



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

**EXPRESSÃO GÊNICA EM FRANGOS DE CORTE**  
**SUBMETIDOS A DIFERENTES NÍVEIS DE ALIMENTOS**  
**ALTERNATIVOS**

**RENAN DOS SANTOS ARAÚJO**

**BOM JESUS – PI**

**2015**

**RENAN DOS SANTOS ARAÚJO**

**EXPRESSÃO GÊNICA EM FRANGOS DE CORTE  
SUBMETIDOS A DIFERENTES NÍVEIS DE ALIMENTOS  
ALTERNATIVOS**

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Katiene Régia Silva Sousa

**Co-orientador:** Prof. Dr. Fábio Barros Britto

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

BOM JESUS – PI

2015

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

A663e Araújo, Renan dos Santos.  
Expressão gênica em frangos de corte submetidos a diferentes níveis de alimentos alternativos. / Renan dos Santos Araújo. – 2015.  
79 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, 2015.

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

1. Frangos. 2. Frangos de corte. 3. Alimentos alternativos – inclusão 4. Expressão gênica . I. Título.

CDD 636.513

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

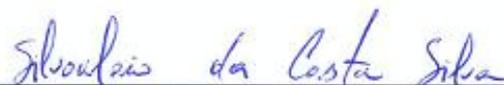
**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

Título: Expressão gênica em frangos de corte submetidos a diferentes níveis de alimentos alternativos.

Autor: Renan dos Santos Araújo  
Orientadora: Profª Drª. Katiene Régia Silva Sousa  
Co-orientador: Prof. Dr. Fábio Barros Britto

Aprovada em: 10 / 06 / 15

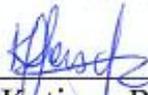
Banca Examinadora



Prof. Dr. Silvokleio da Costa Silva  
UFPI



Profª. Drª. Leilane Rocha Barros Dourado  
UFPI



Prof. Drª. Katiene Régia Silva Sousa  
UFPI

Bom Jesus – PI

2015

***“Até aqui nos ajudou o Senhor”***

I Samuel 7:12b

À Deus por permitir que eu chegasse até aqui.

Aos meus pais, José Dimar de Sousa Araújo e Maria dos Santos Ferreira Araújo, por sempre terem acreditado no meu potencial.

Aos meus irmãos Railson, Rauena e Rian, pela cumplicidade e companheirismo.

Aos professores pelos ensinamentos.

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus o único autor e consumidor da vida.

Aos meus pais que me proporcionaram a base para que eu chegasse tão longe.

Especialmente a minha orientadora, professora Dr<sup>a</sup> Katiene Régia Silva Sousa, por toda orientação, paciência e oportunidades concedidas a mim. Muito Obrigado!

Às guerreiras Adriana Costa e Fabiana Belchior pelas respectivas ajudas (intermináveis).

À professora Dr<sup>a</sup>. Leilane Rocha Barros Dourado pela doação dos tecidos.

A Universidade Federal do Piauí, *Campus* Prof<sup>a</sup> Cinobelina Elvas pelo gentil acolhimento.

À FAFEPI pela bolsa durante cinco meses.

Ao Labtec da UFV, na pessoa da prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Simone Facionie e do técnico MSc. Walmir Silva pelas valiosas contribuições com as extrações de RNAs e confecção do qPCR.

Aos companheiros do programa de Pós-Graduação em Zootecnia: Aline Medeiros, Rogério Paes, Vagner Fontes, Luanna Saraiva, Apoxena Marafon, Adriana Sousa, Carlos Silas, Enoque Leão, Raimundo Ribeiro, Janilda Barros e Antônio Neto pelo recíproco companheirismo.

Enfim, a todos os familiares, amigos e colegas que direta ou indiretamente contribuíram com essa realização.

VALEU MESMO GALERA!

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	vii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>RESUMO GERAL</b> .....	ix
<b>GENERAL ABSTRACT</b> .....	x
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	xi
<b>CAPÍTULO 01. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	13
1. ASPECTOS ECONÔMICOS DA AVICULTURA .....	14
2. AVICULTURA E ALIMENTOS ALTERNATIVOS .....	15
2.1 Óleo de algodão e o Gossipol.....	15
2.2 A glicerina como opção de suplemento na alimentação de aves .....	17
3. NUTRIGENÔMICA .....	18
3.1 Formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) .....	19
3.2 A ação de enzimas antioxidantes.....	21
3.3 Ação de genes relacionados com a síntese de energia.....	22
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	24
<b>CAPITULO 02. EXPRESSÃO GÊNICA EM MÚSCULO E FÍGADO DE FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM GLICERINA</b> .....	32
Introdução .....	35
Material e Método.....	37
Resultado e Discussão .....	41
Conclusão .....	46
Referências Bibliográficas .....	47
<b>CAPITULO 03. INCLUSÃO DO ÓLEO DE ALGODÃO NA DIETA DE FRANGO DE CORTE NOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES</b> .....	53
Introdução.....	56
Material e Método.....	57
Resultado e Discussão .....	61
Conclusão .....	64
Agradecimento .....	65
Referências Bibliográficas .....	65
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	79



## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

- Tabela 1.** Composição percentual das dietas experimentais nos frangos de corte nas diferentes fases de crescimento..... 37
- Tabela 2.** Composição nutricional energética calculada das dietas experimentais para frangos de corte nas diferentes fases de crescimento..... 38
- Tabela 3.** Sequências de nucleotídeos, tamanho do amplicon e temperatura de anelamento dos *primers* utilizados para as reações de RT-PCR em Tempo Real... 40

### CAPÍTULO III

- Tabela 1.** Composição centesimal das dietas experimentais para frangos de corte aos 21 e 42 dias de idade..... 70
- Tabela 2.** Sequências de nucleotídeos, tamanho do amplicon e temperatura de anelamento dos *primers* utilizados para as reações de PCR em Tempo Real..... 71
- Apêndice 1.** Resultados da análise estatística para cada contraste entre tratamentos, incluindo a comparação da suplementação dentro de cada tratamento de óleo de algodão com e sem sulfato ferroso aos 21 e 42 dias..... 75

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

<b>Figura 1.</b> Estrutura química do gossipol.....	16
<b>Figura 2.</b> Metabolismo na mitocôndria durante o ciclo de ácido cítrico .....	20
<b>Figura 3.</b> Formação de espécies reativas de oxigênio e mecanismo antioxidantes nos sistemas biológicos.....	21
<b>Figura 4.</b> Desenho esquemático dos mecanismos de ressíntese de ATP na fosforilação oxidativa e dissipação de energia pelas proteínas desacopladoras.....	23

### CAPÍTULO II

<b>Figura 1.</b> Expressão do mRNA de Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutaciona peroxidase (GPx), Transportador de Nucleotídeos de Adenina (ANT), Citocromo C Oxidase (COX III) e Malondialdeído (MDA) no músculo de frangos de corte suplementados com 0%, 6% e 12% de glicerina.....	42
<b>Figura 2.</b> Expressão do mRNA da Proteína Desacopladora (UCP) no músculo de frangos de corte suplementados com 0%, 6% e 12% de glicerina.....	43
<b>Figura 3.</b> Expressão do mRNA de Glutaciona peroxidase (GPx) no fígado de frangos de corte suplementados com 0%, 6% e 12% de glicerina.....	44
<b>Figura 4.</b> Expressão do mRNA de Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Transportador de Nucleotídeos de Adenina (ANT), Citocromo C Oxidase (COX III), Proteína Desacopladora (UCP) e Malondialdeído (MDA) no fígado de frangos de corte suplementados com 0%, 6% e 12% de glicerina .....	45

### CAPÍTULO III

<b>Figura 1.</b> Expressão relativa ( <i>fold change</i> ) para os valores dos quatros genes entre os níveis 0% e 2% (A), 0% e 4% (B), 0% e 6% (C), ou entre 2% e 4% (D), ou entre 2% e 6% (E), ou entre os níveis de 4% e 6% (F), dentro de cada tratamento sem e com sulfato ferroso aos 21 dias.....	72
<b>Figura 2.</b> Expressão relativa ( <i>fold change</i> ) para os valores dos quatros genes entre os níveis 0% e 2% (A), 0% e 4% (B), 0% e 6% (C), ou entre 2% e 4% (D), ou entre 2% e 6% (E), ou entre os níveis de 4% e 6% (F), dentro de cada tratamento sem e com sulfato ferroso aos 42 dias.....	73
<b>Figura 3.</b> Expressão relativa ( <i>fold change</i> ) para os valores dos quatros genes dentro de cada nível 0%, 2%, 4% e 6%, dentro de cada tratamento com e sem sulfato ferroso aos 21 (A) e 42 (B) dias, respectivamente.....	74

## RESUMO GERAL

ARAÚJO, R.S. Expressão gênica em frangos de corte submetidos a diferentes níveis de alimentos alternativos. 2015. 79 páginas. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal do Piauí, Bom Jesus, 2015.

Objetivou-se com este trabalho avaliar em frangos de corte, a influência da suplementação de diferentes fontes alternativas (óleo de algodão e glicerina), na expressão dos genes de Superóxido Dismutase – SOD; Catalase – CAT; Glutathione peroxidase – GPx; Malondialdeído – MDA; Proteína desacopladora – UCP; Transportador de Nucleotídeos de Adenina – ANT e Citocromo C oxidase - subunidade III – COX III. Foram realizados dois experimentos: no primeiro foi incluído glicerina, na dieta das aves ao nível de 0%, 6% e 12% e a expressão gênica de SOD, CAT, GPx, MDA, UCP, ANT e COX III no músculo do peito e no fígado foram quantificados aos 42 dias de idade; enquanto, no segundo experimento, os animais foram suplementados com óleo de algodão ao nível de 0%, 2%, 4% e 6% com ou sem sulfato ferroso e realizou-se a quantificação dos transcritos dos genes SOD, CAT, GPx e MDA no intestino dos animais com 21 e 42 dias de idade. Observou-se que a suplementação com glicerina ao nível de 12% na dieta influenciou na expressão de UCP no músculo peitoral e também do GPx no fígado, entretanto, ao nível de 6% não foram percebidas alterações significativas. Percebeu-se ainda que a inclusão de óleo de algodão ao nível de 4% com sulfato ferroso altera a expressão da enzima GPx aos 21 dias de idade, todavia, aos 42 dias a inclusão de 6% de óleo de algodão sem sulfato ferroso aumenta a expressão de MDA e com sulfato ferroso de SOD. Conclui-se que a inclusão de alimentos alternativos (glicerina e óleo de algodão) na dieta de frangos de corte, altera a expressão gênica.

Palavras-chaves: estresse oxidativo, genes antioxidantes, óleo de algodão, glicerina, nutrigenômica

## GENERAL ABSTRACT

ARAÚJO, R.S. Gene expression in broilers submitted to different levels of alternative foods. 2015. 79 pages. Dissertation (Master of Animal Science) - University Federal of Piauí, Bom Jesus, 2015.

The objective of this study was to evaluate the influence of supplementation of different alternative feed (cottonseed oil and glycerin) in broilers, in the expression of genes Superoxide dismutase – SOD; Catalase – CAT; Glutathione peroxidase – GPx; Malondialdehyde – MDA; Uncoupling protein – UCP; Adenine nucleotide translocase – ANT and Cytochrome C oxidase - subunit III - COX III. Two experiments were conducted: the first was included in the diet, glycerin the level of 0%, 6% and 12% and the gene expression of SOD, CAT, GPx, MDA, UCP, ANT and COX III in the chest muscle and liver were measured at 42 days of age; while in the second experiment, the animals were supplemented with cottonseed oil to (0%, 2%, 4% and 6%) with or without ferrous sulfate and held quantitation of transcripts of SOD, CAT, GPX and MDA genes in the intestine's animals with 21 and 42 days of age. It found that supplementation with the glycerine level of 12% in the diet changed the UCP expression in the muscle and also the GPx in the liver, however, the level of 6% weren't perceived significant changes. It is also realized that the cottonseed oil inclusion to the 4% level with ferrous sulfate alters the GPx expression at 21 days of age, however, at 42 days the inclusion of 6% cottonseed oil without ferrous sulphate increases the expression of MDA and SOD with ferrous sulfate. It follows that inclusion of alternative foods (glycerin, and cotton oil) in broiler diet alters gene expression.

Keywords: oxidative stress, antioxidant genes, cottonseed oil, glycerin, nutrigenomics

## INTRODUÇÃO GERAL

Através da nutrigenômica é possível estudar a interação entre os nutrientes e os genes, ou seja, a forma pela qual as necessidades nutricionais e o metabolismo dos constituintes presentes nos alimentos de cada espécie, influenciam na regulação gênica (VASCONCELOS, 2010).

Nas últimas décadas, têm-se pesquisado por fontes alternativas de alimentos para viabilizar a substituição total ou parcial dos ingredientes tradicionalmente usados na alimentação animal. Entre as matérias-primas utilizadas na fabricação de rações para animais não ruminantes, o milho destaca-se como o principal alimento energético, enquanto que, o farelo de soja como principal suplemento proteico, estabelecendo assim, uma dependência aos produtores pelo aumento da demanda por fontes de proteína e as principais oscilações no custo final da produção desses animais (ALENCAR et al., 2014).

Logo, os subprodutos da agroindústria, destacam-se como fontes alternativas, avaliadas para substituição do alimento energético (CARVALHO et al., 2010; ALVARENGA, et al., 2011). Entretanto, eventuais constituintes presentes nos subprodutos, podem influenciar na expressão de genes, particularmente alguns com função antioxidante e produção de energia.

Sendo assim, busca-se nesse trabalho avaliar em frangos de corte, a influência da suplementação de diferentes fontes alternativas (óleo de algodão e glicerina), na expressão dos genes: Superóxido Dismutase – SOD; Catalase – CAT; Glutathione peroxidase – GPx; Malondialdeído – MDA; Proteína desacopladora – UCP; Transportador de Nucleotídeos de Adenina – ANT e Citocromo C oxidase - subunidade III – COX III.

A dissertação foi desenvolvida sob protocolo nº 006/2013, junto a Coordenadoria Geral de Projetos (CGP) da Universidade Federal do Piauí e estruturada conforme as normas para elaboração de dissertações do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (PPGZ) da UFPI da seguinte forma: INTRODUÇÃO; CAPÍTULO 01. Revisão Bibliográfica elaborada de acordo com as normas do PPGA; CAPÍTULO 02 – artigo científico intitulado: “Expressão gênica em músculo e fígado de frangos de corte suplementados com glicerina”, elaborado de acordo com as normas da Revista Brasileira Agropecuária; CAPÍTULO 03 – artigo científico intitulado: “Inclusão do óleo de algodão na dieta de

frango de corte nos níveis de expressão de enzimas antioxidantes”, elaborado de acordo com a Revista Ciência Rural; CONSIDERAÇÕES FINAIS.

## **CAPITULO 1. REVISÃO DE LITERATURA**

Elaborada de acordo com as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT

## 1. ASPECTOS ECONÔMICOS DA AVICULTURA

No Brasil, a avicultura emprega mais de 3,6 milhões de pessoas, direta e indiretamente, e responde por quase 1,5% do Produto Interno Bruto (PIB) nacional (ABPA, 2014). Nas últimas três décadas, a avicultura brasileira tem apresentado elevadas taxas de crescimento, tornando-se o terceiro produtor mundial e líder em exportação. Seu bem principal, o frango, conquistou os mais exigentes mercados e atualmente, sua carne e seus derivados chegam a mais de 150 países e, por consequência, são responsáveis por elevados montantes em dinheiro (MAPA, 2014).

O crescente desenvolvimento da avicultura industrial e sua expansão em diversas áreas do Brasil, principalmente no início do século XXI, está relacionado às dinâmicas dos espaços rurais influenciados pelas demandas comerciais e produtivas. Tal fato proporcionou a avicultura consolidar-se como um setor moderno e bastante estimulado por políticas públicas, principalmente a partir dos anos de 1970 (BELUSSI, 2010).

De acordo com Aguiar et al. (2011), o aumento da produção da carne avícola, particularmente de frango, é devido a alguns fatores como o uso de linhagens geneticamente superiores, melhor qualidade dos insumos e técnicas mais adequadas de manejo, o que permitiu a redução dos custos de produção. Contudo, a produção de aves moderna, envolve o uso de raças com carne de alta qualidade e formulações de dietas que garantam uma ótima qualidade, juntamente com altos rendimentos (BOGOSAVLJEVIĆ - BOŠKOVIĆ ET AL., 2012).

Nesse contexto, o custo da alimentação responde por uma proporção significativa da produção animal, tornando cada vez mais importante a eficiência alimentar, objeto de muitos estudos (LASSITER et al., 2006). Romano et al. (2014) afirmaram que a produção de rações representa o maior custo na produção, chegando a 70% na avicultura. Segundo Idahor e Adua (2010), o aspecto essencial da produção de aves depende da alimentação adequada e da qualidade dos alimentos.

Na cadeia de produção animal, cada vez mais rações balanceadas tem sido empregadas para atender as necessidades orgânicas desses indivíduos. Entretanto, apesar de as fórmulas de alimento para animais serem padronizadas em tabelas internacionalmente conhecidas, sabe-se que há variabilidade das exigências do animal de acordo com as condições de manejo e, principalmente, quando há necessidade de produzir resposta inflamatória e imunológica específica para vários patógenos (SAAD, 2009).

## 2. AVICULTURA E ALIMENTOS ALTERNATIVOS

A busca por alimentos alternativos é uma constante de extrema importância nos dias atuais, pois se procura a substituição dos alimentos tradicionais, para proporcionar redução nos custos sem reduzir o desempenho dos animais (HARINDER et al., 2014). Isso é relevante, porque dentre os custos de produção da atividade avícola, a alimentação tem maior representatividade, sendo fator preocupante para os produtores e nutricionistas que visam alta produtividade e menores custos (RIBEIRO et al., 2010). Desse modo, o uso correto de alimentos alternativos pode auxiliar no desenvolvimento da produção de aves (ROSTAGNO et al., 2007).

Vários alimentos regionais alternativos da agroindústria, originário da lavoura de grãos, da fruticultura e de empresas processadoras de frutas, e ainda da indústria de biocombustíveis (álcool e biodiesel) tem sido largamente estudados na alimentação de animais, sob os seguintes aspectos: valor nutritivo, digestibilidade dos alimentos, desempenho, parâmetros ruminais e sanguíneos dos animais, a produção e qualidade da carne ou do leite, e a variabilidade econômica deste uso (OLIVEIRA et al., 2013).

Apesar da quantidade aparentemente elevada de constituintes anti-nutricionais, insalubridade e as características físico-químicas de alguns destes alimentos, eles têm sido apontados como inestimáveis fontes de alta qualidade de nutrientes, pigmentos, vitaminas e minerais (ABDULLAHI, et al., 2008; OLOMU, 2011).

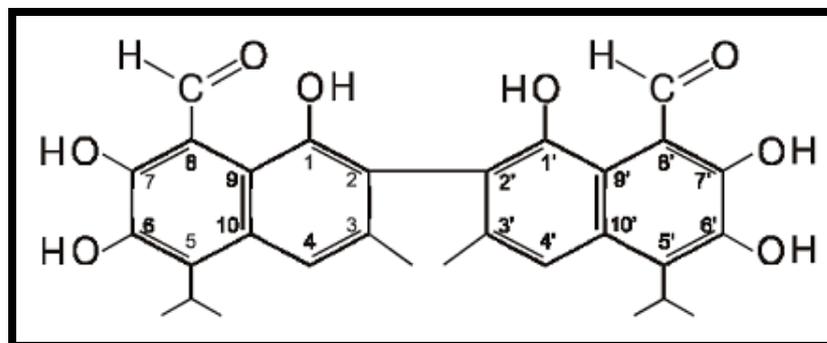
Dentre os alimentos de caráter alternativos está o óleo de algodão, que contém em torno de 40 a 46% de proteína bruta (BUTOLO, 2010). Outro alimento é a glicerina, assim denominada, por apresentar 95% ou mais de glicerol puro em sua composição, que é um composto orgânico que contém um grande valor de energia (4.320kcal de energia bruta kg<sup>-1</sup>) e com alta eficiência de utilização pelos frangos (MENTEN et al., 2008).

### 2.1. Óleo de algodão e o Gossipol

O farelo de algodão é o subproduto obtido do caroço descortado após a extração do óleo por solvente e/ou moagem fina (BUTOLO, 2010). Segundo Quintella et al. (2009), subprodutos são resíduos que servem para serem vendidos quando economicamente viáveis e coproduto aqueles que tem mercado para venda mais frequente.

O caroço de algodão apresenta um pigmento polifenólico de cor amarela, tóxico, denominado gossipol (2,2-bi 8-formil-1,6,7-tri-hidroxi-5-isopropil-3-metil-naftaleno)

ilustrado na **figura 01** (SOTO-BLANCO, 2008; GADELHA et al, 2011), cuja função é repelir muitos insetos que se alimentam da planta (ABDURAKHIMOV et al., 2009; KONG et al., 2010).



**FIGURA 01.** Estrutura química do gossipol

**FONTE:** Alexander, et al. (2008)

A síntese do pigmento é realizada por glândulas das raízes, folhas, caule e especialmente das sementes do algodoeiro. Essas glândulas representam em geral 2,4 a 4,8% do núcleo da semente e o gossipol representa de 20,6% a 39%. As glândulas de gossipol presentes na semente estão em corpos ovo-esferoidal com diâmetros entre 100 e 400µm (SINGLETON & KRATZER, 1973). Porém, a concentração do gossipol na semente de algodão varia amplamente com os genótipos da planta, podendo apresentar plantas com até 9% do peso da semente (JORGE, 2006).

