas em tubos de eluição e foram adicionados 50 µl de água  
211 pura livre de RNase e DNase ao centro da coluna e foram incubadas em temperatura ambiente  
212 por 1 min. Centrifugou-se a coluna com os tubos de eluição por 2 min a 12000g em  
213 temperatura ambiente. Em seguida, foram armazenadas as amostras de RNA purificadas. O  
214 RNA total isolado das amostras foi quantificado por espectrofotometria em aparelho  
215 *Picodrop*. A integridade do RNA foi verificada em gel de agarose 1,5% corado com brometo  
216 de etídeo.

217 A síntese da primeira fita do DNA complementar (cDNA) foi feita com o Kit *GoScript*  
218 *Reverse Transcription System* (Promega, Biotecnologia do Brasil LTDA). As reações foram  
219 feitas com 5 µg de RNA por reação, 0,5 µg do *primer* oligo (dT)<sub>15</sub> e água pura livre de  
220 nuclease, de acordo com as recomendações do fabricante. Em seguida, as amostras foram  
221 aquecidas a 70°C por 5 min, depois foram resfriadas em gelo por 5 min para serem  
222 centrifugadas por 10 s. Ainda no gelo, foram adicionados os mix que continham GoScript™  
223 5X Reaction Buffer, MgCl<sub>2</sub> (1mM), PCR Nucleotide Mix (0,5 mM), Recombinant RNasin®  
224 Ribonuclease Inhibitor, GoScript™ Reverse Transcriptase e água pura livre de nucleases. As  
225 concentrações de cDNA das amostras foram estimadas por espectrofotometria (*Picodrop*), e  
226 os cDNAs foram estocados a -20°C até o uso na reação de RT-PCR em tempo real.

227 Na Tabela 5 estão as informações sobre os genes, que foram obtidas a partir de dados  
228 do UNIPROT (<http://www.uniprot.org/>), GeneCards (<http://www.genecards.org/>) e KEGG  
229 (<http://www.genome.jp/kegg/>).

230

231 Tabela 5. Localização celular (LC), vias metabólicas (VM) e processos biológicos (PB) dos  
 232 genes utilizados no qRT-PCR.

Gene	Ontologia dos genes		
	LC	VM	PB
<i>ATPIA1</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 leve
<i>SLC7A7</i>	Membrana	Transporte de aminoácidos/ Na <sup>+</sup>	Transporte de aminoácidos básicos de cadeia leve Metabolismo da lisina
<i>SLC12A2</i>	Membrana	Transporte de NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Homeostase do Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> e Cl <sup>-</sup>
		Simporte de K <sup>+</sup> /Cl <sup>-</sup>	Crescimento do organismo multicelular
		Simporte de Na <sup>+</sup> /Cl <sup>-</sup>	
<i>SLC26A4</i>	Membrana	Transporte de HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Transporte de HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
		Antiporte anion/anion	Homeostase do Cl <sup>-</sup>
		Atividade nos canais de Cl <sup>-</sup>	Regulação do pH celular

233

234 A análise da expressão dos genes *ATPIA1*, *SLC1A1*, *SLC5A1*, *SLC7A6*, *SLC7A7*,  
235 *SLC12A2* e *SLC26A4* foram realizadas utilizando-se a metodologia de qRT-PCR em tempo  
236 real. Os *primers* utilizados para amplificação dos fragmentos dos genes estudados e dos  
237 controles endógenos foram desenhados por meio do programa *PrimerQuest*  
238 ([www.idtdna.com/Scitools/Applications/PrimerQuest](http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/PrimerQuest)) fornecido pela Integrated DNA  
239 Technologies Inc (Coralville, IA) a partir de sequências de nucleotídeos obtidas do banco de  
240 dados do *GeneBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) que podem ser visualizados na Tabela 6.  
241

242 Tabela 6. Sequências de nucleotídeos, tamanho do amplicon (AMPL) e temperatura de  
 243 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>SLC7A7</i> (XM_418326.5)	F: TCCTGGTCATAGTTCCTCTCTAC R: GGCAGATGGACTCCTAAATAAT	104	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: CCTCCTTGAGAGAAGAGCTATGA R: CAATGAAGGAAGGCTGGAAGAG	102	62
<i>HMBS</i> <sup>1</sup> (XM_015298075)	F: GCTGCTGGACTGAAGAGAAT R: CACGAACCTCCACTGCTAAA	109	62

244 *ATP1A1* – ATPase transportadora de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> subunidade  $\alpha$  1, *SLC1A1* – ETAA3  
 245 (transportador de aminoácidos excitatório 3), *SLC5A1* – SLGT1 (transportador soluto/glicose  
 246 1), *SLC7A6* – y<sup>+</sup> LAT 2 (transportador de aminoácidos de cadeia leve 2), *SLC7A7* – y<sup>+</sup> LAT 1  
 247 (transportador de aminoácidos de cadeia leve 1), *SLC12A12* – NKCC1 (cotransportador de  
 248 ânions, Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>) e *SLC26A4* – Pendrina. <sup>1</sup>Genes referência.

249

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

254 As amplificações foram: a 95°C durante 5 min, 40 ciclos de amplificação a 95°C por  
255 15 s, anelamento a 62°C durante 60 s. Ao final dos 40 ciclos de amplificação, um passo  
256 adicional com elevação gradual da temperatura de 60°C a 94°C foi utilizado para a obtenção  
257 da curva de dissociação.

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

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

267 Três controles endógenos foram testados: *HPRT1*, *ACTA1* e *HMBS*, sendo o *HPRT1*  
268 utilizado para o fígado e intestino e o *ACTA1* para o rim, por mostrarem maior eficiência e  
269 menos variação entre os tratamentos (dados não mostrados) nos tecidos estudados de acordo  
270 com o software NormFinder (Andersen et al., 2004).

271



## 272 **Análise Estatística**

273 Os dados de desempenho foram submetidos ao teste de homogeneidade de variâncias  
274 (Bartlett) e normalidade de Shapiro-Wilks, e atendidas essas pressuposições procedeu-se a  
275 ANOVA. Em seguida foi realizada a comparação das médias pelo teste de Tukey a 5 % de  
276 significância com o auxílio do software SAS<sup>®</sup> 9.0 (SAS Institute, 2003).

277 Foi adotado o seguinte modelo estatístico para as análises de desempenho:

$$278 Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

279 onde,  $Y_{ij}$  = observação da variável na j-ésima ave no i-ésimo Tratamento;  $\mu$  = constante  
280 geral;  $T_i$  = efeito do i-ésimo Tratamento ( $i = 1,2,3,4$  ou  $5$ );  $e_{ij}$  = resíduo experimental.

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

288 Para os dados de expressão gênica foi utilizado o modelo:

$$289 Y_{gijk} = TG_{gi} + S_j + TS_{ij} + GS_{gj} + e_{gijk}$$

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

295

296

## **RESULTADOS**

### 297 **Desempenho**

298 Houve efeito significativo ( $p < 0,05$ ) apenas para a CA aos 7 e 21 dias. O nível de 175  
299 mEq/Kg apresentou maior CA aos 7 dias e o nível de 240 mEq/Kg aos 21 dias. O nível de 370  
300 mEq/Kg apresentou menor média aos 7 e 21 dias e o nível de 110 mEq/Kg também  
301 proporcionou menor CA aos 21 dias (Tabela 7).

302

303

Tabela 7. Efeito dos níveis de balanço eletrolítico dietético (BED) sobre o desempenho de frangos de corte em

304

estresse térmico cíclico natural.

Característica	BED (mEq/Kg)					Média	P-valor	CV (%)
	110	175	240	305	370			
1 a 7 dias								
CR <sup>1</sup> (g)	120,84 <sup>a</sup>	129,07 <sup>a</sup>	124,44 <sup>a</sup>	123,98 <sup>a</sup>	121,80 <sup>a</sup>	123,88	>0,05	5,50
GP <sup>2</sup> (g)	109,23 <sup>a</sup>	104,27 <sup>a</sup>	111,80 <sup>a</sup>	109,40 <sup>a</sup>	110,28 <sup>a</sup>	109,00	>0,05	5,98
CA <sup>3</sup>	1,12 <sup>ab</sup>	1,19 <sup>a</sup>	1,11 <sup>ab</sup>	1,13 <sup>ab</sup>	1,10 <sup>b</sup>	1,13	<0,05	4,54
1 a 21 dias								
CR (g)	1057,02 <sup>a</sup>	1048,87 <sup>a</sup>	1098,44 <sup>a</sup>	1062,77 <sup>a</sup>	1081,43 <sup>a</sup>	1068,91	>0,05	4,56
GP (g)	773,43 <sup>a</sup>	742,51 <sup>a</sup>	745,81 <sup>a</sup>	745,81 <sup>a</sup>	769,54 <sup>a</sup>	755,70	>0,05	4,74
CA	1,34 <sup>b</sup>	1,44 <sup>ab</sup>	1,59 <sup>a</sup>	1,43 <sup>ab</sup>	1,38 <sup>b</sup>	1,44	<0,05	8,65

305

<sup>1</sup>Consumo de Ração, <sup>2</sup>Ganho de Peso, <sup>3</sup>Conversão Alimentar. Letras minúsculas diferentes na linha são

306

significativas ao nível de 5 % pelo teste de Tukey.

307

## 308 **Expressão gênica**

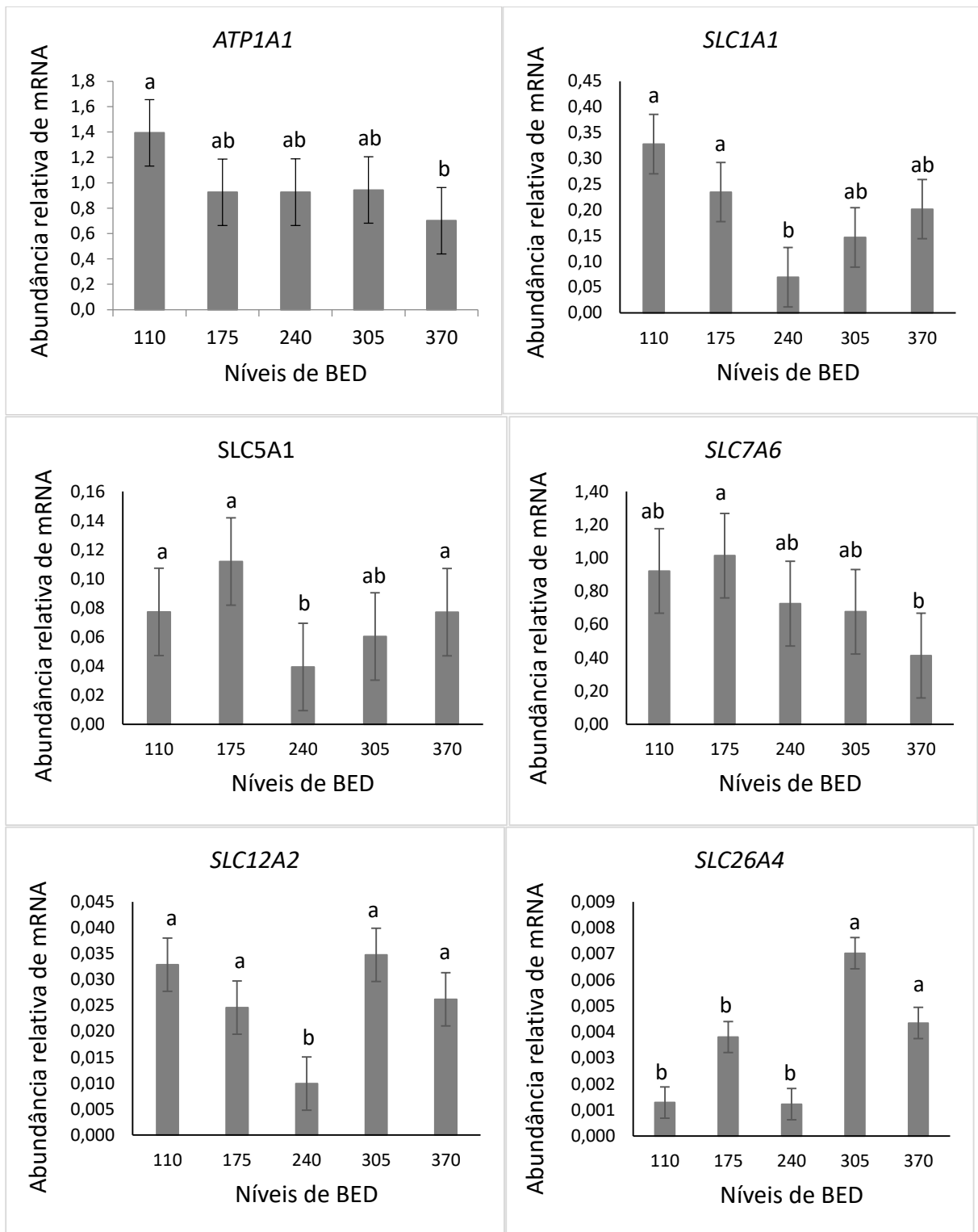
309 Houve efeito significativo ( $p < 0,05$ ) dos níveis de BED sobre a expressão dos genes  
310 *ATPIA1*, *SLC1A1*, *SLC5A1*, *SLC7A6*, *SLC12A2* e *SLC26A4*, no fígado (Figura 1), para os  
311 genes *ATPIA1*, *SLC7A6* e *SLC26A4*, no intestino (Figura 2) e *ATPIA1* e *SLC26A4* no rim  
312 (Figura 3) de frangos de corte aos 21 dias de idade.

313 No fígado (Figura 1), o gene *ATPIA1* foi mais expresso no nível de 110 mEq/Kg,  
314 enquanto o *SLC1A1* apresentou diferença significativa apenas neste órgão, com maior  
315 expressão nos níveis de 110 e 175 mEq/Kg em relação ao nível de 240 mEq/Kg. No caso do  
316 gene *SLC5A1*, o nível de 240 mEq/Kg proporcionou menor quantidade de mRNA. O gene  
317 *SLC7A6* teve maior expressão no nível de 175 mEq/Kg quando comparado ao nível de 370  
318 mEq/Kg, já o *SLC12A2* mostrou diferença de expressão apenas no fígado, sendo a menor  
319 média observada no nível de 240 mEq/Kg em relação a todos os demais tratamentos, e o  
320 *SLC26A4* foi mais expresso nos níveis 305 e 370 mEq/Kg.

321 Na Figura 2, foi observado que o gene *ATPIA1* foi mais expresso no nível de 240  
322 mEq/kg em relação aos níveis de 175 e 305 mEq/Kg, enquanto o gene *SLC7A6* teve maior  
323 expressão nos níveis de 110 e 240 mEq/Kg quando comparados com o nível de 305 mEq/Kg.  
324 O gene *SL26A4* apresentou maior expressão no nível de 370 mEq/Kg quando comparado aos  
325 demais níveis, sendo ainda o nível de 240 mEq/Kg menos expresso que nos níveis de 110,  
326 175 e 305 mEq/Kg.

