

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

USO DE DIPEPTÍDEO DE METIONINA SOBRE A
MORFOMETRIA DO JEJUNO, PARÂMETROS
SANGUÍNEOS E OXIDATIVOS E EXPRESSÃO DE GENES
ASSOCIADOS AO TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS E
SISTEMA IMUNE EM FRANGOS DE CORTE DESAFIADOS
POR *EIMERIA* SPP.

Autora: Angélica de Souza Khatlab
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliane Gasparino
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Del Vesco

MARINGÁ
Estado do Paraná
abril - 2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

USO DE DIPEPTÍDEO DE METIONINA SOBRE A
MORFOMETRIA DO JEJUNO, PARÂMETROS
SANGUÍNEOS E OXIDATIVOS E EXPRESSÃO DE GENES
ASSOCIADOS AO TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS E
SISTEMA IMUNE EM FRANGOS DE CORTE DESAFIADOS
POR *EIMERIA* SPP.

Autora: Angélica de Souza Khatlab
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliane Gasparino
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Del Vesco

Tese apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTORA EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá - Área de Concentração Produção Animal

MARINGÁ
Estado do Paraná
abril – 2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

K45u Khatlab, Angélica de Souza
Uso de dipeptídeo de metionina sobre a morfometria do jejuno, parâmetros sanguíneos e oxidativos e expressão de genes associados ao transporte de aminoácidos e sistema imune em frangos de corte desafiados por *Eimeria* spp / Angélica de Souza Khatlab. -- Maringá, 2019.
165 f. : il. (algumas color.)

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliane Gasparino.
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Del Vesco.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2019.

1. Frango de corte - Doenças - Coccidiose. 2. Frango de corte - Metionina. 3. *Eimeria* spp. 4. Interferon gama. 5. Transportador de peptídeos. I. Gasparino, Eliane, orient. II. Del Vesco, Ana Paula. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. IV. Título.

CDD 23.ed. 636.5

Síntique Raquel de C. Eleuterio - CRB 9/1641



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

USO DE DIPEPTÍDEO DE METIONINA SOBRE A
MORFOMETRIA, PARAMETROS SANGUÍNEOS E
OXIDATIVOS E EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS AO
TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS, SISTEMA IMUNE EM
FRANGOS DE CORTE DESAFIADOS POR *EIMERIA* SPP.

Autora: Angélica de Souza Khatlab
Orientadora: Prof^ª Dr^ª Eliane Gasparino

TITULAÇÃO: Doutora em Zootecnia - Área de Concentração Produção
Animal

APROVADA em 15 de abril de 2019.

Prof^ª Dr^ª Márcia Aparecida
Andreazzi

Prof^ª Dr^ª Fernanda Losi Alves de
Almeida

Prof^ª Dr^ª Simara Márcia Marcato

Prof^ª Dr^ª Adriana Gonela

Prof^ª Dr^ª Eliane Gasparino
Orientadora

“Ainda que eu fale a língua dos homens
e dos anjos, se não tiver amor,
serei como o bronze que soa, ou como
o címbalo que retine.

Ainda que eu tenha o dom de profetizar
e conheça todos os mistérios e toda a ciência;
ainda que eu tenha tamanha fé a ponto
de transportar montanhas,
se não tiver amor nada serei.

Ainda que eu distribua todos os
meus bens entre os pobres
e ainda que entregue meu próprio
corpo para ser queimado,
se não tiver amor,
nada disso me aproveitará.”

Trecho da carta de São Paulo aos Coríntios

Aos meus pais, Aparecido de Souza Khatlab e Maria Fátima Khatlab, exemplos de fé, superação, esperança e pura sabedoria, que me ensinaram a trilhar por caminhos grandiosos. E que em meio a tantas dificuldades me incentivaram e proporcionaram a oportunidade de estudar e que de modo sábio agarrei com fé e força. Não há palavras que expressem minha eterna gratidão.

À minha avó, Maria Alves (*In memoriam*). Um ser espetacular, que sempre ficava imensamente feliz ao ver sua neta chegando tão longe, realizando sonhos que também eram dela. A minha eterna avó Maria, que tanto quis ver este momento, de ter uma neta doutora e não poder esperar. Essa conquista é para a senhora. Saudade eterna!

À incrível professora e amiga, Eliane Gasparino, para quem faltam palavras para expressar tamanha gratidão e carinho. Sem ela, a realização de mais esse sonho na minha vida não teria acontecido.

À grande professora e amiga, Ana Paula Del Vesco. Quisera eu traduzir em palavras o carinho que tenho por ela. O significado que ela tem na realização desse sonho.

Ao meu namorado, Teovan A. Sandes, por me incentivar e apoiar em todos os momentos!
Definir o amor não dá, então direi apenas obrigada!

DEDICO ESTE TRABALHO

AGRADECIMENTOS

A Deus, autor da minha vida, que me deu sabedoria e força para chegar até aqui.

Aos meus pais, por terem me dado à oportunidade de estudar. Obrigada por todo amor, confiança e por vocês terem investido em mim e nos meus estudos.

Aos meus irmãos, Isaac S. Khatlab e Fernanda S. Khatlab, por estarem sempre torcendo por mim. E ao meu amado sobrinho, Victor Hugo Khatlab Silva, que é a alegria de nossas vidas.

Ao meu namorado, Teovan A. Sandes, por se fazer presente mesmo estando tão longe, pelo amor, compreensão e por não me deixar desistir em cada vez que eu dizia que não seria possível. Obrigada, baby por fazer parte da minha vida.

À minha amada e inspiradora Professora Eliane Gasparino, minha eterna “prof” pelo exemplo de ser humano que é. Por toda ajuda, paciência, confiança, orientação, ensinamentos valiosos. Obrigada por ter me escolhido e por cuidar de mim não só como sua orientada, mas como sua amiga e filha. Obrigada, pelas risadas e, principalmente, por não desistir de mim. Obrigada por tudo, sempre.

À minha amada e inspiradora Professora Ana P. Del Vesco, que é parte da minha vida, por ter me aceitado como sua co-orientada, por me dar abrigo e carinho, por toda paciência,

conselhos, ensinamentos e por acreditar em mim!. Obrigada pela sua amizade, por você cuidar de mim como se fosse uma “filha” e por ser esse ser tão especial na minha vida.

Ao Adhemar R. de Oliveira Neto, meus sinceros agradecimentos pela ajuda de sempre, por me ensinar algo sempre que necessitava. Agradeço pela sua amizade. Você faz parte desta realização.

Ao grande amigo Pablo A. Guerra, pelas hospedagens e pelos passeios, por me adotar junto com a Paulinha, como “filha”. Com vocês me sinto em família. Enfim, agradeço a sua amizade e a força que você sempre me transmite.

Às minhas eternas amigas, Júlia Gasparino e Raiane Martinelli, por sempre me apoiarem em tudo. Vocês fazem a diferença na minha vida.

Aos amigos, Vittor Zancanella e Ranulfo C. Junior, pelos momentos de descontração, apoio, pela doação de reagente e por terem me ajudado nesta etapa.

À Universidade Estadual de Maringá e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (PPZ) em especial agradeço ao Prof. Ricardo Vasconcellos, coordenador do PPZ em exercício, ao Prof. Ferenc I. Bankuti vice-coordenador do PPZ, por tornar possível a conclusão deste projeto, e à secretaria Solange Iung (Sol), pela amizade, paciência e ajuda.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq - Brasil, pelo apoio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da UEM, pelos ensinamentos. Em especial, agradeço aos Professores: Simara M. Marcato, Maria Luiza Rodrigues e Paulo C. Pozza, pessoas que eu tanto admiro. Obrigada por vocês me ajudarem sempre, pelas palavras de incentivo e por transmitir seus conhecimentos de maneira tão sábia.

À Professora Fernanda Losi, por ter aberto as portas do seu laboratório para que as minhas análises histológicas fossem realizadas e pelas doações de reagentes. Obrigada, prof. pelo apoio e transmissão de tantos conhecimentos. Agradeço, também, às meninas do laboratório de histologia, Mariangela e Silvia, por terem me compreendido e terem facilitado o meu trabalho.

Aos funcionários da Fazenda Experimental de Iguatemi (UEM). Em especial, agradeço ao Anésio e Célio, por terem me dispensado àquela força no experimento a campo.

Ao Dr. Juan Solis, que forneceu o material necessário para o desenvolvimento desse trabalho, pela amizade, e pelas inúmeras explicações e ensinamentos tão valiosos.

À Fabiana C. Belchior Sousa, Jaisa Casetta e Vanessa Lewandowski, por terem me ajudado nas coletas. Obrigada meninas!

À amiga Cintia (COMCAP-UEM), por disponibilizar um dia ou até mesmo uma noite no COMCAP, para que eu pudesse fazer minhas análises. Obrigada pela amizade que nasceu neste período.

Ao Prof. Celso Nakamura e Cesar Lancheros, que me ensinaram pacientemente as técnicas de microscopia eletrônica de varredura e transmissão.

Aos Professores integrantes da banca de defesa, pelas valiosas sugestões que certamente enriqueceram o presente trabalho.

BIOGRAFIA

ANGÉLICA DE SOUZA KHATLAB, filha de Aparecido de Souza Khatlab e Maria Fátima Khatlab, nasceu em Maringá, Estado do Paraná, no dia 10 de dezembro de 1987.

Cursou graduação em Zootecnia na Universidade Estadual de Maringá, no período de 2009 a 2013.

Em março de 2014, iniciou o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, área de concentração Produção Animal - Melhoramento Genético Animal, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Eliane Gasparino e co-orientação do Prof. Dr. Paulo Cesar Pozza.

No dia 25 de fevereiro de 2016, submeteu-se à banca examinadora para a defesa de dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de mestre em Zootecnia.

Em março de 2016, dando continuidade a seus estudos, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, em nível de doutorado, área de concentração Produção Animal- Melhoramento Genético Animal, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Eliane Gasparino e co-orientação da Prof^a. Dr^a. Ana Paula Del Vesco.

No dia 04 de abril de 2019, submeteu-se à banca examinadora para o exame de qualificação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de doutora em Zootecnia.

No dia 15 de abril de 2019, submeteu-se à banca examinadora para a defesa de tese apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de doutora em Zootecnia.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
RESUMO.....	xviii
ABSTRACT.....	xxii
I. INTRODUÇÃO.....	26
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	28
1.0 Morfologia do intestino delgado.....	28
2.0 Digestão e absorção de nutrientes em frangos.....	34
2.1 Absorção de proteínas.....	36
2.2 Transportadores de pequenos peptídeos e aminoácidos livres.....	38
2.2.1 Transportador de peptídeos 1 PepT1 (SLC15A1).....	39
2.2.2 Transportador de aminoácidos neutros 1 dependente de sódio B ⁰ AT1 (SLC76A19).....	41
2.2.3 Transportador de aminoácidos catiônicos 1 (CAT-1) (SLC7A1).....	42
2.2.4 Transportador de aminoácidos 1 do sistema y ⁺ L, y ⁺ LAT1 (SLC7A7).....	43
2.3 Características do transporte de pequenos peptídeos e aminoácidos livres.....	44
3.0 Metionina: na forma livre (DL-Met) e de dipeptídeo (DL-MMet).....	46
3.1 Absorção e transporte da metionina na sua forma livre (DL-Met) e de dipeptídeo (DL-MMet).....	49
4.0 Coccidiose em frangos.....	50
4.1 Ciclo de vida das <i>Eimeria</i> spp.....	52
4.2 Efeitos das <i>Eimeria</i> spp. sobre as células intestinal.....	53
4.3 Resposta imune ao desafio por <i>Eimeria</i> spp. em frangos.....	54
5.0 Desafio por <i>Eimeria</i> spp. e a sua relação com a produção de radicais livres e os sistemas antioxidantes.....	58
6.0 Relação da metionina com a defesa antioxidante e o sistema imune.....	60

7.0	Desafio por <i>Eimeria</i> spp. e apoptose.....	62
8.0	Por que avaliar a suplementação de metionina (livre ou dipeptídeo) em dietas de frangos de corte em situações de desafio por <i>Eimeria</i> spp. ?.....	65
9.0	Objetivo da revisão de literatura.....	66
	REFERÊNCIAS	67
	III. OBJETIVOS GERAIS.....	83
	IV. DIETARY SUPPLEMENTATION WITH FREE METHIONINE OR METHIONINE DIPEPTIDE MITIGATES INTESTINAL OXIDATIVE STRESS INDUCED BY <i>EIMERIA</i> SPP. CHALLENGE IN BROILER CHICKENS.....	85
	Abstract	85
	Background	86
	Methods	87
	Results	96
	Discussion	107
	Conclusions	112
	Abbreviations	112
	Declarations	113
	Acknowledgements	114
	References	114
	V. SUPLEMENTAÇÃO DE DIPEPTÍDEO DE METIONINA MELHORA A SAÚDE INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE DESAFIADOS POR <i>EIMERIA</i> SPP.....	121
	RESUMO	121
	ABSTRACT	123
	INTRODUÇÃO	125
	MATERIAL E MÉTODOS	126
	RESULTADOS	137
	DISCUSSÃO	149
	CONFLITO DE INTERESSES	155
	LITERATURA CITADA	155
	VI. CONCLUSÕES GERAIS.....	165

LISTA DE TABELAS

	Página
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	28
Tabela 1 - Transportadores de peptídeos e aminoácidos utilizados neste estudo.....	39
IV. DIETARY SUPPLEMENTATION WITH FREE METHIONINE OR METHIONINE DIPEPTIDE MITIGATES INTESTINAL OXIDATIVE STRESS INDUCED BY <i>EIMERIA</i> SPP. CHALLENGE IN BROILER CHICKENS.....	85
Table 1 Composition of experimental diets, %, as is, fed to 10–20 day old broilers.....	88
Table 2 Calculated and analyzed nutrient composition, g/kg, as is, of experimental diets fed to 10–20 day old broilers.....	89
Table 3 Primer sequences used for RT-qPCR.....	95
Table 4 Performance of broilers 144 h post-inoculation with <i>Eimeria</i> spp.....	97
Table 5 Carbonylated protein, CP, total antioxidant capacity, TAC, and antioxidant enzyme activities in the jejunum of broilers 144 h post-inoculation with <i>Eimeria</i> spp.....	100
V. SUPLEMENTAÇÃO DE DIPEPTÍDEO DE METIONINA MELHORA A SAÚDE INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE DESAFIADOS POR <i>EIMERIA</i> SPP.....	121
Tabela 1. Composição das rações experimentais.....	128
Tabela 2. Composição nutricional analisada e calculada (g/kg), das rações experimentais.....	129
Tabela 3. Sequência dos genes utilizados nas reações de RT-qPCR.....	136
Tabela 4. Morfometria e área de superfície de absorção da mucosa do jejuno de frangos de corte 6 dpi.....	142
Tabela 5. Quantificação de células caliciformes neutras e ácidas, e quantificação de linfócitos intraepiteliais (LIEs) no jejuno de frangos de	

corte 6 dpi.....	144
Tabela 6. Expressão dos genes mucina (<i>MUC2</i>), caspase 3 (<i>CASP 3</i>) e linfoma de células B 2 (<i>BCL2</i>) no jejuno de frangos de corte 6 dpi.....	145
Tabela 7. Atividade das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e creatina quinase (CK), conteúdo de ácido úrico (AU) e creatinina (Cr) no plasma de frangos de corte 6 dpi.....	147
Tabela 8. Conteúdo de mucoproteínas (MUCO) e de proteínas totais (PT), e atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) no soro de frangos de corte 6 dpi.....	148

LISTA DE FIGURAS

	Página
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	28
Figura 1 - Imagem ilustrativa das camadas que compõem o intestino delgado (A), da cripta de Lieberkühn e sua composição celular (B) e da vilosidade intestinal (C).....	29
Figura 2 - Imagem ilustrativa da cripta de Lieberkühn e sua composição celular.....	30
Figura 3 - Transportadores de aminoácidos e peptídeos presentes na membrana apical e membrana basolateral dos enterócitos presentes no intestino delgado, abordados neste trabalho. AA ⁺ - aminoácidos catiônicos; AA ⁰ - aminoácidos neutros; B ⁰ AT1 – transportador de aminoácidos neutros 1; CAT-1 – transportador de aminoácidos catiônicos 1; NHE3 – trocador sódio hidrogênio isoforma 3; Pept1 – transportador de peptídeos 1; y ⁺ LAT1/4F2Fhc - transportador de aminoácidos neutros e catiônicos 1/proteína de membrana 4F2 de cadeia pesada.....	44
Figura 4 - Esquema de absorção do aminoácido metionina na sua forma livre (Met) e na forma de dipeptídeo (Met-Met) na membrana apical e basolateral do intestino delgado. AA ⁺ - aminoácidos catiônicos; AA ⁰ - aminoácidos neutros; ASCT2 - transportador de alanina, serina e cisteína; ATB ^{0,+} - transportador de aminoácidos ATB ^{0,+} ; B ⁰ AT1 – transportador de aminoácidos neutros 1; B ^{0,+} AT - transportador de aminoácidos neutros e catiônicos independente de Na ⁺ ; IMINO – transportador de iminoácido; LAT1/2 – transportador de grandes aminoácidos neutros subunidade 1 e 2; LAT4 – transportador de grandes aminoácidos neutros subunidade 4; PepT1 – transportador de peptídeos 1; SNAT1/2 – transportador de aminoácidos neutros 1/2 dependente de Na ⁺ ; y ⁺ LAT1 – transportador de aminoácidos neutros e catiônicos 1; Cl ⁻ - cloro; Cys – cisteína; Ile – isoleucina; Leu – leucina; Na ⁺ - sódio; Phe – fenilalanina; Pro -	

prolina.....	50
Figura 5 - Ciclo de vida biológico das <i>Eimeria</i> spp.....	53
IV. DIETARY SUPPLEMENTATION WITH FREE METHIONINE OR METHIONINE DIPEPTIDE MITIGATES INTESTINAL OXIDATIVE STRESS INDUCED BY EIMERIA SPP. CHALLENGE IN BROILER CHICKENS.....	85
Fig. 1 Oocysts detection in the feces of unchallenged, UC A and <i>Eimeria</i> -challenged, EC B broiler chickens 144 h post-inoculation (PI). C, D Histological images of duodenal villi and E, F jejunal villi in broiler chickens 144 h PI, 40× magnification. Note the presence of <i>Eimeria</i> structures (yellow arrows) in the duodenal and jejunal mucosa of EC broilers. E Intact jejunal villi in UC broilers. Hematoxylin-Eosin staining. A, B, C Scale bars represent 150 µm. D, E, F Scale bars represent 30 µm.....	96
Fig. 2 Effects of <i>Eimeria</i> spp. challenge A and methionine supplementation B on the relative weight of organs of broilers. Results are presented as mean and standard error. ^{a,b} Different letters represent significant differences between treatments by the Tukey test, <i>P</i> < 0.05. UC = unchallenged broilers; EC = <i>Eimeria</i> -challenged broilers; NS = non-supplemented diet; DL-Met = diet supplemented with free methionine; DL-MMet = diet supplemented with methionine dipeptide.....	99
Fig. 3 Expression of catalase, <i>CAT</i> and superoxide dismutase 1, <i>SOD1</i> genes in the jejunum of broiler chickens. Results are expressed as arbitrary units, AU, and are presented as mean and standard error. ^{a,b} Different letters represent significant differences between treatments by the Tukey test, <i>P</i> < 0.05. UC = unchallenged broilers; EC = <i>Eimeria</i> - challenged broilers. NS = non-supplemented diet; DL-Met = diet supplemented with free methionine; DL-MMet = diet supplemented with methionine dipeptide.....	101
Fig. 4 Effect of <i>Eimeria</i> spp. challenge and methionine supplementation on nitrite, NO ₂ ⁻ content and thiobarbituric acid reactive substances, TBARS content in the jejunum of broiler chickens 144 hours post- inoculation. Results are presented as mean and standard error. ^{a,b} Different letters represent significant differences by the Tukey test, <i>P</i> < 0.05. UC = unchallenged broilers; EC = <i>Eimeria</i> -challenged broilers; NS = non-supplemented diet; DL-Met = diet supplemented with free methionine; DL-MMet = diet supplemented with methionine dipeptide.....	102
Fig. 5 Effect of <i>Eimeria</i> spp. challenge A and methionine supplementation B on the expression of genes encoding <i>y</i> ⁺ <i>LAT-1</i> , <i>B</i> ⁰ <i>ATI</i> , <i>CAT - 1</i> , and <i>PEPT1</i> in the jejunum of broilers. Results are expressed as arbitrary units, AU, and are presented as mean and standard error. ^{a,b} Different letters represent significant differences between treatments by the Tukey test, <i>P</i> < 0.05. UC = unchallenged broilers; EC = <i>Eimeria</i> - challenged broilers. NS = non-supplemented diet; DL-Met = diet supplemented with free methionine; DL-MMet = diet supplemented with	

methionine dipeptide. y^+ *LAT-1* = neutral and cationic amino acid transporter 1 gene. *CAT - 1* = cationic amino acid transporter 1 gene; *B⁰ATI* = system B⁰ neutral amino acid transporter 1 gene; *PEPT1* = peptide transporter 1 gene..... 103