O efeito tóxico é acarretado pelo gossipol livre, porque parte dele é solúvel em acetona. O teor de gossipol livre no caroço de algodão normalmente é semelhante ao teor total, podendo restringir sua utilização na alimentação de ruminantes e não ruminantes (RANDEL et al., 1992). Seus efeitos biológicos são atribuídos aos grupos 6-hidróxi e 2-aldeído, que torna a molécula solúvel em solventes orgânicos (ZHENG et al., 2012) assim como, seu caráter ácido e antioxidante (MOREIRA et al., 2006).

O gossipol atua principalmente no metabolismo de aminoácidos, ligando-se às proteínas que possuem aminoácidos livres. Essa molécula pode ainda alterar os glóbulos vermelhos, afetando de forma negativa a taxa de respiração destes animais (YILDRIM et al., 2003). Segundo Nagalakshmi et al. (2007), as moléculas de gossipol induz o estresse mitocondrial, aumentando a permeabilidade de membrana, assim como a função hepática, além das taxas de crescimento, produção e reprodução. Yildirim et al., (2003) acrescentam

que níveis de dieta com gossipol livre acima de 160 e 100 mg pode afetar negativamente o desempenho de aves e suínos, respectivamente.

O gossipol pode ser inativado por tratamentos térmicos, embora o uso destes processos possa formar complexos inertes e indigestíveis entre esse pigmento e algumas proteínas (BARROS et al., 2002). Sua toxidez pode ser prevenida pela adição de sais de ferro à dieta, como sulfato ferroso, utilizado na proporção 1:1 (ferro: gossipol livre). O ferro forma um complexo insolúvel e irreversível com o gossipol no trato intestinal, evitando sua absorção, além disso, interfere no aproveitamento de elementos minerais, formando complexos estáveis com cátions (MOREIRA et al., 2006).

O medo da sua toxicidade é a principal preocupação dos nutricionistas de aves, o que tem limitado a incorporação de farelo de algodão (GAMBOA et al., 2001). Ele inibe a atividade da pepsina e tripsina no trato gastro-intestinal, reduzindo desse modo a digestibilidade de proteínas (NAGALAKSHMI et al., 2007). O efeito negativo do gossipol em aves está relacionado com a diminuição do consumo de ração, da produção de ovos e peso do ovo, assim como, o ganho de peso corporal. Porém, o gossipol em quantidades pequenas não influencia o desempenho das aves (ALEXANDER et al., 2008).

## **2.2. A glicerina como opção de suplemento na alimentação de aves**

O crescimento da produção de biocombustíveis tem gerado um excedente de glicerina, de modo que o mercado tem encontrado dificuldade para absorção desse coproduto (MELO et al. 2014), que é obtido a partir de óleos vegetais e gorduras animais (RIVALDI et al., 2007), que contabiliza aproximadamente 10% do volume total produzido (DASARI et al., 2007; SWIATKIEWCZ et al., 2009). Logo, é necessário novas formas de utilização desse coproduto que sejam ecologicamente corretos e economicamente viáveis (LAGE et al., 2010; BATISTA, 2013).

A glicerina purificada apresenta teores acima de 99,5% de glicerol, e é amplamente utilizada na indústria farmacêutica e alimentícia, uma vez que apresenta elevado valor energético (DONKIN, 2008). O glicerol é uma molécula pequena que é um importante componente dos triglicerídeos e fosfolípidos, o que pode ser convertido em glicose pelo fígado e rins, e fornece energia para o metabolismo celular. Sabe-se ainda que o glicerol é um precursor para gliceraldeído 3-fosfato, um intermediário na lipogênese e caminhos para a gluconeogênese, além de proporcionar rendimentos de energia através das vias glicolíticas e ácidos tricarboxílicos (KREBS & LUND, 1966; MIN et al., 2010).

Com isso, além das aplicações já conhecidas nas indústrias químicas e farmacêuticas, e também em virtude da queda de preços pela grande produção, estudos são realizados para aplicação na alimentação animal (SHIN et al. 2012). Gasparino et al. (2012) concluíram que a inclusão de glicerol na dieta de aves pode afetar a expressão de genes mitocondriais, relacionadas à síntese de ATP e ao estresse oxidativo.

Para Dozier et al. (2008), a glicerina pode ser considerada uma boa fonte de energia dietética para frangos. Menten et al. (2008) e Berenchtein et al. (2010) demonstraram que a glicerina pode constituir um ingrediente energético com potencial para uso em dietas de frangos de corte e suínos em crescimento e em terminação, respectivamente. Guerra et al. (2011) afirmaram que a inclusão de glicerina até o nível de 5% na ração para frangos de corte pode ser utilizada como alimento alternativo energético na formulação de rações, não afetando o desempenho zootécnico nem a composição química da carcaça. De acordo com Kroupa et al. (2011), a utilização da glicerina como substituto ao óleo vegetal para frangos de corte proporciona um maior ganho de peso.

Para Bernardino et al. (2014), a inclusão de glicerina na alimentação animal é alternativa viável e ambientalmente sustentável para destinar parte deste coproduto no mercado, já que poderá evitar que a produção excedente tenha destinos inadequados, de forma a contaminar o meio ambiente (BERNARDINO et al., 2014). Além disso, Martins et al. (2014) acrescentaram que a substituição de suplementos tradicionais como o milho por glicerina, disponibilizaria os grãos de milho apenas para o consumo humano.

### **3. NUTRIGENÔMICA**

A disponibilidade de sequência de informações do genoma, permitiu investigações fisiológicas relacionadas com o processo de digestão para muitas espécies agrícolas importantes, em nível de transcrição gênica. O conhecimento de genes envolvidos no trato gastrointestinal, desenvolvimento e diferenciação, bem como condições que alteram o processo de digestão podem fornecer informações sobre os mecanismos para melhorar a absorção de nutrientes e a eficiência da produção de ruminantes (CONNOR et al., 2009).

Nesse aspecto, a nutrigenômica ou genômica nutricional, descreve a interação biológica entre produtos alimentares químicos e a composição genética (KAPUT & RODRIGUEZ, 2004). Por isso, a nutrigenômica busca investigar quais são as influências dos nutrientes e compostos bioativos dos alimentos na tentativa de prever como os genes se

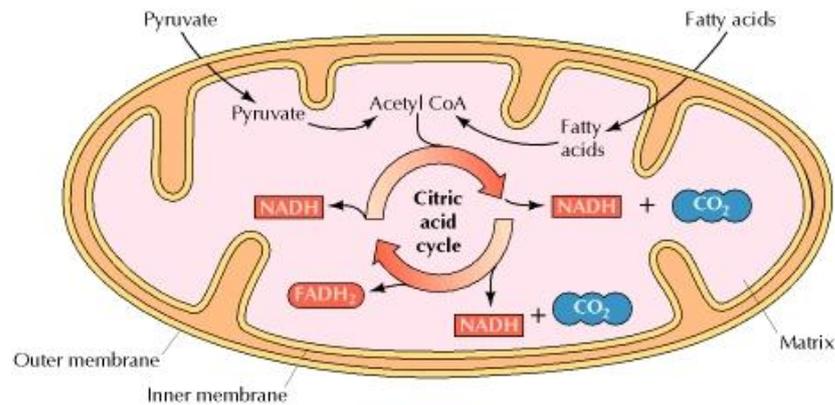
expressarão e como variações no genoma influenciam a forma pela qual o indivíduo responde à dieta (MULLER & KERSTEN, 2003; DUCLOS, 2007). Gasparino et al. (2013) comentaram que a alimentação e eficiência reprodutiva estão associadas a função da genética do animal, o ambiente em que este está exposto e da interação entre esses dois fatores.

Entretando, investigações com uso da nutrição, particularmente de alimentos alternativos, interferindo na expressão gênica ainda são raros em não ruminantes, mas apresenta um potencial crescente, conforme aumenta o entendimento entre a nutrição, a genética e o desempenho produtivo e reprodutivo dos animais (BONAPARTE et al., 2014). Entre os poucos trabalhos encontrados na literatura está o de Silva et al. (2013), onde verificaram que a inclusão de 12% de glicerol na alimentação de codornas, reduz a expressão de genes relacionados ao estresse.

A importância de se conhecer genes sensíveis a mudanças de nutrientes, consiste no fato de que muitos estão envolvidos em processos fisiológicos fundamentais a homeostase do indivíduo e a nutrigenômica objetiva estabelecer estratégias que venham a trazer significativa melhora na saúde e produtividade animal (BONAPARTE et al., 2014).

### **3.1 Formação de espécies reativas de oxigênio (ROS)**

Vários estudos têm investigado diferentes mecanismos da expressão de fenótipos de genes mitocondriais (BOTTJE & CARSTENS, 2009; DEL VESCO et al., 2013). Na matriz mitocondrial estão presentes várias enzimas necessárias à expressão de genes dessa organela, além do próprio DNA genômico mitocondrial (mtDNA) e ribossomos mitocondriais especiais (SHADEL, 2008). Pesquisas em frangos de corte têm mostrado que estes animais produzem menos trifosfato de adenosina (ATP), devido a uma menor eficiência das suas mitocôndrias (OJANO-DIRAIN et al., 2007), deve-se lembrar de que os principais eventos metabólicos como o ciclo do ácido cítrico ou ciclo de Krebs (figura 02), oxidação dos ácidos graxos e síntese de ATP pela fosforilação oxidativa ocorre na matriz da mitocôndria (RODRIGUES, 2005).



**FIGURA 02.** Metabolismo na mitocôndria durante o ciclo do ácido cítrico.  
**FONTE:** NCBI (2014)

O nome ROS é dado ao conjunto de produtos intermediários formados pelas espécies reativas de oxigênio: radical superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila ( $OH^-$ ) (VIEIRA, 2008). O superóxido é produzido em diversos processos biológicos, entre eles, na cadeia transportadora de elétrons das mitocôndrias. A síntese de  $O_2^-$  ocorre quando um elétron é adicionado a uma molécula de oxigênio, e a partir desta espécie reativa, as demais são sintetizadas. A produção constante de radicais livres, que é qualquer espécie química que tenha um ou mais elétrons desemparelhados, durante os processos metabólicos levou ao desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidante para impedir danos aos tecidos ou a moléculas, tais como, as mitocôndrias (MARTINS, 2010).

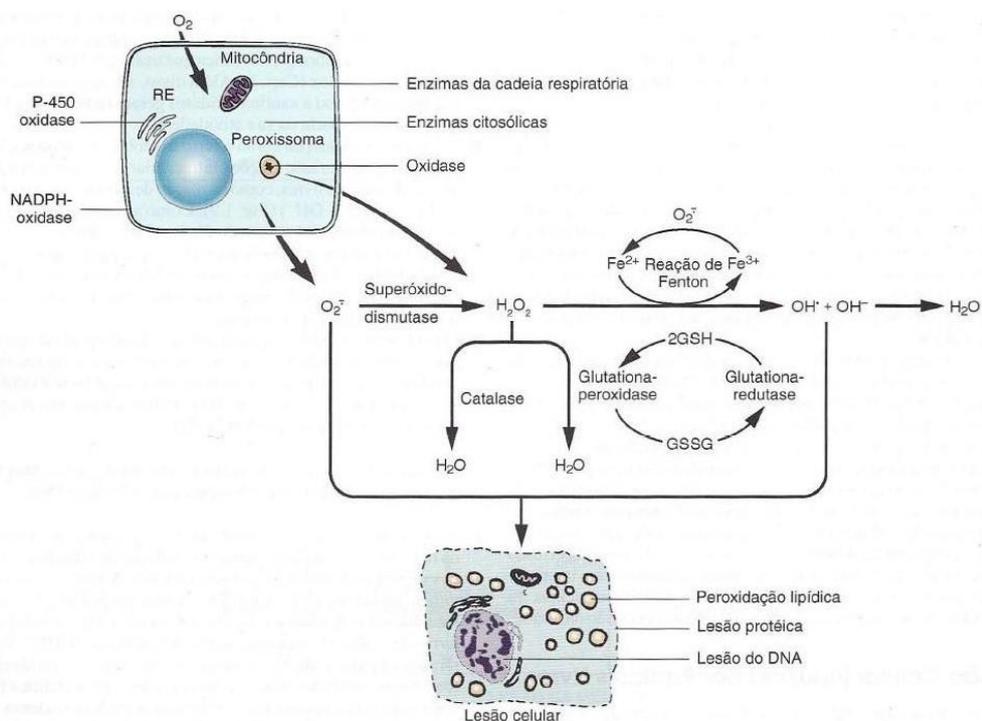
Proteínas oxidadas podem ser produzidas por ROS devido a defeitos específicos no local do transporte de elétrons (BOTTJE et al., 2002; OJANO-DIRAIN et al., 2004). Elevado ROS mitocondrial podem afetar a expressão de proteínas e causar mutações no DNA, levando o RNA a fazer traduções inadequadas (CRAWFORD et al., 1997), bem como diminuir a capacidade respiratória mitocondrial (WALLACE, 1999).

Os dois principais meios de defesa antioxidantes no organismo podem ser subdivididos em: não enzimático e enzimático. Entre os antioxidantes não enzimáticos, incluem-se algumas vitaminas (C, E e A), produtos naturais (ex.: carotenoides, flavonoides, polifenóis, furanoides e tióis) e produtos sintéticos (ex.: Ebselen, *N*-acetilcisteína e Trolox) (VELOSO et al., 2007). Já o sistema antioxidante enzimático é formado pelas enzimas: Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutaciona peroxidase (GPx) (BARBOSA et al., 2010).

### 3.2 A ação de enzimas antioxidantes

O sistema antioxidante enzimático constitui a primeira defesa endógena aos ataques das espécies reativas de oxigênio, impedindo sua formação ou sequestrando-as de forma a impedir sua interação com alvos celulares, ou seja, bloqueia a etapa de iniciação da cadeia radicalar (BARBOSA et al., 2010).

A enzima superóxido dismutase catalisa a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. Devido a isto, é uma importante defesa antioxidante na maioria das células expostas ao oxigênio (YANG et al., 2010). As enzimas catalase e glutatona peroxidase podem converter o peróxido de hidrogênio em água (DROGE et al., 2002), como mostrado na figura 03.



**FIGURA 03:** Formação de espécies reativas de oxigênio e mecanismo antioxidantes nos sistemas biológicos.

**FONTE:** KUMAR et al. (2004).

A enzima catalase pode ser encontrada em peroxissomos celulares, principalmente do fígado e rim, atuando na decomposição de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio resultante da dismutação do ânion radical superóxido (WASSMANN et al., 2004). A glutatona peroxidase age em conjunto com a catalase na eliminação de hidroperóxidos. Ela catalisa a redução de peróxido de hidrogênio e outros peróxidos orgânicos por meio da conversão da glutatona reduzida à glutatona oxidada. Esta enzima também está

relacionada em várias outras vias antioxidantes, incluindo sequestro de radicais livres (MARTINS, 2010).

Além das enzimas antioxidantes, o malondialdeído (MDA) é um importante indicador de estresse oxidativo, que é um dos produtos finais da peroxidação de ácidos graxos poli insaturados. É também conhecido como marcador de estresse oxidativo e *status* antioxidante (ZHENG et al., 2012).

### **3.3 Ação de genes relacionados com a síntese de energia**

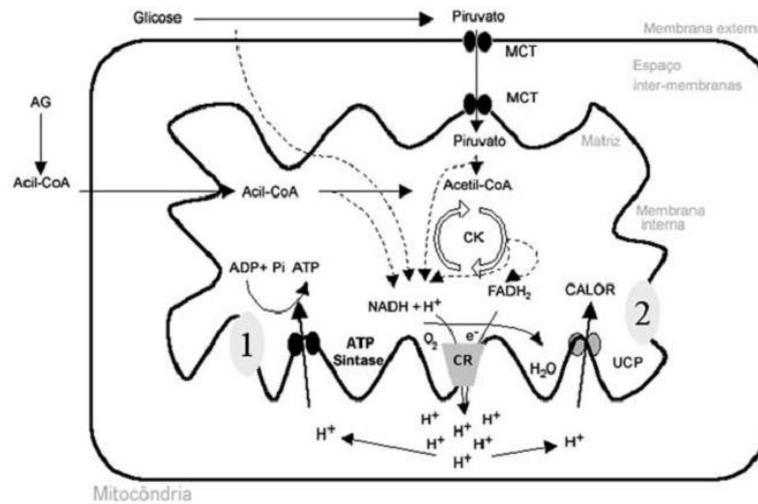
Por conta das suas relevâncias na síntese de ATP, as proteínas mitocondriais, UCP (proteína desacopladora), ANT (transportador de nucleotídeos de adenina) e COXIII (citocromo c oxidase - subunidade III), têm-se tornado tema de pesquisas nos últimos anos (BOTTE et al., 2009; SILVA et al., 2013).

A proteína ANT através da ação da ATP sintetase, possui a função de aumentar a quantidade de ADP para ser transformado em ATP. Com isso a função mitocondrial pode ser prejudicada pela incapacidade de troca do ADP/ATP entre citosol e membrana, podendo existir alguma associação entre a expressão do ANT com a expressão do fenótipo da eficiência alimentar (BOTTE et al., 2006). Em aves particularmente, uma expressão de ANT menor, proporcionou uma pior conversão alimentar em função da menor eficiência em produzir ATP (OJANO-DIRAIN et. al. 2007),

As UCPs são proteínas transportadoras que contribuem no desacoplamento de prótons no gradiente da membrana interna de mitocôndrias para formação de ATP, resultando na produção de calor (CYPESS et al., 2009; SAITO et al., 2009). A UCP é um agente que possibilita a redução da produção de ROS por causar um leve desacoplamento na produção de ATP (ABE et al., 2006), o que pode gerar estado de estresse oxidativo (TAN et al., 2010). De acordo com Ojano-Diran et al. (2007), o efeito benéfico da UCP é de evitar danos ao DNA e às proteínas celulares que poderia reduzir a produção de ATP, assim, é observado maior expressão desta proteína quando ocorre produção excessiva de radicais livres.

Na figura 04 é possível observar os mecanismos de ressíntese de ATP na fosforilação oxidativa e dissipação de energia pelas proteínas desacopladoras. Os hidrogênios liberados das reações catalisadas pelas desidrogenases são carreados pelas flavoproteínas na forma reduzida ( $\text{NADH}^+$ ,  $\text{H}^+$  e  $\text{FADH}_2$ ) e bombeados pela cadeia respiratória (CR) para o espaço intermembranas, criando um gradiente de prótons. Devido

a esse gradiente, os  $H^+$  retornam para a matriz passando pela ATP sintetase e ressintetizando ATP ou, alternativamente, passam pela UCP que dissipa a energia na forma de calor (DEPIERI et al., 2004).



**FIGURA 04.** Desenho esquemático dos mecanismos de ressíntese de ATP na fosforilação oxidativa (1) e dissipação de energia pelas proteínas desacopladoras (2). AG = ácidos graxos; ADP = adenosina difosfato; ATP = adenosina trifosfato; CK = ciclo de Krebs; MCT = transportador de monocarboxilatos; Pi = fosfato inorgânico.

**FONTE:** DEPIERI et al., 2004

O Citocromo C oxidase, subunidade III (COX III) também está presente na cadeia de transporte de elétrons, relacionado com a fosforilação oxidativa. Esta subunidade do complexo protéico IV da mitocôndria é responsável pela modulação de bombeamento de prótons e de transporte de elétrons, a qual pode possuir uma grande importância na produção de energia (SCHEFFLER, 1999). No entanto, a expressão do COX III pode ser menor caso ocorra um maior dano oxidativo devido à produção de substâncias reativas ao oxigênio (KEMP et al., 2003).

#### 4. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ABDULLAHI, A.; OYAWOYE, E. O.; DOMA, D. Performance of broiler chickens fed sorghum mill waste incorporated diets. **Poultry Science Journal**. v.5, nº 3, p.108-112, 2008.
- ABDURAKHIMOV, R.S. et al. Effect of cotton-seed biocidal peptides and gossypol on resistance to biotic factors. **Chem. Nature**. v.45, p.213–216, 2009.
- ABE, T. et al. Possible role of avian uncoupling protein in down-regulating mitochondrial superoxide production in skeletal muscle of fasted chickens. **FEBS Letters**, v.580, p.4815-4822, 2006.
- AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO - ANP. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br>>. Acesso em: 10/10/2014.
- AGUIAR, G. B.; BRUMATTI, J.; MELOTTI, V.; MORAIS, S.; CARMO, F. "Importância Econômica e Social da Avicultura Brasileira - Dados Recentes. WeMD.", 2011.
- ALENCAR, D. et al. Feijão guandu cru na alimentação de frangos caipiras criados em sistema semi-intensivo. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.49, n.9, p.737-744, 2014.
- ALEXANDER, J. et al. Gossypol as undesirable substance in animal feed. **Journal The European Food Safety Authority**. v. 908, p 1-55, 2008.
- ALVARENGA, R.R., et al., Use of glycerin in poultry diets. **World Poultry Science Journal**, v.68, p. 25-44, 2012.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. ABPA 2014, disponível em:[http://www.ubabef.com.br/a\\_avicultura\\_brasileira/historia\\_da\\_avicultura\\_no\\_brasil](http://www.ubabef.com.br/a_avicultura_brasileira/historia_da_avicultura_no_brasil) < acessado dia 19/08/2014 as 15:30>
- BARBOSA, B. et al., Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**. v 23(4), p. 629-643, 2010.
- BATISTA, E. et al., Avaliação nutricional da glicerina vegetal semipurificada para codornas de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65, n.6, p.1783-1791, 2013.
- BARROS, M.M.; LIM, C.; KLESIUS P. H. Effect of soybean meal replacement by cottonseed meal and iron supplementation on growth, immune response and resistance of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to *Edwardsiella ictaluri* challenge. **Aquaculture**, v.207, p.263–279, 2002.
- BERENCHTEIN, B. et al., Utilização de glicerol na dieta de suínos em crescimento e terminação. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.39 nº.7, 2010.