327 Em relação à abundância relativa de mRNA no rim (Figura 3), no gene *ATPIA1* foi  
328 observado resultado semelhante ao fígado, com maior expressão no nível de 110 mEq/Kg. No  
329 caso do gene *SLC26A4*, observou-se menor expressão no nível de 110 mEq/Kg quando  
330 comparado com os demais tratamentos.

331

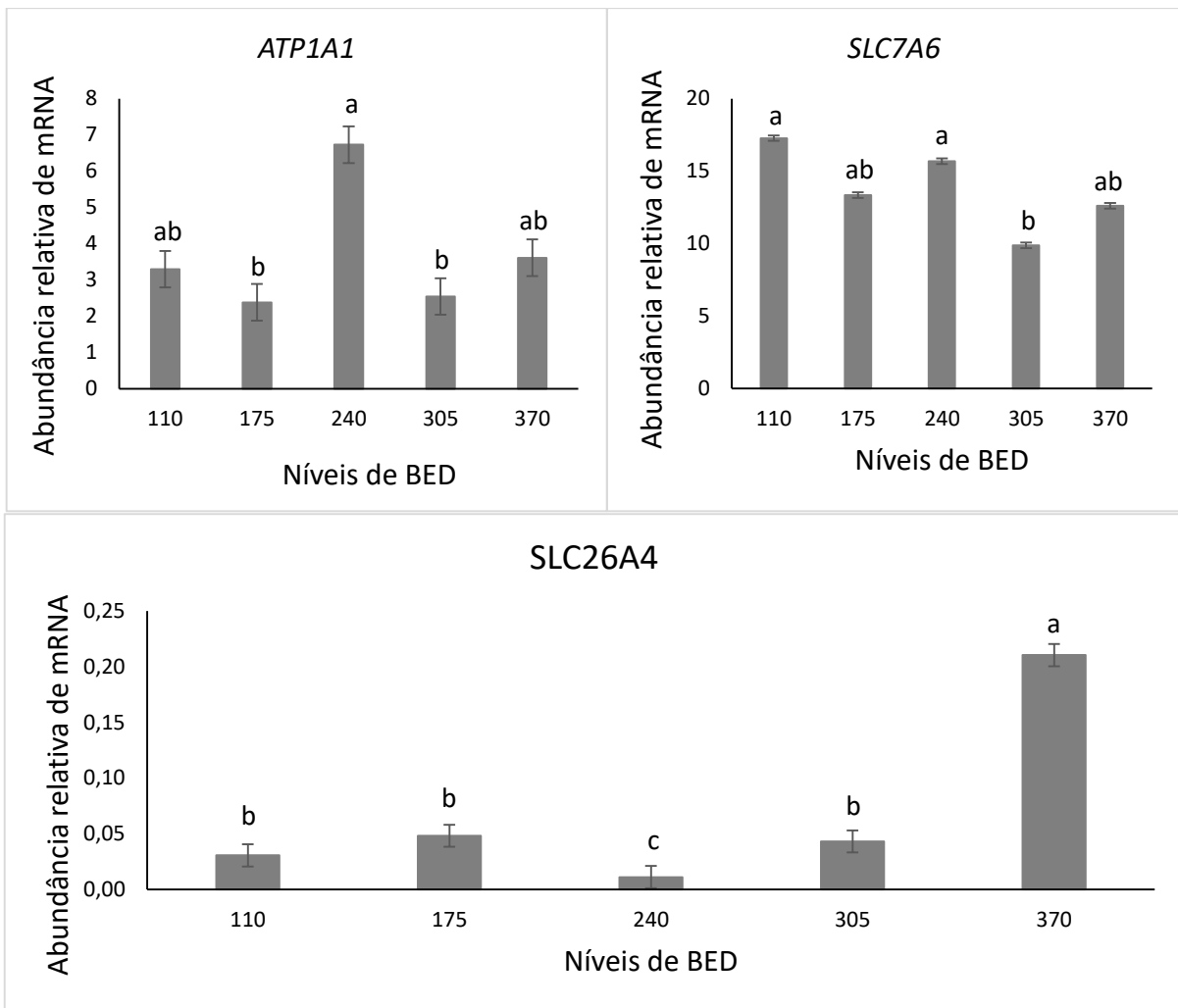


332

333

334

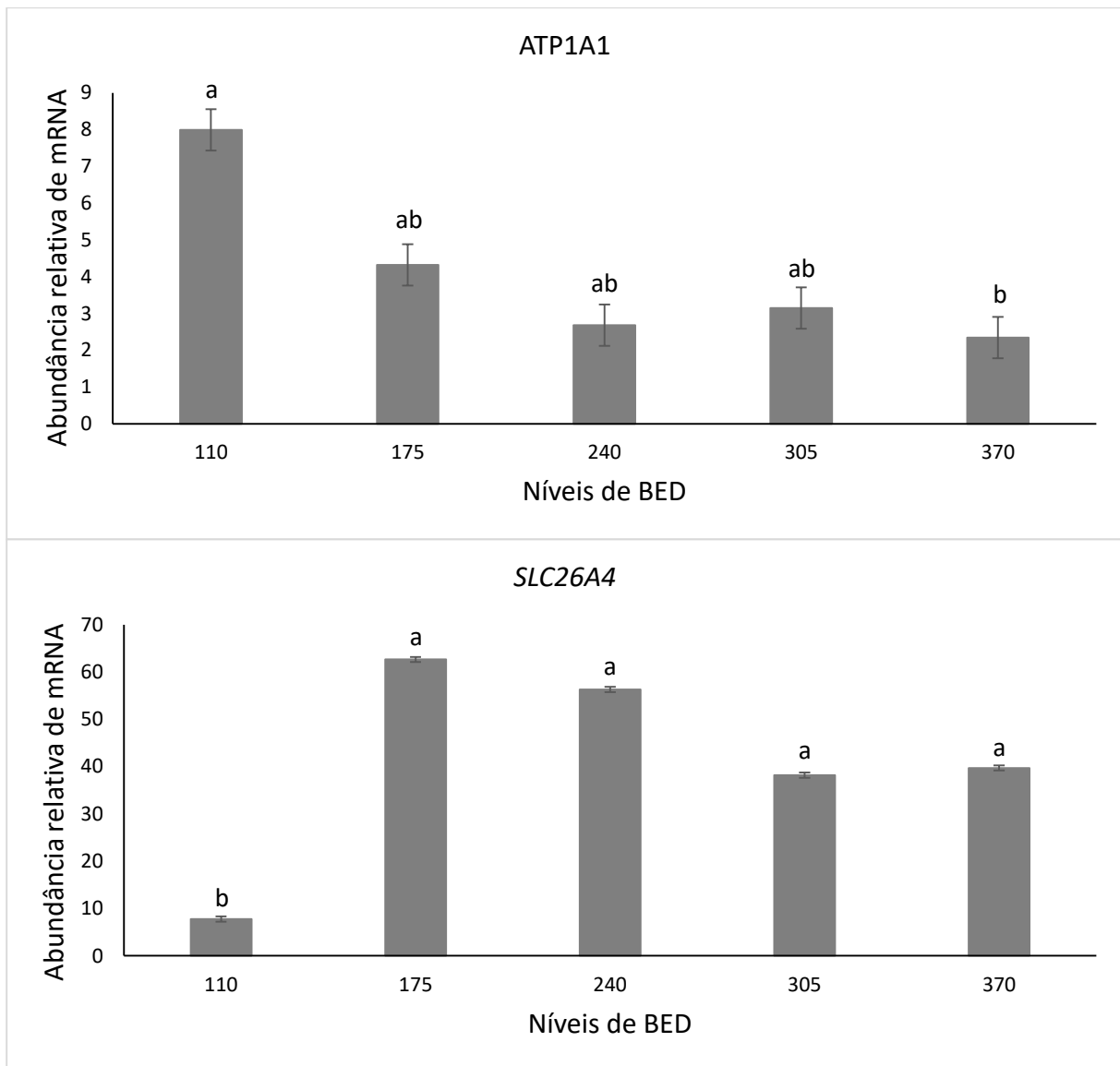
335 Figura 1. Abundância relativa de mRNA ( $2^{-\Delta Ct}$ ) dos genes *ATP1A1*, *SLC1A1*, *SLC5A1*,  
 336 *SLC7A6*, *SLC12A2* e *SLC26A4* no fígado de frangos de corte aos 21 dias alimentados com  
 337 diferentes níveis de balanço eletrolítico dietético (BED).



338

339

340 Figura 2. Abundância relativa de mRNA ( $2^{-\Delta Ct}$ ) dos genes *ATP1A1*, *SLC7A6* e *SLC26A4* no  
 341 intestino de frangos de corte aos 21 dias alimentados com diferentes níveis de balanço  
 342 eletrolítico dietético (BED).



343

344

345 Figura 3. Abundância relativa de mRNA ( $2^{-\Delta Ct}$ ) dos genes *ATP1A1* e *SLC26A4* no rim de  
346 frangos de corte aos 21 dias alimentados com diferentes níveis de balanço eletrolítico  
347 dietético (BED).

348

## DISCUSSÃO

349

350 A dieta com nível 370 mEq/Kg proporcionou melhor CA aos 7 e 21 dias devido maior  
351 inclusão de  $\text{NaHCO}_3$  e  $\text{K}_2\text{CO}_3$ . O  $\text{NaHCO}_3$  proporcionou maiores quantidade de  $\text{Na}^+$   
352 disponível no intestino neste nível de BED (Tabela 4), possivelmente aumentando a absorção  
353 de nutrientes, visto que, a maioria dos transportadores de aminoácidos e glicose são  $\text{Na}^+$   
354 dependentes, sendo necessário para o transporte um gradiente eletroquímico mantido pela  
355 bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase (Matos et al., 2009; Habashy et al., 2017). Levando em consideração  
356 que as dietas eram isonutitivas, exceto pelas quantidades dos eletrólitos, pode ter ocorrido  
357 melhor aproveitamento desses nutrientes com o aumento inclusão de  $\text{NaHCO}_3$ .

358 Em relação ao  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , houve maiores quantidades de  $\text{K}^+$  também no nível de 370  
359 mEq/Kg (Tabela 4), que pode ter corrigido as perdas desse eletrólito em decorrência do  
360 estresse térmico cíclico nos momentos em que as temperaturas estavam mais elevadas. De  
361 acordo com Vieites et al. (2011) pode ocorrer perdas excessivas de  $\text{K}^+$  quando a temperatura  
362 do ambiente se eleva. A perda de  $\text{K}^+$  ocorre por causa da diminuição da competição  $\text{H}^+/\text{K}^+$   
363 nos ductos coletores do rim, aumentando a excreção  $\text{K}^+$  pela diminuição da pressão parcial de  
364 dióxido de carbono ( $\text{pCO}_2$ ), resultante do aumento da frequência respiratória em aves  
365 estressadas pelo calor (Vieites et al., 2011).

366 Na fase de 1 a 21 dias o nível de 110 mEq/Kg também proporcionou menor CA, e esse  
367 fato está relacionado com o menor nível de BED proporcionado pela inclusão de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . O  
368  $\text{NH}_4\text{Cl}$  é uma fonte de  $\text{Cl}^-$  efetiva em diminuir o BED para aves (Araújo, et al., 2011) e,  
369 conseqüentemente, pode reduzir o pH dos fluidos por conta do  $\text{Cl}^-$  ser um íon acidogênico  
370 (Atherton, 2009).

371 A alcalose respiratória é o principal problema quando ocorre elevação da temperatura  
372 por causar o aumento do pH dos fluidos corporais (Vieites et al., 2011), nesses casos, a  
373 acidose metabólica pode ser um mecanismo compensador e estabilizar a variação do pH  
374 (Ayers et al., 2015). O único tratamento que houve inclusão de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  foi o de 110 mEq/Kg  
375 (Tabela 3), sendo a concentração de  $\text{Cl}^-$  neste nível de BED superior aos demais tratamentos  
376 (Tabela 4), apresentando-se como determinante na diminuição da CA aos 21 dias.

377 A faixa de BED para o melhor desempenho em frangos de corte aos 21 dias de acordo  
378 com Vieites et al. (2004) situa-se entre 166 e 177 mEq/Kg, e Vieites et al. (2011), ao  
379 estudarem o efeito de altos valores de BED em frangos estressados pelo calor, afirmaram que  
380 os melhores valores ficam entre 270 e 300 mEq/Kg. Poucos autores encontraram efeito do  
381 BED sobre a CA (Veites et al 2005; Sousa et al., 2002), que pode ser justificado devido às

382 diferenças nas condições ambientais e experimentais (tipo de sal inorgânico, níveis de BED  
383 utilizados no estudo, por exemplo).

384 As alterações observadas no desempenho dos frangos aos 21 dias podem estar  
385 relacionadas com as mudanças no perfil de expressão de genes relacionados ao BEO. Como  
386 por exemplo, o gene *ATPIAI* no fígado e no rim, que foi mais expresso no nível de 110  
387 mEq/Kg e menos expresso 370 mEq/Kg ao mesmo tempo que estes dois níveis de BED  
388 proporcionaram melhores CA.

389 O nível de 110 mEq/Kg não apresentava a relação  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ideal de acordo com  
390 Rostagno et al. (2011), no entanto, neste nível a maior expressão do gene *ATPIAI* pode ter  
391 proporcionado melhor CA por minimizar o efeito do desequilíbrio da concentração destes  
392 íons. No nível de 370 mEq/Kg foi atendida a relação  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , justificando o melhor  
393 desempenho e culminando em melhores condições moleculares e menores quantidades de  
394 mRNA do gene *ATPIAI* provavelmente pela menor necessidade de alterações na expressão  
395 deste gene. Esses resultados indicam que nestes tratamentos a célula pode ter realizado ajustes  
396 moleculares eficientes e, conseqüentemente, melhoraram a CA.

397 Um das principais funções relacionadas ao gene *ATPIAI* é manutenção do gradiente  
398 de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  através das membranas celulares (Sawosz et al., 2012), a quebra de ATP e  
399 manutenção do pH intracelular (Liu et al., 2011). Em condições que ocorre deficiência ou  
400 desequilíbrio de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  a ATPase pode realizar ajustes com o intuito de manter o gradiente  
401 eletroquímico (Stein, 2002), podendo ocorrer alterações moleculares oriundas de mudanças na  
402 presença desses íons nos fluidos corporais com conseqüências sobre o desempenho dos  
403 animais.

404 No intestino, a diferença de expressão do *ATPIAI* foi maior para o nível de 240  
405 mEq/Kg, que pode ter ocorrido devido à falta de ajuste na relação  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . Nesse caso, o  
406 desequilíbrio na relação desses íons pode ter sido determinante na absorção destes nutrientes e  
407 ter proporcionado pior CA, sendo possível afirmar que as alterações moleculares que podem  
408 ser realizadas por este gene não foram eficientes neste nível de BED.