Fig. 6 Effect of *Eimeria* spp. challenge and methionine supplementation on the expression of genes encoding claudin-1, *CLDN1* and occludin, *OCLN* in the jejunum of broiler chickens 144 hours post-inoculation. Results are expressed as arbitrary units, AU, and are presented as mean and standard error. ^{a,b} Different letters represent significant differences between treatments by the Tukey test, *P* < 0.05. NS = non-supplemented diet; DL-Met = diet supplemented with free methionine; DL-MMet = diet supplemented with methionine dipeptide..... 104

Fig. 7 Expression of genes associated with the immune system in the jejunum of broilers 144 h post-inoculation with *Eimeria* spp. Results are expressed as arbitrary units, AU, and are presented as mean and standard error. ^{a,b} Different letters represent significant differences between treatments by the Tukey test, *P* < 0.05. UC = unchallenged broilers; EC = *Eimeria*-challenged broilers. *TLR2* = toll-like receptor 2 gene; *TLR5* = toll-like receptor 5 gene; *IL1B* = interleukin 1 beta gene; *IL2* = interleukin 2 gene; *LITAF* = lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha factor gene; *IFNG* = interferon gamma gene..... 105

Fig. 8 Effect of methionine supplementation on the expression of the toll-like receptor 2 gene, *TLR2*, toll-like receptor 5 gene, *TLR5*, interleukin 1 beta gene, *IL1B*, interleukin 2 gene, *IL2*, interferon gamma gene, *IFNG*, and lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha factor, *LITAF* gene in the jejunum of broiler chickens. Results are expressed as arbitrary units, AU, and are presented as mean and standard error. ^{a,b} Different letters represent significant differences between treatments by the Tukey test, *P* < 0.05. NS = non-supplemented diet; DL-Met = diet supplemented with free methionine; DL-MMet = diet supplemented with methionine dipeptide..... 106

Fig. 9 Effect of *Eimeria* spp. challenge and methionine supplementation on the expression of inducible nitric oxide synthase gene, *iNOS* in the jejunum of broilers 144 h post-inoculation. Results are expressed as arbitrary units, AU, and are presented as mean and standard error. UC = unchallenged broilers; EC = *Eimeria*-challenged broilers. NS = non-supplemented diet; DL-Met = diet supplemented with free methionine; DL-MMet = diet supplemented with methionine dipeptide..... 107

V. SUPLEMENTAÇÃO DE DIPEPTÍDEO DE METIONINA MELHORA A SAÚDE INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE DESAFIADOS POR *EIMERIA* SPP..... 121

Figura 1. (A) Representação das medidas da altura e largura dos vilos (seta dupla amarela), profundidade e largura da cripta (seta dupla verde), coloração Hematoxilina-Eosina, objetiva de 4×, barra = 150µm. (B) Medidas da altura do enterócito (seta dupla amarela) e da largura da lâmina própria (seta dupla verde), realizadas na mucosa do jejuno dos frangos de corte 6 dpi. Coloração Hematoxilina-Eosina, objetiva de 40×,

barra = 30µm.....	132
Figura 2. (A, B) Representação da contagem de células caliciformes neutras (cabeça de seta amarela) e ácidas (cabeça de seta preta), respectivamente. Objetiva de 10×, barra = 10 µm. (A) Coloração Ácido Periódico-Reativo de Schiff (contra corado com eosina). (B) Coloração Azul de Alcian (pH 2,5). (C) Contagem de linfócitos intraepiteliais (cabeça de seta verde), objetiva de 40×, barra = 30 µm, coloração Hematoxilina-Eosina.....	133
Figura 3. Imagens representativas da análise coprológica, demonstrando ausência de oocisto nas excretas das aves UC (A) e a presença de oocistos (cabeça de seta amarela) nas excretas das aves EC (B), 6 dpi. Objetiva de 40×, barra = 30 µm. (C) Representação de corte histológico do jejuno mostrando a morfologia preservada e integridade do vilos das aves UC. Objetiva de 40×, barra = 30 µm, coloração Hematoxilina-Eosina. (D) Imagem representativa do corte histológico de um vilos do jejuno do animal EC. Nota a presença de estruturas de <i>Eimeria</i> spp. (cabeça de seta verde) no enterócito do jejuno de frangos desafiados por <i>Eimeria</i> spp. 6 dpi. Objetiva de 40×, barra = 30 µm, coloração Hematoxilina-Eosina.....	138
Figura 4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV), transmissão (MET) e imagem histológica da mucosa do jejuno de frangos de corte 6 dias depois da inoculação (dpi) com oocistos esporulados de <i>Eimeria</i> spp. (A, B) MEV representativa do vilos do jejuno de animais EC, contendo oocisto não esporulado de <i>E. maxima</i> (seta amarela). (A) Magnificação 2000×, barra = 50 µm. (B) Magnificação 15000×, barra = 5 µm. (C) Representação de corte histológico da mucosa jejunal dos animais EC, evidenciando oocisto de <i>Eimeria maxima</i> no enterócito (seta amarela). Coloração Hematoxilina-Eosina, objetiva de 40×, barra = 30 µm. (D) MET do epitélio jejunal mostrando a ruptura da borda em escova e membrana apical do enterócito (seta vermelha). Magnificação de 10000×, barra = 1 µm.....	139
Figura 5. Efeitos do desafio por <i>Eimeria</i> spp. e da dieta sobre o consumo de ração (CR), ganho de peso (GP) e conversão alimentar (CA) de frangos de corte com 20 dias de idade. ^{a,b} Letras diferente significa medias diferentes pelos testes de t e tukey ($P < 0,05$). NS = dieta não suplementada; DL-Met = dieta suplementada com metionina forma livre (DL-metionina 99%); DL-MMet = dieta suplementada com dipeptídeo de metionina (DL-metionil-DL-metionina 95%).....	140
Figura 6. Efeitos do desafio por <i>Eimeria</i> spp. e dieta sobre a largura da lâmina própria do jejuno de frangos de corte com 20 dias de idade. ^{a,b} Letras diferentes significam médias diferentes pelos testes de t e Tukey ($P < 0,05$). UC = sem desafio; EC = desafio por <i>Eimeria</i> spp.; NS = dieta não suplementada com metionina; DL-Met = dieta suplementada com metionina na forma de aminoácido livre (DL-Metionina 99%); DL-MMet = dieta suplementada com dipeptídeo de metionina (DL-Metionil-DL-Metionina 95%).....	143
Figura 7. Efeitos do desafio por <i>Eimeria</i> spp. e da dieta sobre a	

expressão dos genes alvo mecanicista da rapamicina (*MTOR*) e proteína ribossomal quinase B1 (*RPS6KB1*) no jejuno de frangos de corte com 20 dias de idade. ^{a,b}Letras diferentes significam médias diferentes pelos testes de t e Tukey ($P < 0,05$). UC = sem desafio; EC = desafio por *Eimeria* spp.; NS = dieta não suplementada com metionina; DL-Met = dieta suplementada com metionina na forma de aminoácido livre (DL-Metionina 99%); DL-MMet = dieta suplementada com dipeptídeo de metionina (DL-Metionil-DL-Metionina 95%)..... 146

RESUMO

O crescimento do animal é dependente, de diversos fatores, dentre estes, a obtenção adequada de nutrientes pelo intestino, uma vez que, o máximo potencial de crescimento é limitado pela taxa de nutrientes disponíveis no organismo. A coccidiose é uma doença infecciosa comum na avicultura mundial, causada por protozoários do gênero *Eimeria*, e é caracterizada por causar vários danos no intestino delgado e ceco das aves, com prejuízos sobre os processos de digestão e absorção dos nutrientes, e por afetar o desempenho animal. O fornecimento de rações com nutrientes essenciais como, por exemplo, a metionina, quando suplementada em níveis adequados pode ser útil para aliviar os efeitos negativos produzidos por esses agentes patogênicos. Nesse sentido, este trabalho teve como principal objetivo avaliar os efeitos do desafio por *Eimeria* spp. e da suplementação de metionina na forma de aminoácido livre (DL-Met) e de dipeptídeo (DL-MMet) sobre o desempenho, peso relativo de órgãos, estado redox, expressão de genes envolvidos com o transporte de aminoácidos e peptídeos, genes envolvidos no sistema defesa antioxidante e imune, genes relacionados com a produção de mucina, apoptose e proliferação celular no jejuno, bem como parâmetros morfométricos do jejuno e parâmetros sanguíneos. Para isto, frangos de corte machos de 10 dias de idade, foram divididos em seis tratamentos referentes ao desafio por *Eimeria* spp. (aves desafiadas: EC; ou aves não desafiadas: UC) e suplementação de metionina (sem suplementação de metionina: NS, suplementação de metionina na forma de aminoácido livre: DL-Met, e suplementação de metionina na forma de dipeptídeo: DL-MMet). Aos 14 dias de idade, os animais pertencentes ao grupo

experimental EC receberam por via oral 1 mL de solução contendo oocistos esporulados de *Eimeria* spp. (*E. acervulina*, *E. maxima*, *E. praecox* e *E. mitis*). O restante dos animais (UC) receberam por via oral 1 mL de solução salina. Os animais foram abatidos por deslocamento cervical seis dias depois da inoculação (6 dpi), aos 20 dias de idade. **Capítulo IV:** Neste experimento, os frangos foram desafiados com quatro espécies de *Eimeria* (*E. acervulina*, *E. maxima*, *E. praecox* e *E. mitis*). Seis dias depois da inoculação, os animais foram abatidos e o jejuno foi coletado. Foi avaliado o desempenho dos animais, peso relativo dos órgãos, o estado redox do jejuno e a expressão de genes relacionados ao processo de absorção de aminoácidos e peptídeos, sistema antioxidante e imune no jejuno. Foi observado que os frangos EC apresentaram uma redução de 13% no consumo de ração, (CR), 37% de redução no ganho de peso (GP) e um aumento de 39% na taxa de conversão alimentar (CA). Com relação à suplementação de metionina, os frangos, consumindo a dieta DL-Met, apresentaram maior GP (aproximadamente 12% maior) e melhor CA (aproximadamente 12% menor), do que os frangos alimentados com a dieta NS. Frangos EC também apresentaram menor peso relativo da bursa de Fabricius (51,8%) e maiores pesos relativos do baço e do intestino total (delgado e grosso) (53,6% e 26,3%, respectivamente) do que os frangos UC. O desafio por *Eimeria* spp. causou um aumento nos níveis de nitrito e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no jejuno de frangos 6 dpi. Entre os frangos UC, aqueles, consumindo a dieta DL-Met, apresentaram maior capacidade antioxidante total (TAC) e menor atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD). Frangos EC, consumindo a dieta NS, também apresentaram maior teor de proteína carbonilada (CP) no jejuno 6 dpi. Adicionalmente, foi observado que os frangos alimentados com as dietas DL-Met e DL-MMet apresentaram menor teor de nitrito. O desafio por *Eimeria* spp. suprimiu a expressão dos genes catalase (*CAT*), superóxido dismutase 1 (*SOD1*), transportador de aminoácido neutros 1 (*B⁰ATI*), transportador de peptídeos 1 (*PEPT1*), receptor toll like 5 (*TLR5*), interleucina 2 (*IL2*), e ocludina (*OCLN*). O desafio por *Eimeria* spp. aumentou a expressão dos genes transportador de aminoácidos catiônicos 1 (*CAT - 1*) e interferon gama (*INFG*) no jejuno 6 dpi. O maior nível de expressão de *PEPT1* foi observado em frangos alimentados com a dieta DL-MMet, e o menor nível de expressão do *TLR5* foi observado em frangos consumindo a dieta NS. **Capítulo V:** Neste experimento, os frangos foram

desafiados com *Eimeria* spp. (*E. acervulina*, *E. maxima*, *E. praecox* e *E. mitis*), e seis dias depois da inoculação, os animais foram abatidos para a coleta de sangue e do jejuno. Foi avaliado o desempenho dos animais, a morfometria do jejuno, a quantificação de células caliciformes neutras e ácidas, e os linfócitos intraepiteliais (LIEs) no jejuno. Também foi avaliada no jejuno a expressão de genes relacionados à produção de mucina e genes envolvidos nas vias de apoptose e proliferação celular. Adicionalmente, foi avaliada a atividade das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e creatina quinase (CK), e o conteúdo de ácido úrico (AU) e creatinina (Cr) no plasma sanguíneo. No soro sanguíneo, foi avaliado o conteúdo de mucoproteínas (MUCO) e proteínas totais (PT). Foi observado que os animais desafiados por *Eimeria* spp. apresentaram pior desempenho independentemente da dieta consumida. Com relação à suplementação de metionina, os animais, recebendo a dieta DL-Met, apresentaram maior GP e menor CA. Os animais do grupo EC recebendo dieta NS, apresentaram vilosidades mais baixas e mais largas, com maior valor de profundidade de cripta, menor relação vilo:cripta, menor quantidade de células caliciformes neutras e menor expressão do gene mucina 2 (*MUC2*). Além disso, os animais EC, consumindo a dieta NS, apresentaram também a menor área de superfície de absorção do jejuno. Os animais EC, consumindo a dieta DL-MMet, apresentaram maior altura dos enterócitos, e também observamos que os animais EC apresentaram maior largura da lâmina própria que os animais UC. Houve efeito da dieta sobre a largura da lâmina própria: animais consumindo a dieta DL-MMet apresentaram menor valor de largura da lâmina própria. Animais UC, consumindo a dieta DL-Met, apresentaram maior quantidade de células caliciformes ácidas, e os animais EC, recebendo a dieta DL-MMet, apresentaram a maior quantidade de LIEs. Os animais EC apresentaram menor expressão dos genes caspase 3 (*CASP3*), linfoma de células B2 (*BCL2*), alvo mecanicista da rapamicina (*MTOR*) e proteína ribossomal quinase B1 (*RPS6KB1*) do que os animais UC. A atividade das enzimas AST e CK também foi influenciada pela presença do patógeno com maiores valores em animais EC e NS. Os animais EC apresentaram menor conteúdo de AU. A produção de MUCO foi maior nas aves EC, e o menor conteúdo de PT foi observado nas aves EC, consumindo a dieta DL-MMet. Em resumo, esses resultados confirmam que o desafio por *Eimeria* spp. prejudica o desempenho dos animais. Possivelmente, como consequência da indução da resposta imune e do estresse oxidativo,

que junto com a progressão da coccidiose, causa a destruição celular do jejuno, afetando negativamente a expressão de importantes genes que codificam proteínas transportadoras de nutrientes. A maior parte dos resultados são inéditos, e mostram que a suplementação com metionina como aminoácido livre ou dipeptídeo ajuda a proteger as células intestinais de frangos de corte sob condição de desafio por *Eimeria* spp., contra o dano oxidativo principalmente através da sua função antioxidante. Foi possível concluir ainda, que a suplementação de metionina na forma de dipeptídeo nas dietas de frangos, sobretudo em condições de desafios sanitários, poderia funcionar como um importante elemento capaz de manter a morfologia e função das células intestinais.

Palavras-chave: coccidiose, oxidação, transportador de peptídeos e aminoácidos livres, interferon gama

ABSTRACT

The growth of the animal is dependent of several factors, among them, the adequate obtaining of nutrients by the intestine, since, the maximum potential of growth is limited by the rate of available nutrients in the organism. Coccidiosis is a common infectious disease in poultry farming worldwide, caused by protozoa of the genus *Eimeria*, and it is characterized by causing various damages to the small intestine and cecum of birds, impairing the processes of digestion and absorption of nutrients, and by affecting performance animal. The provision of feed with essential nutrients such as methionine when supplemented at appropriate levels may be useful to alleviate the negative effects produced by such pathogens. In this sense, this work had as main objective to evaluate the effects of the challenge by *Eimeria* spp. and methionine supplementation in the form of free amino acid (DL-Met) and dipeptide (DL-MMet) on performance, relative weight of organs, redox state, expression of genes involved in the transport of amino acids and peptides, genes involved in the antioxidant and immune defense system, genes related to mucin production and cell proliferation in the jejunum, as well as morphometric parameters of the jejunum and blood parameters. For this, male broilers from 10 days of age were divided in six treatments related to the challenge by *Eimeria* spp. (challenged birds: EC, or unchallenged birds: UC), and methionine supplementation (non-supplemented: NS,

methionine supplementation in free amino acid form: DL-Met, and methionine supplementation in the form of dipeptide: DL-MMet). At 14 days of age the animals belonging to the experimental group EC received orally 1 mL of solution containing sporulated oocysts of *Eimeria* spp. (*E. acervulina*, *E. maximus*, *E. praecox* and *E. mitis*). The rest of the animals (UC) received orally 1 mL of saline solution. The animals were slaughtered by cervical dislocation six days after inoculation (6 dpi) at 20 days of age.