- BERNADINO, P., et al., Fontes e níveis de glicerina para frangos de corte no período de 8 a 21 dias de Idade. **Revista Brasileira Saúde Produção Animal** v.15, n.3, p.649-658, 2014.
- BRAGA, A. et al., Extruded–expelled cottonseed meal decreases lymphocyte counts in male sheep. **Revista Medicina Veterinária.** v.163, p. 47–152, 2012.
- BOGOSAVLJEVIĆ-BOŠKOVIĆ, S. et al., Broiler rearing systems: a review of major fattening results and meat quality traits. **World's Poultry Science Journal.** v.68, n° 2, p. 217-228, 2012.
- BONAPARTE, T. et al., Princípios da nutrigenômica e seu emprego na nutrição animal do futuro. IN: DEMINICIS, B.B & MARTINS, C.B. **Tópicos especiais em Ciência Animal III.** 2014. Cap. 19, p. 201 -. 212.
- BOTTJE, W. et al., Mitochondrial proton leak kinetics and relationship with feed efficiency within a single genetic line of male broilers. **Poultry Science.** v.88, p.1683–169, 2009.
- BOTTJE, W. et al, Efficiency and Mitochondrial Function. **Poultry Science.** v.85, p.8–14, 2006.
- BOTTJE, W. et al., Association of mitochondrial function with feed efficiency within a single genetic line of male broilers. **Poultry Science.** v. 81, p.546–555, 2002.
- BOTTJE, W. & CARSTENS, G. Association of mitochondrial function and feed efficiency in poultry and livestock species. **Journal Animal Science.** v.87, p.48–63, 2009.
- BUTOLO, J.E. Qualidade de ingredientes na alimentação animal – Campinas: **Colégio Brasileiro de Nutrição Animal**, 2002, 356p. .
- BUTOLO, J.E. Qualidade de ingredientes na alimentação animal. 2 Ed. Campinas: **Colégio Brasileiro de Nutrição Animal**, 2010, 430p.
- CARVALHO, C. et al. Avaliação nutricional do farelo de algodão de alta energia no desempenho produtivo e características de carcaças de frangos de corte **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.5, p.1166-1172, 2010.
- CONNOR. E. et al., Gene expression in the digestive tissues of ruminants and their relationships with feeding and digestive processes. **The Animal Consortium.** v.10, 2009.
- CRAWFORD, D.R. et al., Down-regulation of mammalian mitochondrial RNAs during oxidative stress. *Free Radic.* **Biological Medicine.** v.22, p.551– 559, 1997.
- CYPESS, M. et al., Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. **N England Journal Med.** v.360, p.1509–1517, 2009.
- DASARI, M. et al., Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol. **Applied Catalysis A: General**, v.281, n.1, p.225-231, 2005.

- DASARI, M. Crude glycerol potencial described. **Feedstuffs**. v.79, nº 43, p.16-19, 2007.
- DEL VESCO, A. et al. Effect of methionine supplementation on mitochondrial genes expression in the breast muscle and liver of broilers. **Livestock Science** v. 151, p.284–291, 2013.
- DEORAS, D.P.; YOUNG-CURTIS, P.; DALVI, R.R.; TIPPETT, F.E. Effect of gossypol on hepatic and serum c-glutamyltransferase activity in rats. **Vet. Res. Commun.** v.21, p.317–323, 1997.
- DIBNER, J.; KITCHELL, L.; ATWELL, A.; IVEY, J. The effects of dietary ingredients and age on the microscopic structure of the gastrointestinal tract in poultry. **Journal of Applied Poultry Resesearch**. v.5, p.70–77, 1996.
- DIPIERI, T. Z et al., UCP-3: Regulação da Expressão Gênica no Músclo Esquelético e Possível Relação com o controle do Peso Corporal. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia Metabolica**. v.48, nº3, 337-344, 2004.
- DONKIN, S. Glycerol from Biodiesel Production: The New Corn For Dairy Cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, p. 280-286, 2008.
- DOZIER, W.A. et al., Apparent metabolizable energy of glycerin for broiler chickens. **Poultry Science**, v 87, p.317–322, 2008.
- DRIDI, S.; DECUYPERE, E.; BUYSE, J. Cerulenin upregulates heat shock protein-70 gene expression in chicken muscle. **Poultry Science**, v. 92, p. 2745–2753, 2013.
- DROGE W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v.82, p.47-95, 2002.
- DUCLOS, M. J. Which perspectives for nutrigenomics in chicken? In: EUROPEAN SYMPOSIUM ON POULTRY NUTRITION. **Proceedings**. p.16, 2007.
- GADELHA, I. et al., Efeitos do gossipol na reprodução animal. **Acta Veterinária Brasileira**. v.5, p.129–135, 2011.
- GAMBOA, A. et al., Use of expander cottonseed meal in broiler diets formulated on a digestible amino acid basis. **Poultry Science**. v.80, p. 789-794, 2001.
- GASPARINO, E. et al., Effect of glycerol on mRNA expression of growth hormone, insulin-like growth factor, and mitochondrial breast muscle genes of Japanese quails. **British Poultry Science**, v.53, p.497-507, 2012.
- GASPARINO, E. et al., IGF-I, GHR and UCP mRNA expression in the liver and muscle of high-and-low-feed-efficiency laying Japanese quail at different environmental temperatures. **Livestock Science**, v.157, p.339–344, 2013.
- GUERRA, R.L. et al., Glicerina bruta mista na alimentação de frangos de corte (1 a 42 dias). **Revista Brasileira Saúde e Produção Animal**, v.12, p.1038-1050, 2011.

- HARINDER, S. et al., A. State-of-the-art on use of insects as animal feed. **Animal Feed Science and Technology**. v.197, p.1–33, 2014.
- IDAHOR, O.; ADUA, M. Determination of proximate composition of various types of commercial layers mash produced and marketed in Nigeria. **Proceedings of the 15<sup>th</sup> Annual Animal Science Association of Nigeria Conference**, p. 474-476, 2010.
- IQBAL, M. et. al., Compromised liver mitochondrial function and complex activity in low feed efficient broilers are associated with higher oxidative stress and differential protein expression. **Poultry Science**. v.84, p.933–941, 2005.
- IQBAL, M. et. al., Low feed efficient broilers within a single genetic line exhibit higher oxidative stress and protein expression in breast muscle with lower mitochondrial complex activity. **Poultry Science**. v.83, p.474–484, 2004.
- JAMROZ, D. et al., Influence of diet type on the inclusion of plant origin active substances on morphological and histochemical characteristics of the stomach and jejunum walls in chicken. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**. v.90, p.255–268, 2006.
- JORGE, S. A. F. Estudo da adsorção do gossipol existente em óleo de semente de algodão. 72f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.
- KAPUT, J.; RODRIGUEZ, L. Nutritional genomics: the next frontier in the postgenomicera. **Physiological Genomics**. v.16, p.166–177, 2004.
- KEMP, T.J.; CAUSTON, H.C.; CLERK, A. Changes in gene expression induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in cardiac myocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.307, p.416-421, 2003.
- KONG, G.; DAUD, M. K.; ZHU, S. Effects of pigment glands and gossypol on growth, development and insecticide-resistance of cotton bollworm (*Heliothis armigera* (Hübner)). **Crop Protect**. v.29, p.813–819, 2010.
- KOŚ MIDER, A. et al., Improved utilization of crude glycerol by-product from biodiesel production. In: MONTERO, G. (Ed.). **Biodiesel - Quality, emissions and by-products**. Rijeka: In Tech, p.341-364, 2011.
- KREBS, A.; LUND, P. Formation of glucose from hexoses, pentoses, polyols and related substances in kidney cortex. **Biochemistry Journal**. v.98, p. 210 – 214, 1996.
- KROUPA, L. et al. Glycerol as source of energy in broiler chicken fattening. **Acta Veterinária Brno**, v.80, p. 157–164, 2011.
- KUMAR, V; ABBAS, A. K; FAUSTO, N. **Robbins & Cotran: Patologia -Bases Patológicas das Doenças**. 7<sup>a</sup> Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

- LASSITER, K. et al. Differential expression of mitochondrial and extramitochondrial proteins in lymphocytes of male broilers with low and high feed efficiency. **Poultry Science**. v.85, p.2251–2259, 2006.
- LI, M.H. et al., Evaluation of glycerol from biodiesel production as a feed ingredient for channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.41, n.1, p.130- 136, 2010.
- MANABE, S.; NUBER, D.C.; LIN, Y.C. Zone-specific hepatotoxicity of gossypol in perfused rat liver. **Toxicol.** v.29, p.787–790, 1991.
- MARTINS, A., et al. Glycerol inclusion levels in corn and Sunflower silages. **Ciência Agrotecuaria**. v.38, n.5, p.497-505, 2014.
- MARTINS, C.A. **Avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo do guaraná (*Paullinia cupana*) em pó**. 115p. Dissertação (Mestrado em Nutrição em Saúde Pública). Programa de Pós Graduação em Nutrição em Saúde Pública. Universidade de São Paulo. Faculdade de Saúde Pública, São Paulo. 2010.
- MCCOY, M. Glycerin surplus. **Chemical & Engineering News**, v.84, n.6, p.7, 2006.
- MELO, S. et al., Qualidade da carne de suínos com uso de glicerina na alimentação. **Arquivo Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.66, n.2, p.583-592, 2014.
- MENTEN, J.F.N. et al. Avaliação da glicerina proveniente do biodiesel como ingredientes para rações de frango de corte. In: CONFERENCIA APINCO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS AVÍCOLAS, Santos, SP. Anais... Campinas: Fundação APINCO de ciências e tecnologia avícolas, p.66, 2008.
- MIN, N. et al., Glycerin-A new energy source for poultry. **International Journal of Poultry Science** v. 9, p. 1 – 4, 2010.
- MINISTERIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, disponível em <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/aves>. Acessado em 26/10/2014 às 10:28.
- MME – MINISTERIO DE MINAS E ENERGIA. Disponível em: <http://www.mme.gov.br/programas/biodiesel/menu/biodiesel/pnpb.html>. Acesso em 26 abril de 2013.
- MOREIRA, I. et al. Utilização do farelo de algodão, com ou sem a adição de ferro, na alimentação de leitões na fase inicial (15-30 Kg). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.3, p.1077-1084, 2006.
- MULLER, M.; KERSTEN, S. Nutrigenomics: goals and strategies. **Nature Review Genetics**, v.4, p.315-322, 2003.
- NAGALAKSHMI, D. et al., Cottonseed meal in poultry diets. **Journal Poultry Science**. v.44, p.119-134, 2007.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9896/figure/A1628/?report=objectonly>, acessado dia 22/12/2014 às 13:33 hs.

NUNES, F. et al., Effects of gossypol present in cottonseed cake on the spermatogenesis of goats. **Journal Animal**. v.9, p.75–78, 2010.

OJANO-DIRAIN, C. et. al. Biochemical evaluation of mitochondrial respiratory chain in duodenum of low and high feed efficient broilers. **Poultry Science**. v.84, p.1926–1934, 2005.

OJANO-DIRAIN, C. et al., Gene expression in breast muscle and duodenum from low and high feed efficient broilers. **Poultry Science**, v.86, p.372-381, 2007.

OJANO-DIRAIN, C. et. al. Determination of mitochondrial function and site-specific defects in electron transport in duodenal mitochondria in broilers with low and high feed efficiency. **Poultry Science**. v.83, p.1394–1403, 2004.

OLOMU, M. *Monogastric Animal Nutrition: Principles and Practice* (2nd Edn) St. Jackson Publishing, p. 478, 2011.

OLIVEIRA, R.L. et al., Alimentos Alternativos na Dieta de Ruminantes. **Revista Científica de Produção Animal**, v.15, n.2, p.141-160, 2013.

OOI, T.L. et al. Glycerol residue – a rich source of glycerol and medium chain fatty acids. **Journal of Oleo Science**. v.53, n.1, p.29-33, 2004.

QUINTELLA, C.M. et al. Cadeia do biodiesel da bancada à indústria: uma visão geral com prospecção da tarefas e oportunidades para P&D&I. **Química Nova**, v.32, n.3, p.793-808, 2009

RANCE, A.; MCENTEE, M.; MC DEVITT, M. Genetic and phenotypic relationships between and within support and de -mand tissues in a single line of broiler chicken. Br. **Journal Poultry Science**. v.43, p.518-527, 2002.

RANDEL, D., CHASE, C., WYSE JR, J. Effects of gossypol and cottonseed products on reproduction of mammals. **Journal Animal Science**. v.70, p.1628–1638, 1992.

RAUW, M. et al., Undesirable side effects of selection for high production efficiency in farm animals: a review. **Livestock Prod. Science**. v.56: p.15-33, 1998.

RIBEIRO, A.; HENN, J.; SILVA, G. Alimentos alternativos para suínos em crescimento e terminação. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 38, p. 61 – 71, 2010.

RIVALDI, R. et al., Glicerol de biodiesel. **Biotechnologia Ciência e Desenvolvimento**. v.37, p.44-51, 2007.

RODRIGUES, A.S.I. **A expressão da proteína mitocondrial CL-39KDa na WASSMANN, S., WASSMANN, K. NICKENIG, G. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells.Hypertension.v.44, p.381-386, 2004.**

- ROVER JÚNIOR, L.; HOEHR, N.F.; KUBOTA, A.P.V.L.T. Sistema Antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**. v.24, p.112-119, 2001.
- RODRIGUES, A.S. "A expressão da proteína mitocondrial CL-39KDa na identificação de doenças mitocondriais associadas a defeitos do complexo I." *São Paulo, Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina* (2005).
- ROMANO, G.G. et al., Effects of glycerol on the metabolism of broilers fed increasing glycerine levels. **Revista Brasileira de. Ciência Avícola**. vol.16 n°.1, 2014.
- ROSTAGNO, S.H. et al. Avanços metodológicos na avaliação de alimentos e de exigências nutricionais para aves e suínos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Jaboticabal, v. 36, p. 295-304, 2007.
- ROVER JÚNIOR, L.; HOEHR, N.F.; KUBOTA, A.P.V.L.T. Sistema Antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quim Nova**, v.24, p.112-119, 2001.
- SAITO, M. et al. High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. **Diabetes**. v.58, p.1526–1531, 2009.
- SHADEL, G.S. Expression and maintenance of mitochondrial DNA: new insights into human disease pathology. **Am J Pathol**. v.172, n.6, p.1445-1456. 2008
- SCHEFFLER, I. **Mitochondria**. 1. ed. Nova York: Wiley-Liss Inc. 367p, 1999.
- SHIN, J.H. et al. Effects of feeding crude glycerin on performance and ruminal kinetics of lactating Holstein cows fed corn silage of cottonseed hull-based, low-fiber diets. **Journal of Dairy Science**. v.95, p.4006-4016, 2012.
- SANTOS, R. Efeitos do gossipol sobre a reprodução. **Cadernos Tecnicos da Escola Veterinária**, v.21, p.73-82, 2007.
- SINGLETON, V. L.; KRATZER, F. H. Plant phenolics. **Toxicants occurring naturally in foods**, p. 309-345, 1973.
- SILVA, S.S. et al., Expressão do mRNA de genes mitocondriais e desempenho produtivo de codornas alimentadas com glicerol. **Pesquisa agropecuária brasileira**. v.48, n.2, p.228-233, 2013
- SOTO-BLANCO, B. Gossipol e fatores antinutricionais da soja. In: Spinosa, H.S., Górniak, S.L., Palermo Neto, J. (Eds.), **Toxicologia Aplicada à Medicina Veterinária**, p. 531–545, 2008.
- SWIATKIEWICZ, S.; KORELESKI, J. Effect of crude glycerin level in the diet of laying hens on egg performance and nutrient utilization. **Poultry Science**, v.88, p.615-619, 2009.

- SWAGGERTY, C.L. et al. Association between in vitro heterophil function and the feathering gene in commercial broiler chickens. **Avian Pathology**. v. 32(5), p.483-488, 2003.
- TAN, Y. et al. Effects of different acute high ambient temperatures on function of hepatic mitochondrial respiration, antioxidative enzymes, and oxidative injury in broiler chickens. **Poultry Science**, v.89, p.115-122, 2010.
- TIMURKAAN, N.; YILMAZ, F.; TIMURKAAN, S. Effects of cottonseed flour on immunohistochemical localization of androgen receptors (AR) in rat testes. **Revista Brasileira de Medicina Veterinaria**. v.162, p.13-17, 2011.
- TUGGLE, K.; WANG, Y.; COUTURE, O. Advances in Swine Transcriptomics REVIEW. **Int. Journal Biological Science**. v. 3, n° 3, p.132-152, 2007.
- VASCONCELOS, F. A ciência da nutrição em trânsito: da nutrição e dietética à nutrigenômica. **Revista de Nutrição**. v. 23, n° 6, 2010.
- VELOSA, A.C. et al., Chemical Residual. **Toxicology**. v.20, p.1162, 2007.
- VIEIRA, S.M.S. **Estudo da associação entre polimorfismos em genes relacionados ao metabolismo da glutatona e a suscetibilidade a complicações microvasculares no diabetes melito tipo 1**. 138f. Tese (Doutorado em Ciências)- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- WALLACE, D. Mitochondrial diseases in man and mouse. **Science**. v.283, p.1482-1488, 1999.
- WASSMANN, S.; WASSMANN, K.; NICKENIG, G. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. **Hypertension**. v.44, p.381-386, 2004.
- WALDROUP, P.W. Biofuels and Broilers. Competitors or Cooperators? In: **MID-ATLANTIC NUTRITION CONFERENCE, Proceedings...** v. 5 p.25-34, 2007
- YILDRIM et al. Growth performance and immune response of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fed diets containing graded levels of gossypol-acetic acid. **Aquaculture**, v. 219, p.751-768, 2003.
- YANG, X. et al. Effect of early feed restriction on hepatic lipid metabolism and expression of lipogenic genes in broiler chickens. **Research in Veterinary Science**, v.89, p.438-44, 2010.
- ZEKARIAS, B. et al. Immunological basis of difference in disease resistance in the chicken. **Veterinary Research**. v. 33, p.109,125. 2002.
- ZHENG, Q. et al. Effect of replacing soybean meal with cottonseed meal on growth, hematology, antioxidant enzymes activity and expression for juvenile Grass carp, *Ctenopharyngodonidellus*. **Fish Physiology Biochemist**, v.38, p.1059-1069, 2012.

**CAPITULO 02. EXPRESSÃO GÊNICA EM MÚSCULO E FÍGADO DE  
FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM GLICERINA**

Elaborada de acordo com as normas da Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira  
(<http://seer.sct.embrapa.br/index.php/pab>)

# Expressão gênica em músculo e fígado de frangos de corte suplementados com glicerina

Renan dos Santos Araújo<sup>(1)</sup> e Katiene Régia Silva Sousa<sup>(1)</sup>

(1) Universidade Federal do Piauí – UFPI, Campus Profª Cinobelina Elvas, CEP 64900-000 Bom Jesus, PI, Brasil.  
Email: renandosantosaraujo@gmail.com, katiregia@gmail.com

Resumo – Objetivou-se avaliar a expressão do mRNA dos genes associados com funções antioxidantes (Superóxido Dismutase - SOD, Catalase – CAT, Glutathiona peroxidase – GPx e Malonaldeído - MDA) e a síntese de energia (Citocromo C oxidase - subunidade III - COX III, Proteína desacopladora UCP e Transportador de nucleotídeos de adenina - ANT) no fígado e músculo de frangos de corte com 42 dias de idade submetidos a tratamentos com 0%, 6% e 12% de inclusão de glicerina na ração. O RNA total foi extraído dos tecidos e o cDNA amplificado com a ajuda de *primers* específicos para os genes em estudo por meio de PCR em tempo real, e o gene endógeno usado foi o  $\beta$ -actina. Nos frangos alimentados com 12 % de glicerina observou-se maior expressão de UCP no músculo e do GPx no fígado. Conclui-se que a inclusão de 12 % de glicerina na dieta de frangos de corte altera a expressão do gene de síntese de energia UCP e de ação antioxidante GPx.

**Termos para indexação:** alimentos alternativos, genes mitocondriais, nutrigenômica, ROS

20 **Gene expression in muscle and liver of broilers supplemented with glycerin**

21 Abstract – This work aimed to evaluate the mRNA expression of genes associated with  
22 antioxidant functions (Superoxide dismutase – SOD, Catalase – CAT, Glutathione  
23 peroxidase – GPx and Malondialdehyde - MDA) and energy synthesis (Cytochrome C  
24 oxidase - subunit III - COX III, Uncoupling protein - UCP and Adenine nucleotide  
25 translocase - ANT) in the liver and muscle of broiler with 42 days submitted the treatments  
26 with 0%, 6%, 12% of inclusion of glycerine in the feed. The total RNA was extracted from  
27 tissues and the cDNA amplified with the help of specific primers for the genes studied by  
28 Real-time PCR and the endogenous gene used was the  $\beta$ -actin. In chickens fed with 12% of  
29 glycerine there was a higher UCP expression in the muscle and GPx in the liver. It  
30 concludes that the inclusion of 12% glycerin in broiler diet alters the expression of energy  
31 synthesis gene UCP and antioxidant action GPx.