409 Houve maior expressão do gene do *SLCIAI* no fígado, nos níveis de 110 e 175  
410 mEq/Kg em relação ao nível de 240 mEq/Kg, que pode estar relacionada com a melhor  
411 utilização de aminoácidos, uma vez que foi observado menor CA. De acordo com Graczyk et  
412 al. (2016), a partir de uma análise de entropia, pesquisaram associações entre SNPs e  
413 eficiência alimentar, e o gene *SLCIAI* está ligado ao sistema nervoso e é expresso no trato  
414 gastrointestinal, apresentando importante função na conversão alimentar de frangos. Uma das  
415 principais funções da proteína EAAT3, codificada pelo *SLCIAI*, é o transporte de



416 aminoácidos (Bianchi et al., 2014). Além disso, a expressão do *SLC1A1* no fígado e intestino  
417 delgado é influenciada pelo estágio de desenvolvimento de frangos de corte até os 21 dias  
418 (Miska et al., 2015). Como é um gene que se expressa no trato gastrointestinal (Graczyk et al.,  
419 2016), por este motivo não foi observado diferença de expressão no rim (Figura 3).

420 A menor expressão do gene *SLC5A1* no fígado no nível de 240 mEq/Kg, aliada a pior  
421 CA observada neste tratamento, indica que houve prejuízo no metabolismo da glicose. A  
422 *SLGT1*, proteína codificada pelo *SLC5A1*, é um transportador de glicose dependente de  $\text{Na}^+$  e  
423 realiza esse processo pelo mecanismo simporte (Xin e Wang, 2011). Barfull et al. (2002), ao  
424 estudarem o efeito do desenvolvimento pós-natal em frangos White Leghorn, observaram  
425 uma diminuição na expressão do *SLC5A1* em função da idade, culminando com menor  
426 quantidade de glicose circulante resultando em prejuízos no metabolismo energético.

427 O fígado é um órgão de intensa atividade metabólica e a glicose é o principal substrato  
428 energético para o organismo. A maioria dos estudos que avaliam a expressão do gene *SLC5A1*  
429 na avicultura se restringem a estudar apenas o intestino dos frangos, no intuito de evidenciar a  
430 absorção de glicose. No entanto, foi observado que a diminuição da quantidade de mRNA do  
431 *SLC5A1* no fígado também pode estar relacionada a prejuízos no metabolismo energético,  
432 visto que houve pior CA no nível de 240 mEq/Kg, que regulou negativamente este gene.

433 Assim como o gene *SLC1A1*, o gene *SLC7A6* tem sido identificado como o principal  
434 transportador intestinal de aminoácidos ácidos, além de codificar o transportador de  
435 aminoácido  $\gamma$ -LAT2, que tem a função de fazer a troca de  $\text{Na}^+$  e aminoácidos neutros de  
436 cadeia grande por aminoácidos básicos, sendo classificado como  $\text{Na}^+$ /dependente (Miska et  
437 al., 2015). Foi observado efeito significativo dos níveis de BED sobre a expressão do *SLC7A6*  
438 no fígado, apresentando maior expressão no nível de 175 mEq/Kg em relação ao nível de 370  
439 mEq/Kg e no intestino nos níveis de 110 e 240 mEq/Kg em relação ao nível de 305 mEq/Kg.  
440 Estes resultados para a expressão do *SLC7A6* ocorreram provavelmente pela menor  
441 disponibilidade de substrato nos menores níveis BED (110, 175, 240 mEq/Kg), que pode ter  
442 sinalizado para a célula maior necessidade da atividade deste gene, regulando positivamente  
443 sua expressão, como alternativa para melhor distribuir os seus substratos.

444 A menor expressão gene do *SLC12A2* no fígado dos frangos alimentados com 240  
445 mEq/Kg, em relação a todos os outros tratamentos, demonstra que este nível de BED  
446 prejudicou a atividade deste gene nos hepatócitos nas aves, visto que, houve pior CA neste  
447 tratamento. O *SLC12A2* atua na homeostase celular, transporte de  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ , crescimento do  
448 organismo multicelular (HAMANN et al., 2005) e está relacionado ao conteúdo de gordura  
449 abdominal (CGA) em frangos de corte (Zhang et al., 2012).

450 Frangos de corte com maiores taxa de crescimento sempre tem sido associados com  
451 aumento na CGA e Zhang et al. (2012) afirmaram que o *SLC12A2* é um gene candidato para  
452 esta característica. O nível de 240 mEq/Kg regulou negativamente a expressão do *SLC12A2* e  
453 como houve maior CA dos frangos submetidos a este nível de BED é possível afirmar que o  
454 gene *SLC12A2* pode estar também relacionado com o aproveitamento da dieta, ou seja, com a  
455 conversão dos alimentos em ganho de peso em frangos de corte.

456 Houve diferença de expressão para o gene *SLC26A4* nos três órgãos estudados. Foi  
457 mais expresso no fígado nos níveis de 305 e 370 mEq/Kg e no intestino com o nível de 370  
458 mEq/Kg, o que sugere uma resposta relacionada a manutenção EAB, pois de acordo Kim et  
459 al. (2009) este gene atua no transporte ânions ( $\text{HCO}_3^-$  e  $\text{Cl}^-$ ) e na regulação do pH intracelular.  
460 Os nutrientes ao serem absorvidos seguem para o fígado e os níveis mais elevados de BED  
461 (305 e 370 mEq/Kg) regularam positivamente o gene *SLC26A4* no intestino e fígado. Esse  
462 fato sugere que estes órgãos podem ter efeito na regulação do EAB, sendo necessários mais  
463 estudos nesse sentido para elucidar essa resposta.

464 Outro ponto que deve ser considerado é a menor expressão do *SLC26A4* no intestino  
465 de frangos alimentados com 240 mEq/Kg de BED. Este nível de BED regulou negativamente  
466 a expressão do *SLC26A4* e proporcionou pior CA, sendo possível estabelecer uma relação  
467 deste gene com a função do intestino, uma vez que quando ele foi regulado positivamente  
468 (maior expressão no nível de 370 mEq/Kg) neste órgão e as aves apresentaram melhor CA.  
469 Assim, mais informações deste gene em frangos de corte devem ser levantadas para melhor  
470 entendimento da função do gene *SLC26A4*, visto que são escassas, principalmente em relação  
471 ao crescimento de frangos de corte.

472 No rim, o *SLC26A4* teve maior expressão nos frangos alimentados com níveis acima  
473 de 110 mEq/Kg, pois o rim tem papel primordial na regulação do EAB, uma vez que é  
474 responsável pela excreção e reabsorção de ácidos e bases do organismo (Ayers et al., 2015).  
475 De acordo com Kim et al. (2009), este gene é efetivo no metabolismo do  $\text{HCO}_3^-$ , e como nos  
476 maiores níveis de BED foram incluídos a maior quantidade de íons alcalinizantes ( $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ ),  
477 pode ter havido maior alocação do  $\text{HCO}_3^-$  das células por conta deste também ser base uma  
478 efetiva no tamponamento do pH. Essa resposta apresenta efeito benéfico ao metabolismo,  
479 visto que, o  $\text{HCO}_3^-$  deve ser perdido para manter o pH dentro de faixas aceitáveis em casos de  
480 excesso de bases (Ayers et al., 2015).

481 A disponibilização de íons que tem funções específicas durante o estresse térmico por  
482 calor, como o  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , presentes em maior quantidade no nível de 370 mEq/Kg pela  
483 inclusão de  $\text{NaHCO}_3$  e  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , respectivamente, atuaram benéficamente no perfil de

484 expressão dos genes estudados. Assim, a formulação de dietas utilizando os conceitos de  
485 nutrigenômica podem ser relevantes na formulação de dietas para frangos de corte.

486 Do ponto de vista produtivo, a acidose metabólica pode ser importante em frangos de  
487 corte criados em clima quente. Como a ofegação é a principal via de perda de calor, a alcalose  
488 respiratória pode ser estabelecida nesse processo, e a acidificação da dieta pode ter efeito  
489 benéfico sobre o desempenho das aves.

490 Dietas com a inclusão de compostos ácidos, como o  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , podem promover acidose  
491 metabólica por acidificar o pH do sangue (Minafra et al., 2009), e pode ser um mecanismo  
492 compensatório no sentido de corrigir a alcalose respiratória (Ayers et al., 2015), que é um dos  
493 principais problemas da criação de frangos de corte em clima quente, como o da região  
494 Nordeste do Brasil. Assim, o nível de 110 mEq/Kg, que foi o único com a inclusão de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  
495 pode ter proporcionado ajustes favoráveis na expressão dos genes afetados pelo BED pela  
496 função acidogênica do  $\text{Cl}^-$ , conseqüentemente, as aves apresentaram melhor CA aos 21 dias.

497 O BED afeta a expressão de genes relacionados ao equilíbrio ácido-básico, absorção e  
498 transporte de aminoácidos e a conversão alimentar de frangos de corte de 1 a 21 dias. O nível  
499 de 370 mEq/Kg melhorou a conversão alimentar aos 7 dias e os níveis de 110 e 370 mEq/Kg  
500 podem ser utilizados para diminuir conversão alimentar aos 21 dias.

501

502

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

503 Alvares, C. A., J. L. Stape., P. C. Sentelhas., J. L. M. Gonçalves., e G. Sparovek. 2014.  
504 Köppen's climate classification map for Brazil. Meteorol. Zeit. 22:711–728.

505

506 Andersen, C. L., J. L. Jensen., e T. F. Orntoft. 2004. Normalization of real-time quantitative  
507 reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify  
508 genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. Canc. Res.  
509 64:5245-5250.

510

511 Araújo, G. M., F. M. Vieites, A. A. Barbosa, J. G. Caramori Junior, A. L. Santos, G. H. K.  
512 Moraes, J. G. Abreu, e E. S. Muller. 2011. Variação aniônica da dieta sobre características  
513 ósseas de frangos de corte: resistência à quebra, composição orgânica e mineral. Arq. Bras.  
514 Med. Vet. Zoo. 63:954-961.

515

516 Atherton, J. C. 2009. Role of the kidney in acid–base balance. Anaest. Int. Car. Med. 10:276-  
517 278.

518  
519 Ayes, P., C. Dixon, e A. Mays. 2015. Acid-Base Disorders: Learning the Basics. *Nutri. Clin.*  
520 *Pract.* 30:14–20.  
521  
522 Barfull, A., C. Garriga, M. Mitfans, e J. Planas. 2002. Ontogenetic expression and regulation  
523 of Na<sup>+</sup>-D-glucose cotransporter in jejunum of domestic chicken. *Am. J. Physiol.* 282:559-  
524 564.  
525  
526 Bianchi, M. G., D. Bardelli, M. Chiu, e O. Bussolati. 2014. Changes in the expression of the  
527 glutamate transporter EAAT3/EAAC1 in health and disease. *Cell. Mol. L. Sci.* 71:2001-2015.  
528  
529 Brossi, C., C. J. Contreras-Castilho, E. A. Amazonas, e J. F. M. MENTEN. 2009. Estresse  
530 térmico durante o pré-abate em frangos de corte. *Ciênc. Rur.* 39:1296-1305.  
531  
532 Buffington, D. E., A. Collazoarcho, G. H. Canton, e D. Pitt. 1981. Black globe-humidity  
533 index (BGHI) as comfort equation for dairy cows. *Trans. ASAE.* 24:711-714.  
534  
535 Freitas, E. R., R. P. S. Xavier, G. A. Jerônimo do Nascimento, A. M. Rodrigues, M. G. R.  
536 Queiroz, D. L. Raquel, e R. C. Lima. 2013. Níveis de cloro da ração sobre parâmetros  
537 sanguíneos e ósseos de codornas italianas destinadas à produção de carne. *Arqu. Bras. Med.*  
538 *Vet. Zoo.* 65:1808-1814.  
539  
540 Gal-Garber, O., S. J. Mabweesh, D. Sklan, e Z. Uni. 2003. Nutrient transport in the small  
541 intestine: Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase expression and activity in the small intestine of the chicken as  
542 influenced by dietary sodium. *Poult. Sci.* 82:1127-1133.  
543  
544 Gonsalves, F. M., M. N. Corrêa, M. A. Anciuti, F. P. Gentilini, J. T. Zanusso, F. Rutz. 2009.  
545 Nutrigenômica: situação e perspectivas na alimentação animal. *Rev. Port. Ciên. Vet.* 104:5-  
546 11.  
547  
548 Graczyk, M., H. Reyer, K. Wimmers, R. Hawken, T. Szwaczkowski. 2016. The search for  
549 SNPs and genes associated with the feed conversion ratio using entropy analysis. *Act.*  
550 *Fytotec. Zoo.* 19:93-95.  
551

552 Habashy, W. S., M. C. Milfort, A. L. Fuller, Y. A. Attia, R. Rekaya, e S. E. Aggrey. 2017.  
553 Effect of heat stress on protein utilization and nutrient transporters in meat-type chickens. *Int.*  
554 *J. Biometeorol.* 61:1-8.  
555

556 Hamann, S., J. J. Herrera-Perez, M. Bundgaard, F. J. Alvarez-Leefmans, e T. Zeuthen. 2005.  
557 Water permeability of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> cotransporters in mammalian epithelial cells. *J. Physiol.*  
558 568:123–135  
559

560 Hamm, L. L., N. Nakhoul, e K. S. Hering-Smith. 2015. Acid-Base Homeostasis. *Clin. J. Am.*  
561 *Soc. Nephrol.* 10:2232–2242.  
562

563 Huang, J., H. Cui, X. Penq, J. Fanq, Z. Zuo, J. Deng., X. Wanq, e B. Wu. 2014.  
564 Downregulation of TLR4 in mRNA, expression. Levels in broiler's spleen caused by diets  
565 supplemented with nickel chloride. *Biol. Trace Elem. Res.* 158:353-358.  
566

567 Huang, S. 2017. Upregulation of TLR4 mRNA Expression Levels in Broiler Chickens under  
568 Acute Heat Stress. *Bra. J. Poult. Sci.* 19:87-94.  
569

570 Junqueira, J. R. C., M. R. S. Balarin, K. K. M. C. Flaiban, D. S. Barbosa, e J. A. N. Lisboa.  
571 2015. Efeito alcalinizante de soluções eletrolíticas intravenosas com concentrações elevadas  
572 de lactato de sódio infundidas em bezerros saudáveis. *Arqu. Bras. Med. Vet. Zoo.* 67:15-24.  
573

574 Kim, Y. H., T. D. Pham, W. Zheng, S. Hong, C. Baylis, V. Pech, W. H. Beierwaltes, D. B.  
575 Farley, L. E. Braverman, J. W. Verlander, e S. M. Wall. 2009. Role of pendrin in iodide  
576 balance: going with the flow. *Am. J. Physiol. Res. Physiol.* 297:1069-1079.  
577

578 Leinonen, I., A. G. Williams, e I. Kyriazakis. 2016. Potential environmental benefits of  
579 prospective genetic changes in broiler traits. *Pout. Sci.* 95:228-236.  
580

581 Liu, Y., D. Li, H. Li, X. Zhou, e G. Wang. 2011. A novel SNP of the ATP1A1 gene is  
582 associated with heat tolerance traits in dairy cows. *Mol. Bio. Rep.* 38:83-88.  
583

584 Livak, K. J., e T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-  
585 time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCt</sup> method. *Meth.* 25:402-408.