Chapter IV: In this experiment the broilers were challenged with four species of *Eimeria* (*E. acervulina*, *E. maxima*, *E. praecox* and *E. mitis*). Six days after inoculation the animals were slaughtered and the jejunum was collected. The performance of the animals, relative weight of organs, the redox state of the jejunum, and the expression of genes related to the process of amino acid and peptides absorption, antioxidant and immune system in the jejunum were evaluated. It was observed that EC chickens presented a 13% reduction in feed intake (FI), 37% reduction in body weight gain (BWG) and a 39% increase in feed conversion rate (FCR). With regard to methionine supplementation, chickens consuming the DL-Met diet presented higher WG (about 12% higher) and better FCR (about 12% lower) than chickens fed the NS diet. EC broilers also had lower relative weight of Fabricius bursa (51.8%), higher relative weights of the spleen and whole intestine (53.6% and 26.3%, respectively) than UC broilers. The challenge for *Eimeria* spp. caused an increase in the levels of nitrite and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in the chicken jejunum 6 dpi. Among the UC chickens, those consuming the DL-Met diet presented higher total antioxidant capacity (TAC) and lower activity of antioxidant catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) enzymes. EC chickens consuming the NS diet, also presented higher carbonylated protein (CP) content in the jejunum 6 dpi. Additionally, it was observed that the broilers fed the DL-Met and DL-MMet diets presented lower levels of nitrite. The challenge for *Eimeria* spp. suppressed the expression of the catalase (CAT), superoxide dismutase 1 (SOD1), neutral amino acid transporter (B^0AT1), peptide transporter 1 (PEPT1), toll like receptor 5 (TLR5), interleukin 2 (IL2), and occludin (OCLN) genes. The challenge for *Eimeria* spp. increased expression of the cationic amino acid 1 transporter (CAT - 1) and interferon gamma (INFG) genes in the jejunum 6 dpi. The highest level of PEPT1 expression was observed in broilers fed the DL-MMet diet, and the lowest level of TLR5 expression was observed in chickens consuming the NS diet. **Chapter**

V: In this experiment the chickens were challenged with *Eimeria* spp. (*E. acervulina*, *E. maxima*, *E. praecox* and *E. mitis*), and six days after inoculation the animals were slaughtered for blood and jejunum collection. The performance of the animals, jejunum morphometry, quantification of neutral and acidic goblet cells, and intraepithelial lymphocytes (LIEs) in the jejunum were evaluated. The expression of genes related to the production of mucin, and genes involved in apoptosis and cell proliferation pathways were also evaluated in the jejunum. Additionally the activity of the enzymes aspartate aminotransferase (AST) and creatine kinase (CK), and the content of uric acid (AU) and creatinine (Cr) in blood plasma were evaluated. In the blood serum the content of mucoproteins (MUCO) and total proteins (PT) were evaluated. It was observed that the animals challenged by *Eimeria* spp. presented worse performance independently of the diet consumed. With respect to methionine supplementation, animals receiving the DL-Met diet presented higher WG and lower FCR. The animals of the EC group receiving NS diet had lower and wider villi, with a greater value of crypt depth, lower villus:crypt ratio, less amount of neutral goblet cells and lower expression of the mucin gene 2 (*MUC2*). In addition, EC animals consuming the NS diet also had the smallest surface area of jejunum absorption. The EC animals consuming the DL-MMet diet showed higher height of the enterocytes, and we also observed that the EC animals showed a greater width of the lamina propria than the UC animals. There was diet effect on the width of the lamina propria: animals consuming the diet DL-MMet showed lower width value of the lamina propria. UC animals consuming the DL-Met diet presented higher amount of acidic goblet cells, and the EC animals receiving the DL-MMet diet had the highest number of LIEs. EC animals showed lower expression of caspase 3 (*CASP3*), B2-cell lymphoma (*BCL2*), mechanistic rapamycin target (*MTOR*) and ribosomal protein B1 (*RPS6KB1*) than UC animals. The activity of AST and CK enzymes was also influenced by the presence of the pathogen; with higher values in EC and NS animals. EC animals presented lower AU content. MUCO production was higher in EC birds, and lower PT content was observed in UC birds consuming the DL-MMet diet. In summary these results confirm that the challenge by *Eimeria* spp. impairs the performance of the animals. Possibly as a consequence of the induction of immune response and oxidative stress, which together with the progression of coccidiosis cause the cellular destruction of the jejunum, negatively

affecting the expression of important genes encoding nutrient transport proteins. Most of the results are unpublished, and show that methionine supplementation as a free or dipeptide amino acid helps to protect intestinal cells from broiler chickens challenged by *Eimeria* spp. against oxidative damage mainly through its antioxidant function. It was also possible to conclude that methionine supplementation in the dipeptide form in broiler diets, especially under conditions of health challenges, could function as an important element capable of maintaining the morphology and function of intestinal cells.

Keywords: coccidiosis, interferon gamma, oxidation, peptide and free amino acid transporter

I. INTRODUÇÃO

A cadeia de produção avícola é um dos setores do agronegócio brasileiro que mais cresce ao longo dos anos. De acordo com a Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA, 2018), em 2017 a produção de carne de frango foi de 13,05 milhões de toneladas, colocando o Brasil em uma posição privilegiada. Para chegar a este patamar e atender à alta demanda mercadológica, inúmeras mudanças neste setor foram realizadas ao longo dos anos (Schmidt e Silva, 2018). Dentre essas mudanças, está a utilização de tecnologias mais sofisticadas que reestruturaram as indústrias avícolas e o melhoramento genético que tornou os animais mais eficientes, permitindo que os mesmos produzam maior quantidade de carne em menor período de tempo (Martins et al., 2012).

Adicionalmente, melhorias na nutrição têm contribuído para a maior eficiência produtiva, permitindo que o animal expresse o seu máximo potencial genético de crescimento, em menor tempo e a um menor custo (Schmidt e Silva, 2018). Aliados a tais mudanças, as melhorias no manejo e sanidade também têm contribuído de maneira positiva para a produção (Rosário et al., 2008; Schmidt e Silva, 2018). Entretanto, para atender essa demanda, o sistema de produção é realizado em uma condição de alta densidade populacional de frangos, o que pode facilitar a propagação de agentes infecciosos (Pant et al., 2018).

A coccidiose é uma doença infecciosa comum na avicultura mundial, causada por protozoários do gênero *Eimeria* (Györke et al., 2016). Essa doença causa vários danos no intestino delgado e ceco das aves, com prejuízos diretos sobre os processos de digestão e

absorção dos nutrientes, além de facilitar a ocorrência de outras patologias, causando considerável redução na produtividade dos animais (Lillehoj et al., 2004). Embora inúmeros avanços na produção tenham sido obtidos, essa doença continua sendo um dos principais motivos de perda econômica neste setor, isso porque, essa doença é de difícil controle e se propaga de um animal para outro, principalmente através do contato com as fezes (Lillehoj et al., 2004).

O crescimento do animal é dependente, de diversos fatores, dentre esses, a obtenção adequada de nutrientes, uma vez que, o máximo potencial de crescimento é limitado pela taxa de nutrientes disponíveis no organismo (Maiorka, 2004). Assim, para que os alimentos sejam corretamente digeridos e os nutrientes possam ser absorvidos, a mucosa intestinal deve manter sua integridade, bem como preservar suas características estruturais morfológicas e funcionais (Awad et al., 2017). Além da coccidiose causar menor taxa de absorção de nutrientes, maior gasto de energia é necessário para a renovação das células intestinais (*turnover*), o que pode resultar em pior conversão alimentar, uma vez que parte dos nutrientes ingeridos e da energia obtida serão desviados para o reparo da mucosa intestinal (Maiorka, 2004).

Dessa forma, percebe-se que o desempenho das aves é orquestrado por muitos fatores que devem ocorrer de maneira totalmente integrada e coordenada, para atingir a máxima eficiência produtiva. Assim, fica evidente a necessidade de melhor compreender como o desafio por *Eimeria* spp. pode afetar o desempenho das aves, em função das modificações intestinais ocorridas, devido a mudanças estruturais e funcionais a nível bioquímico e molecular. Embora diversas pesquisas tenham sido realizadas para melhor entender como o desafio provocado pelas *Eimeria* spp., e como os aminoácidos podem influenciar a expressão de diferentes genes e a atividade de enzimas que governam as mais diversas rotas metabólicas, esses processos ainda não são totalmente conhecidos (Major e Ruff, 1978; Georgieva et al., 2006; Su et al., 2014; Tan et al., 2014; Gottardo et al., 2016; Miska e Fetterer, 2018).

Até o presente momento, não existem dados na literatura sobre os efeitos do uso de dipeptídeo de metionina em frangos de corte desafiados por *Eimeria* spp. Sendo assim, este trabalho visou explorar os possíveis efeitos da suplementação de metionina, na forma de aminoácido livre e de dipeptídeo, em frangos de corte desafiados por *Eimeria* spp. Para

atingir esse objetivo, foram analisados parâmetros relacionados ao desempenho animal, peso relativo de órgãos, a atividade das enzimas do sistema antioxidante, produção de biomarcadores do estresse oxidativo, parâmetros sanguíneos, morfometria do jejuno, e a expressão de genes relacionados ao transporte de aminoácidos e pequenos peptídeos, sistema imune e antioxidante, bem como os genes relacionados com a produção de muco, e aqueles envolvidos no mecanismo de apoptose e proliferação celular, no jejuno de frangos de corte seis dias depois da inoculação dos oocistos esporulados de *Eimeria* spp.

II. REVISÃO DE LITERATURA

1.0. Morfologia do intestino delgado

O intestino delgado é formado por três porções denominadas de duodeno, jejuno e íleo, que são histologicamente semelhantes (Junqueira e Carneiro, 2017). Este órgão é o responsável pela digestão final dos alimentos e pela absorção dos nutrientes (Artoni et al., 2014), sendo de vital importância, uma vez que o mesmo se constitui na via de entrada dos nutrientes para os processos metabólicos dos animais (Okumura e Takeda, 2017). A parede do intestino delgado é formada por quatro camadas denominadas de mucosa, submucosa, muscular externa e serosa (Junqueira e Carneiro, 2017) (Figura 1A). O revestimento do intestino delgado apresenta pregas denominadas de *plicae circularis*, que são dobras da mucosa e submucosa, em forma semilunar, circular ou espiral (Junqueira e Carneiro, 2017).

A mucosa é a camada mais interna deste órgão e apresenta vilosidades que são projeções alongadas, em direção ao lúmen intestinal, formadas por epitélio de revestimento do tipo colunar simples e lâmina própria (Eurell e Frappier, 2012) (Figura 1B). O epitélio de revestimento das vilosidades é formado pelos enterócitos (células absorptivas) e células caliciformes (Junqueira e Carneiro, 2017).

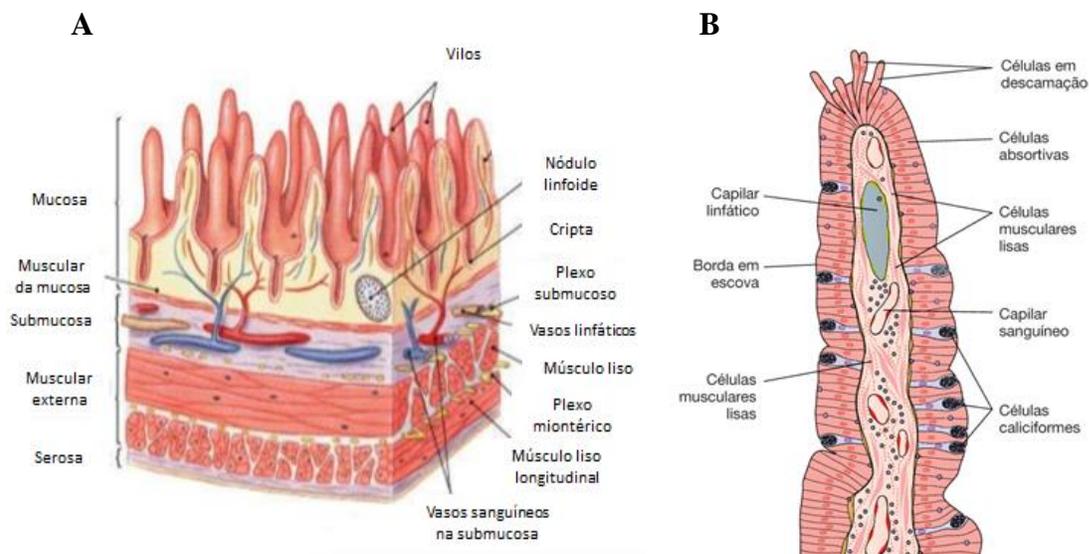


Figura 1 - Imagem ilustrativa das camadas que compõem o intestino delgado (**A**) e da vilosidade intestinal (**B**). (Fonte: Arackal, 2016; Junqueira e Carneiro, 2017).

O eixo central das vilosidades é preenchido pela lâmina própria que é composta por tecido conjuntivo frouxo, contendo vasos sanguíneos e linfáticos, leucócitos, plasmócitos, mastócitos, fibras nervosas, fibras musculares lisas dispostas no sentido vertical e tecido linfoide (Eurell e Frappier, 2012; Junqueira e Carneiro, 2017). Entre as vilosidades, encontram-se as glândulas intestinais, também chamadas de criptas de Lieberkühn, que são tubulares simples, auto renováveis e com alta atividade mitótica (Junqueira e Carneiro, 2017). As criptas são formadas por cinco tipos celulares que incluem as células absorptivas (enterócitos), caliciformes, enteroendócrinas, Paneth e células-tronco (Figura 2) (Junqueira e Carneiro, 2017).

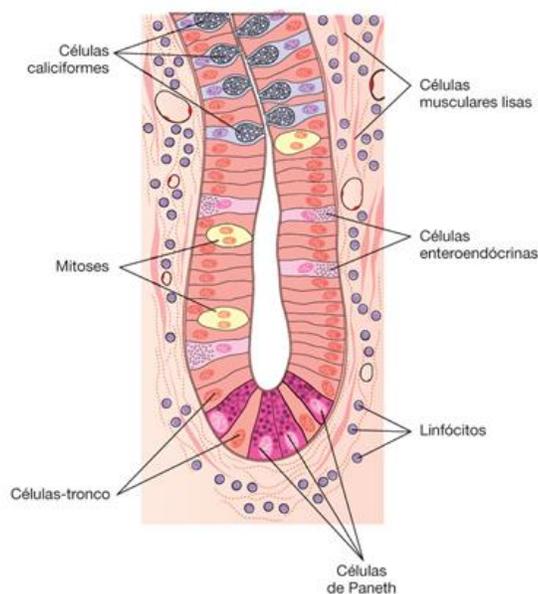


Figura 2 - Imagem ilustrativa da cripta de Lieberkühn e sua composição celular. (Fonte: Junqueira e Carneiro, 2017).

As criptas representam o principal sítio de proliferação celular do intestino, já que suas células-tronco constituintes são capazes de se dividir e se diferenciar, nos distintos tipos celulares que constituem os vilos intestinais (Eurell e Frappier, 2012; Walton et al., 2016; Junqueira e Carneiro, 2017). Vale ressaltar que, em frangos, a proliferação celular ocorre não apenas nas criptas, como nos mamíferos, mas também ao longo de toda vilosidade (Uni et al., 1998; Uni, 1999). Em condições normais, entende-se que o desenvolvimento e manutenção da mucosa intestinal é resultado de dois mecanismos citológicos associados, que incluem a renovação (proliferação e diferenciação celular) e perda celular por extrusão no ápice das vilosidades, após completarem seu ciclo celular (Renehan et al., 2001; Pelicano et al., 2003). Isso permite a renovação ativa do epitélio intestinal e a manutenção da função normal do intestino (Pelicano et al., 2003), sendo um mecanismo extremamente importante já que este é o órgão que apresenta a maior taxa de renovação celular (Junqueira e Carneiro, 2017).

Os enterócitos são células epiteliais colunares altas, contendo na sua membrana apical inúmeras microvilosidades projetadas para o lúmen intestinal (Junqueira e Carneiro, 2017). As microvilosidades, vilosidades e pregas intestinais aumentam a área de superfície de contato do intestino com o bolo alimentar, maximizando a absorção dos nutrientes (Kiela e

Ghishan, 2016; Junqueira e Carneiro, 2017). Os enterócitos são as células mais abundantes do epitélio intestinal, e sua principal função é a digestão final e absorção de nutrientes (Eurell e Frappier, 2012; Junqueira e Carneiro, 2017). Essas células estão unidas entre si por meio de complexos juncionais intercelulares que regulam a permeabilidade paracelular, impedindo a difusão de macromoléculas, microrganismos e outros antígenos através do espaço paracelular, sendo então essenciais para a manutenção da integridade da barreira paracelular (Ulluwishewa et al., 2011).

Os complexos juncionais consistem em junções de oclusão (*tight junctions*), junções comunicantes (junções *gap*), junções aderentes e desmossomos (Junqueira e Carneiro, 2017). As junções de oclusão formam uma vedação entre enterócitos adjacentes próximos da superfície apical, e as principais proteínas constituintes dessas junções são os membros da família claudina e ocludina (Awad et al., 2017). Essas proteínas são os componentes mais importantes na regulação da permeabilidade paracelular e difusão inter membranas (Awad et al., 2017).

No epitélio de revestimento e nas criptas, entre os enterócitos, encontram-se as células caliciformes, que se apresentam em menor proporção numérica no duodeno e aumenta sua proporção em direção ao íleo (Junqueira e Carneiro, 2017). A principal função destas células é a produção de glicoproteínas altamente glicolisadas do tipo mucina que formam o muco, cuja função é lubrificar e proteger o epitélio intestinal (Junqueira e Carneiro, 2017). A camada de muco que recobre a superfície do epitélio fornece uma importante linha de defesa contra danos físicos e químicos causados por bactérias, fungos, vírus e protozoários que podem entrar no intestino, concomitante à ingestão de alimentos (Kim e Ho, 2010).