32 **Index terms:** alternative food, mitochondrial genes, nutrigenomics, ROS

## Introdução

33

34           Através da nutrigenômica é possível correlacionar como os componentes da dieta  
35 afetam a expressão de determinados genes e descobrir quais destes estão sendo induzidos  
36 ou reprimidos, face a um determinado nutriente (KUSSMANN et al., 2006). Pesquisas têm  
37 demonstrado que a inclusão de alguns alimentos alternativos influenciam na expressão de  
38 genes relacionados com a síntese de ATP e estresse oxidativo (GASPARINO et al., 2013).

39           A glicerina, proveniente da produção de biodiesel tem sido apresentada como  
40 alimento alternativo na alimentação de frango de corte, devido a crescente oferta deste  
41 componente na agroindústria e também por conter taxas acima de 95% de glicerol que  
42 apresenta alto valor energético, com reais possibilidades de redução dos custos de  
43 produção (LAGE et. al., 2010; LIMA et al., 2012).

44           A produção de energia no corpo é controlada por vários mecanismos, incluindo  
45 fatores genéticos e nutricionais (DEL VESCO et al, 2013) e as mitocôndrias são  
46 responsáveis pela produção de 90% de toda a energia requerida pelas células (BOTTJE et  
47 al., 2009). No entanto, proteínas oxidadas podem ser produzidas por espécies reativas de  
48 oxigênio (ROS) devido a defeitos específicos no local do transporte de elétrons (OJANO-  
49 DIRAIN et al., 2004). A elevação de ROS mitocondrial pode afetar a expressão de  
50 proteínas, causar mutações no DNA e diminuir a capacidade respiratória da organela  
51 (WALLACE, 1999), influenciando na eficiência energética do animal.

52           Algumas proteínas enzimáticas, como por exemplo, a Superóxido Dismutase  
53 (SOD), a Catalase (CAT) e a Glutathione peroxidase (GPx) fazem parte do sistema  
54 antioxidante, constituindo uma relevante defesa endógena aos ataques de ROS, onde  
55 inibem sua formação ou impedem a interação com regiões celulares (ROVER JUNIOR et  
56 al., 2001). Droge et al. (2002) acrescentam que estas enzimas tem a capacidade de  
57 converter o peróxido de hidrogênio em água. Além das enzimas antioxidantes o

58 Malondialdeído (MDA) é um importante biomarcador utilizado na avaliação do estresse  
59 oxidativo (ANTUNES et al., 2008).

60 As Proteínas Desacopladoras (UCPs), o Citocromo C Oxidase, subunidade III  
61 (COX III) e o Transportador de Nucleotídeos de Adenina (ANT) estão envolvidos no  
62 processo de produção de energia (BOTTJE et al., 2009). Segundo Ledesma et al. (2002), as  
63 UCPs são proteínas transportadoras capazes de desviar a energia de síntese de ATP pelo  
64 interior da membrana, para produção de calor, catalisado por um vazamento de prótons. Já  
65 a enzima COX III é responsável por catalisar a reação final da cadeia de transporte de  
66 elétrons, proporcionando uma oxidação do Citocromo C e transferindo elétrons para o  
67 oxigênio, ao mesmo tempo em que bombeia prótons através da membrana (YOSHIKAWA  
68 et al., 2006). O ANT corresponde a cerca de 10% do conteúdo proteico presente na  
69 membrana mitocondrial interna e tem a função de catalisar ou transportar ADP/APT  
70 através da membrana da mitocôndria (FIORI et al., 1998).

71 Logo, objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito da inclusão de glicerina na  
72 dieta sobre a expressão dos genes que codificam as proteínas relacionadas com funções  
73 antioxidantes (SOD, CAT, GPx e MDA) e com a síntese de energia (UCP, COX III e  
74 ANT), no tecido muscular peitoral e hepático de frangos de corte aos 42 dias de idade.

75

**Material e Método**

76 O experimento foi conduzido no Setor de Avicultura do Colégio Técnico da  
 77 Universidade Federal do Piauí, *Campus* Prof<sup>a</sup> Cinobelina Elvas (Bom Jesus - PI). O  
 78 delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com três tratamentos (0, 6% e 12%  
 79 de glicerina) e seis repetições de cinco aves cada. As dietas experimentais (Tabelas 1 e 2)  
 80 foram formuladas para atender as exigências nutricionais das aves segundo Rostagno et al.  
 81 (2011) e a água e a ração foram fornecidas *ad libitum* para os animais.

82 Tabela 1 - Composição percentual dos ingredientes experimentais nos frangos de corte nas  
 83 diferentes fases de crescimento.

<b>Dias de idade</b>	<b>08 a 21</b>			<b>22 a 22</b>			<b>34 a 42</b>		
	<b>0%</b>	<b>6%</b>	<b>12%</b>	<b>0%</b>	<b>6%</b>	<b>12%</b>	<b>0%</b>	<b>6%</b>	<b>12%</b>
<b>Milho</b>	61,758	54,981	48,203	64,097	57,320	50,543	68,534	61,504	54,474
<b>Farelo de Soja 45%</b>	32,535	33,757	34,979	30,075	31,297	32,519	26,689	27,956	29,224
<b>Óleo de Soja</b>	1,509	1,111	0,714	2,084	1,686	1,289	1,834	1,522	1,210
<b>Glicerina ADM<sup>1</sup></b>	0,000	6,000	12,000	0,000	6,000	12,000	0,000	6,000	12,000
<b>Sal Comum</b>	0,685	0,343	0,000	0,687	0,343	0,000	0,443	0,222	0,000
<b>DL-Meti. MHA 84</b>	0,328	0,335	0,342	0,283	0,289	0,296	0,246	0,253	0,260
<b>L-Lisine 79</b>	0,239	0,216	0,192	0,192	0,168	0,144	0,195	0,171	0,146
<b>Cloreto de amônia</b>	0,000	0,312	0,623	0,000	0,312	0,625	0,000	0,313	0,625
<b>Calcário Calcítico</b>	1,058	1,050	1,043	0,938	0,930	0,923	0,832	0,824	0,817
<b>Fosfato Bicálcico</b>	1,489	1,496	1,503	1,245	1,253	1,260	1,028	1,036	1,043
<b>Supl. vit. e mineral<sup>2</sup></b>	0,400	0,400	0,400	0,400	0,400	0,400	0,200	0,200	0,200

84 <sup>1</sup> Composição da glicerina: glicerol - 22,02%, umidade - 39,23%, metanol - 1,4%, sódio -  
 85 1,69%, cinzas ou material mineral - 2,8% e ácidos graxos totais - 32,58%. <sup>2</sup> Suplemento  
 86 vitamínico e mineral: ácido fólico; óxido de zinco; Selênio; vitamina A, B<sub>1</sub>, B<sub>12</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>,  
 87 D<sub>3</sub>, E, K<sub>3</sub>, Zn; niacina; ácido pantotênico; colina; Ferro; Manganês; Cobre; Iodo; aditivo  
 88 antioxidante; halquinol; salimiciona.

89 Tabela 2 – Composição nutricional energética calculada das dietas experimentais para  
 90 frangos de corte nas diferentes fases de crescimento.

Dias de idade	08 a 21			22 a 33			34 a 42		
	0%	6%	12%	0%	6%	12%	0%	6%	12%
<b>Comp. nut. (%) e energ. (Mcal/kg)</b>									
<b>Ácido Linoléico</b>	2,284	1,951	1,618	2,617	2,284	1,951	1,954	2,245	2,537
<b>Cálcio</b>	0,860	0,860	0,860	0,750	0,750	0,750	0,650	0,650	0,650
<b>Cloro</b>	0,462	0,462	0,462	0,463	0,463	0,463	0,464	0,391	0,319
<b>Energia Metaboliz.</b>	2,980	2,980	2,980	3,050	3,050	3,050	3,100	3,100	3,100
<b>Fósforo Disponível</b>	0,384	0,384	0,384	0,335	0,335	0,335	0,290	0,290	0,290
<b>Lisina Digestível</b>	1,141	1,141	1,141	1,041	1,043	1,045	0,969	0,969	0,960
<b>Met.+Cist. Dig.<sup>1</sup></b>	0,822	0,822	0,822	0,763	0,763	0,763	0,707	0,707	0,707
<b>Metionina Digestível</b>	0,547	0,549	0,552	0,499	0,510	0,504	0,461	0,459	0,456
<b>Potássio</b>	0,775	0,777	0,780	0,736	0,739	0,742	0,693	0,690	0,687
<b>Proteína Bruta</b>	20,000	20,000	20,000	19,000	19,000	19,000	17,800	17,800	17,800
<b>Sódio</b>	0,291	0,291	0,291	0,292	0,291	0,291	0,292	0,243	0,195

91 <sup>1</sup>Metionina + Cisteína digestível.

92 Ao final dos 42 dias, os animais foram abatidos e coletaram-se as amostras de  
 93 fígado e do músculo (*Pectoralis major*) que foram armazenadas em micro tubos de 2 mL  
 94 contendo RNA-Holder<sup>®</sup> (BioAgency, São Paulo, Brasil) para manter a integridade do RNA  
 95 total e, posteriormente, armazenadas em freezer -80°C até a extração do RNA.

96 No Laboratório de Biotecnologia Animal (Labtec) da Universidade Federal de  
 97 Viçosa (Viçosa - MG), o RNA total foi extraído de 100 mg do fígado e do músculo peitoral  
 98 utilizando o Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen, Carlsbad CA, USA). O Trizol fora adicionado ao tecido,  
 99 misturados e triturados com o homogenizador eletrônico Polytron até a completa  
 100 dissociação. Em seguida, 200 µl de clorofórmio foram adicionados às amostras e  
 101 misturados manualmente por 1 minuto. Depois, as amostras foram centrifugadas por 15  
 102 minutos a 10.600 rpm a 4 °C. As fases aquosas das amostras foram coletadas e transferidas

103 para microtubos estéreis contendo 600 µl de isopropanol, e mais uma vez centrifugada por  
104 15 minutos a 4 °C. O conteúdo adquirido foi colocado em uma coluna dentro de um tubo  
105 coletor de 2 mL, onde foi realizado um *Clean up* no RNA e o processo final de extração  
106 com o Kit RNAeasy<sup>®</sup> Micro (Qiagen, Vênio, Netherlands) de acordo com as  
107 recomendações do fabricante.

108 O RNA total isolado das amostras foi quantificado por espectrofotometria em  
109 aparelho *NanoVue Plus* (GEHealthcare, Munich, Germany) e a razão OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> esteve  
110 compreendida na faixa de pureza recomendável (1,8 – 2,1). A integridade do RNA foi  
111 verificada em gel de agarose 1,2%.

112 A síntese da primeira fita do DNA complementar (cDNA) foi feita com o Kit  
113 *GoScript<sup>(TM)</sup> Reverse Transcription System* (Promega Biotecnologia do Brasil LTDA). As  
114 reações foram feitas com o RNA de cada animal que continha 5µg de RNA total, 1µL do  
115 *primer* oligo (dT)<sub>20</sub> 50µM e 4µL de *Anneling Buffer* de acordo com as recomendações do  
116 fabricante.

117 A análise da expressão dos genes SOD, CAT, GPx, UCP, COXIII, ANT, MDA, β-  
118 actina, GAPDH e HPRT1 foram realizadas utilizando-se a metodologia de RT-PCR em  
119 Tempo Real. Os *primers* utilizados para amplificação dos fragmentos dos genes estudados  
120 e dos controles endógenos foram desenhados por meio do programa *PrimerQuest*  
121 ([www.idtdna.com/Scitools/Applications/PrimerQuest](http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/PrimerQuest)) fornecido pela Integrated DNA  
122 Technologies Inc. (Coralville, IA) a partir de sequências de nucleotídeos obtidas do banco  
123 de dados do *GeneBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Os conjuntos de *primers* que foram  
124 utilizados podem ser visualizados na Tabela 3.

125 Tabela 3 - Sequências de nucleotídeos, tamanho do amplicon e temperatura de anelamento  
 126 dos *primers* utilizados para as reações de RT-PCR em Tempo Real.

Gene	Sequência de Oligonucleotídeos	Amplicon (pb)	TA (°C)
SOD (NM_205064)	F: AGATGGCAGTGGGAAATGAG R: ACTCAAGACAGCAGAGTAGTAATG	110	62
CAT (NM_001031215.1)	F: GAGGAACCCCTCAGACTCATTG R: CCATCAGGAATACCACGATCAC	117	62
ANT (AB088686)	F: TGTGGCTGGTGTGGTTTCCTA R: GCGTCCTGACTGCATCATCA	67	62
GPx (NM_001163232.2)	F: GGAGAGGGAGAAGGTGAAATG R: TGGCCACGTTGACAAAGA	137	62
UCP (AB088685)	F: TGTGGCTGGTGTGGTTTCCTA R: GCGTCCTGACTGCATCATCA	91	62
COX III (NP_006921)	F: AGGATTCTATTTACAGCCCTACAAG R: AGACGCTGTCAGCGATTGAGA	71	62
MDA (ACC# AB371640)	F: GAAGGACTGGTTCTCTCAGTTT R: CCTCTGTTCTCCTGTATTTCC	95	62
GAPDH (NM_204305)	F: AGATGCAGGTGCTGAGTATG R: CTGAGGGAGCTGAGATGATAAC	113	62
$\beta$ actina (NM_205518)	F: TCCCTGGAGAAGAGCTATGAA R: CAGGACTCCATACCCAAGAAAG	113	62
HPRT1 NM_204848.1	F: GTGATTGGCGATGATGAACAAG R: GCCATGAGGGATATAGACTTTC	97	62

127 SOD = Superóxido Dismutase, CAT = Catalase, ANT = Transportador de Nucleotídeos de  
 128 Adenina, GPx = Glutaciona peroxidase, UCP = Proteína Desacopladora, COX III =  
 129 Citocromo C Oxidase, MDA = Malondialdeído, GAPDH = Gliceraldeído-3-fosfato-  
 130 desidrogenase,  $\beta$  actina, HPRT1 = Hipoxantina-guanina Fosforibosiltransferase 1.  
 131

132 A detecção foi através do sistema GoTaq<sup>®</sup> qPCR Master Mix (Promega  
 133 Biotecnologia do Brasil LTDA), de acordo com o fabricante. Cada reação conteve os  
 134 seguintes componentes: 7,5  $\mu$ L de GoTaq qPCR Master Mix (tampão, Mix primer 10 uM,  
 135 ROX Reference Dye, H<sub>2</sub>O), concentrações estabelecidas de *primer* e de cDNA em um  
 136 volume final de 15  $\mu$ L. As reações foram efetuadas em termociclador *ABI Prism 7300*  
 137 *Sequence Detection Systems* (AppliedBiosystems, Foster City, C.A., EUA), a partir do  
 138 método de Quantificação Relativa. Três controles endógenos foram testados e o  $\beta$ -actina  
 139 foi selecionado como gene referência para normalização das amostras porque mostrou  
 140 maior eficiência e menos variação entre os tratamentos (dados não mostrados).

141 A medida em experimentos de RT - qPCR é expresso em ciclos até o limiar ( $C_t$ ) da  
 142 PCR, ou seja, o valor relativo que representa o número do ciclo em que a quantidade de  
 143 cDNA amplificada atinge o nível máximo. A eficiência de cada reação foi avaliada a fim

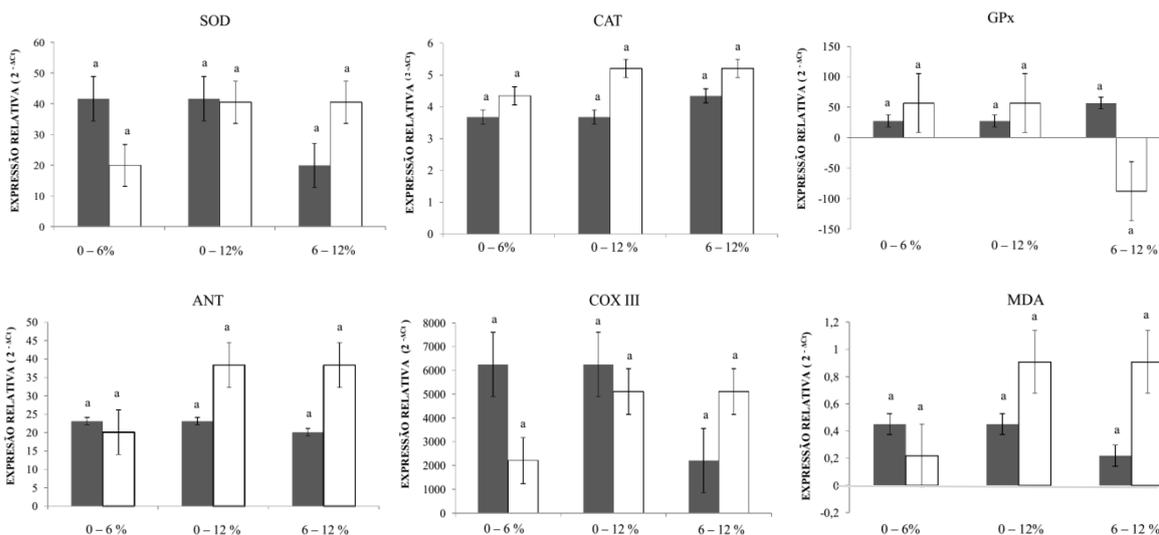
144 de escolher a melhor combinação de concentração de cDNA e de primer nas reações  
145 subsequentes. Uma vez que o *slope* da regressão linear foi estabelecido entre o *log* cDNA e  
146 o valor de  $C_t$  para cada concentração de primer, a eficiência da PCR ( $E$ ) foi calculada  
147 usando a fórmula  $E=10^{(-1/slope)}$ , para cada gene. Todas as reações foram feitas em  
148 duplicatas e o coeficiente de variação dos valores de  $C_t$  das replicatas dentro de cada  
149 amostra foi baixo, < 5%, indicando acurácia e reprodutibilidade aceitável.

150 A análise estatística dos dados de  $C_t$  foi realizada usando %QPCR\_MIXED macro  
151 SAS® ([https://www.msu.edu/~steibelj/JP\\_files/QPCR.html](https://www.msu.edu/~steibelj/JP_files/QPCR.html)) desenvolvida para gerar as  
152 rotinas no SAS PROC MIXED adequadas para analisar os dados de RT-qPCR, assumindo  
153 efeitos aleatórios independentes para os genes alvos e de referencia em cada réplica  
154 biológica (STEIBEL et al., 2009).

155 Os valores do *fold change* foram estimados com o método  $2^{-\Delta C_t}$  (PFAFFL, 2001;  
156 LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). Os  $\Delta C_t$  são estimativas de comparações dos valores de  
157  $C_t$  dos tratamentos para os genes alvos normalizados. A comparação dos valores de  $C_t$   
158 entre os tratamentos foi feita usando a função CONTRAST do proc GLM (software SAS)  
159 utilizando o teste t de Student ao nível de 5% de probabilidade. Vale ressaltar que quanto  
160 maior o valor de  $C_t$  significa menor expressão de transcritos de um gene específico para  
161 uma amostra específica relativa a outra.

## 162 **Resultados e discussão**

163 Não houve efeito significativo dos diferentes níveis de suplementação de glicerina  
164 sobre a expressão dos genes SOD, CAT, GPx, ANT, COX III e MDA, no músculo do  
165 peito, o que sugere que estes genes não sofreram alterações com a inclusão deste coproduto  
166 na alimentação (Figura 1).



167

168

169 **Figura 1.** Expressão do mRNA de Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT),  
 170 Glutaciona peroxidase (GPx), Transportador de Nucleotídeos de Adenina (ANT),  
 171 Citocromo C Oxidase (COX III) e Malondialdeído (MDA) no músculo de frangos de corte  
 172 suplementados com 0%, 6% e 12% de glicerina. Letras iguais indicam que não houveram  
 173 diferenças entre as médias dos contrastes, de acordo com o teste t de Student ( $P > 0,05$ ).

174

175

Os animais que consumiram dietas contendo 12% de glicerina tiveram maior  
 176 expressão gênica da UCP no músculo do peito quando comparado com aqueles das dietas  
 177 de 6% (Figura 2). Esse aumento pode estar relacionado com a quantidade de glicérol  
 178 (22,02%) presente na glicerina. De acordo com Nelson & Cox (2008), o glicérol ao ser  
 179 convertido em glicérol-3-fosfato, seria utilizado pelas mitocôndrias para produção de  
 180 energia através da fosforilação oxidativa. Nesse processo podem existir falhas na condução  
 181 de prótons do espaço intermembranoso para a matriz mitocondrial (BRAND et al., 1995) e  
 182 a UCP tem a função benéfica de reduzir a produção de radicais livres (MIAW et al., 2003)  
 183 promovendo uma via alternativa para translocação de prótons na síntese de ATP, gerado  
 184 pela cadeia respiratória (VIDAL-PUIG, 2000).