586

587 Matos, M. B., R. A. Ferreira, V. D. L. Savaris, H. P. Couto, R. T. R. N. Soares, e N. T. E.  
588 Oliveira. 2009. Balanço eletrolítico e redução da proteína bruta da ração sobre parâmetros  
589 fisiológicos e sanguíneos de frangos de corte no calor. *Act. Sci. An. Sci.* 31:243-249.

590

591 Minafra, C. S., H. K. Moraes, A. C. C. Lopes, C. O. Lopes Júnior, F. M. Vieites, C. S. M.  
592 Resende, e V. Mao. 2009. O Balanço eletrolítico e protéico dietéticos sobre as  
593 aminotransferases hepáticas, renais e séricas e teores séricos de magnésio e cloro de frangos  
594 de corte. *Ciênc. An. Bras.* 10:425-437.

595

596 Miska, K. B., R. H. Fetterer, e E. A. Wong. 2015. mRNA expression of amino acid  
597 transporters, aminopeptidase, and the di- and tri-peptide transporter PepT1 in the intestine and  
598 liver of posthatch broiler chicks. *Poult. Sci.* 94:1323–1332.

599

600 Mongin, P. 1981. Recent advances in dietary anion-cation balance: application in poultry.  
601 *Proc. Nut. Soci.* 40:285-294.

602

603 Oliveira, M. C., U. M. Arantes, e J. H. Stringhini. 2010. Efeito do balanço eletrolítico da  
604 ração sobre parâmetros ósseos e da cama de frango. *Biotemas.* 23:203-209.

605

606 Oliveira. G. A., e S. L. R. Pessa. 2013. Revisão dos aspectos operacionais e os estressores  
607 relacionados à fase de pré-abate de frangos. *Rev. Téc. Cient.* 1:1-15.

608

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

611

612 Rostagno, H. S., L. F. T. Albino, J. L. Donzele, P. C. Gomes, R. F. Oliveira, D. C. Lopes, A.  
613 S. Ferreira, S. L. T. Barreto, e R. F. Euclides. 2011. *Tabelas brasileiras para aves e suínos:*  
614 *composição de alimentos e exigências nutricionais.* 3.ed. Vicosa, MG: Universidade Federal  
615 de Vicosa, 252p.

616

617 Sakomura, N. K., H. S. Rostagno. 2016. *Métodos de pesquisa em nutrição de monogátricos.*  
618 2.ed. Jaboticabal, SP: FUNEP, 262p.

619

620 Sawosz, F., L. Pineda, A. Hotowy, P. Hyttel, E. Sawosz, M. Szmidt, T. Niemiec, e A.  
621 Chwalibog. 2012. Nano-nutrition of chicken embryos. The effect of silver nanoparticles and  
622 glutamine on molecular responses, and the morphology of pectoral muscle. *Int. J. Nanomed.*  
623 2:29-45.  
624

625 Souza, B. B., A. G. Bertechini, A. S. Teixeira, J. A. S. Lima, e R. T. F. Freitas. 2002. Efeito  
626 da suplementação de cloreto de potássio na dieta sobre o equilíbrio ácido-básico e o  
627 desempenho de frangos de corte no verão. *Ciênc. Agrotec.* 26:1297-1304.  
628

629 Steibel, J. P., R. Poletto, P. M. Coussens, e G. J. Rosa. 2009. A powerful and flexible linear  
630 mixed model framework for the analysis of relative quantification RT-PCR data. *Genomic.*  
631 94:146-152.  
632

633 Stein, W. D. 2002. Cell volume homeostasis: ionic and nonionic mechanisms. The sodium  
634 pump in the emergence of animal cells. *Int. Rev. Cyto.* 215:231-238.  
635

636 Trujillo, E., C. Davis, e J. Milner. 2006. Nutrigenomics, Proteomics, Metabolomics and the  
637 Practice of Dietetics. *J. Am. Diet. Associ.* 106:403-413.  
638

639 Vieites, F. M., A. L. Fraga, C. S. Souza, G. M. Araújo, J. G. Vargas Júnior, R. V. Nunes, e G.  
640 S. S. Corrêa. 2011. Desempenho de frangos de corte alimentados com altos valores de  
641 balanço eletrolítico em região de clima quente. *Arqu. Bras. Med. Vet. Zoo.* 63:441-447.  
642

643 Vieites, F. M., G. H. K. Moraes, L. F. T. Albino, H. S. Rostagno, A. Atencio, e J. G. Vargas  
644 Junior. 2005. Balanço Eletrolítico e Níveis de Proteína Bruta sobre o Desempenho, o  
645 Rendimento de Carcaça e a Umidade da Cama de Frangos de Corte de 1 a 42 dias de Idade.  
646 *Rev. Bras. Zoo.* 34:1990-1999.  
647

648 Vieites, F. M., G. H. K. Moraes, L. F. T. Albino, H. R. Rostagno, J. L. Donzele, J. G. Vargas  
649 Junior, e A. Atencio. 2004. Balanço eletrolítico e níveis de proteína bruta sobre o desempenho  
650 de pintos de corte de 1 a 21 dias de idade. *Rev. Bras. Zoo.* 33:2076-2085.  
651

652 Yahav, S., S. Druyan, M. Rusal, e D. Shinder. 2011. Diurnally cycling temperature and  
653 ventilation affect young turkeys performance and sensible heat loss. *J. Therm. Bio.* 36:334-  
654 339.

655

656 Xin, B., e H. Wang. 2011. Multiple sequence variations in SLC5A1 gene are associated with  
657 glucose-galactose malabsorption in a large cohort of Old Order Amish. *Clinic. Genetc.* 79:86-  
658 91.

659

660 Zhang, H., X. Hu, Z. Wang, Y. Zhang, S. Wang, N. Wang, L. Ma, L. Leng, S. Wang, Q.  
661 Wang, Y. Wang, Z. Tang, N. Li, Y. Da, e H. Li. 2012. Selection signature analysis implicates  
662 the PC1/PCSK1 region for chicken abdominal fat content. **PLoS ONE.** 7:1-14.



**Capítulo 3. Expressão gênica, parâmetros fisiológicos, comportamentais e desempenho de frangos de corte submetidos a níveis de balanço eletrolítico dietético**

Elaborado de acordo com as normas da revista Journal of Agricultural Science

(<http://www.ccsenet.org/journal/index.php/jas>)

## **Expressão gênica, parâmetros fisiológicos, comportamentais e desempenho de frangos de corte alimentados com níveis de balanço eletrolítico dietético**

André C. Araujo<sup>1</sup> & Katiene R. S. Sousa<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Pós-graduação em Zootecia, Universidade Federal do Piauí – UFPI, Bom Jesus, PI, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Zootecnia, Universidade Federal do Maranhão – UFMA, Chapadinha, MA, Brazil.

Autor correspondente: André C. Araujo, Pós-graduação em Zootecia, Universidade Federal do Piauí – UFPI, Bom Jesus, PI, Brasil, e-mail: andrefuturo7@hotmail.com

### **Resumo**

Objetivou-se avaliar o efeito de níveis de balanço eletrolítico dietético (BED) sobre a expressão de genes relacionados com o equilíbrio ácido-básico, parâmetros fisiológicos, comportamentais e o desempenho de frangos de corte na fase inicial em estresse térmico cíclico natural. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 5 níveis de BED (110, 175, 240, 305 e 370 mEq/Kg), 7 repetições por tratamento constituídas de 7 aves por unidade experimental. Foram avaliados o consumo de ração diário (CRD), ganho de peso diário (GPD), os parâmetros fisiológicos: temperatura retal (TR), frequência respiratória (FR), frequência cardíaca (FC) e temperatura superficial média (TSM). Para o comportamento das aves utilizou-se um etograma com base na atividade, ociosidade e movimentos agonísticos. A análise da expressão dos genes *CHPI*, *SLC9A1*, *SLC24A3* no fígado, intestino e rim foram realizadas utilizando-se a metodologia de qRT-PCR. Não houve efeito significativo dos níveis de BED sobre as médias do CRD e GPD das aves. Nos parâmetros fisiológicos, houve efeito significativo ( $p < 0,05$ ) dos níveis de BED apenas para FR e FC. Houve efeito significativo ( $p < 0,05$ ) para os parâmetros comportamentais “Ativo”, “Comer”, e “Respiração Ofegante”, assim como para os genes *CHPI* e *SLC9A1* no fígado e *SLC24A3* no intestino e rim. O nível de 370 mEq/Kg é recomendado por proporcionar efeito favorável na expressão gênica, parâmetros fisiológicos e comportamentais em frangos de corte aos 21 dias.

**Palavras chave:** absorção de nutrientes, aves, balanço cátion-ânion, comportamento, eletrólitos

## **Abstract**

The objective of this work was to evaluate the effect of dietary electrolyte balance (BED) on the expression of genes related to acid-base balance, physiological and behavioral parameters and performance of broiler chickens in the initial phase under natural cyclic thermal stress. The experimental design was completely randomized with 5 BED levels (110, 175, 240, 305 and 370 mEq / kg), 7 replicates per treatment consisting of 7 birds per experimental unit. The daily dietary intake (CRD), daily weight gain (GPD), the physiological parameters: rectal temperature (TR), respiratory rate (FR), heart rate (FC) and mean surface temperature (TSM) were evaluated. For the behavior of the birds an etogram was used based on the activity, idleness and agonistic movements. Analysis of the expression of the *CHPI*, *SLC9A1*, *SLC24A3* genes in the liver, intestine and kidney were performed using the qRT-PCR methodology. There was no significant effect of BED levels on mean CRD and GPD of birds. In the physiological parameters, there was a significant effect ( $p < 0.05$ ) of BED levels only for FR and FC. There was a significant ( $p < 0.05$ ) effect for the behavioral parameters "Active", "Eat" and "Breathing Breath" as well as for the *CHPI* and *SLC9A1* genes in the liver and *SLC24A3* in the gut and kidney. The level of 370 mEq/kg is recommended for providing favorable effect on gene expression, physiological and behavioral parameters in broilers at 21 days.

**Key words:** absorption of nutrients, behavior, birds, cation-anion balance, electrolytes

## Introdução

Alguns fatores impostos no regime de criação de frangos de corte, principalmente a seleção para rápido ganho de peso e elevada taxa de lotação, causam estresse nos animais. Estes fatores aliados a temperaturas elevadas em algumas regiões fazem com que ocorram prejuízos tanto no desempenho como na saúde dos mesmos (NAZARENO, 2009).

O bem-estar animal pode ser estimado por alguns indicadores, como a dosagem de glicocorticoides (RAULT, 2012), comportamento (PEREIRA et al., 2014), e parâmetros fisiológicos (MATOS et al., 2009). Além destes, alterações moleculares relacionadas a mudanças na cadeia respiratória mitocondrial também podem ser observadas nas aves, principalmente se o estresse for originado por conta do clima quente, sendo possível afetar a expressão de genes (YANG et al., 2010)

A perda de calor evaporativa constitui-se em um dos mais importantes meios de dissipação de calor das aves em temperaturas elevadas. No entanto, o aumento da frequência respiratória faz com que o nível de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) expirado se eleve, acarretando em perdas excessivas deste gás (TEIXEIRA & ABREU, 2011), podendo chegar a um quadro de alcalose respiratória pela diminuição de ácido carbônico ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ) no plasma sanguíneo (VIEITES et al., 2011).

A alcalose respiratória prejudica profundamente o equilíbrio ácido-básico (EAB) do animal, podendo alterar o pH dos fluidos e afetar o meio em que ocorre as reações bioquímicas do organismo (MINAFRA et al., 2009). A manutenção deste equilíbrio está relacionada com os eletrólitos da dieta, sendo os principais, o sódio ( $\text{Na}^+$ ), o potássio ( $\text{K}^+$ ) e o cloro ( $\text{Cl}^-$ ) (MINAFRA et al., 2009), que são essenciais para manter o balanço eletrolítico do organismo (BEO), que é dado pela diferença entre os cátions e ânions ingeridos e excretados (VIEITES et al., 2011).

Para evidenciar os efeitos da dieta na saúde e produção animal através da interação entre os nutrientes bioativos nos alimentos e o genoma do animal tem-se destacado a nutrigenômica, que objetiva melhorar a saúde e a produtividade pela nutrição personalizada, levando em consideração as moléculas nutricionais e o genoma (GONÇALVES et al., 2009). Assim, a suplementação de eletrólitos dietéticos pode promover alterações de genes, resultando em mudanças fisiológicas e, conseqüentemente, no desempenho de frangos de corte, uma vez que esses genes podem atuar em vias metabólicas que esses íons são ativos.

Substâncias eletrolíticas podem alterar a expressão do gene *SLC9A1* (MAGALHAES et al., 2011), que além da regulação do pH, está relacionado com manutenção das concentrações iônicas e regula positivamente o promotor da transcrição da RNA polimerase II

(ALEXANDER et al., 2011), sendo importante para as funções celulares básicas. O gene *SLC9A1* está ainda diretamente relacionado com a atividade do gene *CHPI* e a ligação do íon cálcio ( $\text{Ca}^{++}$ ) (MATSUSHITA et al., 2007).

O gene *CHPI* codifica a proteína homóloga da calcineurina B1 e regula negativamente o fator de transcrição *NF-kappaB*, importante na resposta pró-inflamatória do organismo (KANG et al., 2014). Este gene também atua na regulação do pH das células (SCHALCH et al., 2011), que é uma das atividades mais prejudicadas em situações de desequilíbrio ácido-básico (DAB) (VIEITES et al., 2011). Como o balanço eletrolítico da dieta (BED) afeta o EAB das aves, alterações no padrão de expressão do *CHPI* podem ocorrer com o uso de substâncias eletrólíticas nas rações.

O metabolismo do  $\text{Ca}^{++}$  também está relacionado ao EAB, sendo afetado diretamente pelo pH sanguíneo por contribuir no tamponamento do pH sistêmico. A maior parte do  $\text{Ca}^{++}$  do organismo está presente nos ossos e pode ser liberado na corrente sanguínea para atuar na correção do DAB por ser um íon alcalogênico (TYLAVSKY et al., 2008). Devido a este comportamento, se torna relevante a verificação do efeito do BED sobre genes relacionados ao metabolismo do  $\text{Ca}^{++}$ , como o *SLC24A3*, pela importância deste mineral na homeostase.

Normalmente se usa o bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ), carbonato de potássio ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ ) e cloreto de amônio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) na correção do BED para aves e sabe-se que eles podem afetar o EAB de frangos de corte (MINAFRA et al., 2009). Poucos estudos foram realizados no sentido de verificar o efeito do BED sobre parâmetros fisiológicos (MINAFRA et al., 2009; MATOS et al., 2009), não foram encontradas pesquisas relacionando o comportamento e expressão gênica ao uso de  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , e  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e existem divergências nos resultados de desempenho zootécnico em frangos de corte alimentados com níveis de BED (VIEITES et al., 2011).