Componentes da mucina podem funcionar como pseudoreceptores para microrganismos, fazendo com que os mesmos sejam envoltos pela camada de muco e não expressem a sua capacidade patogênica (Kim e Ho, 2010). As mucinas secretadas pelas células caliciformes podem ser do tipo neutra e ácida (sulfomucina e sialomucina) (Corfield et al., 2001; Deplancke e Gaskins, 2001), sendo o muco neutro mais denso que o ácido, conferindo a este tipo de muco maior capacidade de proteção e lubrificação, quando as células são expostas a fatores abrasivos e irritantes (Silva et al., 2010). Por outro lado, a camada de muco ácida tem a função de proteger as células epiteliais, contra a translocação

bacteriana, e essas mucinas parecem ser menos degradadas por glicosidases bacterianas (Robertson e Wright, 1997).

Pelo menos 20 genes de mucina (*MUC*) foram identificados em humanos e foram classificados em dois tipos: mucina secretada e transmembrana (Dharmani et al., 2009). No genoma de frangos, o gene mucina apresenta homologia com o gene *MUC* de humanos e três tipos foram identificados como mucinas transmembrana (*MUC4*, *MUC13* e *MUC16*) e quatro como mucinas secretadas (*MUC2*, *MUC5ac*, *MUC5B* e *MUC6*) (Lang et al., 2006). A mucina 2 (*MUC2*) é o principal componente do muco intestinal e seus monômeros apresentam mais de 5000 aminoácidos em sua estrutura, que consiste em domínios centrais repetidos em série que são ricos em prolina, serina e treonina (Strous e Dekker 1992; Dharmani et al., 2009).

Os resíduos de serina e treonina são ligados *O*-glicosicamente às cadeias laterais dos oligossacarídeos. O conjunto central altamente glicosilado é flanqueado em ambos os lados pelos domínios ricos em cisteína, incluindo domínio C-terminal e quatro domínios D do tipo fator de von Willebrand (vWF), que estão envolvidos na dimerização e oligomerização, respectivamente, resultando em uma rede de mucina formadora de gel altamente viscosa (Dharmani et al., 2009). Estudos realizados com camundongos têm demonstrado que a perda intestinal de *MUC2* afeta a capacidade de proteção da camada de muco e causa inflamação do cólon (Van der Sluis et al., 2006). Em frangos, estudos também têm demonstrado que durante a ocorrência de doenças entéricas, esses animais apresentam menor expressão do gene *MUC2*, provavelmente como consequência dos severos danos causados na mucosa intestinal (Forder et al., 2012; Kitessa et al., 2014; Chen et al., 2015). Chen et al. (2015) sugeriram que a expressão do gene *MUC2* na mucosa intestinal, poderia em partes, funcionar como um potencial biomarcador da barreira intestinal em frangos.

Outro tipo de célula encontrada na mucosa é a de Paneth, que está localizada na base das criptas, e são células exócrinas que secretam várias proteínas e peptídeos, incluindo as enzimas lisozimas e defensina (Elphick e Mahida, 2005; Junqueira e Carneiro, 2017). Essas enzimas apresentam atividade antibacteriana, uma vez que as mesmas produzem substâncias que são capazes de digerir a parede de determinadas bactérias (Junqueira e Carneiro, 2017). Além das células de Paneth, as criptas também apresentam células

enteroendócrinas, que são secretoras de hormônios (colecistocinina, secretina, polipeptídeo inibitório gástrico e peptídeo semelhante ao glucagon 1), que modulam funções fisiológicas, principalmente, as relacionadas aos processos de digestão e absorção (Eurell e Frappier, 2012; Latorre et al., 2016; Junqueira e Carneiro, 2017).

Na mucosa intestinal do íleo, encontram-se as células M, que se localizam no epitélio de revestimento que aparece acima dos nódulos linfáticos das placas de Peyer (Gebert et al., 1996; Junqueira e Carneiro, 2017). Essas células são altamente especializadas para a fagocitose e transcitose de macromoléculas do lúmen do intestino, como antígenos particulados e microrganismos patogênicos (Gebert et al., 1996; Junqueira e Carneiro, 2017). As células M, ao capturarem os antígenos, transportam-os para os macrófagos e células linfoides subjacentes, para iniciar a resposta imunológica (Junqueira e Carneiro, 2017). Assim, o eficiente transporte de antígenos luminiais mediado pelas células M, é considerado como um importante mecanismo inicial na indução de algumas respostas imunes na mucosa intestinal (Mabbott et al., 2013).

O limite inferior da mucosa é estabelecido por uma fina camada de músculo liso que constitui a muscular da mucosa. Abaixo da mucosa, encontra-se submucosa, formada por tecido conjuntivo denso não modelado, contendo vasos sanguíneos e linfáticos. Apenas no duodeno, a submucosa contém glândulas, denominadas de glândulas de Brunner, que secretam muco alcalino para proteger a mucosa duodenal do ácido oriundo do suco gástrico (Eurell e Frappier, 2012; Junqueira e Carneiro, 2017). Na submucosa, também são encontrados nódulos linfáticos isolados em toda a extensão do intestino delgado (Junqueira e Carneiro, 2017). Grandes agregados de nódulos linfáticos permanentes também são encontrados nesta camada, mais especificamente no íleo, formando a placa de Peyer (Eurell e Frappier, 2012).

A inervação da submucosa é realizada pelo plexo nervoso submucoso (de Meissner), formado por neurônios sensoriais, que recebem informações de terminações nervosas, e neurônios efetores que inervam a muscular da mucosa e as células secretoras das criptas (Nezami e Srinivasan, 2010). As funções do plexo submucoso dependem principalmente do peptídeo intestinal vasoativo (VIP) que induz vasodilatação e modula a liberação de mucina e a proliferação de células caliciformes (Weber et al., 2001; Toumi et al., 2004). Trevizan et al. (2016) demonstraram em seu estudo com ratos com infecção intestinal, que os animais

apresentaram atrofia da camada submucosa, sugerindo que isso possa estar relacionado com as mudanças morfofisiológicas dos neurônios presentes nesta camada.

Abaixo da submucosa, localiza-se a camada muscular externa, formada por músculo liso organizado em duas subcamadas: circular interna e longitudinal externa. Entre essas subcamadas, encontra-se o plexo nervoso mioentérico (de Auerbach) (Junqueira e Carneiro, 2017). Esta camada é responsável pelos movimentos peristálticos do intestino e está sob o controle de fibras nervosas colinérgicas parassimpáticas, que estimulam a atividade muscular, e fibras nervosas adrenérgicas simpáticas que deprimem essa atividade (Eurell e Frappier, 2012). Estudo tem demonstrado alterações na espessura dessa camada do intestino em decorrência de infecções (Trevizan et al., 2016), possivelmente como resultado de um estado de hipercontratibilidade das células musculares lisas, intencionalmente alteradas no intuito de aumentar o movimento intestinal, para promover a expulsão do parasita dos enterócitos (Bauer, 2008). A última camada da parede intestinal é a serosa formada por tecido conjuntivo frouxo revestido por um epitélio simples pavimentoso denominado mesotélio.

2.0. Digestão e absorção de nutrientes em frangos

O processo de aquisição e assimilação dos nutrientes a partir dos ingredientes que compõem a ração é complexo, e envolve o processo de digestão dos alimentos em partículas menores (nutrientes), as quais podem ser absorvidas pelo trato intestinal (Bertechini, 2012). No sistema digestório, mais especificamente no proventrículo, o alimento ingerido estimula a secreção do hormônio gastrina, secretado pelas células do proventrículo (Silva et al., 2014). Esse hormônio por sua vez estimula a produção de ácido clorídrico (HCl), a motilidade do proventrículo, bem como a secreção da enzima pepsina (Silva et al., 2014). Devido ao baixo pH no proventrículo, a enzima amilase se torna inativa e ocorre o interrompimento da digestão dos carboidratos.

Por outro lado, a fração proteica do alimento será fragmentada no proventrículo, em partículas menores por meio da ação do HCl que desnatura as proteínas expondo suas ligações peptídicas, onde a pepsina exercerá sua ação (Silva et al., 2014). O processo de digestão proteica tem início no proventrículo e continua na moela, onde ocorre a trituração e mistura do alimento com as secreções gástricas. No momento em que o quimo deixa a

moela, a enterogastrona é secretada pelas células do intestino delgado, a fim de inibir a secreção de HCl (Silva et al., 2014). Os produtos parciais da digestão dos alimentos (quimo) passam para o duodeno, onde o processo de digestão continua.

O pâncreas sintetiza e secreta enzimas digestivas no duodeno, como a amilase, proteases (tripsina, quimotripsina, carboxipeptidase A e B, e elastase), lipases, fosfolipase, colipase e carboxi-éster-hidrolase, responsáveis pela digestão de carboidratos, proteínas e lipídeos, respectivamente (Guyton e Hall, 2006). A digestão completa de oligossacarídeos, dissacarídeos e pequenos peptídeos dependem da ação de enzimas glicosidases (maltase, dextrinase e sacarase) e peptidases, localizadas na membrana plasmática apical dos enterócitos (Silva et al., 2014). Essas enzimas atuam sobre esses componentes, até que os mesmos cheguem a sua forma de monossacarídeos (glicose, galactose e frutose), tripeptídeos, dipeptídeos e aminoácidos livres, que são as formas absorvidas pelos enterócitos (Silva et al., 2014).

A fração lipídica dos alimentos ao atingir o duodeno, estimula a secreção de colecistocinina (CCK), que reduz a motilidade gástrica e estimula a secreção de lipase pelo pâncreas, além de estimular a contração da vesícula biliar para que a bile seja secretada no duodeno (Guyton e Hall, 2006). Os lipídeos serão então emulsificados pela bile, formando pequenas gotículas, facilitando assim a sua hidrólise num processo catalisado pelas enzimas lipase, colipase e fosfolipase A2 (Smulikowska, 1998). Os produtos da hidrólise lipídica serão absorvidos pelos enterócitos na forma de micelas, que contém ácidos graxos de cadeia curta, mono e diacilgliceróis, vitaminas lipossolúveis, colesterol e fosfolipídeos (Furlan e Macari, 2002; Nelson e Cox, 2011). No citoplasma dos enterócitos, verifica-se ainda reesterificação dos ácidos graxos, formando novamente triacilglicerol, que se une a apolipoproteínas, colesterol livre e esterificado, e a fosfolipídeos para formar portomicrons, que serão secretados diretamente no sistema porta hepático (Krogdahl, 1985; Hermier, 1997; Baião e Lara, 2005). Os produtos finais passíveis de absorção oriundos da hidrólise proteica, de carboidratos e lipídeos ao serem absorvidos pelo enterócito, serão transportados para a corrente sanguínea, que os levam primeiramente para a veia porta e após a passagem pelo fígado, os nutrientes serão distribuídos para as demais células corporais (Silva et al., 2014).

2.1. Absorção de proteínas

O transporte dos di e tripeptídeos bem como dos aminoácidos livres, oriundos da hidrólise proteica, do lúmen para dentro dos enterócitos, ocorre por meio de três mecanismos: transferência passiva por difusão simples, transferência passiva por difusão facilitada e transferência ativa por co-transporte (Frenhani e Burini, 1999).

O mecanismo de transporte passivo pode ocorrer por meio da via celular e paracelular, enquanto o transporte ativo ocorre somente por via celular (Silva et al., 2014). O transporte passivo por difusão simples ocorre principalmente com alguns aminoácidos livres, não havendo gasto de energia celular, e interação das moléculas com proteínas transportadoras na membrana (Frenhani e Burini, 1999). Esse tipo de transporte ocorre a favor de um gradiente de concentração, ou seja, o movimento da molécula ocorre do meio mais concentrado para o menos concentrado. De acordo com Frenhani e Burini (1999), quanto mais hidrofóbicos forem os aminoácidos (a maioria dos neutros), e quanto maior for o seu gradiente de concentração através da membrana, maior será a importância desse tipo de transporte. Ainda de acordo com Hirts (1993), pequenos peptídeos também podem ser absorvidos por difusão passiva através da via paracelular e celular, entretanto, este processo parece ser insignificante por ocorrer em menor quantidade.

O transporte passivo por difusão facilitada também ocorre predominantemente com aminoácidos livres (Frenhani e Burini, 1999). Entretanto, quando comparado ao mecanismo de difusão simples, esse tipo de transporte apresenta a vantagem de ser mais rápido, por ser mediado por transportadores independentes de sódio (Na^+) e energia (Cooper, 2000). O transporte passivo (difusão simples e facilitada) é importante, uma vez que esse tipo de transporte pode equilibrar a concentração de aminoácidos intracelular e extracelular (Cooper, 2000).

O transporte ativo ocorre com os aminoácidos livres, di e tripeptídeos (Frenhani e Burini, 1999). É mediado por proteínas transportadoras e, neste sistema de transporte, existe o gasto de energia, uma vez que a substância a ser absorvida será transportada contra o gradiente de concentração, ou potencial eletroquímico (Cooper, 2000). A energia para este processo é obtida indiretamente, por meio do gradiente eletroquímico do íon que seja ativamente co-transportado (Frenhani e Burini, 1999). Neste tipo de transporte, os

aminoácidos livres são co-transportados juntamente com o Na^+ para o citoplasma dos enterócitos, e seu transporte depende do gradiente eletroquímico deste íon, gerado pelo transporte ativo primário da bomba sódio potássio (Na^+/K^+ ATPase) presente na membrana basolateral (Hirst, 1993).

Os di e tripeptídios são co-transportados através da membrana apical dos enterócitos com prótons de hidrogênio (H^+), e a energia necessária para esse transporte é obtida, pelo menos em parte, por meio do gradiente eletroquímico de H^+ (Silva et al., 2014). Esse gradiente é gerado e mantido pelo contra transporte do H^+ com o Na^+ , que ocorre na membrana plasmática apical, realizado pelo trocador sódio hidrogênio isoforma 3 (NHE3) e pela bomba de Na^+/K^+ ATPase localizada na membrana basolateral (Hirts, 1993). O transporte ativo dos produtos oriundos da hidrólise proteica assume significativa importância no processo de absorção, uma vez que é considerado o mecanismo quantitativamente mais eficiente e predominante, e por ser o principal mecanismo para absorção de di e tripeptídeos (Silva et al., 2014). Esses sistemas de transporte supracitados são realizados através da membrana plasmática apical dos enterócitos.

Seguindo o processo de absorção, dentro do citoplasma dos enterócitos, os dipeptídeos e tripeptídeos absorvidos serão hidrolisados por diversas peptidases liberando os seus aminoácidos constituintes, que juntamente com o pool de aminoácidos livres (previamente absorvidos), serão transportados por meio de diferentes proteínas transportadoras independente de sódio (difusão facilitada), através da membrana basolateral para a corrente sanguínea (Miner-Williams et al., 2014). Estudos sugerem que os peptídeos resistentes à hidrólise intracelular, são transportados pela membrana basolateral, via transportador de peptídeo independente de H^+ , cuja identidade molecular ainda não é conhecida (Daniel, 2004; Daniel e Kotra, 2004). Os di e tripeptídeos resistentes à hidrólise citosólica poderão ser degradados por peptidases plasmáticas solúveis (Foltz et al., 2010). O processo de absorção dos aminoácidos termina na membrana basolateral, onde se verifica a presença de diversas proteínas transportadoras, incluindo aquelas que são trocadores obrigatórios de aminoácidos catiônicos (Na^+ -independente), e aminoácidos neutros (Na^+ -dependente) (Krehbiel e Matthews, 2003).

Vale ressaltar que, durante a passagem dos aminoácidos pelo citoplasma dos enterócitos, alguns serão metabolizados pelo próprio enterócito, para manutenção do seu

metabolismo e de suas funções (revisado por Alpers, 2000). De acordo com Wu (1998), os aminoácidos, principalmente a glutamina, o glutamato e o aspartato ao invés da glicose como observado em outros tecidos biológicos, são os principais combustíveis para o intestino delgado. Assim como para os demais nutrientes, após o completo processo de absorção, os aminoácidos livres não metabolizados pelo enterócito serão recuperados na veia porta, e capturados pelo fígado, onde serão parcialmente metabolizados ou liberados na circulação periférica, seguindo para as demais células e tecidos corporais (Krehbiel e Matthews, 2003; Silva et al., 2014).

2.2. Transportadores de pequenos peptídeos e aminoácidos livres

Os transportadores de pequenos peptídeos e aminoácidos livres são proteínas associadas à membrana celular, que permitem a translocação de substratos para dentro e fora das células (Matthews, 2000). No intestino delgado, existem diferentes transportadores de aminoácidos, que de acordo com Hyde et al. (2003) são classificados como sendo sistemas distintos, dependendo da especificidade e afinidade pelo substrato, do mecanismo de transporte e das propriedades reguladoras. Assim, na membrana apical dos enterócitos, existem os transportadores dependentes de Na^+ (transporte ativo) e independentes de Na^+ (transporte facilitado), e também transportadores dependentes de outros íons como, por exemplo, o hidrogênio (H^+) e o cloro (Cl^-) (Matthews, 2000).

Segundo Ganapathy e Leibach (1985), a função do Na^+ no transporte de aminoácidos é aumentar a afinidade do transportador pelo aminoácido, sem afetar a velocidade máxima do mesmo. Entre os sistemas de transporte dependentes de Na^+ presentes na membrana apical, pode-se citar alguns exemplos sendo eles: sistema A, ASC, Beta, IMINO, Gly, PHE e B^0 , que são específicos para a maioria dos aminoácidos neutros (Matthews, 2000). Dentre os sistemas independentes de Na^+ , pode-se citar o sistema $\text{b}^{0,+}$ (Matthews, 2000; Bröer, 2002). Na membrana basolateral, sistemas dependentes e independentes de Na^+ , também são encontrados, dentre estes estão os sistemas y^+ , y^+L e L (Bröer, 2002).

O transporte através da membrana basolateral dos enterócitos assume grande importância metabólica, não somente por realizar o efluxo dos aminoácidos para fora das células, mas também por mediar o influxo de aminoácidos (do sangue para a célula) (Bröer, 2008). Uma vez que estes transportadores são projetados para manter os níveis de

aminoácidos intracelulares para o seu próprio metabolismo, principalmente durante períodos entre refeições (Bröer e Bröer, 2017). Os transportadores de peptídeos e aminoácidos, bem como sua localização e função, abordados nessa revisão de literatura, estão resumidos na Tabela 1.

Tabela 1 - Transportadores de peptídeos e aminoácidos utilizados neste estudo

<i>Transportador</i>		<i>Abreviação</i>	<i>Família</i>	<i>Localização</i>	<i>Função</i>
Transportador de peptídeos 1	de	PepT1	SLC15A1	MA	Transporte de di e tripeptídeos
Transportador de aminoácidos neutros 1	de	B ⁰ AT1	SLC6A19	MA	Transporte de aminoácidos neutros
Transportador de aminoácidos catiônicos 1	de	CAT-1	SLC7A1	MA e MB	Transporte de aminoácidos catiônicos
Transportador de aminoácidos neutros e catiônicos 1	de	y ⁺ LAT1	SLC7A7	MB	Transporte de aminoácidos catiônicos e neutros

MA - membrana apical; MB - membrana basolateral.