185

186

187

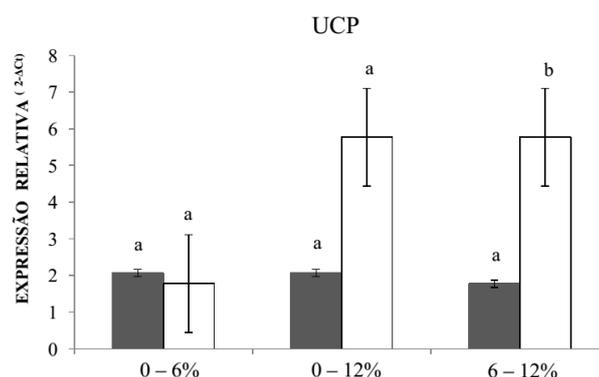
188

189

Entretanto, a produção excessiva pode conduzir potenciais danos oxidativos, provocando

190 perda de funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, que é prejudicial às células e  
191 tecidos (BARBOSA et al., 2010). Logo, o aumento percebido na expressão de UCP pode  
192 ter ocorrido para minimizar a síntese de radicais livres excedentes. Para Ojano-Diram et al.  
193 (2007) e Parker et al. (2008), uma ideal produção de radicais livres aumenta a eficiência  
194 mitocondrial que, conseqüentemente, potencializa a eficiência alimentar. Gasparino et al.  
195 (2012, 2014) também atribuíram à UCP uma relação com o desempenho das aves, uma vez  
196 que esta proteína aumenta a dissipação de energia pela oxidação da mitocôndria, como  
197 meio de manter a produção de ATP, pois uma diminuição pode conduzir a um aumento de  
198 catabolismo dos nutrientes.

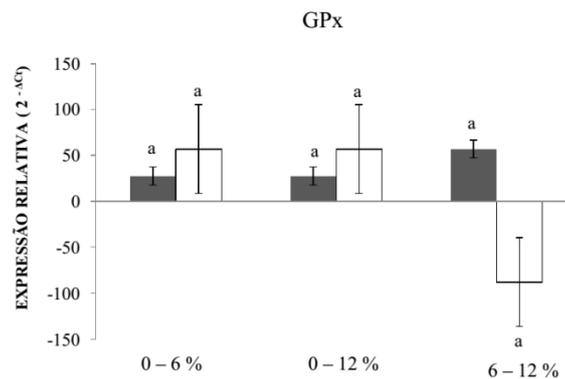
199 A UCP é expressa predominantemente no músculo esquelético (DRIDI et al., 2013)  
200 o que corrobora com o que foi observado neste trabalho, uma maior concentração de  
201 transcritos da UCP no músculo do que no fígado (Figura 2 e 4). Ao estudar a UCP em  
202 codornas, Silva et al. (2013) concluíram que a inclusão de 8% e 12% de glicerol na dieta  
203 alteram a expressão gênica dessa proteína nesses animais. Liu et al. (2007) afirmaram que  
204 o gene da UCP pode ser um *locus* candidato ou ligado a um gene principal que afeta o  
205 metabolismo do músculo e gordura em aves.



206 **Figura 2.** Expressão do mRNA da Proteína Desacopladora (UCP) no músculo de frangos  
207 de corte suplementados com 0%, 6% e 12% de glicerina. Letras iguais indicam que não  
208 houveram diferenças entre as médias dos contrastes, de acordo com o teste t de Student (P  
209 > 0,05).  
210

211  
212 No fígado, a expressão gênica do GPx em frangos de cortes suplementados com  
213 12% de glicerina apresentou um aumento significativo quando comparados com os animais

214 da dieta controle (Figura 3). A GPx faz parte do sistema de defesa do organismo, sendo  
 215 uma relevante enzima frente a substâncias nocivas formadas durante o metabolismo do  
 216 oxigênio, como peróxidos de hidrogênio e seus derivados convertendo-os em água ou  
 217 alcools (URSINI et al., 1994; ALBERTO et al., 2010). KOHRLE et al. (2000)  
 218 consideraram a GPx uma “enzima emergencial” responsável por prevenir os efeitos do  
 219 estresse oxidativo.



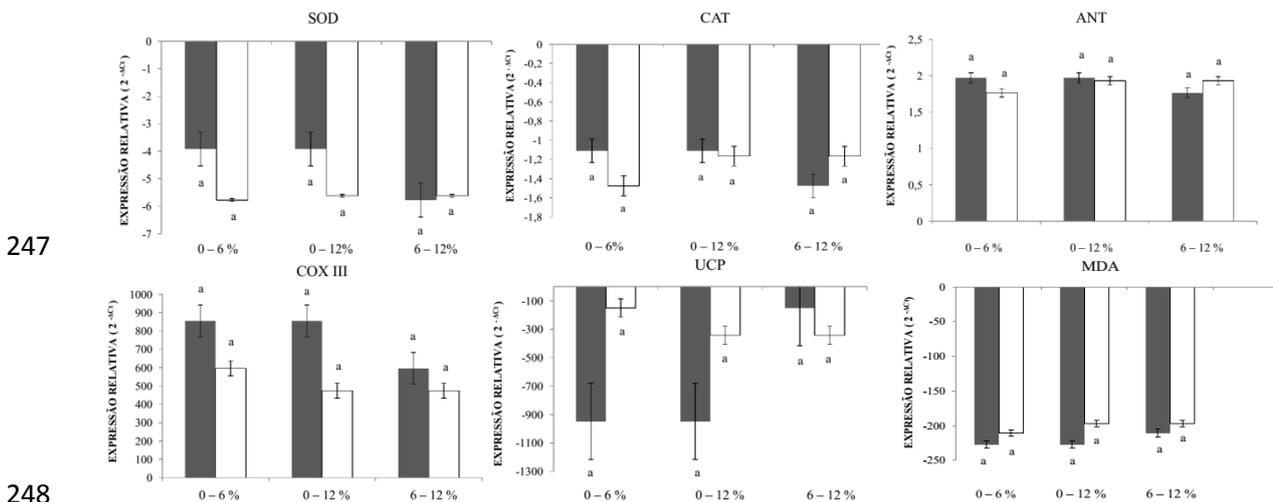
220 **Figura 3.** Expressão do mRNA de Glutathiona peroxidase (GPx) no fígado de frangos de  
 221 corte suplementados com 0%, 6% e 12% de glicerina. Letras iguais indicam que não  
 222 houveram diferenças entre as médias dos contrastes, de acordo com o teste t de Student ( $P$   
 223  $> 0,05$ ).  
 224

225  
 226 A glicerina é metabolizada, principalmente, no fígado e nos rins (STRYER et al.,  
 227 2008). Embora um de seus constituintes, o glicerol, seja altamente energético, a capacidade  
 228 de transformação enzimática deste no corpo é limitada e, quando o seu consumo excede  
 229 esta capacidade, ele pode não ser completamente metabolizado, aumentando assim os seus  
 230 níveis no sangue (ROBINSON & NEWSHOLME, 1969), proporcionando alterações  
 231 metabólicas desfavoráveis (ROMANO et al., 2014). Nesse sentido, é possível inferir que o  
 232 aumento da expressão de GPx no fígado ocorreu, para diminuir o estresse oxidativo  
 233 associado a atividade de peróxidos durante o metabolismo do oxigênio nas células deste  
 234 órgão.

235 Neste estudo não foram observadas alterações na expressão de SOD, CAT, ANT,  
 236 UCP, COX III e MDA no fígado pelos tratamentos avaliados (Figura 4). A GPx age  
 237 articuladamente com a CAT, impedindo o acúmulo de peróxidos de hidrogênio

238 (VINCENT et al. 2007; KOIVULA & EEVA, 2010). Entretanto, a expressão gênica da  
 239 CAT não foi suficiente para promover diferenças significativas de expressão entre os  
 240 tratamentos. Uma menor expressão de CAT do que GPx ocorreu porque esta última,  
 241 também tem a função de detoxicar os peróxidos lipídicos, transformando-os em  
 242 lipoálcoois, facilmente elimináveis (FELLENBERG & SPEISKY, 2006) o que pode ter  
 243 sido suficiente para não aumentar a expressão da CAT.

244 O que podemos observar é que alterações induzidas pelas dietas têm efeitos sobre a  
 245 função mitocondrial, além de genes de ação antioxidante, que pode depender de uma  
 246 variedade de fatores, incluindo tecido e tipo de alteração da dieta (BOTTJE et al., 2002).



248 **Figura 4.** Expressão do mRNA de Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT),  
 249 Transportador de Nucleotídeos de Adenina (ANT), Citocromo C Oxidase (COX III),  
 250 Proteína Desacopladora (UCP) e Malondialdeído (MDA) no fígado de frangos de corte  
 251 suplementados com 0%, 6% e 12% de glicerina. Letras iguais indicam que não houveram  
 252 diferenças entre as médias dos contrastes, de acordo com o teste t de Student ( $p > 0,05$ ).  
 253

## Conclusão

254

255           A inclusão de glicerina na dieta de frangos de corte ao nível de 12% aumenta a  
256 expressão de transcritos da Proteína desacopladora (UCP) no músculo peitoral e de  
257 Glutationa peroxidase (GPx) no fígado. Contudo ao nível de 6%, a expressão dos genes  
258 estudados não sofreram alterações, sugerindo que até essa quantidade é possível  
259 suplementar frangos de corte com glicerina sem que haja respostas metabólicas  
260 desfavoráveis.

## Referências Bibliográficas

- 261  
262 ALBERTO, E.; NASCIMENTO, V.; BRAGA, A. Catalytic application of selenium and  
263 tellurium compounds as glutathione peroxidase enzyme mimetics. **Jornal Brazilian of**  
264 **Chemics**. v.21, n.11, 2010.
- 265 ANTUNES, V. M.; LAZZARETTI, C.; GAMARO, G.D.; LIDEN, R. Estudo pré-analítico  
266 e de validação para determinação de malondialdeído em plasma humano por cromatografia  
267 de alta eficiência, após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina. **Brazilian Journal of**  
268 **Pharmaceutical Sciences**. v. 44, n. 2, 2008.
- 269 BARBOSA, K. B.; COSTA, N.M.; ALFENAS, R.C.; PAULA, S.G.; MINIM V.L.;  
270 BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista**  
271 **Nutrição**. v. 23, n. 4, 2010.
- 272 BOTTJE, W.G.; CARSTENS, G.E. Association of mitochondrial function and feed  
273 efficiency in poultry and livestock species. **Journal of Animal Science**. v.87, p.48-63,  
274 2009.
- 275 BOTTJE, W.Z; TANG, M; IQBAL, D.; CAWTHON R.; OKIMOTO, T.; WING, M.  
276 COOPER. Association of mitochondrial function with feed efficiency within a single  
277 genetic line of male broilers. **Poultry Science**. v.8, n.1, p.546-555. 2002.
- 278 BRAND, M.D.; CHIEN, L.F.; AINSCOW, E.K.; ROLFE, D.F.; PORTER, R.K. The  
279 causes and function of mitochondrial proton leak. **Biochemistry Biophysical Acta**, v.1187,  
280 p.132-139. 1995.

281 DEL VESCO, A.; GASPARINO E.; NETO, A. et. al. Effect of methionine  
282 supplementation on mitochondrial genes expression in the breast muscle and liver of  
283 broilers. **Livestock Science** v. 151, p.284–291, 2013.

284 DRIDI, S.; DECUYPERE, E.; BUYSE, J. Cerulenin upregulates heat shock protein-70  
285 gene expression in chicken muscle. **Poultry Science**, v. 92, p. 2745–2753, 2013.

286 DROGE, W. Free radicals on physiological control of cell function. **Physiol Review**, v. 82,  
287 n.1, p.47-95, 2002.

288 FELLEBERG, M. A.; SPEISKY, H. Antioxidants: their effects on broiler oxidative stress  
289 and its meat oxidative stability. **World's Poultry Science Journal**. v.62, 2006.

290 FIORE, C.; TREZEGUET, V.; LE SAUX, A.; ROUX, P.; SCHWIMMER, C.; DIANOUX,  
291 A.C.; VIGNAIS, P.V. The mitochondrial ADP/ATP carrier: structural, physiological and  
292 pathological aspects. **Biochimie**, v.80, n.2, p.137-150, 1998.

293 GASPARINO, E.; VOLTOLINI, D.M.; DEL VESCO, A.P.; MARCATO, S.M.;  
294 ZANCANELA, V.; GRIESER, D.O.; KHATLAB, A.S.; GUIMARÃES, S.E.F.; NETO,  
295 A.R.; Thermal stress induces changes in gene expression and blood parameters in high and  
296 low feed efficiency meat quail. **Animal Genetics**, 2014.

297 GASPARINO, E.; DEL VESCO, A.P.; GUIMARÃES, S.E.F.; SILVA, S.C.C.;  
298 MARCATO, S.M.; NETO, A.R.O.; SOUSA, K.R.S.; Age-related changes in  
299 mitochondrial UCP, ANT and COX III gene expression in the breast muscle of quails  
300 (*Coturnix coturnix japonica*), **Genetics and Molecular Research**, v. 11, n. 3, p. 1981-  
301 1989, 2012.

302 KOIVULA, M.J.; EEVA, T. Metal-related oxidative stress in birds. **Environmental**  
303 **pollution**, v.158, p.2359–2370, 2010.

304 KOHRLE, J.; BRIGELIUS-FLOHE, R; BOCK, A; GARTNER, R.; MEYER, O.; FLOHE,  
305 L. Selenium in biology: facts and medical perspectives. **Biology Chemistry**, v.381, p.849-  
306 864, 2000.

307 KUSSMANN, M.; RAYMOND, F.; AFFOLTER, M. Omics-driven biomarker discovery  
308 in nutrition and health. **Journal Biotechnology**, v.124. p. 758-787, 2006.

309 LAGE, J.F.; PAULINO, P.V.; PEREIRA, L.G.; VALADARES FILHO, S.D.; OLIVEIRA,  
310 A.S.; DETMANN, E.; LIMA, J.C. Glicerina bruta na dieta de cordeiros terminados em  
311 confinamentos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.45, nº 9, p.1012-1020, 2010.

312 LEDESMA, A.M.; DE LACOBIA, G.; RIAL, E. The mitochondrial uncoupling proteins.  
313 **Genome Biology**, v.3, p.1–9, 2002.

314 LIMA, E.M.; RODRIGUES, P.B.; ALVARENGA, R.R.; BERNARDINO, V.M.;  
315 MAKIYAMA, L.; LIMA, R.R.; ZANGERÔNIMO, M.G. The energy value of biodiesel  
316 glycerine products fed to broilers at different ages. **Journal of Animal Physiology and**  
317 **Animal Nutrition**, Berlin, v.5, n.10, p.1515-1520, 2012.

318 LIU, S., S.Z.; WANG, Z.H.; LI, H. L.I. Association of single nucleotide polymorphism of  
319 chicken uncoupling protein gene with muscle and fatness traits. **Jornal Animal**  
320 **Breeding Genetics**. v.124, p. 230–235, 2007.

321 LIVAK K.J.; SCHMITTGEN T.D. Analysis of relative gene expression data  
322 using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). **Methods**. v.25, p.402–408,  
323 2001.

324 MIWA, S.; ST-PIERRE, J.; PARTRIDGE, L.; BRAND, M.D. Superoxide and hydrogen  
325 peroxide production in Drosophila mitochondria. **Free Rad. Biological Medicine**. v.35,  
326 p.938-948. 2003.

327 NELSON, D.L.; COX, M.M. Lehninger Principles of Biochemistry. 5th ed. W.H.  
328 Freeman: New York, 2008. 1100p.

329 OJANO-DIRAIN, C.; M. IQBAL, D.; CAWTHON, S.; SWONGER, T.; WING, M.  
330 COOPER, W. BOTTJE. Determination of mitochondrial function and site-specific defects  
331 in electron transport in duodenal mitochondria in broilers with low and  
332 high feed efficiency. **Poultry Science**. 83:1394–1403. 2004.

333 PARKER, N.; AFFOURTIT, C.; VIDAL-PUIG, A.; BRAND, M. Energization-dependent  
334 endogenous activation of proton conductance in skeletal muscle mitochondria.  
335 **Biochem. Journal**, v. 412, p. 131-139. 2008.

336 PFAFFL M.W. A new mathematical model for relative quantification in  
337 real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Residual**. v. 29, p.2002–2007, 2001.

338 ROMANO, G.G.; MENTEN, J.F.; FREITAS, L.W.; LIMA, M.B.; PEREIRA, R.;  
339 ZAVARIZE, K.C.; DIAS, C.T. Effects of glycerol on the metabolism of broilers fed  
340 increasing glycerine levels. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**. v.16 n°.1, 2014.

341 ROVER JÚNIOR, L.; HOEHR, N.F.; KUBOTA, A.P. Sistema Antioxidante envolvendo o  
342 ciclo metabólico da glutathiona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do  
343 estresse oxidativo. **Química Nova**, v.24, p.112-119, 2001.

344 ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.; DONZELE, J.L.; GOMES, P.C.; OLIVEIRA, R.T.;  
345 LOPES, D.C.; EUCLIDES, R.F. **Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos. Composição**  
346 **de Alimentos e Exigências Nutricionais**. 3.Ed. Viçosa, MG: UFV, 2011. 254 p.

347 ROBINSON, J.; NEWSHOLME, A. The effects of dietary conditions and glycerol  
348 concentration on glycerol uptake by rat liver and kidney-cortex slices. **Journal of**  
349 **Biochemistry** V.112, nº4, p.449-453, 1969.

350 STEIBEL, J.P.; WYSOCKI, M.L.; RAMOS, A.M.; HU, Z.L.; ROTHSCCHILD, M.;  
351 ERNST, C.W.; Assessment of the swine protein-annotated oligonucleotide microarray.  
352 **Animal genetics**, v. 40, n. 6, p.883-893, 2009.

353 SILVA, S. C. et al. Expressão do mRNA de genes mitocondriais e desempenho produtivo  
354 de codornas alimentadas com glicerol. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.48, n.2,  
355 p.228-233, 2013.

356 STRYER, L.; TYMOCZKO J.L.; BERG, J.M. Bioquímica. 6ª ed. Rio de Janeiro:  
357 **Guanabara Koogan**, 2008.

358 URSINI, F. In: **Oxidative Processes and Antioxidants**; PAOLETTI, R. ed **Raven Press**:  
359 New York, p.25-31, 1994.

360 YOSHIKAWA, S.; MURAMOTO, K.; SHINZAWA-ITOH, K.; et al. "Proton pumping  
361 mechanism of bovine heart cytochrome c oxidase". **Biochim. Biophys. Acta**, p.9-10, 2006.

362 VINCENT, H.K.; INNES, K.E.; VINCENT, K.R. Oxidative stress and potential  
363 interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. **Diabetes Obesity and**  
364 **Metabolism**. v.9, n.6, p.813-839, 2007.

365 VIDAL-PUIG, A. J. Uncoupling expectations. **Natural Genetics**. v. 26, p. 387–388, 2000.

366 WALLACE, D. Mitochondrial diseases in man and mouse. **Science**. v.283, p.1482–1488,  
367 1999.

**CAPITULO 03. Inclusão do óleo de algodão na dieta de frango de corte nos níveis de expressão de enzimas antioxidantes**

Elaborada de acordo com as normas da Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria (<http://coral.ufsm.br/ccrrevista/>)

1 **Inclusão do óleo de algodão na dieta de frango de corte nos níveis de expressão de**  
2 **enzimas antioxidantes**

3 **Inclusion of cottonseed oil in broiler diet on levels of expression of antioxidant enzymes**

4 **Renan dos Santos Araújo<sup>(1)</sup> e Katiene Régia Silva Sousa<sup>(2)</sup>**

5 (2) Universidade Federal do Piauí – UFPI, Campus Prof<sup>a</sup> Cinobelina Elvas, CEP 64900-000 Bom Jesus, PI, Brasil.  
6 Email: renandosantossaraujo@gmail.com, katiregia@gmail.com

7 **Resumo**

8 O presente trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar a expressão gênica (mRNA) das  
9 enzimas antioxidantes: Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione peroxidase  
10 (GPx) e Malondialdeído (MDA) no intestino de frangos de corte aos 21 e 42 dias de idade,  
11 alimentados com dietas contendo níveis de 0%, 2%, 4% e 6% de óleo de algodão com e sem  
12 sulfato ferroso. O RNA total foi extraído do intestino e o cDNA amplificado. Com *primers*  
13 específicos para os genes SOD, CAT, GPx e MDA foi realizado a RT-PCR em tempo real,  
14 com o intercalante GoTaq<sup>®</sup> qPCR Master Mix e o endógeno usado foi o  $\beta$ -actina. Nos frangos  
15 de corte aos 21 dias de idade suplementados com óleo de algodão ao nível de 4% com sulfato  
16 ferroso percebeu-se um aumento na expressão da enzima GPx quando comparados com o  
17 nível de 6% com sulfato ferroso e quando comparados com o grupo de 4% sem sulfato  
18 ferroso; já nos animais aos 42 dias com dieta contendo 6% de óleo de algodão com sulfato  
19 ferroso houve maior expressão no gene SOD quando comparados ao nível de 2% com sulfato  
20 ferroso, enquanto ao analisar dentro do grupo sem sulfato ferroso comparando os níveis de  
21 4% e 6% observou-se aumento de expressão do gene MDA em 6%. Dentro dos níveis 2% e  
22 6% houve aumento na expressão do gene MDA quando não teve o acréscimo de sulfato. A  
23 inclusão de 4% de óleo de algodão com sulfato ferroso na alimentação de frangos de corte  
24 altera a expressão do gene antioxidante GPx no intestino aos 21 dias de idade e aos 42 dias a  
25 inclusão 6% de óleo de algodão com sulfato ferroso muda a expressão do gene SOD,  
26 enquanto 6% sem sulfato ferroso aumenta a expressão do gene MDA.