Dessa forma, objetivou-se avaliar o efeito de níveis de BED obtidos pela inclusão de  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , e  $\text{NH}_4\text{Cl}$  sobre a expressão de genes relacionados com o EAB e transporte de nutrientes, parâmetros fisiológicos, comportamentais, e o desempenho de frangos de corte na fase de 1 a 21 dias.

## **Metodologia**

A pesquisa foi cadastrada no Comitê de Ética em Experimentação Animal e foi aprovada sob o protocolo n° 075/15 na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI). O trabalho foi realizado no setor de Avicultura do Colégio Técnico de Bom Jesus, pertencente à Universidade Federal do Piauí, no município de Bom Jesus-PI, Está localizado na latitude

09°04'28" Sul e longitude 44°21'31" Oeste, estando a uma altitude de 277 metros. O clima da região é do tipo semiárido (seco e quente) com estação chuvosa no verão (ALVARES et al., 2014).

Foram utilizados 245 pintos 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 e adotou-se 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 em torno do galpão experimental, permanecendo fechadas nas horas mais frias.

A temperatura do ar e a umidade relativa foram mensuradas com termo-higrômetro colocado dentro do galpão na altura média das aves. O Índice de Temperatura de Globo e Umidade (ITGU) foi obtido segundo Buffington et al. (1981), pelo uso da temperatura de globo negro posicionado na mesma altura do termo-higrometro. As variáveis climáticas foram medidas a cada hora do dia durante o período experimental e foram divididas em turnos para análise (de 00:00 às 06:00 horas = turno 1, de 06:00 a 12:00 horas = turno 2, 12:00 a 18:00 horas = turno 3, e de 18:00 a 00:00 horas = turno 4).

Tabela 1. Médias, coeficientes de variação (CV), valores máximos (Max), valores mínimos (Min) das variáveis climáticas nos turnos: madrugada (1), manhã (2), tarde (3) e noite (4).

Variável	Turno	Média	CV (%)	Max	Min	Amplitude
TA <sup>1</sup> (°C)	1	25,10 <sup>b</sup>	5,50	27,00	23,15	3,85
	2	22,93 <sup>b</sup>	3,40	24,35	22,05	2,30
	3	30,28 <sup>a</sup>	8,57	32,95	26,10	6,85
	4	31,19 <sup>a</sup>	8,17	33,65	27,50	6,15
UR <sup>2</sup> (%)	1	43,16 <sup>b</sup>	9,95	49,00	37,00	12,00
	2	56,25 <sup>a</sup>	7,96	62,00	50,00	12,00
	3	33,75 <sup>c</sup>	25,50	48,00	25,00	23,00
	4	27,75 <sup>c</sup>	17,23	35,00	23,00	12,00
ITGU	1	73,28 <sup>b</sup>	1,88	75,18	71,33	3,85
	2	71,11 <sup>b</sup>	1,09	72,53	70,23	2,30
	3	78,46 <sup>a</sup>	3,31	81,13	74,28	6,85
	4	79,37 <sup>a</sup>	3,21	81,83	75,68	6,15
Totais diários						
TA (°C)		27,37	14,57	33,65	22,05	11,60
UR (%)		40,23	30,46	62,00	23,00	39,00
ITGU		75,55	5,28	81,83	70,23	11,60

<sup>1</sup>Temperatura do Ar, <sup>2</sup>Umidade Relativa, <sup>3</sup>Índice de Temperatura de Globo e Umidade. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna são significativas pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

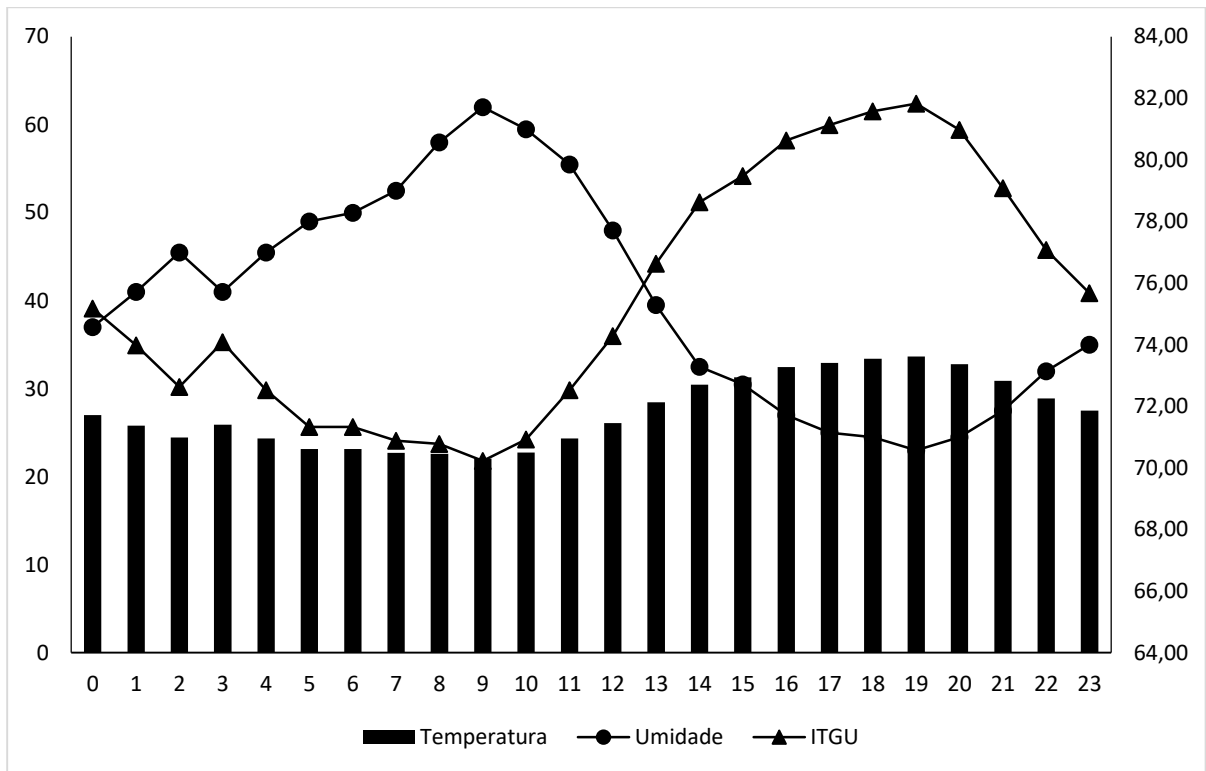


Figura 1. Distribuição da Temperatura do ar (°C), Umidade (%) e ITGU em função das horas do dia nas datas de coleta.



O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com cinco níveis de BED (110, 175, 240, 305 e 370 mEq/Kg) e 7 repetições de 7 aves cada. Com um dia de idade as aves foram pesadas e distribuídas de acordo com o peso médio em cada tratamento ( $38,51 \pm 0,36$  g).

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 e de cada tratamento, que foi calculado segundo Mongin (1981):

$$\text{BED} = (\% \text{Na}^+ \times 100/22,990^*) + (\% \text{K}^+ \times 100/ 39,102^*) - (\% \text{Cl}^- \times 100/35,453^*),$$

em que \* = equivalente grama do  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ou  $\text{Cl}^-$ , respectivamente. Para se obter o nível de BED de cada tratamento foram incluídos o bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ), carbonato de potássio ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ ) e cloreto de amônio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) em substituição do material inerte (Tabela 2).

Os níveis de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e as relações eletrolíticas nas dietas encontram-se na Tabela 3. A adição de  $\text{NaHCO}_3$  e  $\text{K}_2\text{CO}_3$  foi calculada de forma proporcional e gradativa até atingir a relação ideal de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  no último nível de BED, de acordo com Rostagno et al. (2011).

Tabela 2. 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
Composição calculada		
Energia metabolizável (Kcal/Kg)	2950	3000
Proteína bruta (%)	20,5046	18,7766
Metinionina + 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 (%)	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 dietético (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 3. Valores da inclusão de  $K_2CO_3$ ,  $NaHCO_3$  e  $NH_4Cl$  para compor o balanço eletrolítico das dietas experimentais para frangos de corte em substituição ao inerte.

1 a 7 dias						
BED <sup>1</sup> (mEq/Kg)	Dieta Basal (Kg)	Inerte	$K_2CO_3$ (Kg)	$NaHCO_3$ (Kg)	$NH_4Cl$ (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

BED: Balanço eletrolítico dietético

$K_2CO_3$  – peso molecular (UMA) = 138,20; pureza: 99,0%.

$NaHCO_3$  – peso molecular (UMA) = 84,00; pureza: 99,0%.

$NH_4Cl$  – peso molecular (UMA) = 53,45; pureza: 99,5%.

Tabela 4. 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.

## **Dados de desempenho**

Para o desempenho foram avaliados o consumo de ração diário (CRD) e ganho de peso diário (GPD). O CRD foi determinado pela diferença entre a quantidade fornecida de ração e as sobras dos comedouros, sendo os valores obtidos corrigidos pela mortalidade dos animais (SAKOMURA & ROSTAGNO, 2016). O GPD foi obtido pela pesagem dos animais em jejum de 12 horas ao final de cada fase e posteriormente foi feita a diferença com o peso inicial da fase, sendo os valores divididos pelo número de dias durante a fase.

## **Parâmetros fisiológicos**

Foram mensurados a temperatura retal (TR), frequência respiratória (FR), frequência cardíaca (FC) e temperatura superficial média (TSM) em 25 aves escolhidas aleatoriamente no 18º dia de vida, uma ave de cada repetição e 5 repetições por tratamento. A TR foi obtida pela introdução de termômetro clínico digital 2 cm no reto da ave até a estabilização da temperatura, percebida pelo disparo marcador do termômetro. A FR foi medida visualmente em movimentos respiratórios por minuto, observados na região peitoral das aves, com o auxílio de um relógio digital durante um minuto (mov/min). A FC foi aferida com o uso de um estetoscópio na região peitoral e mensurada em batimentos por minuto (bat/min). A TSM foi obtida com um termômetro infravermelho de ponto (modelo ST3-RAYTEK) na região da cabeça, dorso, asa e na canela, que posteriormente foi calculada utilizando a fórmula escrita por Malheiros et al., (2000):  $TSM = (0,03 \times T_{cabeça}) + (0,70 \times T_{dorso}) + (0,12 \times T_{asa}) + (0,70 \times T_{canela}$ ); onde T representa a temperatura mensurada em cada região descrita da ave. A ordem de mensuração dos parâmetros fisiológicos foi FR, TSM, FC e, por último, a TR, com o intuito de minimizar o estresse da coleta e, conseqüentemente, diminuir o efeito da manipulação dos animais nas respostas obtidas.

## **Dados comportamentais**

Foram escolhidas 25 aves aleatoriamente, uma ave de cada repetição e 5 repetições por tratamento, no 15º e 19º dia de vida e com o auxílio de um etograma foram tomados os comportamentos (Tabela 4), elaborado de acordo com Salgado et al. (2007), Bizeray et al. (2002) e Estevez et al. (2003). As aves foram marcadas com tinta guaxe atóxica vermelha no dorso e nas asas e tiveram o comportamento registrado em intervalos de 10 minutos durante 24 horas. Os comportamentos foram contados pela presença de determinada atividade no momento de coleta, sendo a frequência igual à soma de todas as presenças para a variável observada.

Tabela 5. Etograma desenvolvido para avaliação do comportamento das aves a partir dos estados de atividade, ócio e movimento agonístico.

	Comportamento	Descrição
Ativo (A)	Comer (C)	Ação de ingerir alimento.
	Beber (B)	Ação de ingerir de água.
	Bicar não agressivo (BI)	Ato de bicar de forma curiosa.
	Explorar Penas (EP)	Ato em que a ave arruma as penas com o bico, induzindo a liberação de óleos nas glândulas encontradas na base das penas.
	Correr (CO)	Movimentação da ave entre dois pontos em velocidade maior do que a observada normalmente.
	Andar (AN)	Ato de caminhar.
Ócio (O)	Deitar (D)	Ato de ficar sentada ou deitada sobre a cama
	Espreguiçar (E)	Ato em que a ave estica uma asa e uma perna, do mesmo hemisfério do corpo.
	Dormir (DO)	Ato em que a ave fica sentada ou deitada sobre a cama e fecha os olhos.
	Parada (P)	Quando a ave não apresenta nenhum movimento, ou aparentemente seu comportamento não se enquadra em nenhum dos anteriores.
Agonístico (AG)	Respiração Ofegante (RO)	Respiração de forma acelerada
	Dificuldade ao levantar (DL)	Ato em que a ave tenta levantar ou caminhar, mas a ação é dificultada.
	Brigar (BR)	Ação de uma ave bicar qualquer parte do corpo de outra de forma agressiva.
	Prostar (PR)	Atitude em que a ave fica deitada na cama, com o bico aberto e ofegante, as asas semiabertas.
	Asa Aberta (AA)	Movimento em que a ave abre as duas asas.

Fonte: Adaptado de Salgado et al. (2007), Bizeray et al. (2002) e Estevez et al. (2003)

## Expressão gênica

Ao final da fase de 21 dias, 4 animais de cada tratamento foram abatidos e coletaram-se amostras do fígado, intestino e rim 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 de amostras de 100 mg de cada tecido utilizando o Trizol® Reagente com o Pure Link® RNA Mini Kit (Ambion, Life Technologies, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. Foram pesados 100 mg de cada amostra e homogeneizados com 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 15 s, 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 de cada amostra para a coluna, depois as amostras 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.

Adicionou-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 5 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 6. Localização celular (LC), vias metabólicas (VM) e processos biológicos (PB) dos genes utilizados no qRT-PCR.

Gene	Ontologia dos genes		
	LC	VM	PB
<i>CHP1</i>	Membrana	Ligação de Ca <sup>+</sup>	Resposta pH celular
	Citosol	Ligação com a proteína quinase	Regulação do transporte de proteínas
	Núcleo	Atividade de Transportador	
<i>SLC9A1</i>	Membrana	Antiporte de próton/Na <sup>+</sup>	Resposta ao estiramento muscular
		Antiporte de próton/K <sup>+</sup>	Homeostase do Na <sup>+</sup>
			Homeostase do K <sup>+</sup>
<i>SLC24A3</i>	Membrana	Antiporte de Ca <sup>2+</sup> / Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup>	Homeostase do Ca <sup>2+</sup>
		Atividade nos canais de Ca <sup>2+</sup>	Resposta a alteração do pH

A análise da expressão dos genes *CHP1*, *SLC9A1* e *SLC24A3* foram realizadas utilizando-se a metodologia de qRT-PCR. 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>) podem ser visualizados na Tabela 6.

Tabela 7. 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>CPHI</i> (NM_001007930)	F: GATGGACAGTGGTGTCTTAAA R: CAAGCCTGGAAGCTACTCATAG	110	62
<i>SLC9A1</i> (NM_001044643.1)	F: CCATCATCACCGTCATCTTCTT R: CTTCGTCTCCTGCTTCTTCTTC	98	62
<i>SLC24A3</i> (XM_015283393.1)	F: GATAAACACTGCTCCCGTCTTA R: GGGCTGGCAATCAAACCTATTG	91	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

*CHPI* - proteína homóloga da calcineurina B1, *SLC9A1* – trocador de Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 1 (NHE1), *SLC24A3* – NCKX (trocador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>). <sup>1</sup>Genes de referência: HBMS – Hidroximetilbilano sintase, ACTA1 – Actina  $\alpha$  1 e HPRT1 – Hipoxantina fosforribosil transferase 1.