2.2.1. Transportador de peptídeos 1 PepT1 (SLC15A1)

O PepT1 pertence a família de transportadores de oligopeptídeos acoplados a prótons (POT) (Agu et al., 2011) (Figura 3). É o membro um (1) da família 15 de carreadores de solutos (SLC15A1), sendo caracterizado como um transportador de baixa afinidade, mas de alta capacidade, presente principalmente na membrana apical do enterócito (Ogihara et al., 1996; Hu et al., 2008; Smith et al., 2013; Zwarycz e Wong, 2013). Esse transportador é responsável pela absorção de pequenos peptídeos intactos acoplada com H⁺, principalmente di e tripeptídeos, a partir do lúmen intestinal para o citoplasma dos enterócitos (Hu et al., 2008). Como o potencial elétrico das células é negativo, a molécula de H⁺ tende a entrar nas células, acoplando a entrada de di e tripeptídeos via PepT1 (Krehbiel e Matthews, 2003; Spanier e Rohm, 2018).

O gradiente eletroquímico do H⁺ extracelular e intracelular que dirige a atividade do PepT1, é reestabelecido por uma função combinada do trocador sódio hidrogênio isoforma 3 (NHE3), presente na membrana apical, e da bomba Na⁺/K⁺ ATPase presente na membrana basolateral. A bomba Na⁺/K⁺ ATPase reestabelece o nível de Na⁺ intracelular o

qual está reduzido pela troca Na^+/H^+ , e pelo transporte de aminoácidos livres dependentes de sódio (Gilbert et al., 2008). Assim, a capacidade ótima de absorção intestinal deste transportador, depende do funcionamento adequado do trocador sódio hidrogênio (NHE3) e da bomba Na^+/K^+ ATPase (Watanabe et al., 2005).

Esse transportador de pequenos peptídeos apresenta importância nutricional, devido à sua função na absorção intestinal de pequenos peptídeos da dieta, e por seu papel na reabsorção de aminoácidos ligados a peptídeo do filtrado glomerular no rim (Hu et al., 2008). O Pept1 ainda apresenta considerável importância para a farmacologia, em função da sua afinidade por algumas drogas, com estrutura de peptídeos, como por exemplo, o β -lactam e a cefalosporina (Matthews, 2000).

Em frangos, a menor expressão do gene *PEPT1* foi detectada no proventrículo, cérebro, coração, bursa de Fabricius, pulmão, rim e fígado, sendo a maior expressão desse gene observada no intestino delgado (Zwarycz e Wong, 2013). Chen et al. (1999) também observaram maior nível de expressão do gene *PEPT1* no intestino delgado de frangos, suínos e ruminantes. Gilbert et al. (2007) observaram maior quantidade de RNA mensageiro (mRNA) *PEPT1* no duodeno quando comparado com o íleo, enquanto a quantidade de mRNA *PEPT1* no jejuno foi intermediária. No cólon de humanos sob condições normais, a expressão do *PEPT1* é baixa ou quase nula, contudo nos pacientes com doença inflamatória intestinal, a expressão compensatória do *PEPT1* pode permitir a absorção efetiva de aminoácidos da dieta, ou ainda ser útil para o tratamento de pacientes com síndrome do intestino curto, utilizando soluções de nutrição enteral com hidrolisados proteicos (Daniel, 2004).

De acordo com Gilbert et al. (2008), a expressão e atividade funcional do PepT1 é estimulada pelo nível e qualidade da proteína presente na dieta, bem como pela presença de peptídeos e de alguns aminoácidos seletivos. Assim, esses autores sugerem que o PepT1 é sensível às mudanças na quantidade e composição de proteína da dieta. Adibi (2003), sugere que a regulação do PepT1, pelo substrato dietético, parece ocorrer por meio do aumento da estabilidade do mRNA e da taxa de transcrição gênica. Outros fatores também podem regular a expressão e função do PepT1, como por exemplo, hormônios (insulina e leptina), idade, ciclo circadiano e doenças que acometem o intestino (Gilbert et al., 2008).

Segundo Silva et al. (2014), animais em jejum apresentam maior expressão desse gene, possivelmente como uma forma de hierarquizar a absorção de aminoácidos em detrimento de outros componentes nutricionais, como por exemplo, a glicose, já que a mesma pode ser suprida por meio de vias gliconeogênicas. Ainda Barbot et al. (2003), demonstraram que ratos parasitados com o protozoário intestinal *Cryptosporidium parvum*, apresentaram maior expressão do gene *PEPT1* no intestino delgado, no pico da infecção. Além disso, esses autores também demonstraram que a expressão proteica foi mantida durante a infecção.

2.2.2. Transportador de aminoácidos neutros 1 dependente de sódio B⁰AT1 (SLC6A19)

O transportador B⁰AT1 é um membro da família SLC6 de transportadores transmembrana, que inclui transportadores de aminoácidos e neurotransmissores, estando envolvidos com várias funções fisiológicas (Bala et al., 2013) (Figura 3). Dentre as suas funções conhecidas, estão à captação de neurotransmissores na sinapse, o transporte de aminoácidos neutros no intestino e a reabsorção de aminoácidos neutros nas células renais (Bala et al., 2013). Esse transportador é encontrado, principalmente, na membrana apical dos enterócitos, e sua expressão aumenta do duodeno para o íleo (Terada et al., 2005). Este transportador promove a translocação dos seus substratos numa reação dependente de Na⁺ e independente de cloro (Cl⁻) (Bröer et al., 2004).

O B⁰AT1 é responsável pelo transporte ativo de muitos aminoácidos neutros para o citoplasma dos enterócitos (Fairweather et al., 2015). De acordo com Bröer (2009), o B⁰AT1 é capaz de transportar oito dos dez aminoácidos essenciais, nomeadamente a leucina, isoleucina, valina, metionina, fenilalanina, triptofano, treonina e histidina. Através de mecanismos de controle único, para ser expresso na membrana plasmática da célula e ser funcional, o B⁰AT1 é co-expresso com a enzima conversora de angiotensina 2 ao longo de todo o intestino delgado (Camargo et al., 2009). Estudo tem demonstrado que o B⁰AT1 parece ser o principal transportador que absorve aminoácidos neutros no intestino, sugerindo que na ausência do B⁰AT1 uma deficiência seletiva de aminoácidos neutros pode ocorrer no organismo (Bröer et al., 2011). E isso poderia ser usado para compreender o papel dos aminoácidos neutros na regulação metabólica (Bröer et al., 2011).

De acordo com Kleta et al. (2004) e Bröer et al. (2011), mutações no gene *B⁰ATI*, causam a doença de Hartnup, um distúrbio caracterizado pela má absorção dos aminoácidos neutros. O conhecimento sobre a regulação dos transportadores de aminoácidos livres é limitado, entretanto, Jando et al. (2017), sugerem que a expressão do gene *B⁰ATI* possa ser regulada pela ingestão de dieta rica em proteínas e aminoácidos. Zhang et al. (2017), observaram em seu estudo, que frangos suplementados com DL-metionina apresentaram maior expressão do gene *B⁰ATI* no jejuno. Estudos têm demonstrado menor expressão desse gene no intestino delgado de frangos com coccidiose, possivelmente como consequência do menor consumo de ração e da maior destruição celular observada no intestino (Su et al., 2014; Miska e Fetterer, 2017; Miska e Fetterer, 2018).

2.2.3. Transportador de aminoácidos catiônicos 1 (CAT-1) (SLC7A1)

O CAT-1 é um transportador de aminoácidos catiônicos (arginina, lisina, ornitina e histidina), independente de Na⁺, membro do sistema de transporte y⁺, pertencente à família de transportadores SLC7 (Closs et al., 2006) (Figura 3). Segundo Hatzoglou et al. (2004), a expressão desse transportador varia nos diferentes tecidos e tipos celulares, podendo ser modulado de maneira específica ao tipo celular, por diversos estímulos, incluindo a proliferação celular, fatores de crescimento, citocinas, hormônios e nutrientes. O CAT-1 apresenta a mais pronunciada trans-estimulação (estímulo do transportador por substratos no lado oposto da membrana), dentre os outros transportadores constituintes do sistema y⁺ (Hatzoglou et al., 2004). Dessa forma, Closs et al. (2006) sugerem que um dos principais determinantes da atividade desse transportador é a trans-estimulação.

Em frangos, o CAT-1 é expresso no fígado, bursa de Fabricius (Humprey et al., 2004) e intestino delgado (Gilbert et al., 2007). O CAT-1 está localizado tanto na membrana apical, como na membrana basolateral dos enterócitos, sendo caracterizado como um transportador de alta afinidade pelo substrato, mas com baixa capacidade (Krehbiel e Matthews, 2003). O CAT-1 realiza sua função através do transporte facilitado bidirecional (Krehbiel e Matthews, 2003). Na membrana apical, o CAT-1 transporta os aminoácidos do lúmen intestinal para o citoplasma dos enterócitos (Krehbiel e Matthews, 2003), e na membrana basolateral, os aminoácidos são transportados de modo unilateral da corrente sanguínea para o citoplasma do enterócito (Krehbiel e Matthews, 2003).

Além de exercer importante papel na absorção de aminoácidos, o CAT-1 também está envolvido na síntese do óxido nítrico, uma vez que este é o principal sistema de transporte de aminoácidos catiônicos, para regular o suprimento intracelular de arginina para as enzimas óxido nítrico sintase (NOS) (Yuan et al., 2015). Estudo tem sugerido que a arginina esteja envolvida na regulação do CAT-1 nas células intestinais de frangos, devido ao aumento no nível de mRNA e da proteína do CAT-1 observado em frangos suplementados com arginina (Yuan et al., 2015).

2.2.4. Transportador de aminoácidos neutros e catiônicos 1, y^+ LAT1 (SLC7A7)

O y^+ LAT1 é um transportador de aminoácidos pertencente ao sistema y^+ L, membro da família de transportadores SLC7, e está presente na membrana basolateral dos enterócitos (Krehbiel e Matthews, 2003) (Figura 3). Este transportador apresenta alta afinidade por aminoácidos catiônicos e neutros, e na presença de Na^+ a afinidade deste transportador por aminoácidos neutros torna-se maior (Bröer, 2008; Bröer e Palacín, 2011). O y^+ LAT1 apresenta atividade funcional quando está associado com a proteína de membrana 4F2 de cadeia pesada (4F2hc), formando um complexo heterodimérico via ligação dissulfeto (Torrents et al., 1998). Tanto o y^+ LAT1 quanto o 4F2hc são expressos no intestino e rim (Wagner et al., 2001; Verrey et al., 2004).

O y^+ LAT1/4F2hc é caracterizado como um transportador que realiza um mecanismo de troca obrigatória, transportando aminoácidos catiônicos (independentes de Na^+), e aminoácidos neutros (dependentes de Na^+) através da membrana basolateral dos enterócitos (Bröer, 2008; Bröer e Palacín, 2011). Dessa forma, o y^+ LAT1 medeia o efluxo dos aminoácidos catiônicos do meio intracelular para a corrente sanguínea, em troca do influxo de aminoácidos neutros da corrente sanguínea para o meio intracelular (Krehbiel e Matthews, 2003). Estudo tem demonstrado que a suplementação de arginina melhora a expressão do gene y^+ LAT1 no jejuno de suínos (Yin et al., 2014).

Em humanos, mutações no gene y^+ LAT1 causam intolerância à proteína lisinúrica, que é uma desordem caracterizada pelo transporte defeituoso dos aminoácidos catiônicos, causando falhas no crescimento, hepatoesplenomegalia, osteoporose, hiperamonemia pós-prandial e aversão a proteínas da dieta (Mykkänen et al., 2000). Em frangos, Su et al.

(2014) demonstraram que a infecção intestinal causada por protozoário do gênero *Eimeria*, reduz a expressão do gene γ^+LAT1 no intestino delgado.

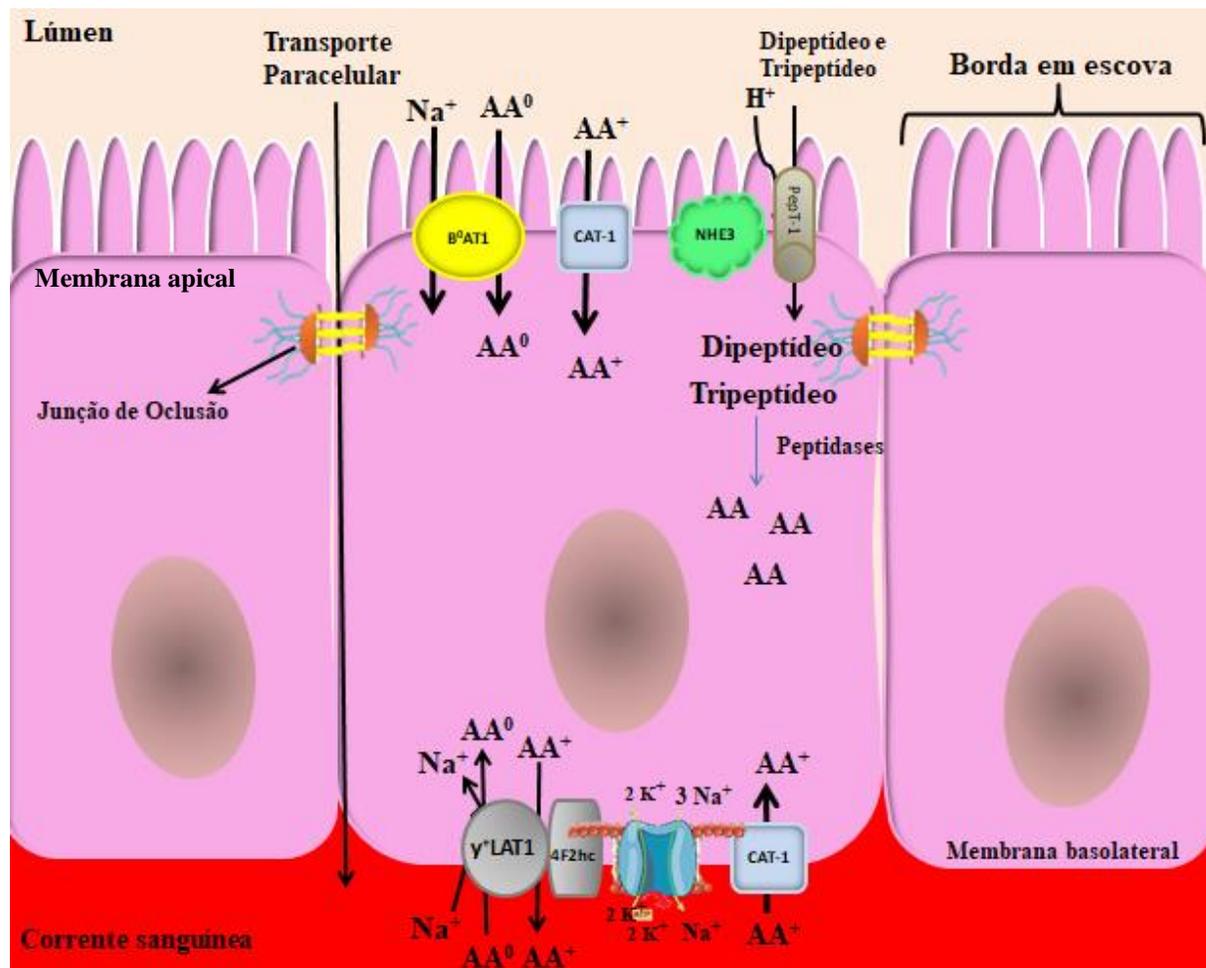


Figura 3 - Transportadores de aminoácidos e peptídeos presentes na membrana apical e membrana basolateral dos enterócitos presentes no intestino delgado, abordados neste trabalho. AA – aminoácidos; AA⁺ - aminoácidos catiônicos; AA⁰ - aminoácidos neutros; B⁰AT1 – transportador de aminoácidos neutros 1; CAT-1 – transportador de aminoácidos catiônicos 1; NHE3 – trocador sódio hidrogênio isoforma 3; Pept1 – transportador de peptídeos 1; $\gamma^+LAT1/4F2hc$ - transportador de aminoácidos neutros e catiônicos 1/proteína de membrana 4F2 de cadeia pesada. (Fonte: Autora do trabalho).

2.3. Características do transporte de pequenos peptídeos e aminoácidos livres

O mecanismo de absorção dos pequenos peptídeos e dos aminoácidos livres apresenta algumas propriedades distintas, relacionadas principalmente com o sistema de transporte (Gilbert et al., 2008). Estudos têm demonstrado que pequenos peptídeos intactos (2-3 peptídeos) podem ser transportados de forma muito mais eficiente, em relação aos aminoácidos livres (Chen et al., 2002; Dabrowski et al., 2003; Daniel, 2004). O transporte

de aminoácidos livres é realizado por diversos tipos de proteínas transportadoras, é um processo saturável e exibe alta especificidade entre substrato e transportador (Gilbert et al., 2008). Ainda, o transporte dos aminoácidos livres possui velocidade de absorção específica, para cada aminoácido, de acordo com a afinidade dos mesmos pelos transportadores (Frenhani e Burini, 1999).

Por outro lado, di e tripeptídeos são transportados principalmente pelo transportador PepT1, que potencialmente pode transportar 400 dipeptídeos e 8000 tripeptídeos, que resultam da combinação dos 20 diferentes aminoácidos da dieta (Daniel, 2004). O PepT1 é específico para di e tripeptídeos, sendo independente e distinto do sistema de transporte de aminoácidos livres, não existindo competição entre peptídeos e aminoácidos livres, apenas entre peptídeos (Frenhani e Burini, 1999). O gasto energético para transportar os aminoácidos livres é o mesmo que o observado para transportar di e tripeptídeos, mostrando maior eficiência energética corporal quando se absorve di e tripeptídeos (Daniel, 2004).

Alguns aminoácidos livres apresentam afinidade por mais de um transportador, podendo existir competição entre alguns aminoácidos com estruturas semelhantes (Frenhani e Burini, 1999). Essa competição resulta na inibição da absorção do aminoácido que estiver em menor concentração, causando desequilíbrios na quantidade de aminoácidos a ser suprida no organismo, podendo ocasionar anorexia e redução no crescimento do animal, seja por excesso ou deficiência moderada de pelo menos um aminoácido (Silva et al., 2014). Por outro lado, a absorção de peptídeos ocorre de forma mais rápida e eficiente (Matthews e Adibi, 1976), dessa forma, a quantidade total de cada aminoácido absorvido na forma de di e tripeptídeos é consideravelmente maior que a quantidade absorvida sob a forma de aminoácidos livres (Frenhani e Burini, 1999).