27 **Palavras-chave:** aves, gossipol, nutrigenômica e sulfato ferroso

28

### Abstract

29 This work was conducted with aim to evaluate the gene expression (mRNA) of antioxidant  
30 enzymes: Superoxide Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione peroxidase (GPx) and  
31 Melondyaldeido (MDA), in the intestine of broilers at 21 and 42 days of age, fed diets  
32 containing levels of 0%, 2%, 4% and 6% of cottonseed meal with and without ferrous sulfate.  
33 The total RNA was extracted from the intestine and the cDNA amplified. With specific  
34 primers for the genes SOD, CAT, GPx e MDA was performed RT-PCR in real time with the  
35 intercalator GoTaq<sup>®</sup> qPCR Master Mix, and the endogenous used was the  $\beta$ -actin. In broilers  
36 at 21 days of age supplemented with cottonseed oil the level of 4% with ferrous sulfate  
37 realized up an increase in the enzyme expression GPx when compared with the level of 6%  
38 with ferrous sulfate and compared with the group of 4% without ferrous sulfate; already in  
39 animals at 42 days with diet containing 6% of cottonseed oil with ferrous sulfate there was  
40 higher expression in the SOD gene when compared to the level of 2% with ferrous sulfate,  
41 while to analyze within the group without ferrous sulphate comparing the levels of 4% and  
42 6% was observed increased expression of the MDA gene in 6%. Within levels of 2% and 6%  
43 was increased the expression of the MDA gene when wasn't additioned the sulphate. The  
44 inclusion of 4% of cottonseed oil with ferrous sulphate in the feed of broilers alters the  
45 expression of the GPx antioxidant gene in the intestine at 21 days of age and at 42 days to  
46 include 6% cottonseed oil with ferrous sulfate changing the expression of the SOD gene,  
47 while 6% withot ferrous sulphate increases the MDA gene expression.

48 **Keywords:** birds, gossypol and ferrous sulfate, nutrigenomics

## Introdução

50 Entre os alimentos alternativos com potencial para utilização na alimentação animal  
51 estão os subprodutos da indústria algodoeira, com destaque ao farelo e ao óleo de algodão  
52 (PAIANO et al., 2014). Este subproduto possui o gossipol, que é um fator antinutricional e  
53 interfere no aproveitamento de elementos minerais, tais como cálcio, magnésio e zinco  
54 (MACEDO et al., 2007; BENEVIDES et al., 2011). Entretanto, o caráter tóxico do gossipol  
55 pode ser prevenido pelo acréscimo de sais de ferro à dieta, como sulfato ferroso, usado na  
56 proporção de 50% de cada (ferro/gossipol livre), uma vez que, a sua absorção é evitada no  
57 trato intestinal, por formar um aglomerado insolúvel e irreversível (MOREIRA et al., 2006).

58 O gossipol livre pode causar efeitos fisiológicos desfavoráveis, como diminuição do  
59 desempenho do animal, mas possui forte atividade antioxidante natural (YILDRIM et al.,  
60 2003; ZHENG et al., 2012), auxiliando na proteção do conteúdo celular e membranas  
61 subcelulares de danos oxidativos, levando a uma maior eficiência na produção de energia.

62 Para combater o dano oxidativo, as células têm desenvolvido um complexo sistema de  
63 defesa de moléculas reguladoras das reações de oxidorredução, antioxidantes não enzimáticos  
64 e enzimáticos que atuam em conjunto para minimizar os efeitos de espécies reativas de  
65 oxigênio (ROS) ou radicais livres no organismo (SILVEIRA, 2004). De acordo com Barbosa  
66 et al. (2010), as enzimas antioxidantes que constituem a principal defesa endógena aos  
67 ataques de ROS são: Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione peroxidase  
68 (GPx). Zheng et al. (2012) afirmam que além das enzimas antioxidantes, o malondialdeído  
69 (MDA) é um importante indicador de estresse oxidativo, que é um dos produtos finais da  
70 peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados, sendo também conhecido como marcador de  
71 estresse oxidativo e *status* antioxidante.

72 Estudar genes relacionados com a prevenção desses radicais livres é de suma  
73 importância, uma vez que na produção animal, a geração de radicais livres e peroxidação

74 lipídica são responsáveis pelo desenvolvimento de várias doenças, decréscimos na produção  
75 animal e qualidade do produto (SURAI, 2002). Por meio da nutrigenômica é possível  
76 relacionar a ação de nutrientes a funções biológicas consideradas fundamentais no  
77 metabolismo, associada a outros fatores inerentes ao ambiente e métodos de manejo,  
78 proporcionando uma melhoria no desempenho zootécnico de animais, bem como na  
79 rentabilidade econômica (GONÇALVES et al., 2009).

80 Deste modo, com a presente pesquisa objetivou-se avaliar a expressão gênica das  
81 enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx e MDA) no intestino de frangos de corte aos 21 e 42  
82 dias de idade, alimentados com dietas contendo diferentes níveis de óleo de algodão com ou  
83 sem sulfato ferroso.

## 84 **Material e Métodos.**

### 85 ***Animais e dietas utilizados***

86 O experimento foi conduzido no Módulo de Avicultura do Colégio Técnico da  
87 Universidade Federal do Piauí, *Campus* Prof<sup>a</sup> Cinobelina Elvas (Bom Jesus- PI).

88 O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com esquema fatorial 4x2,  
89 sendo quatro níveis de inclusão do farelo de algodão (0%, 2%, 4% e 6%) com ou sem  
90 suplementação de sulfato ferroso (heptahidratado) que foi incluído na dosagem de 1 kg/ton de  
91 acordo com Santos et al. (2009), e seis repetições de cinco aves cada.

92 As dietas experimentais foram formuladas considerando o valor energético do óleo  
93 com e sem o sulfato ferroso para atender as exigências nutricionais das aves nas fases de 21 e  
94 42 dias de idade (Tabela 1), além das exigências e composição química dos ingredientes,  
95 conforme descrito por Rostagno et al. (2011). A água e ração foram fornecidas *ad libitum*  
96 para os animais.

97 Durante todo o período experimental foi adotado um programa de luz contínuo (24  
98 horas de luz natural + artificial), utilizando-se lâmpadas incandescentes de 60W. A

99 temperatura e umidade relativa do ar no interior do galpão foram aferidas diariamente,  
100 durante todo o período experimental, por meio de termohigrômetros.

### 101 ***Extração do RNA total***

102 Foram abatidos 24 animais, ao final de cada fase, 21 e 42 dias de idade. Foram  
103 coletadas amostras de intestino de três animais/tratamento e depois armazenadas em micro  
104 tubos de 2 mL contendo RNA Holder (*BioAgency*) para manter a integridade do RNA total e,  
105 posteriormente, foram armazenadas em freezer -80°C até a extração do RNA.

106 No Laboratório de Biotecnologia Animal/UFV-MG (Labtec), o RNA total foi extraído  
107 de 100 mg do intestino utilizando-se o Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen, Carlsbad CA, USA), de acordo  
108 com as recomendações do fabricante. O Trizol foi adicionado ao tecido, foram misturados e  
109 triturados com o homogenizador eletrônico Polytron até a completa dissociação. Em seguida,  
110 200 µl de clorofórmio foram adicionados à amostra e misturados manualmente por 1 minuto.  
111 Depois, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 10.600 rpm a 4 °C. As fases  
112 aquosas foram coletadas e transferidas para microtubos estéreis contendo 600 µl de  
113 isopropanol e, mais uma vez, centrifugadas por 15 minutos a 4 °C. O volume adquirido foi  
114 colocado em uma coluna dentro de um tubo coletor de 2 mL, para ser realizado um *Clean up*  
115 no RNA e finalizar o processo de extração com o Kit RNAeasy<sup>®</sup> Micro (Qiagen, Vênio,  
116 Netherlands) de acordo com as recomendações do fabricante.

117 O RNA total isolado das amostras foi quantificado por espectrofotometria em aparelho  
118 *NanoVue Plus* (GEHealthcare, Munich, Germany) e a razão OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> esteve  
119 compreendida na faixa de pureza recomendável (1,8 – 2,1). A integridade do RNA foi  
120 verificada em gel de agarose 1,2%.

### 121 ***Síntese da primeira fita de cDNA***

122 A síntese da primeira fita do DNA complementar (cDNA) foi feita com o Kit *Go*  
123 *Script<sup>(TM)</sup> Reverse Transcription System* (Promega Biotecnologia do Brasil LTDA). As

124 reações foram feitas com o RNA de cada animal que continha 5 µg de RNA total, 1µL do  
125 *primer* oligo (dT)<sub>15</sub> 50µM e 1µL de *Anneling Buffer*. A reação foi incubada a 70°C por 5  
126 minutos e foi transferida para um recipiente com gelo por 1 minuto. Foi dado um *spin* nos  
127 tubos em microcentrífuga e, em seguida, foram adicionados os componentes do *Go Script*<sup>TM</sup>  
128 (Nuclease-Free Water, Reaction Buffer, MgCl<sub>2</sub>, PCR Nucleotide Mix, GoScript<sup>TM</sup> Reverse  
129 Transcriptase). A reação foi incubada a 50°C por 50 minutos, a 85°C por 5 minutos e resfriada  
130 no gelo. As concentrações de cDNA das amostras foram estimadas por espectrofotometria  
131 (*NanoVue Plus* – GE Healthcare), e o cDNA fita simples foi estocado a –20°C até o uso na  
132 reação de RT-qPCR em tempo real.

### 133 ***Confecção dos Sistemas de PCR em Tempo Real dos Genes***

134 A análise da expressão dos genes SOD, CAT, GPx e MDA foi realizada utilizando-se  
135 a metodologia de RT-PCR em Tempo Real. Os *primers* utilizados para amplificação dos  
136 fragmentos dos genes estudados e dos controles endógenos β-actina, GAPDH (gliceraldeído-  
137 3-fosfato-desidrogenase) e HPRT1 (Hipoxantina-guanina Fosforibosiltransferase 1) (Tabela  
138 2) que foram desenhados por meio do programa *PrimerQuest*  
139 ([www.idtdna.com/Scitools/Applications/PrimerQuest](http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/PrimerQuest)) fornecido pela Integrated DNA  
140 Technologies, Inc (Coralville, IA) a partir de sequências de nucleotídeos obtidas do banco de  
141 dados do *GeneBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

142 As reações foram efetuadas em termociclador *ABI Prism 7300 Sequence Detection*  
143 *Systems* (*AppliedBiosystems*, Foster City, C.A., EUA), a partir do método de Quantificação  
144 Relativa, utilizando como controle endógeno o gene da β-actina, pois foi o que mostrou maior  
145 eficiência e menos variação entre os tratamentos (dados não mostrados) e como detecção, o  
146 sistema *GoTaq*<sup>®</sup> *qPCR Master Mix* (Promega Biotecnologia do Brasil LTDA), de acordo  
147 com o fabricante. Cada reação conteve os seguintes componentes: 7,5 µL de *GoTaq qPCR*

148 Master Mix (tampão, Mix primer 10 uM, ROX Reference Dye, H<sub>2</sub>O), concentrações  
149 estabelecidas de *primer* e de cDNA em um volume final de 15 µL.

150 As condições de amplificação para todos os sistemas foram: 95°C durante 5 minutos,  
151 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos, anelamento e extensão a 60°C durante 60  
152 segundos. Ao final dos 40 ciclos de amplificação, um passo adicional com elevação gradual  
153 da temperatura de 60°C a 94°C foi utilizado para a obtenção da curva de dissociação. A  
154 análise da curva de dissociação permitiu verificar a ausência de produtos não específicos e/ou  
155 dímeros de *primers*.

156 A amplificação dos genes alvo e da referência endógena foi realizada em diferentes  
157 poços na mesma placa de reação. Os dados obtidos durante a reação de RT-PCR em Tempo  
158 Real, gerados pelo equipamento *ABI Prism 7300 Sequence Detection System*, foram  
159 exportados para arquivos de planilhas do tipo Excel para posterior análise estatística.

160 A medida em experimentos de RT-qPCR é expresso em ciclos até o limiar ( $C_t$ ) da  
161 PCR; o valor relativo que representa o número do ciclo em que a quantidade de cDNA  
162 amplificada atinge o nível máximo. A eficiência de cada reação foi avaliada a fim de escolher  
163 a melhor combinação de concentração de cDNA e de primer nas reações subsequentes. Uma  
164 vez que o *slope* da regressão linear foi estabelecido entre o *log* cDNA e o valor de  $C_t$  para  
165 cada concentração de primer, a eficiência da PCR ( $E$ ) foi calculada usando a fórmula  $E=10^{-1/\text{slope}}$ ,  
166 para cada gene. Todas as reações foram feitas em duplicatas e o coeficiente de variação  
167 dos valores de  $C_t$  das replicatas dentro de cada amostra foi baixo, < 5%, indicando acurácia e  
168 reprodutibilidade aceitável.

169 A análise estatística dos dados de  $C_t$  em cada nível de óleo de algodão foi realizada  
170 usando %QPCR\_MIXED macro SAS<sup>®</sup> ([https://www.msu.edu/~steibelj/JP files/QPCR.html](https://www.msu.edu/~steibelj/JP_files/QPCR.html))  
171 desenvolvida para gerar as rotinas no SAS PROC MIXED adequadas para analisar os dados

172 de RT-qPCR, assumindo efeitos aleatórios independentes para os genes alvos e de referencia  
173 em cada réplica biológica (STEIBEL et al., 2009).

174 Os valores do *fold change* foram estimados com o método  $2^{-\Delta C_t}$  (PFAFFL, 2001;  
175 LIVAK &SCHMITTGEN, 2001). O  $\Delta C_t$  são estimativas de comparações dos valores de  $C_t$   
176 dos tratamentos para os genes alvos normalizados. A comparação dos valores de  $C_t$  entre os  
177 tratamentos foi feita usando a função CONTRAST do proc GLM (software SAS) utilizando o  
178 teste t de Student ao nível de 5% de probabilidade.

179 Vale ressaltar que quanto maior o valor de  $C_t$  significa menor expressão de transcritos  
180 de um gene específico para uma amostra específica relativa a outra; valores negativos dos  
181 “estimates” indica o *fold change* positivo (mudança na expressão relativa) da primeira  
182 amostra comparada com a segunda (Apêndice 1).

## 183 **Resultados e Discussão**

### 184 ***Expressão gênica em frangos de corte aos 21 dias de idade***

185 Os resultados indicam que não houve diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) na expressão  
186 dos genes CAT, SOD e MDA em frangos de corte aos 21 dias de idade (Figura 1A - E). Esses  
187 dados mostram que a suplementação de frangos de corte até o nível de 6% de óleo de algodão  
188 com ou sem sulfato ferroso, não interfere na expressão destes genes antioxidantes no  
189 intestino.

190 Todavia, ao comparar os animais suplementados com óleo de algodão aos níveis de 4  
191 e 6% com sulfato ferroso aos 21 dias de idade, observou-se um efeito significativo ( $P < 0,05$  -  
192 Apêndice 1) na expressão gênica da Glutathiona Peroxidase (GPx), sendo maior a expressão no  
193 nível de 4% (Figura 1F) o que sugere que em concentrações elevadas de óleo de algodão com  
194 sulfato ferroso há uma redução da atividade desta enzima, possivelmente devido a formação  
195 excessiva de radicais livres, levando à uma depleção de enzimas antioxidantes, como a GPx  
196 (GROVER et al., 2010).

197 Dentre as funções da GPx está a capacidade de sequestrar radicais livres em excesso  
198 nas células e tecidos (STOCKER & KEANEY-JR, 2004). Além disso, a maior expressão de  
199 GPx pode estar associada a uma resposta pela quantidade de ferro na dieta. Pesquisa tem  
200 mostrado que estoques elevados de ferro nos tecidos apresentam a capacidade de levar à  
201 formação de radicais livres (SIAH, et al. 2006). Parece um paradoxo, pois se por um lado o  
202 ferro é um elemento indispensável para a célula, por outro, pode se tornar extremamente  
203 tóxico por conta do seu poder catalítico na formação de radicais livres de oxigênio (PORTO  
204 et al., 2012). A produção excessiva desses radicais pode conduzir potenciais danos oxidativos,  
205 provocando perda de funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, que é prejudicial às  
206 células e tecidos (BARBOSA, et al. 2010).

207 Para Eaton (1991), o sulfato ferroso nas dietas está relacionado à decomposição do  
208 peróxido de hidrogênio, um metabólito do oxigênio dependente de ferro, que tem sua  
209 toxicidade potencializada extraordinariamente na presença deste metal, que a reação resulta  
210 na formação de radicais hidroxilas ( $\text{OH}^+$ ) potencialmente capazes de reagir com os lipídeos da  
211 membrana das células. É importante salientar que a GPx, ao associar-se junto à outros agentes  
212 antioxidantes também tem a função de reduzir os efeitos destrutivos da peroxidação lipídica  
213 nas células vivas (PEHRSON, 1993; TAN, et al. 2010).

214 Seja pela indução à produção de ROS ou à reação a lipídeos nas células, a expressão  
215 de GPx tenha aumentada para diminuir o estresse oxidativo provocado pelo ferro demasiado  
216 presente na dieta. Esta hipótese é reforçada porque ao comparar a expressão gênica das aves  
217 que tiveram dieta com e sem sulfato ferroso dentro de cada nível de óleo de algodão foi  
218 possível observar uma diferença significativa ( $P < 0,05$ ) na expressão da GPx nos animais  
219 suplementados com 4% de óleo de algodão acrescentado sulfato ferroso (Figura 3A).

220 *Expressão gênica em frangos de corte aos 42 dias de idade*

221 Aos 42 dias de idade ao suplementar as aves com óleo de algodão sem sulfato ferroso  
222 houve um aumento na expressão do MDA quando comparado os níveis de 4 e 6% na  
223 suplementação ( $P < 0,05$ ), havendo maior expressão no nível de 6% sem sulfato ferroso  
224 (Figura 2F). Também percebemos que o MDA apresentou diferença significativa na  
225 expressão gênica quando se comparou o nível de óleo de algodão com e sem sulfato ferroso,  
226 onde as aves suplementadas sem sulfato ferroso tiveram maior expressão ao nível de 2% e 6%  
227 (Figura 3B).

228 Lord-Fortaine & Averill-Bates (2002) afirmaram que a nutrição animal pode  
229 prejudicar as funções das defesas antioxidantes e, portanto, modificar a resposta celular ao  
230 estresse oxidativo. Por conseguinte, um aumento de MDA reflete um ligeiro aumento do  
231 desequilíbrio entre as moléculas oxidantes e antioxidantes que resulta na indução de danos  
232 celulares pelos radicais livres (BIANCHI & ANTUNES, 1999). Nesse contexto, o aumento de  
233 MDA pode ser atribuído como consequência à resposta ao gossipol presente no suplemento,  
234 já que as moléculas deste composto induz o estresse mitocondrial, aumentando a  
235 permeabilidade da membrana (NAGALAKSHMI et al., 2007). O MDA é, segundo Tan et al.  
236 (2010), um relevante indicador da peroxidação lipídica e danos oxidativos no DNA e  
237 proteínas (grupos carbonilas e sulfidrilas). A peroxidação lipídica influencia na fluidez das  
238 membranas, provocando uma redução na seletividade no transporte de íons e na sinalização  
239 transmembrana, o que prejudica o transporte celular (SILVA & FERRARI, 2011). Dessa  
240 maneira, uma perfeita atividade dos complexos da cadeia respiratória é exigida para manter o  
241 sistema em equilíbrio (TENGAN et al., 1998).

242 Contudo, embora tenha existido um aumento na expressão de MDA nos animais  
243 suplementados com óleo de algodão sem sulfato ferroso é possível inferir que não houve

244 estresse oxidativo ao ponto de provocar um aumento significativo na expressão das enzimas  
245 antioxidantes CAT, GPx e SOD (Figuras 2A - F).

246 Nos frangos de corte suplementados ao nível de 6% de óleo de algodão com sulfato  
247 ferroso foi observado um aumento significativo na expressão da SOD (Figura 2E) quando  
248 comparadoas ao nível de inclusão de 2%. A proteína SOD é essencial para a sobrevivência  
249 das células aeróbias, pois é considerada a primeira barreira antioxidante, sendo responsável  
250 pela dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio, que é menos reativo e  
251 pode ser degradado por outras enzimas como a CAT e GPx (HALLIWELL &  
252 GUTTERIDGE, 2007; LODI et al., 2011). Porém, um aumento excessivo de peróxido de  
253 hidrogênio poderia provocar um dano oxidativo às células e uma deficiência na atividade da  
254 SOD tornando as células mais susceptíveis à ação deletéria dos radicais livres (VALDÍVIA et  
255 al. 2009). Nesse sentido, houve uma resposta compensatória da SOD contra o aumento do  
256 radical superóxido, o que possivelmente ocorreu pela adição do sulfato ferroso na dieta.

257 Não existem relatos anteriores na literatura sobre o efeito da inclusão do óleo de  
258 algodão nos níveis de expressão de transcritos de enzimas antioxidantes em frangos de corte,  
259 sendo os dados deste trabalho pioneiro e ponto de partida para novas pesquisas.

## 260 **Conclusão**

261 A inclusão de 4% de óleo de algodão com sulfato ferroso na alimentação de frangos de  
262 corte altera a expressão do gene antioxidante GPx no intestino de frangos de corte aos 21 dias  
263 de idade, não sendo necessário acrescentar o sulfato ferroso até esta fase de desenvolvimento.

264 Aos 42 dias de idade a inclusão de 6% de óleo de algodão sem sulfato ferroso altera a  
265 expressão do gene MDA e com o sulfato ferroso aumenta a expressão da SOD comparado ao  
266 nível de 2%. Assim sendo é opcional o sulfato ferroso no óleo de algodão nesta fase do  
267 desenvolvimento.