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 o SYBR Green® Master Mix (*Applied Biosystems*), de acordo com as instruções do fabricante. As condições de amplificações foram: 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 de cada amostra foi baixo, < 5%, indicando acurácia e reprodutibilidade aceitável.

Três controles endógenos foram testados: *HPRT1*, *ACTA1* e *HMBS*, sendo o *HPRT1* utilizado para o fígado e o intestino e o *ACTA1* para o rim, por mostrarem maior eficiência e menos variação entre os tratamentos (dados não mostrados) nos tecidos estudados de acordo com o software NormFinder (ANDERSEN et al., 2004).

### **Análise estatística**

Os dados foram submetidos ao teste de homogeneidade de variâncias (Bartlett) e normalidade de Shapiro-Wilk pelo PROC UNIVARIATE do software SAS® versão 9.0 (SAS Institute, 2003). Em seguida foi realizada a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ao nível de 5 % de significância pelo PROC GLM do SAS® para as variáveis climáticas e de desempenho.

Adotou-se o seguinte modelo estatístico para as variáveis climáticas:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

onde,  $Y_{ij}$  = observação da variável na j-ésima repetição no i-ésimo Turno de coleta;  $\mu$  = constante geral;  $T_i$  = efeito do i-ésimo Turno de coleta ( $i = 1,2,3$  ou  $4$ );  $e_{ij}$  = resíduo experimental.

Utilizou-se o seguinte modelo estatístico para os dados de desempenho:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

onde,  $Y_{ij}$  = observação da variável na  $j$ -ésima ave no  $i$ -ésimo Tratamento;  $\mu$  = constante geral;  $T_i$  = efeito do  $i$ -ésimo Tratamento ( $i = 1,2,3,4$  ou  $5$ );  $e_{ij}$  = resíduo experimental.

Os parâmetros fisiológicos e dados comportamentais foram submetidos ao teste Qui-quadrado de Friedman. As médias dos escores foram obtidas e comparadas pelos PROCs NPAR1WAY e FREQ, respectivamente, do software SAS®.

A análise estatística dos dados de Ct para cada nível de BED foi realizada usando a macro %QPCR\_MIXED ([https://www.msu.edu/~steibelj/JP\\_files/QPCR.html](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  $\Delta C_t$  entre os tratamentos foi feita usando a função CONTRAST do proc GLM (software SAS) utilizando o teste  $t$  de Student ao nível de 5% de significância.

Para os dados de expressão gênica foi utilizado o modelo:

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

onde,  $Y_{gijk}$  =  $C_t$  obtido do  $g$ -ésimo gene na  $k$ -ésima réplica da  $j$ -ésima amostra no  $i$ -ésimo BE;  $TG_{gi}$  = 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,  $e_{gijk} \sim N(0, \sigma_e^2)$ .

As diferenças na expressão gênica foram estimadas usando o método  $2^{-\Delta C_t}$  (Livak; Schmittgen, 2001). Os dados estão apresentados por média  $\pm$  erro padrão.

## Resultados

### Desempenho zootécnico

Não houve efeito significativo dos níveis de BED sobre as médias do CRD e GPD dos frangos de corte na fase de 1 a 21 dias.

Tabela 8. Efeito dos níveis de balanço eletrolítico sobre o desempenho zootécnico de frangos de corte durante a fase de 1 a 21 dias.

Característica	Balanço Eletrolítico Dietético (mEq/Kg)					Média	P-valor	CV (%)
	110	175	240	305	370			
CRD <sup>1</sup> (g/dia)	50,33 <sup>a</sup>	49,94 <sup>a</sup>	52,30 <sup>a</sup>	50,60 <sup>a</sup>	51,49 <sup>a</sup>	50,90	p>0,05	4,46
GPD <sup>2</sup> (g/dia)	36,83 <sup>a</sup>	35,35 <sup>a</sup>	35,51 <sup>a</sup>	35,51 <sup>a</sup>	36,64 <sup>a</sup>	35,98	p>0,05	4,74

<sup>1</sup>Consumo de Ração Diária. <sup>2</sup>Ganho de Peso Diário. <sup>3</sup>Efeito quadrático. <sup>4</sup>Ponto de mínimo GPD. Letras minúsculas diferentes na linha são significativas ao nível de 5 % pelo teste de Tukey.

### **Parâmetros fisiológicos**

Não houve efeito significativo ( $p>0,05$ ) dos níveis de BED sobre a TR e TSM dos frangos de corte aos na fase de 1 a 21 dias. A FR foi menor no nível de 370 mEq/Kg (78,00 mov/min). O nível de 175 mEq/Kg apresentou a maior média para a FC (138,92 bat/min) (Tabela 9).



Tabela 9. Efeito dos níveis de balanço eletrolítico dietético (BED) sobre parâmetros fisiológicos de frangos de corte na fase de 1 a 21 dias sob estresse térmico cíclico natural.

BED (mEq/Kg)	Parâmetros			
	TR (°C)	FR (mov/min)	FC (bat/min)	TSM (°C)
110	41,97 <sup>a</sup>	82,71 <sup>a</sup>	132,85 <sup>b</sup>	35,42 <sup>a</sup>
175	41,90 <sup>a</sup>	82,00 <sup>a</sup>	138,92 <sup>a</sup>	35,39 <sup>a</sup>
240	41,66 <sup>a</sup>	80,28 <sup>b</sup>	130,28 <sup>b</sup>	35,27 <sup>a</sup>
305	42,00 <sup>a</sup>	81,71 <sup>a</sup>	131,28 <sup>b</sup>	35,68 <sup>a</sup>
370	41,28 <sup>a</sup>	78,00 <sup>c</sup>	132,42 <sup>b</sup>	35,15 <sup>a</sup>
Max	42,00	148,00	192,00	37,00
Min	40,80	48,00	96,00	31,73
CV (%)	0,87	29,15	15,66	3,30

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna são significativas ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste Qui-quadrado de Friedman. TR = Temperatura Retal; FR = Frequência Respiratória, em movimentos por minuto (mov/min); FC = Frequência Cardíaca, em batimentos por minuto (bat/min); e TSM = Temperatura Superficial Média.

## **Comportamento**

Houve efeito significativo ( $p < 0,05$ ) do BED nos parâmetros comportamentais apenas para os comportamentos “Ativo (A)”, “Comer (C)”, e “Respiração Ofegante (RO)” (Tabela 10). Para o comportamento “A”, o nível que proporcionou a maior frequência foi o de 175 mEq/Kq de ração (535), sendo que os níveis de 110 e 370 mEq/Kq apresentaram menores valores (418 e 472, respectivamente) (Tabela 10).

No que diz respeito ao comportamento “C”, o nível de 175 mEq/Kq apresentou a maior quantidade de visitas ao comedouro (339), sendo a menor frequência observada no nível de 110 mEq/Kq (239). A “RO” foi maior no nível de 110 mEq/Kq (51) e menor no nível de 175 mEq/Kg (29) (Tabela 10).

Tabela 10. Médias dos escores e frequências comportamentais em função de níveis de balanço eletrolítico dietético (BED) de frangos de corte na fase de 1 a 21 dias sob estresse térmico cíclico natural.

Comportamento	Níveis de BED (mEq/Kg)				
	110	175	240	305	370
Ativo (A)	3465,38 <sup>c</sup> (412)	3638,25 <sup>a</sup> (531)	3525,55 <sup>b</sup> (486)	3523,10 <sup>b</sup> (482)	3483,90 <sup>c</sup> (472)
Ócio (O)	3559,88 (812)	3446,10 (850)	3552,05 (883)	3549,00 (884)	3568,60 (898)
Agonístico (AG)	3560,22 (84)	3503,60 (59)	3535,45 (71)	3513,40 (74)	3533,00 (71)
Comer (C)	3412,11 <sup>c</sup> (239)	3592,05 <sup>a</sup> (339)	3562,65 <sup>b</sup> (327)	3547,95 <sup>b</sup> (321)	3516,10 <sup>b</sup> (308)
Beber (B)	3554,50 (63)	3530,00 (60)	3512,85 (53)	3522,65 (57)	3525,10 (58)
Bicar (BI)	3534,00 (27)	3551,15 (37)	3524,20 (26)	3511,95 (21)	3521,75 (25)
Explorar Penas (EP)	3552,38 (40)	3527,80 (34)	3532,70 (36)	3508,20 (26)	3522,90 (32)
Correr (COR)	3527,88 (4)	3536,60 (8)	3531,70 (6)	3519,45 (1)	3526,80 (4)
Andar (AN)	3518,13 (39)	3541,99 (53)	3505,07 (38)	3549,16 (56)	3522,21 (45)
Deitar (D)	3582,88 (346)	3525,45 (361)	3449,50 (330)	3520,55 (359)	3569,55 (379)
Espreguiçar (E)	3516,27 (8)	3538,60 (18)	3531,25 (15)	3523,90 (12)	3531,25 (15)
Dormir (DO)	3572,55 (385)	3453,05 (379)	3607,40 (442)	3587,35 (393)	3526,55 (409)
Parada (P)	3489,22 (73)	3515,90 (92)	3525,70 (96)	3584,50 (120)	3523,25 (95)
Respiração Ofegante (RO)	3563,33 <sup>a</sup> (51)	3495,55 <sup>c</sup> (29)	3527,40 <sup>b</sup> (42)	3537,20 <sup>b</sup> (46)	3522,50 <sup>b</sup> (40)

Dificuldade de	3532,94	3527,50	3527,50	3527,50	3527,50
Levantar (DL)	(2)	(0)	(0)	(0)	(0)
Brigar (BRI)	3528,44	3527,90	3525,45	3530,35	3530,35
	(2)	(2)	(1)	(3)	(3)
Prostar (PRO)	3533,55	3524,30	3529,20	3526,75	3529,20
	(25)	(24)	(26)	(25)	(26)
Asas Abertas (AA)	3533,38	3532,30	3527,40	3522,50	3527,40
	(4)	(4)	(2)	(0)	(2)

---

Médias dos escores seguidas de letras minúsculas diferentes na linha são significativas ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste Qui-quadrado de Friedman.

### **Expressão gênica**

Houve efeito significativo ( $p < 0,05$ ) dos níveis de BED para os genes *CHP1* e *SLC9A1* no fígado (Figura 2) e *SLC524A3* no intestino e rim (Figura 3). O gene *CHP1* foi menos expresso no nível de 240 mEq/Kg no fígado em relação a todos os demais tratamentos (Figura 2). Para o gene *SLC9A1* houve maior expressão do nível de 370 mEq/Kg quando comparado aos níveis de 175 e 240 mEq/Kg no fígado (Figura 2). O gene *SLC24A13* foi mais expresso no nível de 370 mEq/Kg no intestino e no nível de 110 mEq/Kg no rim (Figura 3).

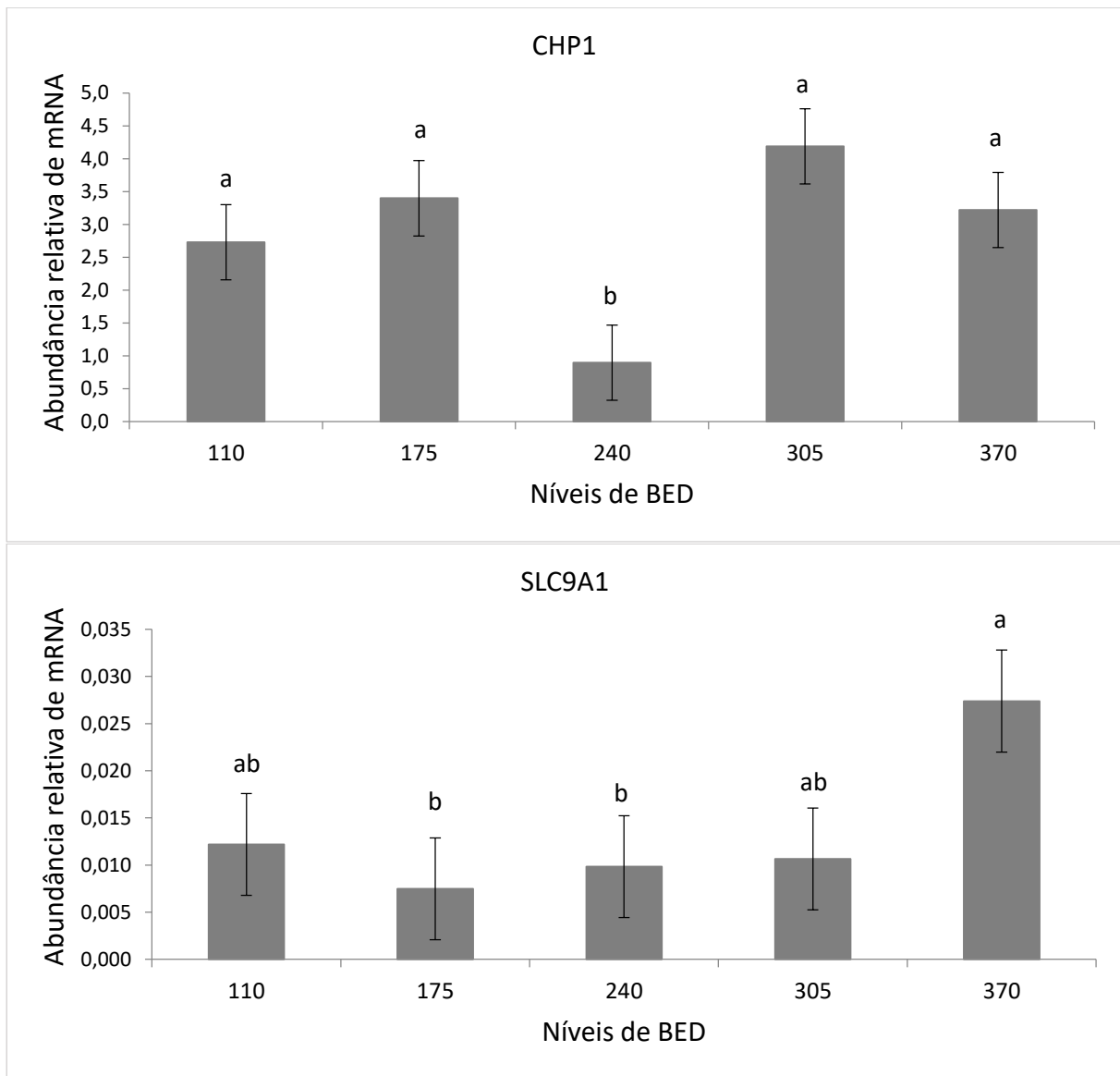


Figura 2. Abundância relativa de mRNA ( $2^{-\Delta Ct}$ ) dos genes *CHP1* e *SLC9A1* no fígado de frangos de corte aos 21 dias alimentados com níveis de balanço eletrolítico dietético (BED).