Segundo Krehbiel e Matthews (2003), aproximadamente 85% de todo aminoácido presente no lúmen intestinal são absorvidos pelos enterócitos na forma de pequenos peptídeos. Kodera et al. (2006), utilizando ratos, demonstraram que os pequenos peptídeos presentes no hidrolisado de proteína de soja, foram absorvidos mais rapidamente no sangue portal após infusão no duodeno, do que aqueles representando uma mistura de aminoácidos livres ou de proteína intacta, com a mesma composição de aminoácidos. Esses autores sugeriram que isso possa ocorrer devido ao fato de que o sistema de transporte intestinal

para pequenos peptídeos é separado daqueles para aminoácidos livres (Sleisenger et al., 1976; Koderá et al., 2006).

De acordo com Gilbert et al. (2008) uma maior quantidade de aminoácido é absorvida no intestino delgado proximal, quando a proteína infundida está na forma de hidrolisado ao invés da sua forma intacta, sugerindo que aminoácidos na forma de peptídeos estão mais prontamente disponíveis para absorção. Adicionalmente, a absorção de peptídeos é resistente às mudanças na dieta, por exemplo, em casos de desnutrição proteico-energética verifica-se uma redução na absorção de leucina, mas a absorção do dipeptídeo glicina-leucina não é afetada (Matthews e Adibi, 1976). Sabe-se ainda que o transporte de dipeptídeos é menos afetado por problemas de agressões à mucosa intestinal, comparado com os transportadores para aminoácidos livres (Adibi, 2003, Barbot et al., 2003).

Em casos de doenças ou desafios que possam levar a redução absorptiva pelos enterócitos, a administração de di e tripeptídeo poderia atuar como fator de prevenção de desnutrição proteica. Isso porque, verifica-se que o PepT1 apresenta maior resiliência no intestino, mantendo a expressão e funcionalidade, mesmo sob condição de dano intestinal (Gilbert et al., 2008).

3.0. Metionina: na forma livre (DL-Met) e de dipeptídeo (DL-MMet)

Diante do atual cenário da avicultura mundial, onde existe a recorrente necessidade de se produzir carne de elevado valor nutricional em menor período de tempo, fica evidente a necessidade de compreender melhor como os aminoácidos (formadores de proteínas), estão envolvidos no desempenho produtivo das aves. Assim, mais importante do que a quantidade de proteínas fornecida na dieta, é a qualidade deste nutriente, ou seja, o perfil de aminoácidos desta proteína (Costa et al., 2014). Isto porque as aves apresentam exigências nutricionais dos aminoácidos essenciais que compõem a proteína da dieta, além de necessitarem de uma quantidade de nitrogênio amino suficiente, para a biossíntese de aminoácidos não essenciais (Costa et al., 2014).

Nas dietas de frangos formuladas geralmente a partir de milho e farelo de soja, a metionina é o primeiro aminoácido limitante, além disso, essa ordem de limitação da metionina está relacionada a outros fatores, como a maior exigência deste aminoácido para a formação das penas, e devido ao seu maior metabolismo no trato gastrointestinal,

pâncreas, baço e fígado (Oliveira-Neto, 2014). Além de ser limitante nas dietas de frangos, a metionina é um aminoácido sulfurado essencial, já que o mesmo não é sintetizado pelo corpo em quantidade e/ou velocidade suficiente e, portanto, deve ser obtido a partir da dieta (Brosnan e Brosnan, 2006).

A metionina é um aminoácido proteogênico responsável pelo início da tradução de proteínas, envolvidas em diversas funções no organismo do animal, incluindo a promoção do crescimento (deposição de músculos), formação das penas, precursora de cisteína através da doação de enxofre, precursora de importantes componentes corporais, dentre estes o componente antioxidante glutatona (GSH) e S-adenosilmetionina (SAM) (Oliveira-Neto, 2014). Este último composto (SAM) serve primariamente como um agente doador de grupos metil, sendo que essas metilações são essenciais para a biossíntese de diversos compostos celulares, incluindo a creatina, carnitina e proteínas (Stipanuk, 2004). Além dessas funções, estudos têm evidenciado a função antioxidante da metionina, bem como o possível envolvimento deste aminoácido com o sistema imune (Tsiagbe et al., 1987; Grimble, 2006; Luo e Levine, 2009; Swain e Johri, 2010; Mirzaaghatbar et al., 2011; Martínez et al., 2017).

Assim, devido à essencialidade, alta exigência nutricional dos animais e aos papéis cruciais da metionina para os processos fisiológicos e metabólicos, a suplementação deste aminoácido por meio de fontes industriais na dieta de aves, é importante para se atingir o máximo desempenho animal. As principais fontes comerciais disponíveis deste aminoácido geralmente utilizadas nas dietas são: L-metionina (L-Met, 99%), DL-metionina (DL-Met, 99%) e precursor de metionina hidróxi análoga (MHA, 88%) (Oliveira-Neto, 2014). A forma L-metionina é a forma natural da metionina que pode ser usada diretamente pelos animais, enquanto que as outras duas fontes são compostas de uma mistura racêmica de isômeros dextrógiro (50%) (D) e levogiro (50%) (L) (Dilger e Baker, 2007). Como os animais utilizam apenas os isômeros L para a síntese de proteínas, é necessário que os isômeros D, sejam metabolizados nas células para serem transformados em seus respectivos L-isômeros (Dilger e Baker, 2007). A diferença entre a forma DL-Met e MHA está na sua estrutura química, onde a primeira forma contém um grupo amina, enquanto a forma MHA tem um grupo hidroxila que deverá ser substituído metabolicamente pelo grupo amina, para se tornar efetivamente uma molécula de metionina (Oliveira-Neto, 2014). Dilger e Baker

(2007), ao compararem os efeitos das fontes DL-Met e L-Met sobre o desempenho de frangos, concluíram que a DL-Met é tão eficiente quanto a L-Met, e que a DL-Met mostrou 100% de eficiência em relação a L-Met. Estudos comparando às fontes DL-Met e MHA, concluíram que a eficácia relativa do MHA foi menor que da DL-Met (Lemme et al., 2002; Meirelles et al., 2003).

Recentemente, outra potencial fonte de suplementação de metionina surgiu no mercado, que é o aminoácido metionina na forma de dipeptídeo (DL-metionil-DL-metionina 95%, AQUAVI[®] Met-Met). Essa fonte sintética de metionina foi produzida inicialmente com foco específico na alimentação de camarões e outros crustáceos, isso porque uma das principais características desta fonte é a sua menor solubilidade em água, quando comparada a DL-metionina, e não é lixiviado com tanta facilidade. Os dipeptídeos, de modo geral, são considerados como uma inovação, para formular dietas completas e balanceadas para as diferentes espécies animais (Dabrowski et al., 2003; Dabrowski et al., 2005; Mamaug et al., 2012; Silva et al., 2016).

Poucos estudos sobre a utilização de dipeptídeos de metionina estão disponíveis na literatura, dentre estes, estão os estudos realizados com rato (Chen et al., 2018), peixe (Dabrowski et al., 2005; Mamaug et al., 2012) e tecidos da glândula mamária de bovinos (Yang et al., 2015; Wang et al., 2018). Os resultados de Mamaug et al. (2012) demonstraram que tanto a metionina na forma livre como na forma de dipeptídeo, podem ser igualmente utilizadas pelas larvas e formas juvenis de peixe (*Pagrus major*). Dabrowski et al. (2005) sugeriram que, para trutas, os aminoácidos dados inteiramente como dipeptídeos poderiam sustentar o crescimento dos peixes.

Contudo, em frangos, os dados são limitados, Silva et al. (2016) e Mencialha et al. (2016) determinaram a bioeficácia das fontes de L-metionina 99% (L-Met), DL-metionil-DL-metionina 95% (Met-Met), e MHA, em comparação com a DL-metionina 99% (DL-Met), nas fases inicial e de crescimento. Em ambos os estudos, esses autores concluíram, que não houve diferença na biodisponibilidade da L-Met, DL-Met e Met-Met. Entretanto, a fonte MHA apresentou menor bioeficácia em ambas às fases avaliadas.

3.1. Absorção e transporte da metionina na sua forma livre (DL-Met) e de dipeptídeo (DL-MMet)

Como revisado por Mastrototaro et al. (2016), a absorção intestinal da DL-Met é muito eficiente, sendo que apenas 4% da DL-Met ingerida pode ser recuperada nas excretas de frangos de corte (provavelmente como perda endógena). O sítio primário da absorção da metionina é o intestino delgado (Zhang, 2016). O transporte intestinal durante a absorção da metionina através da membrana apical e basolateral dos enterócitos é realizado por meio de vários sistemas de transporte de aminoácidos neutros (Mastrototaro et al., 2016) (Figura 4). Dentre estes, podemos citar o transportador B⁰AT1 e y⁺LAT1, presentes na membrana apical e basolateral dos enterócitos, respectivamente (Bröer, 2009; Mastrototaro et al., 2016).

Como a metionina é um aminoácido neutro, ela é absorvida através da membrana apical do enterócito, num processo dependente de energia e de Na⁺, mediado pelo transportador B⁰AT1 (Bröer, 2009; Mastrototaro et al., 2016). Esse transportador também é denominado como o sistema preferencial para a absorção de metionina, isso porque o B⁰AT1 tem afinidade relativamente maior para aminoácidos com cadeia lateral mais longa como a metionina, fenilalanina e L-leucina (Bröer, 2008). A metionina pode ainda ser transportada da corrente sanguínea para o interior do enterócito, por meio do sistema de transporte y⁺LAT1/4F2hc (Mastrototaro et al., 2016).

Esse processo de influxo pode contribuir para a disponibilização de metionina para as células do intestino, o que pode estimular o metabolismo da metionina nos enterócitos (Mastrototaro et al., 2016). Já o efluxo de metionina pela membrana basolateral é limitado a quase uma única proteína transportadora, denominada transportador de aminoácidos tipo L 4 (LAT4) (Guertg et al., 2015; Mastrototaro et al., 2016). Assim como outros pequenos peptídeos, o dipeptídeo de metionina é absorvido intacto através da membrana apical do enterócito, principalmente pelo PepT1, num processo dependente de energia e H⁺ (Figura 4) (Frenhani e Burini, 1999; Wang et al., 2017). No citoplasma do enterócito, essa molécula será hidrolisada para a sua forma livre.

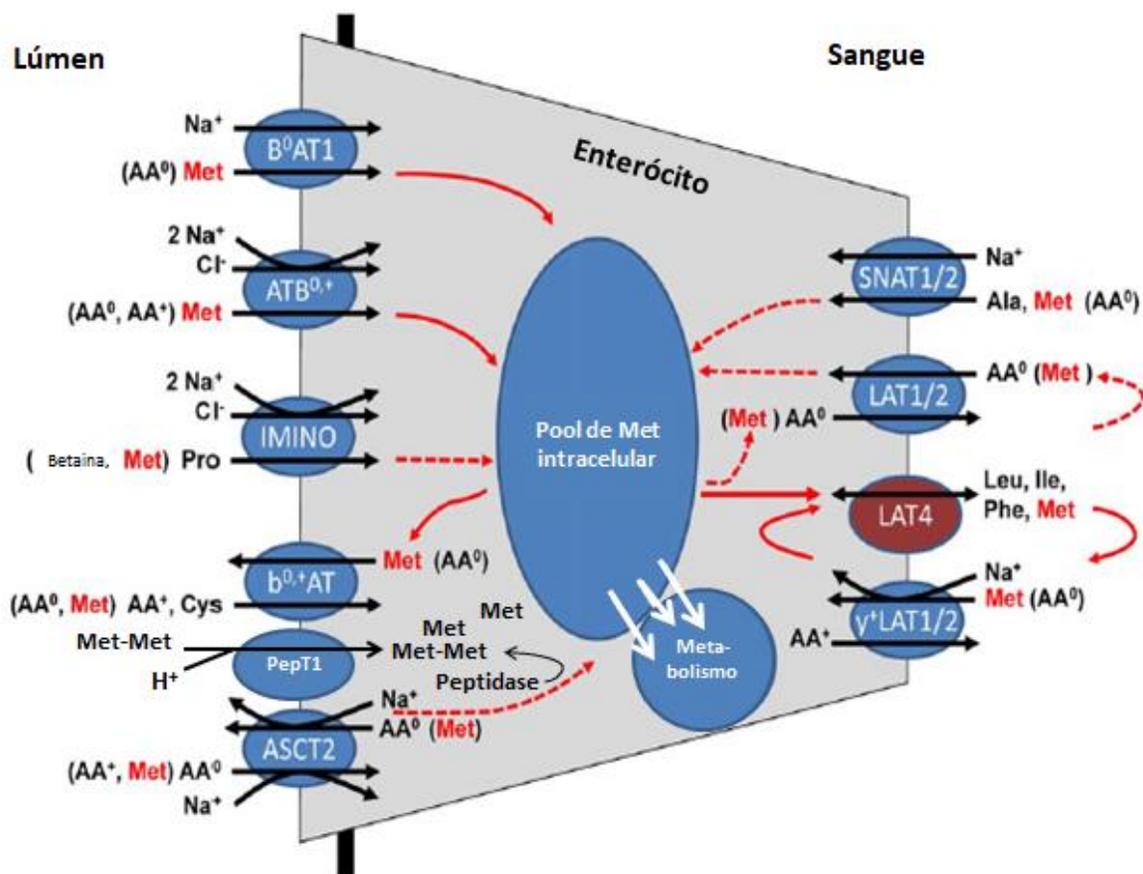


Figura 4 - Esquema de absorção do aminoácido metionina na sua forma livre (Met) e na forma de dipeptídeo (Met-Met) na membrana apical e basolateral do intestino delgado. AA⁺ - aminoácidos catiônicos; AA⁰ - aminoácidos neutros; ASCT2 - transportador de alanina, serina e cisteína; ATB^{0,+} - transportador de aminoácidos ATB^{0,+}; B⁰AT1 - transportador de aminoácidos neutros 1; B^{0,+}AT - transportador de aminoácidos neutros e catiônicos independente de Na⁺; IMINO - transportador de iminoácido; LAT1/2 - transportador de grandes aminoácidos neutros subunidade 1 e 2; LAT4 - transportador de grandes aminoácidos neutros subunidade 4; PepT1 - transportador de peptídeos 1; SNAT1/2 - transportador de aminoácidos neutros 1/2 dependente de Na⁺; γ⁺LAT1 - transportador de aminoácidos neutros e catiônicos 1; Cl⁻ - cloro; Cys - cisteína; Ile - isoleucina; Leu - leucina; Na⁺ - sódio; Phe - fenilalanina; Pro - prolina. (Fonte: Adaptado de Mastrototaro et al., 20146).

4.0. Coccidiose em frangos

A doença intestinal denominada como coccidiose aviária, é um dos principais problemas sanitários vivenciados na indústria de frango, e que gera grandes prejuízos nesse setor (Chapman, 2014; Györke et al., 2016). Uma vez que, além do custo para prevenir a doença, esta provoca uma redução considerável no desempenho produtivo das aves

(McDougald, 1998; Chapman, 2014; Shirley et al., 2004). Essa doença é causada por várias espécies do protozoário intestinal pertencentes ao gênero *Eimeria* (família Eimeriidae) e filo Apicomplexa (Menezes, 2018). Os protozoários pertencentes a este filo são parasitas intracelulares obrigatórios, caracterizados por conterem complexo apical com organelas especializadas únicas (micronemas, roptrias, grânulos densos e anéis conoides e polares) (Min et al., 2004; Menezes, 2018). Esse complexo é que fornece a estabilidade estrutural necessária durante o processo de invasão das células hospedeiras, proliferação, sobrevivência do parasita e a progressão do seu ciclo (Min et al., 2004; Hu et al., 2006; Morrison, 2009).

As espécies de *Eimeria* são hospedeiras-específicas e sete são as espécies de *Eimeria* reconhecidas que infectam especificamente as aves: *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. praecox*, *E. brunetti*, *E. necatrix* e *E. tenella* (Shirley et al., 2005). Essas espécies são sítios-específicas e o grau de patogenicidade varia de acordo com a espécie infectante, bem como pela carga genética e idade das aves (Lillehoj e Trout, 1993). As espécies de *Eimeria* altamente patogênicas são a *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. necatrix* e *E. tenella*, as levemente patogênicas incluem a *E. acervulina* e *E. mitis*, enquanto que a *E. praecox* é considerada a menos patogênica (Chapman, 2014; Morris et al., 2007). Todas essas espécies de *Eimeria* penetram no epitélio intestinal das aves, destruindo-o e causando sintomas em maior ou menor grau que varia de acordo com sua patogenicidade (Morris et al., 2007). Os sintomas dos animais com coccidiose incluem diarreia mucosa a sanguinolenta, despigmentação da pele, desidratação, anorexia, má absorção de nutrientes e redução do ganho de peso, com prejuízos diretos sobre o desempenho produtivo dos animais (Ruff et al., 1976; Allen, 1987; Chapman, 2014; Miska e Fetterer, 2018). A mortalidade devido à coccidiose é geralmente rara, entretanto, as lesões causadas nas células epiteliais do intestino podem tornar o animal mais susceptível às infecções secundárias, o que pode causar a mortalidade das aves (Ursula, 2011).

Cada espécie de *Eimeria* infecta uma porção distinta do intestino. A infecção causada pela *E. acervulina* e *E. praecox* localiza-se no duodeno, *E. maxima* e *necatrix* infectam o jejuno e íleo, *E. brunetti* infecta o íleo e intestino grosso, *E. mitis* infecta o íleo, e a *E. tenella* infecta o ceco (Chapman, 2014). As aves são tipicamente expostas a várias espécies

de *Eimeria*, sendo que a *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. praecox*, *E. mitis* e *E. tenella* são as mais comumente encontradas na produção de frangos de corte (Sun et al., 2009).

4.1. Ciclo de vida das *Eimeria* spp.

O tempo do ciclo de vida desses protozoários varia de acordo com a espécie, sendo que, normalmente, o período médio de conclusão do ciclo leva cerca de quatro a seis dias (Rasheed, 2012). O ciclo de vida das *Eimeria* spp. é complexo, sendo desenvolvido em um único hospedeiro (monóxeno) e consiste de dois estágios: estágio exógeno que ocorre no meio ambiente (esporulação), e estágio endógeno que se desenvolve no hospedeiro (reprodução assexuada e sexuada) (Figura 5) (Menezes, 2018).