268

269

## Agradecimento

270 Os autores agradecem à Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado do Piauí – FAPEPI,  
271 pelo auxílio financeiro.

272

## Referências Bibliográficas

273

274 BARBOSA, B. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios.  
275 **Revista de Nutrição**. v 23, n.4, p. 629-643, 2010.

276 BENDER, H. S.; DEROLF, S. Z.; MISRA, H. P. Effects of gossypol on the antioxidant  
277 defense system of the rat testis. **Archives of Andrology**. v.21, n.1, p.59-70, 1988.

278 BENEVIDES, C.M. et al. Fatores antinutricionais em alimentos: revisão. **Segurança**  
279 **alimentar e nutricional**, v. 18, n. 2, p.67- 79, 2011.

280 BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais  
281 antioxidantes da dieta free radicals and the main dietary antioxidants. **Revista Nutrição**, v.  
282 12, n.2, p.123-130, 1999.

283 EATON, D.L. et al. Isolation, Molecular Cloning, and Partial Characterization of a Novel  
284 Carboxypeptidase **B** from Human Plasma. **Journal Biological Chemistry**, v. 266, n. 32,  
285 p.21833-21838,1991.

286 GONÇALVES, F.M. et al. Nutrigenômica: situações e perspectivas na alimentação animal.  
287 **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.104, p.569-572, 2009.

288 GROVER, Paramjit et al. Genotoxicity evaluation in workers occupationally exposed to lead.  
289 **International journal of hygiene and environmental health**, v. 213, n. 2, p. 99-106, 2010.

290 HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Antioxidant defences: endogenous and diet  
291 derived. In: HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radicals in Biology and  
292 Medicine. United States: Oxford University Press, 4 ed, 2007, p. 79-186.

293 LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-  
294 time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

295 LODI, S., SHARMA, V., KANSAL, L. The protective effect of *Rubia cordifolia* against  
296 lead nitrate-induced immune response impairment and kidney oxidative damage. **Indian**  
297 **Journal Pharmacological**. v.43, p.441-444, 2011.

298 MOREIRA, I. et al. Utilização do farelo de algodão, com ou sem a adição de ferro, na  
299 alimentação de leitões na fase inicial (15-30 Kg). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.3,  
300 p.1077-1084, 2006.

301 MACEDO, L.P. et al. Gossipol: Fator de resistência a insetos-praga. **Campo Dig.**, Campo  
302 Mourão, v.2, n.1, p.34-42, 2007.

303 NAGALAKSHMI, D. et al. Cottonseed meal in poultry diets. **Journal Poultry Science**. v.44,  
304 p.119-134, 2007.

305 PAIANO, D. et. al. Farelo de algodão na alimentação de suínos (30 - 90 kg). **Revista**  
306 **Brasileira de Saúde Produção Animal**, v.15, n.3, p.790-800, 2014.

307 PEHRSON, B.G. Selenium in nutrition with special, reference to the biopotency of organic  
308 and inorganic selenium compounds. In: BIOTECHNOLOGY IN FEED INDUSTRY, 1.,  
309 **Proceedings...** Altech, p. 71-89, 1993.

310 PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.  
311 **Nucleic acids research**, v. 29, n. 9, p. 45-45, 2001.

312 PORTO, G.; OLIVEIRA, S.; PINTO, J. P. Hpcidina: A Molécula-Chave na Regulação do  
313 Metabolismo do Ferro. **Jornal Português de Gastreterologia**, v. 19, n. 1, p. 26-32, 2012.

314 ROSTAGNO H.S. et al. **Tabelas Brasileira para aves e suínos: composição de alimentos e**  
315 **exigência nutricional**. 3 ed. Viçosa, MG: UNIVERSIDADE FEDERAL DE VOÇOSA,  
316 2011. 252p.

317 SAHIN, H. et al. Epigallocatechin-3-gallate prevents lipid peroxidation and enhances  
318 antioxidant defense system via modulating hepatic nuclear transcription factors in heat-  
319 stressed quails. **Poultry Science**, v.89, p. 2251–2258, 2010.

320 SIAH, C. et al. Normal iron metabolism and the pathophysiology of iron overload disorders.  
321 **Clinical Biochem Reviews**, 549 v. 27, 2006.

322 SANTOS, M. S. V. et al. Desempenho e qualidade dos ovos de poedeiras comerciais  
323 submetidas às dietas com diferentes óleos vegetais. **Revista Brasileira de Saúde Produção**  
324 **Animal**, v. 10, n. 3, p. 654-667, 2009.

325 SILVA, W. J. M.; FERRARI, C. K. B. Mitochondrial Metabolism, Free Radicals and Aging.  
326 **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 14, n.3, p.441-451, 2011.

327 SILVEIRA R. L. Considerações críticas e metodológicas na determinação de espécies  
328 reativas de oxigênio e nitrogênio em células musculares durante contrações. **Arquivo**  
329 **Brasileiro de Endocrinologia Metabólica**, v.48, nº6, p.812-22, 2004.

330 STEIBEL, J.P. et al. Assessment of the swine protein-annotated oligonucleotide microarray.  
331 **Animal genetics**, v. 40, n. 6, p. 883-893, 2009.

332 STEPHANIE LORD-FONTAINE, S.; AVERILL-BATES, D. A. Heat shock inactivates  
333 cellular antioxidant defenses against hydrogen peroxide: protection by glucose Free Radical,  
334 **Biology & Medicine**, v.32, n.8, p.752–765, 2002

335 STOKER, R.; KEANEY-JR, J. F. Role of oxidative modifications in atherosclerosis.  
336 **Physiological Review**, v. 84, p. 1381-1478.

337 SURAI, P.F. **Natural antioxidants in Avian nutrition and reproduction**. Nottingham  
338 University Press, Nottingham. 2002. 234p.

339 TAN, G.Y. et al. Effects of different acute high ambient temperatures on function of hepatic  
340 mitochondrial respiration, antioxidative enzymes, and oxidative injury in broiler chickens.  
341 **Poultry Scienc**i, v.89, p. 115–122, 2010.

342 TENGAN, C.H.; GABBAI, A.A.; MORAES, C.T. Deleções do DNA mitocondrial no  
343 envelhecimento: efeito da disfunção na fosforilação oxidativa. **Revista de Psiquiatria**  
344 **Clínica**, v.25, n.3, p.126-131, 1998.

345 VALDIVIA, A.; PÉREZ-ALVARES, S.; AROUCA-AGUILAR, J. D.; IKUTA, I.; JÓRDAN,  
346 J. Superoxide dismutase: a physiopharmacological update. *Jornal of physiology and*  
347 *biochemistry*, v. 65, n. 2, p. 195 -208, 2009.

348 YILDRIM, H. et al. Growth performance and immune response of channel catfish  
349 (*Ictalurus punctatus*) fed diets containing graded levels of gossypol–acetic acid. **Aquaculture**, v.  
350 219, p. 751–768, 2003

351 ZHANGA, W. et al. Influence of canthaxantina on broiler breeder reproduction chick quality,  
352 and performance. **Poultry Science**, v.90, p. 1516-1522, 2011.

353 ZHENG, Q. et al. Effect of replacing soybean meal with cottonseed meal on growth,  
354 hematology, antioxidant enzymes activity and expression for juvenile Grass carp,  
355 *Ctenopharyngodonidellus*. **Fish Physiology Biochemistry**, v.38, p.1059-1069, 2012.

**Tabela 01** - Composição centesimal das dietas experimentais para frangos de corte aos 21 e 42 dias de idade.

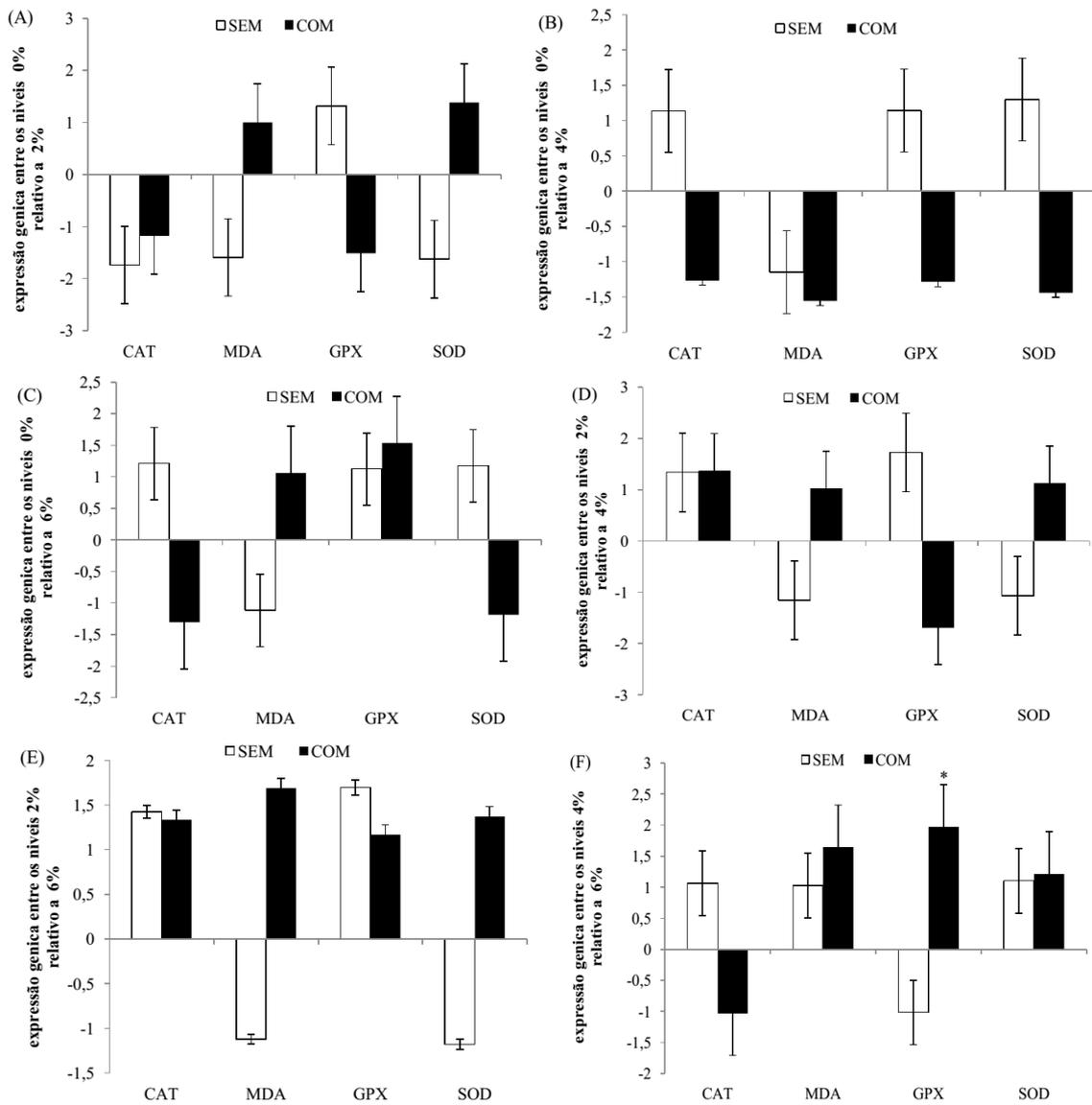
<b>Tratamentos aos 21 dias</b>								
<b>Ingrediente (%)</b>	<b>0%</b>	<b>2%</b>	<b>4%</b>	<b>6%</b>	<b>0% + SF</b>	<b>2% + SF</b>	<b>4% + SF</b>	<b>6% + SF</b>
Milho	65,334	62,110	56,958	51,805	65,230	61,752	56,241	50,729
Farelo de soja 48%	30,023	30,570	31,444	32,319	30,057	30,631	31,566	32,501
Fosfato bicálcico	1,474	1,477	1,483	1,488	1,474	1,478	1,483	1,489
Calcário	0,994	0,990	0,983	0,977	0,993	0,989	0,982	0,975
Óleo de soja	0,659	0,000	0,000	0,000	0,728	0,000	0,000	0,000
Sal comum	0,480	0,482	0,484	0,486	0,481	0,482	0,484	0,487
Supl. Vit.min. <sup>1</sup>	0,400	0,400	0,400	0,400	0,400	0,400	0,400	0,400
DL-metionina	0,271	0,274	0,278	0,283	0,271	0,274	0,279	0,284
L-lisina HCL	0,262	0,251	0,233	0,215	0,261	0,250	0,230	0,211
Inerte <sup>2</sup>	0,100	1,443	3,734	6,024	0,000	1,641	4,231	6,820
Óleo de algodão	0,000	2,000	4,000	6,000	0,000	2,000	4,000	6,000
Sulfato ferroso	0,000	0,000	0,000	0,000	0,100	0,100	0,100	0,100
<b>Total</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>
<b>Tratamentos aos 42 dias</b>								
<b>Ingrediente (%)</b>	<b>0%</b>	<b>2%</b>	<b>4%</b>	<b>6%</b>	<b>0% + SF</b>	<b>2% + SF</b>	<b>4% + SF</b>	<b>6% + SF</b>
Milho	71,089	69,640	64,487	59,335	71,089	69,281	63,770	58,259
Farelo de soja 48%	24,688	24,933	25,808	26,683	24,688	24,994	25,930	26,865
Fosfato bicálcico	1,016	1,018	1,023	1,029	1,232	1,018	1,023	1,029
Calcário	0,781	0,779	0,772	0,766	0,781	0,779	0,772	0,766
Óleo de soja	1,265	0,000	0,000	0,000	1,265	0,000	0,000	0,000
Sal comum	0,443	0,444	0,445	0,446	0,443	0,444	0,446	0,448
Supl. Vit.min. <sup>1</sup>	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200
DL-metionina	0,204	0,205	0,209	0,214	0,204	0,205	0,209	0,214
L-lisina HCL	0,213	0,208	0,190	0,172	0,213	0,208	0,188	0,168
Inerte <sup>2</sup>	0,100	0,572	2,862	5,153	0,000	0,770	3,359	5,948
Óleo de algodão	0,000	2,000	4,000	6,000	0,000	2,000	4,000	6,000
Sulfato ferroso	0,000	0,000	0,000	0,000	0,100	0,100	0,100	0,100
<b>Total</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>

<sup>1</sup>Níveis de garantia por kg do produto: ácido fólico – 200,00 mg; biotina - 10.000mg; clorohidroquinolina - 7500,00 mg; vitamina A – 1680000,00 UI; vitamina B1 – 436,50 mg; vitamina B12 - 2400,00 mcg; vitamina B2 – 1200,00 mg; vitamina B6 – 624,00 mg; vitamina D3 – 400000,00 UI; vitamina E - 3500,00 mg ; vitamina K 3 – 360,00 mg; niacina – 8400,00 mg; monensina sódica - 25000,00 mg; ácido pantotênico – 3119,00 mg; cloreto de colina – 80,710 mg; selênio -75,00 mg; sulfato de ferro 11,250 mg; monóxido de manganês – 18740,00 mg; sulfato de cobre - 1996,00 mg; iodo – 187,47mg; zinco – 17500,00 mg; <sup>2</sup>Inerte – areia;

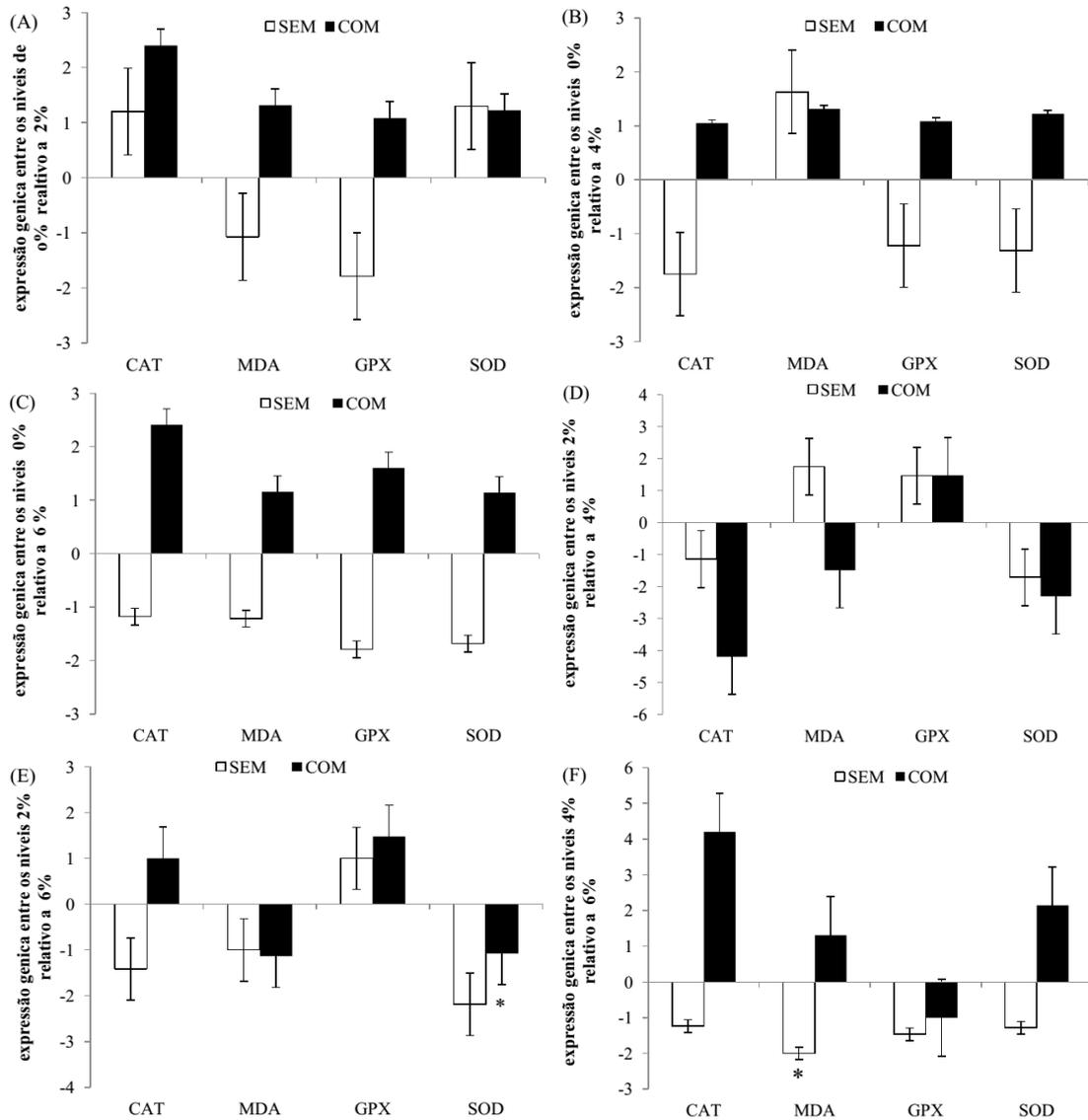
**Tabela 2** - Sequências de nucleotídeos, tamanho do amplicon e temperatura de anelamento dos *primers* utilizados para as reações de PCR em Tempo Real.