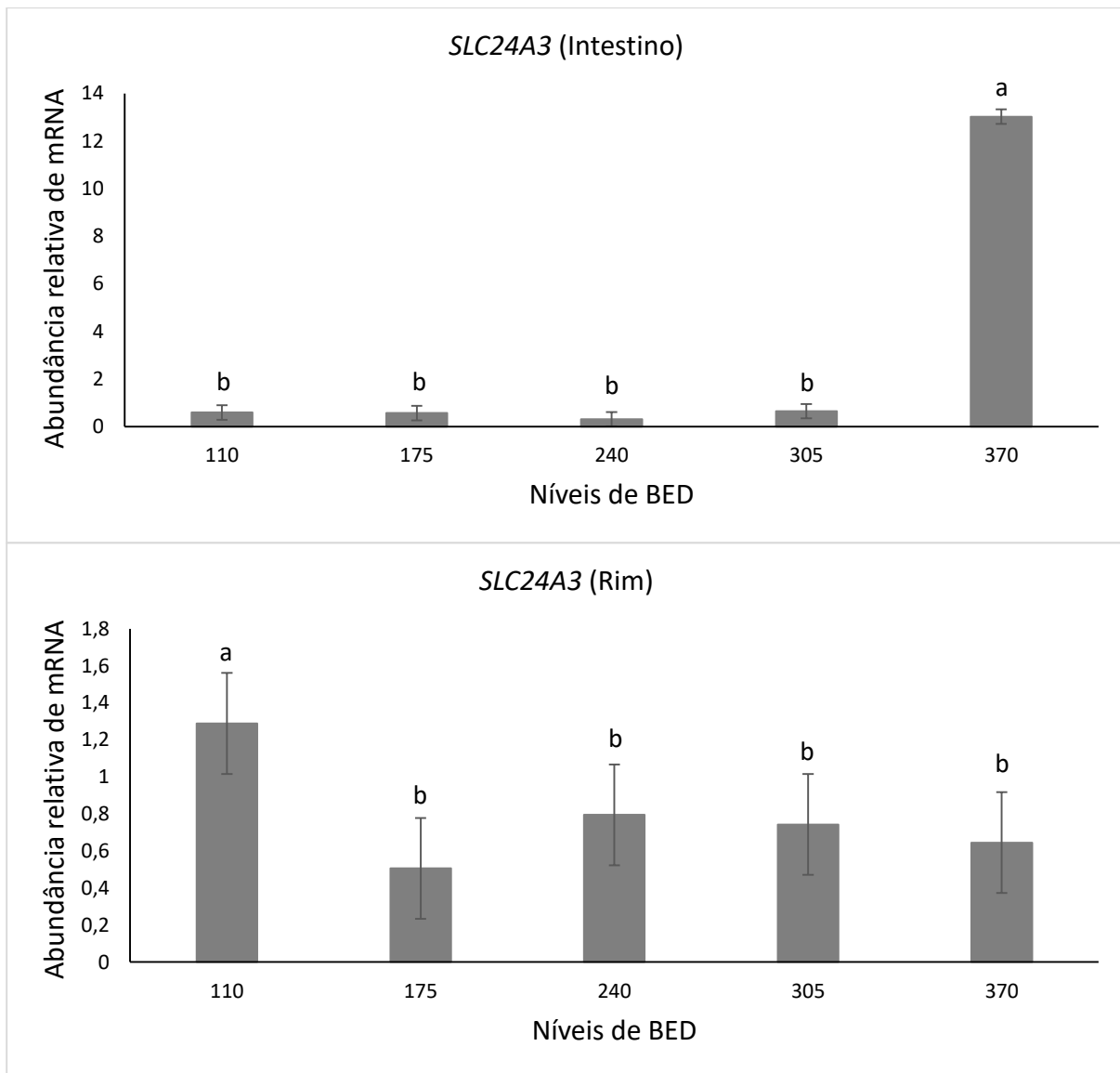


Figura 3. Abundância relativa de mRNA ( $2^{-\Delta C_t}$ ) do gene *SLC24A3* no intestino e rim de frangos de corte aos 21 dias alimentados com níveis de balanço eletrolítico dietético (BED).

## Discussão

O ambiente térmico durante o período experimental foi considerado estressante para aves na terceira semana de idade. Abreu e Abreu (2011) afirmaram que a faixa de TA e UA para o conforto térmico para aves na terceira semana são 29 a 32°C e 60 a 70 %, respectivamente, e os valores observados nos turnos 3 e 4 para TA encontram-se próximo a este limite superior e nos demais turnos bem abaixo do limite superior, enquanto a UA em nenhum dos turnos esteve no intervalo de conforto (Tabela 1).

Os valores de ITGU obtidos encontraram-se fora do limite da zona de conforto para aves na terceira semana de idade nos turnos 3 e 4 (Tabela 1), pois situa-se entre 65 e 74,9±1,65 (VITORASSO & PEREIRA, 2009; SAMPAIO et al., 2011), demonstrando que durante à tarde e noite as aves estavam submetidas a um ambiente potencialmente estressante pelo calor. O ITGU é um índice que leva em consideração a temperatura de bulbo seco, umidade relativa do ar, velocidade do ar e a radiação na forma de temperatura de globo negro em um único valor, sendo imprescindível na caracterização do ambiente de produção (BUFFINGTON et al., 2011).

Houve grande variação no ambiente climático diariamente (Figura 1) caracterizando o estresse cíclico; e nesses casos os animais podem sofrer por ajustar os mecanismos fisiológicos para acompanhar essa variação e tentar manter-se na zona de conforto térmico, sendo os principais ajustes a elevação da FR para perda de calor latente e aumento do fluxo sanguíneo para a pele, permitindo que a superfície do animal possa trocar o calor interno de forma mais eficiente com o ambiente (ABREU & ABREU). A FR foi menor no nível de 370 mEq/Kg (78,00 mov/min) e o nível de 175 mEq/Kg apresentou a maior média para a FC (138,92 bat/min) (Tabela 9). A ofegação é a principal via para perda de calor das aves em condições de estresse térmico por calor, considerando que as trocas de calor sensível são desprezíveis em ambientes quentes (ABREU & ABREU, 2011). As maiores médias obtidas para FR nos níveis de 110, 175, 240 e 305, mEq/Kg, em relação ao nível de 370 mEq/Kg, indica maior estresse térmico por calor das aves neste tratamento, visto que a elevação deste parâmetro fisiológico está relacionado a esta condição.

A alcalose respiratória, resultante da elevação da FR, pode levar a uma perda excessiva de  $K^+$  por conta da diminuição da competição  $H^+/K^+$  nos ductos coletores do rim, aumentando a excreção  $K^+$  e resultando em prejuízos metabólicos para as aves (Vieites et al., 2011). No nível de 370 mEq/Kg houve maior inclusão de  $K_2CO_3$  (Tabela 3), que pode ter corrigido estas perdas de  $K^+$ , por ser fonte deste eletrólito, e, conseqüentemente, minimizado



o estresse térmico por calor nas aves durante esta parte do estresse térmico cíclico natural, visto que houve maior FR em todos os outros tratamentos.

No nível de 370 mEq/Kg houve também maior inclusão de NaHCO<sub>3</sub> (Tabela 3), que é uma fonte de Na<sup>+</sup> efetiva na correção do desequilíbrio eletrolítico, que é importante na manutenção da pressão osmótica, equilíbrio ácido básico e absorção e transporte de nutrientes (Matos et al., 2009). Ele é perdido em excesso quando as aves estão estressadas por calor (Minafra et al., 2009), podendo ter sido determinante na FR diminuída neste nível (78,00 mov/min) por corrigir o potencial desequilíbrio ácido-básico (DAB) proporcionado pela variação nas variáveis climáticas durante o experimento.

Parâmetros fisiológicos como a elevação da FC podem indicar bem-estar precário para os animais (BROOM, 1991). No nível de 175 mEq/Kg houve menor inclusão de sais inorgânicos para correção do BED (Tabela 3), sendo o provável motivo de ocorrer maior média da FC nas aves submetidas a esse tratamento. Isto assegura a necessidade de suplementar as aves com compostos capazes de corrigir o BED e proporcionar íons específicos para atuar nas funções orgânicas do organismo em ambientes estressantes. Em geral, todos os mecanismos de troca de calor são utilizados com um gasto a mais de energia que poderia ser utilizada para produção. Nos casos de estresse térmico, à medida que o ambiente se afasta da zona termoneutralidade, esse gasto pode ser potencialmente maior e, dependendo do tempo de duração ou da intensidade, pode ser fatal.

A maior atividade as aves, denotada pelo comportamento “A”, observada no nível de 175 mEq/Kg de BE (Tabela 10) não ficou fora do intervalo considerado normal, visto que, aves independentemente da idade, passam de 60 a 80 % do tempo em descanso (BIZERAY et al., 2002), e neste tratamento as aves apresentaram 40 % do tempo em atividade. Neste tratamento houve menor inclusão de sais para corrigir o BED, sugerindo que a maior quantidade de compostos para correção do BED altera este comportamento da ave.

De acordo com Bizeray et al. (2002) a maior atividade é desejável em frangos de corte, principalmente o ato de andar, por auxiliar no desenvolvimento dos membros posteriores, culminado em menores incidência de problemas de perna e possibilidade de alimentar e dessorar. A menor atividade observada neste trabalho nos níveis de 110 e 370 mEq/Kg foi compatível com valores normais pra frangos de corte, considerando os valores descritos por Bizeray et al. (2002), não denotando prejuízos nesta característica.

As aves submetidas ao nível de 110 mEq/Kg de BED apresentaram menor quantidade de visitas ao comedouro (CO = 239) provavelmente pela menor atividade das aves neste tratamento (32 % de atividade). Normalmente as aves são pouco ativas e à medida que

aumenta a idade e ganho de peso o tempo de atividade se torna menor ainda (BUIJS et al., 2009). Como não houve diferença no CRD, não houve prejuízos deste nível de BED sobre o desempenho zootécnico.

No nível de 175 mEq/Kg as aves apresentaram a menor frequência de “RO” devido menores concentrações de  $K_2CO_3$  e  $NaHCO_3$  em relação aos demais tratamentos, exceto no nível de 110 mEq/Kg, que houve inclusão apenas de  $NH_4Cl$ . O  $K_2CO_3$  e  $NaHCO_3$  são compostos alcalinos utilizados na correção do BED e são capazes de aumentar o pH sanguíneo (MINAFRA et al., 2009). Como a taxa respiratória elevada provoca a alcalose respiratória, essa condição pode aumentar o pH sanguíneo e causar alterações no equilíbrio ácido-básico e, conseqüente, alterar as funções fisiológicas normais (BROSSI et al., 2009), tais como respiração ofegante.

Para manter a homeostase, o corpo do animal utiliza vários mecanismos com o intuito de retornar ao estado de equilíbrio (YAHAV et al., 2011). Alguns comportamentos são comumente visualizados em aves quando estão sob condições de temperaturas elevadas, como aumento na superfície corporal, mantendo as asas abertas afastadas do corpo, eriçar as penas (RESTELATTO et al., 2008) e prostrar (CARVALHO et al., 2013). Assim, a complexidade das vias metabólicas que regem os mecanismos fisiológicos pode traduzir, às vezes, respostas contrastantes, mas adequadas a cada situação específica.

São necessários estudos constantes de parâmetros fisiológicos e comportamentais, bem como das variáveis climáticas sob diversas condições de estresse, com o intuito de acompanhar as demandas da avicultura. Esse conjunto de dados pode ajudar na descrição das mudanças que as aves vem sofrendo ao longo do tempo e auxiliar na solução de problemas do setor avícola.

A amplitude térmica pode influenciar negativamente devido à necessidade das aves se ajustarem aos extremos, e a medida que esse quadro persiste a ave pode chegar a um esgotamento fisiológico. Variações climáticas ao longo do tempo prejudicam o bem-estar e o desempenho. Dessa forma, medidas que minimizam os efeitos do clima sobre as aves, de origem nutricional ou nas instalações, são necessárias para melhor produção e produtividade.

Um dos principais efeitos do estresse térmico nas aves é a perda renal de  $K^+$ . Nos frangos estressados por calor ocorre a diminuição da competição  $H^+/K^+$  nos ductos coletores do rim, fazendo com que o metabolismo do  $K^+$  seja afetado durante o estresse (VIEITES et al., 2011). O  $K^+$  está envolvido em vários processos metabólico, como o antagonismo arginina-lisina, a condução nervosa, a contração muscular, a síntese de proteínas teciduais, a

manutenção da homeostasia intracelular, as reações enzimáticas, o balanço osmótico e o equilíbrio ácido-base (BORGES et al., 2007).

O  $\text{Na}^+$  é o principal íon dos fluidos extracelulares, ativo no processo de repolarização das membranas e efetivo na absorção e transporte de nutrientes (MATOS et al., 2009). Como no nível mais elevado (370 mEq/Kg) de BED houve maior concentração de  $\text{K}^+$  e  $\text{Na}^+$  e a relação  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ideal, este nível de BED proporcionou respostas moleculares adequadas, bem como melhores respostas fisiológicas e comportamentais.

A menor expressão do gene *CHPI* no nível de 240 mEq/Kg pode demonstrar que neste nível as funções relacionadas a proteína homóloga da calcineurina B1 podem ter sido prejudicadas, no entanto, não houve alterações no desempenho zootécnico (Tabela 8). Neste nível de BED as aves apresentaram respostas intermediárias para os parâmetros fisiológicos e comportamentais (Tabelas 9 e 10, respectivamente), sugerindo que a relação entre o nível de BED com a função do *CHPI* pode traduzir efeito nestas variáveis em condições de estresse térmico cíclico.

A deficiência na atividade do gene *CHPI* em culturas de células transgênicas de frangos, dificulta a atividade na ligação de  $\text{Ca}^+$ , alteração nas trocas de  $\text{Na}^+$  por  $\text{H}^+$ , alteração do pH, diminuição na resposta ao pH ácido (MATSUSHITA et al., 2007) e regulação negativa do fator de transcrição *NF-kappaB*, importante na resposta inflamatória e sistema imune (KANG et al., 2014). Assim, a complexidade das interações entre os fatores que regem o EAB pode ter sido determinante nos resultados observados. É de grande relevância mais estudos do *CHPI* relacionado a níveis de BED pelo fato de serem possíveis alterações fisiológicas e comportamentais e são escassas pesquisas neste sentido, com o intuito de elucidar a ligação deste gene com o EAB em frangos de corte.

A menor expressão dos gene *SLC9A1* nos níveis de 175 e 240 mEq/Kg em relação aos nível de 370 mEq/Kg pode estar relacionada a atividade  $\text{Na}^+$ /dependente deste gene. Uma das funções da NHE1, proteína codificada pelo gene *SLC9A1*, é realizar a troca de  $\text{Na}^+$  por  $\text{H}^+$ , sendo esta troca feita por transporte do tipo antiporte (ALEXANDER et al., 2011), que acontece de maneira dependente da concentração dos substratos necessários (HOLM et al., 2017), sendo possível que a maior quantidade de  $\text{Na}^+$  no nível de 370 mEq/Kg possa ter influenciado a expressão deste gene.