O ciclo biológico das *Eimeria* spp. tem início quando o animal ingere oocistos esporulados contendo a forma infectante (esporozoítos), presente na cama, excretas e água contaminada (Menezes, 2018). Após a ingestão, o microambiente da moela e do proventrículo estimulam a ruptura da parede dos oocistos com consequente liberação dos esporocistos (Min et al., 2004; Quiroz-Castañeda e Dantán-González, 2015). No lúmen do intestino delgado, os esporocistos serão hidrolisados pela tripsina quinase tendo os seus esporozoítos liberados, uma forma móvel que invade e destrói as células da mucosa intestinal, dando início ao seu ciclo celular reprodutivo (Allen e Fetterer, 2002; Menezes, 2018). No epitélio intestinal, o parasita passará por uma série de divisões assexuadas (esquizogonia), resultando na formação de esquizontes que podem liberar centenas de merozoítos que infectam células hospedeiras vizinhas (Allen e Fetterer, 2002). Este ciclo assexual pode ser repetido várias vezes, causando patologia quando os parasitas se despreendem de enterócitos. Subsequentemente à invasão das novas células epiteliais, os merozoítos se diferenciam em micro (gameta masculino) e macrogametas (gameta feminino), e então esses gametas vão se reproduzirem, dando início à fase sexuada (gametogênese) do ciclo (Allen e Fetterer, 2002; Min et al., 2004; Chapman, 2014). O macrogameta é fecundado pelo microgameta para produzir zigotos, que mais tarde se diferenciam em oocistos não esporulados, e são liberados no lúmen intestinal sendo, em seguida, excretados para o ambiente pela ave (Allen e Fetterer, 2002). A partir deste momento, inicia-se a fase exógena (esporogonia) que ocorre num período mínimo de 24 horas, mediante algumas condições determinantes de temperatura, umidade e oxigênio,

resultando em oocistos esporulados que são totalmente infecciosos (Allen e Fetterer, 2002; Menezes, 2018).

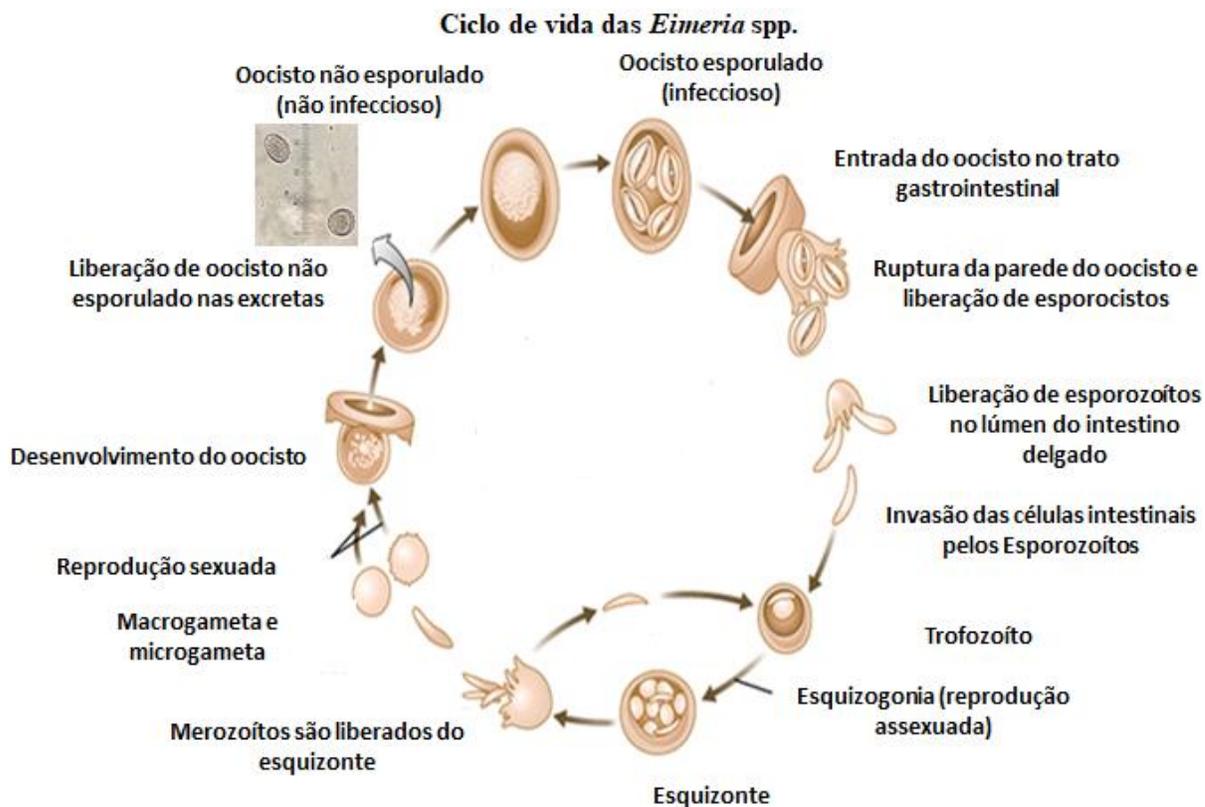


Figura 5 - Ciclo de vida biológico das *Eimeria* spp. (Fonte: Adaptado de Shelk, 2018).

4.2. Efeitos das *Eimeria* spp. sobre as células intestinais

Durante o desenvolvimento endógeno das *Eimeria* spp. no hospedeiro, dependendo da magnitude da infecção, podem ocorrer lesões intestinais leves a graves e patologia significativa (Chapman, 2014). O que pode causar inflamação e significativas modificações na morfologia e funcionalidade das células intestinais, incluindo a redução na altura e aumento de largura dos vilos intestinais, aumento da profundidade de cripta bem como redução na relação vilo:cripta, sendo que, muitas vezes, ocorre a destruição das células epiteliais, sem que ocorra a renovação das mesmas, causando sérios danos na barreira física do intestino (Min et al., 2004; Morris, et al., 2004; Silva et al., 2009; Freitas, 2014). A manutenção das células epiteliais em perfeitas condições depende do equilíbrio entre renovação celular (proliferação e diferenciação), e a perda de células por descamação, que ocorre naturalmente no ápice dos vilos (Freitas, 2014), principalmente diante de um desafio infeccioso que agride a mucosa intestinal. Contudo, a perda celular muitas vezes supera o

processo de renovação, causando alterações na mucosa intestinal, com efeitos diretos sobre a digestão e capacidade de absorção de nutrientes pelos enterócitos (Fernando e McCraw, 1973; Pluske et al., 1997; Pelicano et al., 2003).

Estudos têm demonstrado que os animais desafiados por *Eimeria* spp. apresentam redução na atividade de enzimas envolvidas com o processo de digestão intestinal, e alterações na expressão de genes relacionados com a digestão e absorção presentes na membrana apical dos enterócitos (Major e Ruff, 1978; Su et al., 2014; Miska e Fetterer, 2018), atribuindo esses resultados aos danos no tecido intestinal. Adicionalmente estudos demonstraram redução na absorção de nutrientes como zinco e ácido oleico (Turk e Stephens, 1967), metionina (Ruff et al., 1976), vitamina A e C (Koinarski et al., 2005) e vitamina E (Jafari et al., 2012). Adicionalmente, Paris e Wong (2013) sugeriram que todas essas mudanças possam causar depleção da principal fonte de energia (glutamina) para o intestino, bem como de alguns aminoácidos essenciais, que podem ser parte do mecanismo de defesa do hospedeiro para a eliminação de células infectadas e inibição da replicação de patógenos.

4.3. Resposta imune ao desafio por *Eimeria* spp. em frangos

A resposta imune dos animais ao desafio por espécies de *Eimeria* é espécie específica, assim à imunidade a uma espécie de *Eimeria* geralmente confere pouca ou nenhuma proteção cruzada contra outras espécies (Rochell, 2015). Dessa maneira, no caso de reinfecção o animal não estará imune a uma espécie diferente da primeira infecção (Dallou e Lillehoj, 2006). Segundo Allen e Fetterer (2002), a coccidiose aviária é altamente imunogênica e infecções primárias podem estimular imunidade sólida a desafios homólogos. Dessa forma, as respostas do hospedeiro contra a coccidiose são complexas e envolvem muitas facetas da resposta imune celular e humoral (Lillehoj e Trout, 1996). Durante o curso da infecção, a resposta imune é mediada pelas células B (anticorpos) e células T ativadas (Lillehoj e Trout, 1993), sendo que a imunidade mediada pelas células T desempenha um papel importante na proteção do hospedeiro contra a coccidiose em frangos, sendo considerada como o principal fator que confere resistência à coccidiose (Rose e Hesketh, 1979; Lillehoj, 1987; Lillehoj e Trout, 1993; Min et al., 2004).

Como o trato gastrointestinal é uma via de entrada para microrganismos exógenos incluindo as *Eimeria* spp., as células epiteliais intestinais dispõem de vários tipos de barreiras para proteger a mucosa intestinal de agentes patogênicos invasores (Okumura e Takeda, 2017). Essas barreiras incluem a camada de muco que recobre a mucosa intestinal, representando uma importante linha de defesa do animal, e também as junções celulares que mantêm as células unidas umas as outras. Juntas, essas barreiras inibem fisicamente a invasão da mucosa por microrganismos intestinais (Okumura e Takeda, 2017). Além disso, o tecido linfóide associado à mucosa do intestino (GALT) tem atraído atenção como um dos principais sistemas imunológicos de frangos (Lillehoj e Trout, 1996; Bar-Shira et al., 2003; Caldwell et al., 2004), já que as aves não possuem linfonodos bem definidos (Caldwell et al., 2004). E, principalmente porque a coccidiose é uma doença entérica, e a resposta imune é principalmente coordenada pelo GALT (Befus et al., 1980).

Em frangos, o GALT é composto por estruturas linfoides organizadas que incluem a bursa de Fabricius, tonsilas cecais, placa de Peyer, divertículo de Meckel, e agregados linfocitários intraepiteliais (linfócitos intraepiteliais - LIEs), sendo que esses LIEs também estão presentes na lâmina própria do trato gastrointestinal (Lillehoj e Trout, 1996). Os LIEs consistem principalmente de células T, e em menor extensão células B e Natural Killer (NK) (Lillehoj e Chung, 1992). Mesmo com esses sistemas de defesa intestinal, as *Eimeria* spp. conseguem vencer as barreiras e penetrar no epitélio intestinal, causando um estado de alerta na mucosa, iniciando uma resposta imune local (Yun et al., 2000). As funções básicas do sistema imunológico incluem a proteção do hospedeiro contra a infecção, por meio da sua detecção e eliminação do patógeno, sem causar danos indevidos às células do hospedeiro, além de desenvolver a memória imunológica, de maneira que as respostas subsequentes aos patógenos previamente encontrados sejam efetivas (Rochell, 2015). Isso requer uma resposta complexa, rápida e sustentada que seja coordenada pelo sistema imune inato e adaptativo (Rochell, 2015).

Nos frangos, as células chave do sistema imune inato incluem células NK, heterófilos, macrófagos, eosinófilos, basófilos e células dendríticas (Rochell, 2015). Quando esse protozoário vence as barreiras físicas intestinais, e penetra nos enterócitos com a consequente ruptura celular, o sistema imune detecta e responde rapidamente, por meio de receptores imunes inatos, como os do tipo Toll-like (TLR), pertencentes à família

de proteínas transmembranas (Gazzinelli e Denkers, 2006). Esses TLRs desempenham importante papel na resposta imune inata em infecções causadas por *Eimeria* spp. (Zhou et al., 2014).

Os TLRs são expressos pela maioria das células imunes, bem como por uma ampla variedade de tipos celulares, incluindo as células epiteliais intestinais e células imunes dentro da lâmina própria (Iqbal et al., 2005; Kogut et al., 2005; Feng et al., 2012). Esses receptores são os responsáveis pelo reconhecimento dos componentes conservados de patógenos, denominados de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs pathogen-associated molecular patterns), expressos por vários agentes infecciosos (Zhou et al., 2014). Os macrófagos são importantes elementos para o desencadeamento da resposta imune. Após o reconhecimento do patógeno, eles são capturados pelos macrófagos, que vão então processar os antígenos derivados do patógeno, para apresentarem a outras células do sistema imune (células T $CD8^+$ e $CD4^+$) em associação com o complexo principal de histocompatibilidade classes I ou II (MHC) (Rochell, 2015). As células T citotóxicas ($CD8^+$) reconhecem antígenos em associação com moléculas do MHC classe I, enquanto as células T auxiliares ($CD4^+$) reconhecem antígenos em associação com moléculas do MHC classe II (Lillehoj e Trout, 1996).

Assim como os macrófagos, as células dendríticas e as células B, também são células apresentadoras de antígenos especializadas que ativarão as células T naïve (Lillehoj e Trout, 1996; Abbas et al., 2011). Essas células (T naïve) até então quiescentes, têm a função de produzir interleucina 2 (IL-2) e expressar receptores para esta interleucina. O principal efeito da IL-2 é sobre a própria célula que a está secretando. Após as células T naïve serem estimuladas pelas células apresentadoras de antígenos, as mesmas serão diferenciadas em células auxiliares Th1 ou Th2, dependendo das citocinas presentes (Abbas et al., 2011). As células T naïve vão se diferenciar em células Th1 por indução da interleucina 12 (IL-12), e em células Th2 por indução da interleucina 4 (IL-4) (Abbas et al., 2011). As células Th1 produzirão grandes quantidades de interleucina 2 (IL-2), que induzirá a proliferação de células T (incluindo as próprias células T $CD4^+$ de maneira autócrina) (Abbas et al., 2011). A IL-2 também induz a proliferação e aumenta a capacidade citotóxica das células T $CD8^+$ (Abbas et al., 2011). As células Th1 vão produzir ainda, outras citocinas como o interferon gama (INF- γ), e o fator de necrose tumoral alfa

(TNF- α), relacionados principalmente com a defesa mediada por fagocitose contra agentes infecciosos intracelulares (Abbas et al., 2011; Rochell, 2015). O INF- γ atuará ativando os macrófagos infectados com patógenos intracelulares, incluindo os protozoários, além de ativar as células T CD8⁺ e NK (Abbas et al., 2011). Na resposta imune Th1, as células T citotóxicas ativadas são capazes de detectar células infectadas e destruí-las (Abbas et al., 2011). As células T citotóxicas ativadas terão como alvo os esquizontes e as fases sexuadas do parasita (Lillehoj e Trout, 1996). Quando a resposta mediada por células Th1 ocorre de forma bem sucedida, ocorrerá uma redução drástica na eliminação de oocistos, e os danos causados na mucosa intestinal pelo protozoário são interrompidos. Segundo Rochell (2015), essa resposta imune geralmente ocorre dentro de poucos minutos após a exposição do animal ao patógeno. Vale ressaltar que a IL-2 e o INF- γ desempenham um papel importante nesta resposta, uma vez que a IL-2 é responsável pela diferenciação das células T primárias, para uma resposta Th1, e o IFN- γ permite a diferenciação das células não diferenciadas em macrófagos e células NK (Lillehoj e Lillehoj, 2000). Assim, essas citocinas são importantes moléculas efetoras da imunidade inata e adaptativa contra microrganismos patogênicos (Hong et al., 2006). Dalloul e Lillehoj (2005) reforçam que a resposta imune do tipo Th1 e induzida pelo IFN- γ são os fatores dominantes durante a infecção por *Eimeria* spp. Além das citocinas citadas, estudos têm demonstrado maior expressão do gene interleucina 10 (*IL-10*) na mucosa intestinal de frangos desafiados por *Eimeria* spp. (Hong et al., 2006; Sand et al., 2016). A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória, secretada pelas células Th2. A IL-10 ameniza os danos no tecido intestinal, por inibir as citocinas pró-inflamatórias IL-2, IFN- γ , TNF- α e interleucina 1 beta (IL-1 β) (Arendt et al., 2016). Entretanto, Sand et al. (2016) supõem que a ativação potencialmente inapropriada da IL-10 durante a coccidiose, seja uma estratégia de defesa utilizada pelas *Eimeria* spp. para escapar da detecção imune no trato intestinal do hospedeiro.

Além da resposta imune celular e humoral mediada por células T e B respectivamente, um grupo de proteínas denominadas como proteínas de fase aguda incluindo a ovotransferrina, ceruloplasmina e mucoproteína α -1 glicoproteína ácida (AGP), demonstraram níveis aumentados no plasma das aves após a infecção por *Eimeria* (Rochell, 2015). Essas proteínas são secretadas pelo fígado, após o estímulo de citocinas pró-inflamatórias, sendo um indicativo de inflamação sistêmica (Gruys et al., 2005). Estas

proteínas podem participar diretamente na defesa do hospedeiro, bem como auxiliar o transporte de outras proteínas com atividade antioxidante e imunológicas (O'Reilly e Eckersall, 2014) que podem ser benéficas durante a coccidiose. No estudo conduzido por Rath et al. (2009) com frangos desafiados por *E. maxima* ou *E. tenella*, esses autores observaram aumento na ovotransferrina. Richard e Augustine (1988) observaram maior conteúdo de ceruloplasmina no plasma de frangos desafiados por *E. tenella*. Dessa forma, parece que a infecção por *Eimeria* spp. pode influenciar a síntese e secreção de proteínas de fase aguda, contudo o papel e a importância destas proteínas durante a coccidiose ainda não foram totalmente esclarecidos.

5.0. Desafio por *Eimeria* spp. e a sua relação com a produção de radicais livres e os sistemas antioxidantes

Radicais livres como o óxido nítrico (NO) e o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), são produtos conhecidos por serem gerados durante a resposta imune celular do hospedeiro à invasão das *Eimeria* spp. (Allen, 1987). Esses produtos oxidativos podem ser sintetizados e secretados por vários tipos de células como os macrófagos, em resposta ao estímulo de citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo, o interferon gama (IFN- γ) (Min et al., 2004). Adicionalmente, o superóxido também pode ser produzido durante a fagocitose (Rosen et al., 1995; Min et al., 2004). O nitrito e o nitrato são os produtos primários estáveis e não voláteis da degradação do óxido nítrico (Berlett e Stadtman, 1997; Habib e Ali, 2011). O aumento destes produtos no organismo durante condições patológicas é considerado como um indicativo de aumento da produção do NO (Watanabe et al., 2001).