Gene	Sequência de Oligonucleotídeos	Amplicon (pb)	TA (°C)
SOD (NM_205064)	F: AGATGGCAGTGGGAAATGAG R: ACTCAAGACAGCAGAGTAGTAATG	110	62
CAT (NM_001031215.1)	F: GAGGAACCCTCAGACTCATTG R: CCATCAGGAATACCACGATCAC	117	62
GPx (NM_001163232.2)	F: GGAGAGGGAGAAGGTGAAATG R: TGGCCACGTTGACAAAGA	137	62
MDA (ACC# AB371640)	F: GAAGGACTGGTTCTCTCAGTTT R: CCTCTGTTCTCCTGTATTTCC	95	62
GAPDH (NM_204305)	F: AGATGCAGGTGCTGAGTATG R: CTGAGGGAGCTGAGATGATAAC	113	62
$\beta$ actina (NM_205518)	F: TCCCTGGAGAAGAGCTATGAA R: CAGGACTCCATACCCAAGAAAG	113	62
HPRT1 (NM_001032376)	F: TTGTGGTAGGCTATGCCCTTGACT R: ACTAAGCAGCTGGCCACAGAACTA	194	62

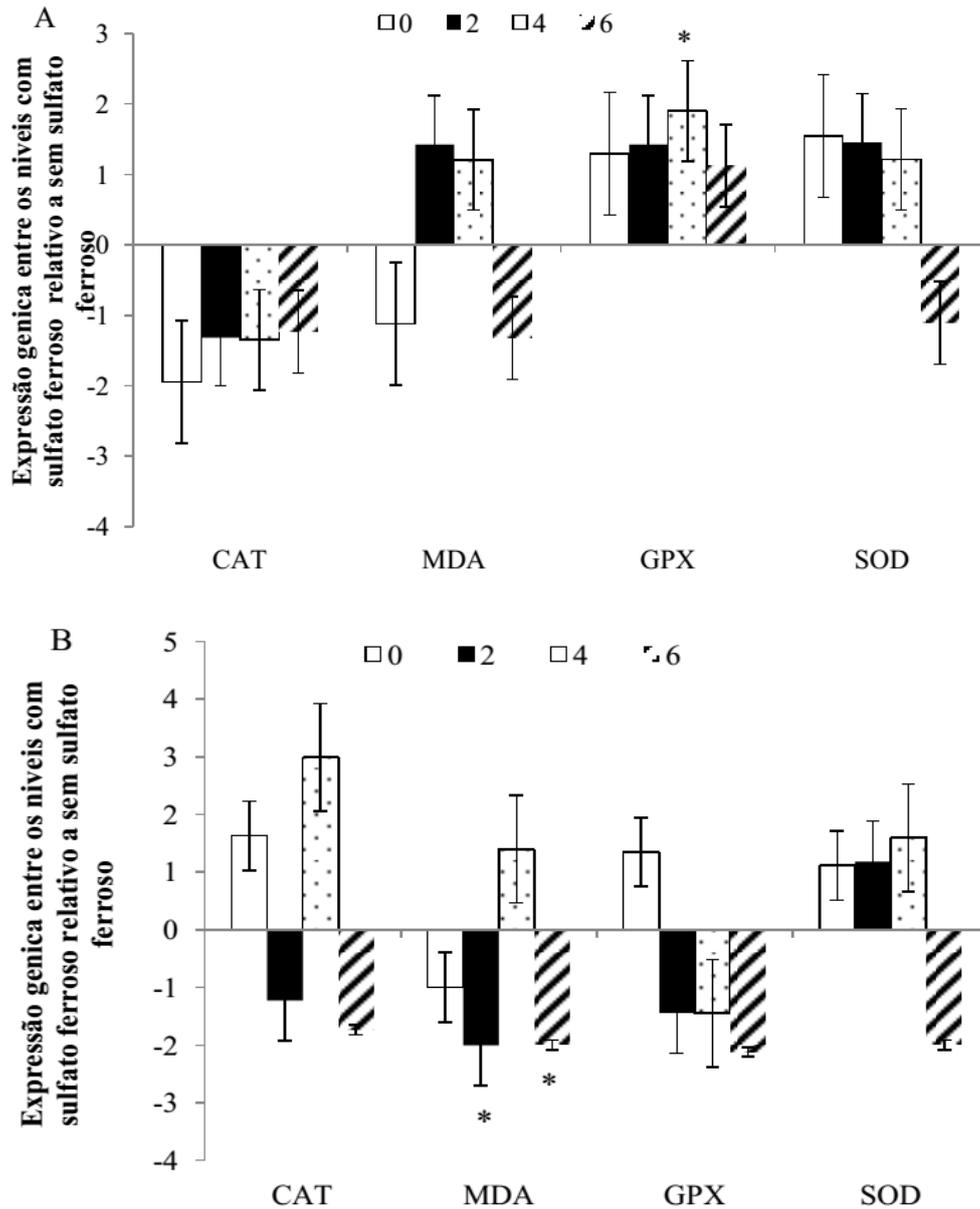
SOD = Superóxido Dismutase, CAT = Catalase, GPx = Glutathione peroxidase, MDA = Malondialdeído, GAPDH = Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase,  $\beta$  actina, HPRT1 = Hipoxantina-guanina Fosforibosiltransferase 1.



**Figura 1.** Expressão relativa (*fold change*) para os valores dos quatro genes entre os níveis 0% e 2% (A), 0% e 4% (B), 0% e 6% (C), ou entre 2% e 4% (D), ou entre 2% e 6% (E), ou entre os níveis de 4% e 6% (F), dentro de cada tratamento sem e com sulfato ferroso aos 21 dias. Barras acima da origem significa maior expressão no primeiro nível relativo ao segundo. \* $P < 0.05$ .



**Figura 2.** Expressão relativa (*fold change*) para os valores dos quatro genes entre os níveis 0% e 2% (A), 0% e 4% (B), 0% e 6% (C), ou entre 2% e 4% (D), ou entre 2% e 6% (E), ou entre os níveis de 4% e 6% (F), dentro de cada tratamento sem e com sulfato ferroso aos 42 dias. Barras acima da origem significa maior expressão no primeiro nível relativo ao segundo.  $*P < 0.05$ .



**Figura 3.** Expressão relativa (*fold change*) para os valores dos quatros genes dentro de cada nível 0%, 2%, 4% e 6%, dentro de cada tratamento com e sem sulfato ferroso aos 21 (A) e 42 (B) dias, respectivamente. Barras acima da origem significa maior expressão no primeiro nível relativo ao segundo. \* $P < 0.05$

**Apêndice 1.** Resultados da análise estatística para cada contraste entre tratamentos, incluindo a comparação da suplementação dentro de cada tratamento de óleo de algodão com e sem sulfato ferroso aos 21 e 42 dias.

<b>Tratamentos aos 21 dias</b>					
Contraste	Estimate	Fold change	Std Err	t-value	p-value
NO:0-2 SF=COM gene:CAT	0.7982	-1.7389	0.9604	0.83	0.4182
NO:0-4 SF=COM gene:CAT	0.3398	-1.2655	0.9604	0.35	0.7281
NO:0-6 SF=COM gene:CAT	0.3820	-1.3031	0.9604	0.40	0.6961
NO:2-4 SF=COM gene:CAT	-0.4583	1.3734	0.9604	-0.48	0.6397
NO:2-6 SF=COM gene:CAT	-0.4162	1.3344	0.9604	-0.43	0.6706
NO:4-6 SF=COM gene:CAT	0.04217	-1.0296	0.9604	0.04	0.9655
NO:0-2 SF=SEM gene:CAT	0.2353	-1.1771	0.9604	0.25	0.8095
NO:0-4 SF=SEM gene:CAT	-0.1852	1.1369	0.9604	-0.19	0.8495
NO:0-6 SF=SEM gene:CAT	-0.2755	1.2104	0.9604	-0.29	0.7779
NO:2-4 SF=SEM gene:CAT	-0.4205	1.3383	0.9604	-0.44	0.6674
NO:2-6 SF=SEM gene:CAT	-0.5108	1.4248	0.9604	-0.53	0.6021
NO:4-6 SF=SEM gene:CAT	-0.09033	1.0646	0.9604	-0.09	0.9262
SF:COM-SEM NO=0 gene:CAT	0.9595	-1.9446	0.9604	1.00	0.3326
SF:COM-SEM NO=2 gene:CAT	0.3967	-1.3164	0.9604	0.41	0.6851
SF:COM-SEM NO=4 gene:CAT	0.4345	-1.3514	0.9604	0.45	0.6570
SF:COM-SEM NO=6 gene:CAT	0.3020	-1.2328	0.9604	0.31	0.7572
NO:0-2 SF=COM gene:MDA	0.6707	-1.5918	0.6213	1.08	0.2964
NO:0-4 SF=COM gene:MDA	0.6350	-1.5529	0.6212	1.02	0.3220
NO:0-6 SF=COM gene:MDA	-0.08533	1.0609	0.6213	-0.14	0.8925
NO:2-4 SF=COM gene:MDA	-0.03567	1.0250	0.6213	-0.06	0.9549
NO:2-6 SF=COM gene:MDA	-0.7560	1.6888	0.6213	-1.22	0.2413
NO:4-6 SF=COM gene:MDA	-0.7203	1.6475	0.6213	-1.16	0.2633
NO:0-2 SF=SEM gene:MDA	-0.00283	1.0019	0.6213	-0.00	0.9964
NO:0-4 SF=SEM gene:MDA	0.1997	-1.1484	0.6213	0.32	0.7521
NO:0-6 SF=SEM gene:MDA	0.1603	-1.1175	0.6213	0.26	0.7997
NO:2-4 SF=SEM gene:MDA	0.2025	-1.1506	0.6213	0.33	0.7487
NO:2-6 SF=SEM gene:MDA	0.1632	-1.1197	0.6213	0.26	0.7962
NO:4-6 SF=SEM gene:MDA	-0.03933	1.0276	0.6213	-0.06	0.9503
SF:COM-SEM NO=0 gene:MDA	0.1620	-1.1188	0.6213	0.26	0.7976
SF:COM-SEM NO=2 gene:MDA	-0.5115	1.42555	0.6213	-0.82	0.4225
SF:COM-SEM NO=4 gene:MDA	-0.2733	1.2085	0.6213	-0.44	0.6659
SF:COM-SEM NO=6 gene:MDA	0.4077	-1.3265	0.6213	0.66	0.5211
NO:0-2 SF=COM gene:GPX	-0.3967	1.3164	0.4399	-0.90	0.3806
NO:0-4 SF=COM gene:GPX	0.3615	-1.2847	0.4399	0.82	0.4233
NO:0-6 SF=COM gene:GPX	-0.6203	1.5371	0.4399	-1.41	0.1776
NO:2-4 SF=COM gene:GPX	-0.2237	-1.6913	0.4399	1.72	0.1040
NO:2-6 SF=COM gene:GPX	-0.9818	1.1677	0.4399	-0.51	0.6181

NO:4-6 SF=COM gene:GPX	-0.9818	1.9749	0.4399	-2.23	0.0403
NO:0-2 SF=SEM gene:GPX	0.5952	-1.5106	0.4399	1.35	0.1948
NO:0-4 SF=SEM gene:GPX	-0.1903	1.1410	0.4399	-0.43	0.6710
NO:0-6 SF=SEM gene:GPX	-0.1670	1.1227	0.4399	-0.38	0.7092
NO:2-4 SF=SEM gene:GPX	-0.7855	1.7236	0.4399	-1.79	0.0931
NO:2-6 SF=SEM gene:GPX	-0.7622	1.6960	0.4399	-1.73	0.9584
NO:4-6 SF=SEM gene:GPX	0.02333	-1.0163	0.4399	0.05	0.9762
SF:COM-SEM NO=0 gene:GPX	-0.3715	1.2936	0.4399	-0.84	0.4108
SF:COM-SEM NO=2 gene:GPX	0.6203	-1.5371	0.4399	1.41	0.1735
SF:COM-SEM NO=4 gene:GPX	-0.9233	1.8964	0.4399	-2.10	0.0520
SF:COM-SEM NO=6 gene:GPX	0.08183	-1.0583	0.4399	0.19	0.8548
NO:0-2 SF=COM gene:SOD	0.7003	-1.6248	0.4902	1.43	0.1724
NO:0-4 SF=COM gene:SOD	0.5185	-1.4402	0.4902	1.07	0.2989
NO:0-6 SF=COM gene:SOD	0.2428	-1.1832	0.4902	0.50	0.6271
NO:2-4 SF=COM gene:SOD	-0.1818	1.1281	0.4902	-0.35	0.7273
NO:2-6 SF=COM gene:SOD	-0.4575	1.3731	0.4902	-0.93	0.3646
NO:4-6 SF=COM gene:SOD	-0.2757	1.2171	0.4902	-0.58	0.5711
NO:0-2 SF=SEM gene:SOD	-0.4685	1.3836	0.4902	-0.96	0.3535
NO:0-4 SF=SEM gene:SOD	-0.3750	1.2968	0.4902	-0.76	0.4554
NO:0-6 SF=SEM gene:SOD	-0.2307	1.1734	0.4902	-0.47	0.6443
NO:2-4 SF=SEM gene:SOD	0.09350	-1.0669	0.4902	0.19	0.8511
NO:2-6 SF=SEM gene:SOD	0.2378	-1.1791	0.4902	0.49	0.6342
NO:4-6 SF=SEM gene:SOD	0.1443	1.1051	0.4902	0.29	0.7722
SF:COM-SEM NO=0 gene:SOD	0.6252	1.5424	0.4902	1.28	0.2204
SF:COM-SEM NO=2 gene:SOD	-0.5437	1.4577	0.4902	-1.11	0.2838
SF:COM-SEM NO=4 gene:SOD	-0.2683	1.2110	0.4902	-0.56	0.5810
SF:COM-SEM NO=6 gene:SOD	0.1517	-1.1108	0.4902	0.31	0.7610

### Tratamentos aos 42 dias

NO:0-2 SF=COM gene:CAT	-1.2638	2.4012	1.0946	-1.15	0.2652
NO:0-4 SF=COM gene:CAT	0.8038	-1.7456	1.0946	0.73	0.4734
NO:0-6 SF=COM gene:CAT	-1.2682	2.4086	1.0946	-1.16	0.2636
NO:2-4 SF=COM gene:CAT	2.0677	-4.1921	1.0946	1.89	0.0772
NO:2-6 SF=COM gene:CAT	-0.00433	1.0030	1.0946	-0.00	0.9969
NO:4-6 SF=COM gene:CAT	-2.072	4.2046	1.0946	-1.89	0.0766
NO:0-2 SF=SEM gene:CAT	-0.2643	1.2010	1.0946	-0.24	0.8122
NO:0-4 SF=SEM gene:CAT	-0.0705	1.0500	1.0946	-0.06	0.9494
NO:0-6 SF=SEM gene:CAT	0.2347	-1.1766	1.0946	0.21	0.8330
NO:2-4 SF=SEM gene:CAT	0.1938	-1.1437	1.0946	0.18	0.8617
NO:2-6 SF=SEM gene:CAT	0.499	-1.4132	1.0946	0.46	0.6546
NO:4-6 SF=SEM gene:CAT	0.3052	-1.2355	1.0946	0.28	0.7840
SF:COM-SEM NO=0 gene:CAT	-0.7052	1.6303	1.0946	-0.64	0.5286
SF:COM-SEM NO=2 gene:CAT	0.2943	-1.2262	1.0946	0.27	0.7914

SF:COM-SEM NO=4 gene:CAT	-15.795	2.9886	1.0946	-1.44	0.1683
SF:COM-SEM NO=6 gene:CAT	0.7977	-1.7383	1.0946	0.73	0.4767
NO:0-2 SF=COM gene:MDA	-0.3957	1.3155	0.4123	-0.96	0.3515
NO:0-4 SF=COM gene:MDA	0.1785	-1.1317	0.4123	0.43	0.6708
NO:0-6 SF=COM gene:MDA	-0.2117	1.1580	0.4123	-0.51	0.6147
NO:2-4 SF=COM gene:MDA	0.5742	-1.4888	0.4123	1.39	0.1828
NO:2-6 SF=COM gene:MDA	0.1840	-1.1360	0.4123	0.45	0.6614
NO:4-6 SF=COM gene:MDA	-0.3902	1.3105	0.4123	-0.95	0.3581
NO:0-2 SF=SEM gene:MDA	0.1025	-1.0736	0.4123	0.25	0.8068
NO:0-4 SF=SEM gene:MDA	-0.7032	1.6281	0.4123	-1.71	0.1074
NO:0-6 SF=SEM gene:MDA	0.2828	-1.2165	0.4123	0.69	0.5025
NO:2-4 SF=SEM gene:MDA	-0.8057	1.7479	0.4123	-1.95	0.0684
NO:2-6 SF=SEM gene:MDA	0.1803	-1	0.4123	0.44	0.6677
NO:4-6 SF=SEM gene:MDA	0.9860	-2	0.4123	2.39	0.0294
SF:COM-SEM NO=0 gene:MDA	0.4007	-1	0.4123	0.97	0.3456
SF:COM-SEM NO=2 gene:MDA	0.8988	-2	0.4123	2.18	0.0445
SF:COM-SEM NO=4 gene:MDA	-0.4810	1.3957	0.4123	-1.17	0.2604
SF:COM-SEM NO=6 gene:MDA	0.8952	-2	0.4123	2.17	0.0453
NO:0-2 SF=COM gene:GPX	-0.1180	1.0852	0.5029	-0.23	0.8175
NO:0-4 SF=COM gene:GPX	-0.6810	1.6032	0.5029	-1.35	0.1945
NO:0-6 SF=COM gene:GPX	-0.6793	1.6013	0.5029	-1.35	0.1955
NO:2-4 SF=COM gene:GPX	-0.5630	1.4773	0.5029	-1.12	0.2794
NO:2-6 SF=COM gene:GPX	-0.5613	1.4755	0.5029	-1.12	0.2808
NO:4-6 SF=COM gene:GPX	0.0016	-1	0.5029	-0.00	0.9974
NO:0-2 SF=SEM gene:GPX	0.8398	-1.7898	0.5029	1.67	0.1144
NO:0-4 SF=SEM gene:GPX	0.2863	-1.2195	0.5029	0.57	0.5770
NO:0-6 SF=SEM gene:GPX	0.8382	-1.7878	0.5029	1.67	0.1150
NO:2-4 SF=SEM gene:GPX	-0.5535	1.4676	0.5029	-1.10	0.2873
NO:2-6 SF=SEM gene:GPX	-0.0016	1.0011	0.5029	-0.00	0.9974
NO:4-6 SF=SEM gene:GPX	0.5518	-1.4659	0.5029	1.10	0.2887
SF:COM-SEM NO=0 gene:GPX	-0.4293	1.3465	0.5029	-0.85	0.4058
SF:COM-SEM NO=2 gene:GPX	0.5285	-1.4424	0.5029	1.05	0.3089
SF:COM-SEM NO=4 gene:GPX	0.5380	-1.4519	0.5029	1.07	0.3006
SF:COM-SEM NO=6 gene:GPX	1.0882	-2.1260	0.5029	2.16	0.0459
NO:0-2 SF=COM gene:SOD	-0.2917	1.2240	0.5490	-0.53	0.6025
NO:0-4 SF=COM gene:SOD	0.9130	-1.8829	0.5490	1.66	0.1158
NO:0-6 SF=COM gene:SOD	-0.1888	1.1398	0.5490	-0.34	0.7354
NO:2-4 SF=COM gene:SOD	1.2047	-2.3048	0.5490	-0.35	0.7273
NO:2-6 SF=COM gene:SOD	0.1028	-1.0738	0.5490	0.19	0.8538
NO:4-6 SF=COM gene:SOD	-1.1018	2.1462	0.5490	-2.01	0.0620
NO:0-2 SF=SEM gene:SOD	-0.3803	1.3016	0.5490	-0.69	0.4984
NO:0-4 SF=SEM gene:SOD	0.3957	-1.3155	0.5490	0.72	0.4815

NO:0-6 SF=SEM gene:SOD	0.7507	-1.6826	0.5490	1.37	0.1904
NO:2-4 SF=SEM gene:SOD	0.7760	-1.7123	0.5490	1.41	0.1767
NO:2-6 SF=SEM gene:SOD	1.1310	-2.1901	0.5490	2.06	0.0560
NO:4-6 SF=SEM gene:SOD	0.3550	-1.2789	0.5490	0.65	0.5270
SF:COM-SEM NO=0 gene:SOD	-0.1530	1.1118	0.5490	-0.28	0.7841
SF:COM-SEM NO=2 gene:SOD	-0.2417	1.1823	0.5490	-0.44	0.6657
SF:COM-SEM NO=4 gene:SOD	-0.6703	1.5914	0.5490	-1.22	0.2398
SF:COM-SEM NO=6 gene:SOD	0.7865	-2	0.5490	1.43	0.1712

NO:0-2|SF=COM = nível 0 versus nível 2 de óleo de algodão com sulfato ferroso. NO:0-4|SF=COM = nível 0 versus nível 4 de óleo de algodão com sulfato ferroso. NO:0-6|SF=COM = nível 0 versus nível 6 de óleo de algodão com sulfato ferroso. NO:2-4|SF=COM = nível 2 versus nível 4 de óleo de algodão com sulfato ferroso. NO:2-6|SF=COM = nível 2 versus nível 6 de óleo de algodão com sulfato ferroso. NO:4-6|SF=COM = nível 4 versus nível 6 de óleo de algodão com sulfato ferroso. NO:0-2|SF=SEM = nível 0 versus nível 2 de óleo de algodão sem sulfato ferroso. NO:0-4|SF=SEM = nível 0 versus nível 4 de óleo de algodão sem sulfato ferroso. NO:0-6|SF=SEM = nível 0 versus nível 6 de óleo de algodão sem sulfato ferroso. NO:2-4|SF=SEM = nível 2 versus nível 4 de óleo de algodão sem sulfato ferroso. NO:2-6|SF=SEM = nível 2 versus nível 6 de óleo de algodão sem sulfato ferroso. NO:4-6|SF=SEM = nível 4 versus nível 6 de óleo de algodão sem sulfato ferroso. SF:COM-SEM|NO=0 = óleo de algodão com sulfato ferroso versus óleo de algodão sem sulfato ferroso no nível 0. SF:COM-SEM|NO=2 = óleo de algodão com sulfato ferroso versus óleo de algodão sem sulfato ferroso no nível 2. SF:COM-SEM|NO=4 = óleo de algodão com sulfato ferroso versus óleo de algodão sem sulfato ferroso no nível 4. SF:COM-SEM|NO=6 = óleo de algodão com sulfato ferroso versus óleo de algodão sem sulfato ferroso no nível 6. Os valores negativos de "estimates" indicam uma mudança positiva de expressão relativa, o que significa uma expressão elevada na primeira amostra relativamente à segunda amostra das comparações dos níveis de óleo de algodão com e sem sulfato ferroso. Os valores positivos de "estimates" indicam uma variação negativa na expressão relativa, o que significa menor expressão na primeira amostra relativamente à segunda amostra das comparações dos níveis de óleo de algodão com e sem sulfato ferroso.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A inclusão de glicerina na dieta de frangos de corte ao nível de 12% altera a expressão de mRNA da Proteína desacopladora (UCP) no músculo e de Glutathione peroxidase (GPx) no fígado aos 42 dias de idade.

A inclusão de óleo de algodão ao nível de 4% com sulfato ferroso na alimentação de frangos de corte altera a expressão do gene antioxidante GPx no intestino de frangos de corte aos 21 dias de idade.

A inclusão de óleo de algodão ao nível de 6% sem sulfato ferroso altera a expressão do gene MDA aos 42 dias de idade; e a inclusão de óleo de algodão ao nível de 6% com sulfato ferroso aumenta a expressão da SOD comparado ao nível de 2%.