O nível de 370 mEq/Kg apresentou a menor FR e FC e respostas intermediárias nos parâmetros comportamentais, sendo estes resultados relacionados as funções do *SLC9A1*. Entre essas funções podem ser citadas a manutenção do pH intracelular e osmolaridade das

células, importantes na diferenciação e proliferação e regulação do volume celular (MATSUSHITA et al., 2007).

A regulação positiva de um promotor de transcrição da RNA polimerase II também está relacionada ao *SLC9A1* (BAUMGARTNER et al., 2004), que é responsável por codificar os genes ativos nos vários processos biológicos do organismo (PARAJAPE et al., 1994). Dessa forma, alterações na expressão do *SLC9A1* pode ter sido determinante na atividade celular, conseqüentemente, no metabolismo, fisiologia e comportamento dos frangos alimentados com níveis diferentes de BED.

O gene *SLC24A3* no intestino foi mais expresso no nível de 370 mEq/Kg, em relação aos demais tratamentos, e a provável explicação pode ser a maior quantidade de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  presente nesse tratamento. O nível de 370 mEq/Kg contemplou as maiores quantidades de  $\text{NaHCO}_3$  e  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , apresentando maiores concentrações de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  dietéticos e provavelmente aumentando a necessidade de transporte desses íons.

O tipo de transporte da NCKX3, proteína codificada pelo gene *SLC24A3*, é o antiporte e tem efeito sobre a absorção, transporte e o metabolismo do  $\text{Ca}^{2+}$ , sendo esta atividade realizada pela troca  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  de forma dependente do  $\text{K}^+$  (VISSER et al., 2007). O  $\text{Ca}^{2+}$  também auxilia na manutenção do EAB, pois pode ser mobilizado do tecido ósseo em resposta a alterações no pH sanguíneo (TYLAVSKY et al., 2008). Os resultados sugerem que o  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  podem regular positivamente o *SLC24A3* no intestino e, portanto, ter efeito sobre o absorção do  $\text{Ca}^{2+}$ , sendo as alterações benéficas observadas nos parâmetros fisiológicos e comportamentais das aves que se alimentaram com o nível de 370 mEq/Kg relacionadas ao efeito deste gene sobre o EAB por atuar na homeostase de íons importantes na manutenção deste equilíbrio.

A maior expressão do gene *SLC24A3* no rim dos frangos alimentados com 110 mEq/Kg de BED é coerente com a inclusão de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  neste tratamento, visto que o  $\text{NH}_4\text{Cl}$  é um composto ácido efetivo na diminuição do BED (MINAFRA et al., 2009) e possui 65 % de  $\text{Cl}^-$ . O  $\text{Cl}^-$  é um íon acidogênico e quando sua concentração se encontra elevada no plasma sanguíneo pode indicar acidose metabólica (ATHERTON, 2009). Como o metabolismo do  $\text{Ca}^{2+}$  é sensível a condições de acidez sanguínea e a dieta com 110 mEq/Kg pode ter proporcionado essas condições e alterado a expressão do *SLC24A3*.

A composição química dos líquidos corporais é mantida pelo rim, configurando uma importante função fisiológica deste órgão na manutenção do EAB (MINAFRA et al., 2009). Assim, a maior expressão do gene *SLC24A3* neste órgão nas aves submetidas ao nível de 110 mEq/Kg foi um ajuste a maior quantidade de um íon acidogênico ( $\text{Cl}^-$ ), no sentido de manter a

quantidade  $\text{Ca}^{2+}$  presente no fluido corporal pela sua propriedade de íon alcalogênico efetivo na manutenção do EAB. Esta resposta é favorável pela importância de manter o EAB e poder ter sido determinante na menor FC (Tabela 9) e respostas não prejudiciais ao comportamento (Tabela 10) e desempenho zootécnico (Tabela 8).

## **Conclusão**

O balanço eletrolítico dietético não influenciou o desempenho, mas afetou a expressão de genes relacionados ao equilíbrio ácido-básico, parâmetros fisiológicos e comportamentais, de frangos de corte na fase inicial sob estresse térmico cíclico natural. O nível de 370 mEq/Kg é recomendado por proporcionar efeito favorável na expressão gênica, parâmetros fisiológicos e comportamentais em frangos de corte aos 21 dias.

## **Referências Bibliográficas**

Abreu, V. M. N., & Abreu, P. G. (2011). Os desafios da ambiência sobre os sistemas de aves no Brasil. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 40:1-14.

Alexander, R. T., Jaumouille, V., Yeung, T., Furuya, W., Peltekova, I., Boucher, A., Zasloff, M., Orłowski, J., & Grinstein, S. (2011). Membrane surface charge dictates the structure and function of the epithelial  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger. *Embo Journal*, 30:679–691.

Alvares C. A, Stape, J. L., Sentelhas, P. C., Gonçalves, J. L. M., & Sparovek, G. (2014). Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift*, 22:711–728

Andersen, C. L., Jensen, J. L., & Orntoft, T. F. (2004). 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. *Cancer Research*, 64:5245-5250.

Atherton, J.C. (2009). Role of the kidney in acid–base balance. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 10:276-278.

Baumgartner, M., Patel, H., & Barber, D. L. (2004).  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger NHE1 as plasma membrane scaffold in the assembly of signaling complexes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 287:844–850.

- Bizeray, D., Estevez, I., Leterrier, C., & Faure, F. M. (2002). Effects of increasing environmental complexity on the physical activity of broiler chickens. *Applied Animal Behaviour Science*, 79:27-41.
- Borges, S. A., Silva, A. Y. F., & Maiorka, A. (2007). Acid-base balance in broilers. *World's Poultry Science Journal*, 63:73-81,
- Broom, D. M. (1991). Animal Welfare: Concepts and measurement. *Journal of Animal Science*, 69:4167-4175,
- Brossi, C., Contreras-Castilho, C. J., Amazonas, e. A., & Menten, J. F. M. (2009). Estresse térmico durante o pré-abate em frangos de corte. *Ciência Rural*, 39:1296-1305.
- Broucek, J., Kisac, P., & Uhrincat, M. (2009). Effect of hot temperatures on the hematological parameters, health and performance of calves. *International Journal of Biometeorology*, 53:201-208.
- Buffington, D. E., Collazoarcho, A., Canton, G. H., & Pitt, D. (1981). Black globe-humidity index (BGHI) as comfort equation for dairy cows. *Transation of the ASAE*, 24:711-714.
- Buijs, S., Keeling, L., Rettenbacher, S., Van Pouche, E., & Tuyttens, F. A. M. (2009). Stocking density effects on broiler welfare. Identifying sensitive ranges for different indicator. *Poultry Science*, 88:1536 – 1543.
- Carvalho, G. B., Lopes, J. B., Santos, N. P. S., Reis, N. B. N., Carvalho, W. F., Silva, S. F., Carvalho, D. A., Silva, E. M., & Silva, S. M. (2013). Comportamento de frangos de corte criados em condições de estresse térmico alimentados com dietas contendo diferentes níveis de selênio. *Revista Brasileira Saúde Produção Animal*, 14:785-797.
- Estevez, I., Keeling, L. J., & Newberry, R. C. (2003). Decreasing aggression with increasing group size in young domestic fowl. *Applied Animal Behaviour Science*, 84:213-218.

Gonslaves, F. M., Corrêa, M. N., Anciuti, M. A., Gentilini, F. P., Zanusso, J. T., Rutz, F. (2009). Nutrigenômica: situação e perspectivas na alimentação animal. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 104:5-11.

Holm, R. J., Khandelwal., Einholm, A. P., Andersen, J. P., Artigas, P., & Vilsen, B. (2017). Arginine substitution of a cysteine in transmembrane helix M8 converts Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase to an electroneutral pump similar to H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 114:316-321.

Kang, Y. H., Han, S. R., Kim, J. T., Lee, S. J., Yeom, Y. I., Min, J. K., Lee, C. H. Kim, J. W., Yoon, S. R., Yoon, D. Y., Hong, K. S., Hwang, G. D., Kim, H. C., Lee, Y. H., & Lee, H. G. (2014). The EF-hand calcium-binding protein tescalcin is a potential oncotarget in colorectal cancer. *Impact Journals*, 5:2149-2160.

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods*, 25:402-408.

Magalhaes, M. A. O., Larson, D. R., Mader, C. C., Bravo-Cordero, J. J., Gil-Henn, H., Oser, M., Chen, X., Koleske, A. J.; Coodelis, J. Cortactin phosphorylation regulates cell invasion through a pH-dependent pathway. **The Journal of Cell Biology**, 195:903-920, 2011.

Matos, M. B., Ferreira, R. A., Savaris, V. D. L., Couto, H. P., Soares, R. T. R. N., & Oliveira, N. T. E. (2009). Balanço eletrolítico e redução da proteína bruta da ração sobre parâmetros fisiológicos e sanguíneos de frangos de corte no calor. *Acta Scientiarum Animal Sciences*, 31:243-249.

Matsushita, M., Sano, Y., Yokoyama, S., Takai, T., Inoue, H., Mitsui, K., Todo, K., Ohmori, H., & Kanazawa, H. (2007). Loss of calcineurin homologous protein-1 in chicken B lymphoma DT40 cells destabilizes Na/H exchanger isoform-1 protein, *American Journal of Physiology*, 293:246-254.

Minafra, C. S., Moraes, H. K., Lopes, A. C. C., Lopes Júnior, C. O., Vieites, F. M., Resende, C. S. M., & Viu Mao. (2009). O Balanço eletrolítico e protéico dietéticos sobre as

aminotransferases hepáticas, renais e séricas e teores séricos de magnésio e cloro de frangos de corte. *Ciência Animal Brasileira*, 10:425-437.

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

Nascimento, G. R., Pereira, D. F. Nääs, I. A., & Rodrigues, L.A. (2011). Índice fuzzy de conforto térmico para frangos de corte. *Revista de Engenharia Agrícola*, 31:219-229,

Nazareno, A. C., Pandorfi, H., Almeida, G. L. P., Giongo, P. R., Pedrosa, E. M. R. & Guiselini, C. (2009). Avaliação do conforto térmico e desempenho de frangos de corte sob regime de criação diferenciado. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental*, 13:802-808.

Rault, J. L. (2012). Friends with benefits: Social support and its relevance for farm animal welfare. *Applied Animal Behaviour Science*, 136:1-14.

Parajape, S. M., Kamakaka, R. T. E., & Kadonaga, J. T. (1994). Role of chromatin structure in the regulation of transcription by RNA polymerase II. *Annual Review of Biochemistry*, 63:265-297.

Pereira, E. M., Nääs, I. A., & Garcia, R. G. (2014). Identification of acoustic parameters for broiler welfare estimate. *Engenharia Agrícola*, 34:413-421.

Restelatto, R., Mendes, A. S., Possent, M. A., & Paixão, S. J. (2008). Aplicação dos conceitos de calorimetria na produção de frangos de corte. *Brazilian Journal of Biosystems Engineering*, 2:99-108.

Rostagno, H. S., Albino, L. F. T., Donzele, J. L., Gomes, P. C., Oliveira, R. F., Lopes, D. C., Ferreira, A. S., Barreto, S. L. T., & Euclides, R. F. (2011). *Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais* (3ª ed.). Universidade Federal de Viçosa.



Salgado, D. D., Nääs, I. A., Pereira, D. F. E., & Moura, D. J. (2007). Modelos estatísticos indicadores de comportamentos associados a bem-estar térmico para matrizes pesadas. *Engenharia Agrícola*, 27:619 – 629.

Schalch, T., Job, G., Shanker, S., Partridge, J. F., & Joshua-Tor, L. (2011). The Chp1-Tas3 core is a multifunctional platform critical for gene silencing by RITS. *Nature Structural & Molecular Biology*, 18:1351–1357.

Sakomura, N. K., & Rostagno, H. S. (2016). *Métodos de pesquisa em nutrição de monogátricos* (2ª ed.) Jaboticabal, SP: FUNEP.

Sampaio, C. A. P., Cardoso, C. O., & Souza, G.P. (2011). Superficial temperatures of tiles and the relation with thermal environment. *Engenharia Agrícola*, 31:230-236.

Steibel, J. P., Poletto, R., Coussens, P. M., & Rosa, G. J. (2009). A powerful and flexible linear mixed model framework for the analysis of relative quantification RT-PCR data. *Genomics*, 94:146-152.

Teixeira, M. P. F. & Abreu, M. L. T. (2011). Vitamina C em rações de frango de corte. *Revista Eletrônica Nutritime*, 8:489-1498.

Tylavsky, F. A., Spence, L. A., & Harkness, L. (2008). The Importance of Calcium, Potassium, and Acid-Base Homeostasis in Bone Health and Osteoporosis Prevention. *The Journal of Nutrition*, 138:164-165.

Vieites, F. M., Fraga, A. L., Souza, C. S., Araújo, G. M., Vargas Júnior, J. G., Nunes, R. V., & Corrêa, G. S. S. (2011). Desempenho de frangos de corte alimentados com altos valores de balanço eletrolítico em região de clima quente. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 63:441-447.

Visser, F., Valsecchi, V., Annunziato, L., & Lytton, J. (2007). Analysis of ion interactions with the K<sup>+</sup>-dependent Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> Exchangers NCKX2, NCKX3, and NCKX4: identification of Thr-551 as a key residue in defining the apparent K<sup>+</sup> affinity of NCKX2. *Journal of Biology and Chemistry*, 282:4453–4462.

Vitorasso, G., & Pereira, D. F. (2009) Análise comparativa do ambiente de aviários de postura com diferentes sistemas de condicionamento. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 13:788-794.

Yahav, S., Druyan, S., Rusal, M., & Shinder, D. (2011). Diurnally cycling temperature and ventilation affect young turkeys performance and sensible heat loss. *Journal of Thermal Biology*. 36:334-339.

Yang, L., Tan, G. Y., Fu, Y. Q., Feng, J. H., & Zhang, M. H. (2010). 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*, 151:204-208.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15

A relevância da correta manipulação dos eletrólitos dietéticos para as aves pode ser confirmada pelas alterações observadas no comportamento, fisiologia, desempenho e, principalmente, na expressão gênica. Essas mudanças ocorridas em função dos níveis de eletrólitos necessitam ser melhor estudadas em condições de campo e em interação com outros fatores. Poucos trabalhos relacionados à expressão gênica de frangos de corte alimentados com diferentes níveis de BED foram encontrados, sendo necessários maiores estudos para apurar o conhecimento sobre os genes estudados nesta pesquisa e outros genes não contemplados, visto que, ocorrem mudanças no padrão de expressão gênica e possível associação com alterações de desempenho. Também foram encontrados poucos trabalhos relacionando o BED com parâmetros fisiológicos, e nenhum com comportamento, tornando promissoras pesquisas direcionadas a estes parâmetros para entender como os frangos de corte podem responder a manipulação de eletrólitos dietéticos e, conseqüente, melhorar a produtividade do setor avícola.