Estudos têm demonstrado que frangos desafiados com *Eimeria* spp. apresentam maior nível de nitrito e nitrato no plasma (Allen, 1999; Allen e Fetterer, 2000). Allen (1997), Allen (1999) e Allen e Fetterer (2000) citam que os valores máximos de nitrato e nitrito no plasma e na mucosa intestinal, dos animais desafiados por *Eimeria* spp., foram observados no momento de maior desorganização da mucosa intestinal, sendo associados com a formação de gametas e a produção e liberação dos oocistos dos enterócitos. Além da função imune realizada pelo IFN- γ , o mesmo pode agir como um potente indutor da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), que produz o óxido nítrico que tem sido proposto ser a molécula efetora capaz de prejudicar a replicação intracelular das *Eimeria* spp. (Min

et al., 2004). Uma vez que, o NO resultante da ativação da iNOS possui ação citotóxica e citostática, promovendo a destruição de microrganismos, parasitas e células tumorais (Dusse et al., 2003). O NO é um radical livre altamente reativo, sintetizado a partir da L-arginina por enzimas conhecidas como óxido nítrico sintase (NOS) (Moncada et al., 1997). Esse radical livre possui uma variedade de funções biológicas (Dusse et al., 2003), sendo que o NO produzido pela iNOS, é considerado como um agente citotóxico contra parasitas, bactérias, vírus, células tumorais e outros microrganismos invasores, devido às suas propriedades oxidantes diretas, e da sua capacidade de reagir com compostos intracelulares, sendo gerado em grandes quantidades durante respostas imunológicas (Moilanen e Vapaatalo, 1995; Dusse et al., 2003). A ação direta do NO como oxidante, possivelmente ocorre devido à sua reação com metais (especialmente o ferro) presentes nas enzimas dos seus alvos (Dusse et al., 2003), e através da inativação de enzimas fundamentais para o ciclo de Krebs, para a cadeia de transporte de elétrons, para a síntese de DNA e para o mecanismo de proliferação celular (Dusse et al., 2003). Durante a infecção, células ativadas como macrófagos e neutrófilos secretam simultaneamente NO e intermediários reativos do oxigênio, assim, a ação citotóxica indireta do NO ocorre principalmente por meio da sua reação com esse intermediário do oxigênio (Dusse et al., 2003). O NO, ao interagir com radicais derivados do oxigênio como o superóxido, produz outras substâncias tóxicas, como o peroxinitrito (ONOO^-) que é um poderoso agente oxidante (Beckman et al., 1990; Kamat, 2006), capaz de oxidar biomoléculas importantes como os lipídeos e as proteínas, assim como pode inibir a atividade de importantes enzimas antioxidantes como a catalase e a glutathione peroxidase (Radi et al., 1991; Asahi et al., 1995; Brown, 1995; Dusser et al., 2003; Prolo et al., 2014). Causando assim, um estado biológico conhecido como estresse oxidativo nos animais infectados.

O organismo do animal dispõe de dois tipos de mecanismos de defesa antioxidante bastante eficiente, cuja função principal é suprimir ou impedir a formação de radicais livres (Ighodaro e Akinloye, 2018). Essa defesa antioxidante pode ser mediada por antioxidantes não enzimáticos, dentre estes a metionina (Levine et al., 1996), ácido úrico (Simoyi et al., 2002), vitaminas lipossolúveis, zinco e selênio (Siqueira-Catania et al., 2009), e principalmente, por antioxidantes enzimáticos, que fornecem a primeira linha de defesa antioxidante, representados principalmente pelas enzimas superóxido dismutase (SOD),

catalase e o sistema da glutathione (GSH) (Kuss, 2005). A enzima superóxido dismutase (SOD) encontra-se no organismo dos animais sob diferentes formas e com distintas localizações: a enzima superóxido dismutase, contendo manganês em seu sítio ativo (Mn-SOD), está presente nas mitocôndrias, e a SOD, que contém cobre e zinco em seu sítio ativo (CuZn-SOD) é encontrada no citoplasma celular (Halliwell, 1994). Juntas, essas formas atuam auxiliando no controle da produção de radicais livres. A SOD é fundamental na eliminação do ânion superóxido, gerando nessa reação denominada dismutação, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (Halliwell, 1994). O peróxido de hidrogênio formado, pode ser eliminado através de reações catalisadas pela enzima catalase ou pelo sistema da glutathione (Fang et al., 2002), completando o processo de desintoxicação iniciado pela SOD. A catalase é uma enzima abundante nas células e é altamente eficiente, podendo decompor grande quantidade de moléculas de peróxido de hidrogênio por segundo (Ighodaro e Akiloye, 2018). Esta enzima encontra-se localizada principalmente nos peroxissomos, mas estão ausentes nas mitocôndrias das células de mamíferos, com exceção dos ratos (Ighodaro e Akiloye, 2018). Assim, nas mitocôndrias, a decomposição do peróxido de hidrogênio é realizada por outra enzima conhecida como glutathione peroxidase (Ighodaro e Akiloye, 2018).

Adicionalmente à produção de radicais livres endógenos durante a coccidiose, estudos têm demonstrado que os animais também apresentam alterações na atividade das enzimas antioxidantes (Georgieva et al., 2006; Bun et al., 2011), bem como redução nos níveis de antioxidantes não enzimáticos como a metionina (Ruff et al., 1976), os carotenoides, vitaminas C e E (Allen e Fetterer, 2002; Koinarski et al., 2006; Georgieva et al., 2011; Jafari et al., 2012). Indicando assim, que os animais desafiados pelas *Eimeria* spp. podem desenvolver um estado de estresse oxidativo em virtude da maior produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, e pela menor capacidade antioxidante.

6.0. Relação da metionina com a defesa antioxidante e o sistema imune

A metionina está entre os diversos componentes nutritivos conhecidos que podem agir como antioxidantes (Levine et al., 1996) e, assim, pode atenuar os efeitos prejudiciais dos radicais livres às células. Isso porque, além de estar envolvida na síntese da glutathione (Wang et al., 1997; Métayer et al., 2008), este aminoácido apresenta efeito antioxidante

direto de proteção contra o estresse oxidativo, por ser um dos resíduos mais prontamente oxidados nas proteínas (Levine et al., 2000). Dentre as substâncias oxidantes que direta ou indiretamente atacam a metionina, está a cloramina, peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso, oxigênio, ozônio, peroxinitrito (na ausência de dióxido de carbono) e superóxido (Levine et al., 2000).

A metionina, ao reagir com as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, é oxidada de maneira reversível, formando metionina sulfóxido. A enzima metionina sulfóxido redutase A (MsrA) então, catalisa a reação de redução da metionina sulfóxido a metionina (Weissbach et al., 2005), sendo esse processo dependente da enzima tioredoxina (TRx). Após a redução dos resíduos de metionina nas proteínas, as mesmas podem voltar a reagir com os radicais livres. A enzima tioredoxina é oxidada na reação, e então é reduzida novamente a tioredoxina através da reação catalisada pela enzima tioredoxina redutase (TRxR), à custa de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) (Koháryová e Kollárová, 2008). A partir desse coordenado e complexo ciclo enzimático, pode ocorrer então à eliminação catalítica das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio dependentes de resíduos de metionina (Luo e Levine, 2009). Vale ressaltar que além da oxidação da glutatona, a metionina sulfóxido é a única modificação de aminoácido que conta com um sistema de reparo enzimático, assim a metionina presente nas proteínas pode fornecer defesa antioxidante direta para a molécula em que se encontra, bem como para toda a célula (Stadtman e Levine, 2003; Luo e Levine, 2009; Nakao et al., 2003).

A resposta metabólica à infecção e lesão tecidual é mediada por uma série de mensageiros secundários e mecanismos de sinalização celular, que oferecem amplo escopo para modulação nutricional (Grimble e Grimble, 1998). A modulação nutricional da resposta imune ocorre em três níveis principais, dentre estes está à alteração do estado redox das células ou por alterar o vigor dos mecanismos de defesa antioxidante, sendo que esta forma de modulação, envolve componentes antioxidantes presentes na dieta e aminoácidos sulfurados como a metionina (Grimble e Grimble, 1998).

A metionina tem demonstrado importância para garantir a saúde intestinal bem como a função imune do tecido, durante o desenvolvimento do animal e durante a inflamação (Ruth e Field, 2013). De acordo com Rubin et al. (2007), a metionina afeta o sistema imunológico, melhorando a resposta imune celular e humoral. Entretanto, o nível de

metionina necessário para a resposta imune ideal são maiores do que para o crescimento (Tsiagbe et al., 1987; Swain e Johri, 2000; Mirzaaghatabar et al., 2011). Mirzaaghatabar et al. (2011) adicionando 1,2% de metionina nas rações de frangos, observaram maior título de imunoglobulina G (IgG), leucócito total, porcentagem de linfócitos e heterofilos, sugerindo que este nível de adição de metionina induziu maior imunidade humoral, sem afetar o desempenho desses animais. A relação da metionina com o sistema imune possivelmente se dá por meio de alguns de seus metabólitos como a glutathiona (GSH) (Grimble, 2006). Esse metabólito tem importante propriedade imunomoduladora, por meio da defesa antioxidante capaz de proteger o ambiente intestinal dos danos oxidativos durante reações imunológicas, e auxiliando a proliferação de células T (Grimble, 2006). Provavelmente, essa proliferação ocorre por meio da ativação de fatores de transcrição fortemente associados à proliferação celular (por exemplo, o ativador de proteína 1 (AP1)) (Grimble, 2006). Adicionalmente, outro produto do metabolismo da metionina, a cisteína também parece ser terapêutica em estados inflamatórios (Ruth e Field, 2013). Isso porque menor infiltração de células inflamatórias, danos à cripta e menor permeabilidade intestinal foram observados nos suínos suplementados com cisteína (Kim et al., 2009).

7.0. Desafio por *Eimeria* spp. e apoptose

A morte celular pode ocorrer por meio de alguns mecanismos biológicos diferentes, dentre estes a apoptose e necrose (Rock e Kono, 2008). A apoptose celular é um mecanismo de morte celular programada, altamente regulado por muitos genes (Metzstein et al., 1998). Esse mecanismo é imprescindível para o desenvolvimento dos animais, sendo reconhecido como parte normal do desenvolvimento e homeostase dos tecidos dos animais, por ser responsável pela manutenção do equilíbrio celular entre proliferação e morte (Vaux e Strasser, 1996; Ramachandran et al., 2000). Este mecanismo de morte é responsável pela eliminação de células danificadas que perderam suas funções, ou as células indesejadas presentes nos tecidos biológicos, para manter assim uma quantidade constante da população celular (Vaux e Strasser, 1996).

A apoptose pode ainda atuar como um importante mecanismo de defesa, por eliminar células danificadas ou infectadas por patógenos intracelulares, o que poderia eliminar o patógeno no estágio inicial da infecção, sem emitir sinal de alarme (Ashida et al., 2011).

Outro mecanismo de defesa desse processo seria através da indução de células dendríticas para fagocitar corpos apoptóticos contendo patógenos, o que permitiria que antígenos extracelulares entrassem em contato com o MHC, e subsequentemente, ocorresse à indução de uma resposta imune protetora (Elliott e Ravichandran, 2010; Ashida et al., 2011).

Os principais eventos da apoptose incluem a condensação nuclear, colapso do citoesqueleto, dissolução do envelope nuclear e fragmentação da cromatina (Heussler et al., 2001). Alterações na membrana das células apoptóticas sinalizam células fagocitárias completando seu processo de degradação (Heussler et al., 2001). Uma característica importante da apoptose, é a eliminação da célula morta sem a indução de uma resposta inflamatória (Heussler et al., 2001). A necrose também é um processo de morte celular, entretanto este é um mecanismo de ordem patológica, ligado à perda da integridade das membranas celulares, promovendo o extravasamento de enzimas intracelulares derivadas dos lisossomos, capazes de digerirem células lesadas (Heussler et al., 2001; Ashida et al., 2011). Dessa forma, esse processo causa a liberação de conteúdo celular que inicia um processo de inflamação, a fim de reparar o tecido danificado (Heussler et al., 2001).

Os mecanismos da apoptose envolvem cascatas de eventos moleculares dependentes de energia (Elmore, 2007). Existem duas principais vias de sinalização da apoptose: a via extrínseca (via dos receptores de morte celular), e a via intrínseca (via das mitocôndrias) (Heussler et al., 2001). Essas vias de sinalização desencadeiam a execução da apoptose, especificamente, por meio da ativação de uma família de proteases de cisteína intracelular, denominadas como caspases (Elmore, 2007). As caspases estão armazenadas nas células como grânulos de zimogênios inativos, e podem ser ativadas por um processo envolvendo geralmente o seu processamento proteolítico (Shi, 2004).

A via extrínseca da apoptose é ativada após o estímulo dos receptores de morte presentes na membrana celular, como por exemplo os receptores da família do fator de necrose tumoral (TNF) (Elmore, 2007). Esses receptores transmitem a sinalização apoptótica externa ao complexo da apoptose, o que resulta na ativação das caspases executoras 3 e 7 (Ashida et al., 2011). A via de apoptose dependente das mitocôndrias (intrínseca) é governada pelas proteínas da família Bcl-2 (Heussler et al., 2001). Os membros dessa família estão divididos em moléculas pró-apoptóticas como, por exemplo, a proteína X associada ao Bcl-2 (BAX), e anti-apoptóticas, incluindo a proteína linfoma de

células B 2 (Bcl-2) (Elmore, 2007). Quando um sinal apoptótico é detectado, a BAX transloca-se pelo citoplasma e se adere à membrana mitocondrial externa, liberando o citocromo c dessas organelas (Faria et al., 2006). No citoplasma, o citocromo c irá se ligar ao fator apoptótico de ativação de protease 1 (Apaf-1) ativando-o, para formar o apoptossomo, um complexo proteico multimérico que ativará proteoliticamente a procaspase-9, num processo dependente de energia (Faria et al., 2006; Ashida et al., 2011). Em seguida, a caspase 9 (iniciadora) agora ativada, irá ativar as caspases efetoras da apoptose, incluindo a caspase 3 (Ashida et al., 2011). Por outro lado, a proteína Bcl-2, é uma proteína com função anti-apoptótica (Opferman e Kothari, 2017) que favorece a sobrevivência celular. Essa proteína atua impedindo que o citocromo c escape da mitocôndria, possivelmente pela inibição de proteínas pró-apoptóticas, mediante a formação de heterodímeros com a BAX (Chipuk e Douglas, 2008).

Estudos têm relacionado à perda celular do intestino durante a coccidiose, com o mecanismo de apoptose (Major et al., 2011, Tan et al., 2014; Yan et al., 2015; Abdel-Haleem et al., 2017). Os agentes patogênicos, incluindo as espécies do gênero *Eimeria*, ao penetrarem no intestino e com o desenvolvimento do seu ciclo, acabam promovendo a morte das células, entretanto, ao mesmo tempo, esses agentes são dependentes de células vivas e das suas funções (Leirião et al., 2004). Dessa forma, esses agentes patogênicos desenvolveram mecanismos capazes de permitir o seu desenvolvimento, protegendo-os da morte (Leirião et al., 2004). O estudo de del Cacho et al. (2004) fornece evidências de que as *Eimeria* spp. lançam mão de algumas estratégias para garantir o seu ciclo de vida na célula, sugerindo que possivelmente isso ocorra por meio da ativação da via metabólica do fator de transcrição nuclear NF-kB, garantindo, assim, a sua sobrevivência intracelular. Em células não estimuladas, o NF-kB está presente no citoplasma como um complexo citoplasmático com a proteína inibitória específica (IκB) (Heussler et al., 2001). Quando ocorre um estímulo como a infecção induzida por uma variedade de patógenos, a proteína IκB é fosforilada, causando a dissociação do complexo NF-kB-IκB, com a liberação e a translocação do NF-kB para o núcleo celular, onde o NF-kB regulará a transcrição de vários genes, incluindo aqueles envolvidos na inibição da via da apoptose (Heussler et al., 2001).

Adicionalmente, del Cacho et al. (2004) sugerem que quando necessário as *Eimeria* spp. inibem a via do NF- κ B, a fim de desencadear a apoptose celular para facilitar a sua liberação dos enterócitos permitindo que as mesmas invadam células vizinhas e escapem de células imunológicas (Ashida et al., 2011).

8.0. Por que avaliar a suplementação de metionina (livre ou dipeptídeo) em dietas de frangos de corte em situações de desafio por *Eimeria* spp.?

Como a coccidiose é reconhecida mundialmente na indústria avícola como uma doença entérica, que promove considerável redução no desempenho produtivo do animal, inúmeras estratégias de controle têm sido utilizadas no combate da doença (Dalloul e Lillehoj, 2006; Lillehoj et al., 2011). Uma dessas estratégias envolve o uso de compostos anticoccidianos que previnem o crescimento e replicação dos protozoários no hospedeiro, ou até mesmo promovem a sua destruição (Quiroz-Castañeda e Dantán-González, 2015). Além disso, vacinas têm sido utilizadas na prevenção da doença, e isso adicionalmente as perdas produtivas, resulta em grande perda econômica para a indústria de frangos (Dalloul e Lillehoj, 2006; Lillehoj et al., 2011).

Como a reação imune é específica para cada espécie de *Eimeria*, as vacinas anticoccidianas não são totalmente eficazes, principalmente porque a distribuição das *Eimeria* spp. pode variar entre e dentro das explorações avícolas (Quiroz-Castañeda e Dantán-González, 2015). Adicionalmente, a resistência das aves aos agentes anticoccidianos, tem direcionado a busca de produtos naturais com atividade anticoccidiana eficiente (Abbas et al., 2011). Esses compostos naturais (por exemplo: óleos essenciais, extrato herbal e probióticos) são utilizados como suplementos dietéticos, apresentando efeitos variados que incluem a estimulação do sistema imune, atividades anti-inflamatória e antioxidante (Abbas et al., 2012; Quiroz-Castañeda e Dantán-González, 2015). Arab et al. (2006) avaliaram os efeitos anticoccidianos da artemisinina em frangos desafiados por *Eimeria* spp. Esses autores demonstraram redução significativa na produção de oocistos por grama de fezes dos animais desafiados, concluindo que o extrato desta planta pode reduzir a infecção por coccidiose em frangos de corte. Além disso, estudos têm demonstrado que alguns aminoácidos podem atenuar os danos celulares causados pelo desafio por *Eimeria*

spp. sugerindo um efeito trófico desses aminoácidos no epitélio intestinal (Sakamoto et al., 2014; Tan et al., 2014; Luquetti et al., 2016; Fernandes et al., 2018).

Assim, a partir das funções conhecidas da metionina em frangos de corte (promoção do crescimento e ação antioxidante), e comprovadas pelo nosso grupo de pesquisa (Del Vesco et al., 2015a, b), e sobre a hipótese de que os transportadores de dipeptídeos são menos afetados por problemas de agressões à mucosa intestinal, comparado com os transportadores para aminoácidos livres, nosso objetivo foi investigar se a metionina na sua forma livre e de dipeptídeo poderia atenuar os efeitos prejudiciais da infecção por *Eimeria* spp. em frangos de corte. Vale ressaltar que este é o primeiro trabalho utilizando o dipeptídeo de metionina em frangos de corte desafiados por *Eimeria* spp.

9.0. Objetivo da revisão de literatura

Essa revisão de literatura teve como principal objetivo apresentar informações sobre a coccidiose, a relação dessa doença com o estado redox e mecanismo de morte celular, bem como essa doença pode afetar o desempenho produtivo de frangos de corte. Além de demonstrar os possíveis efeitos benéficos de proteção da metionina sobre o intestino delgado (jejuno).

REFERÊNCIAS

- Abbas, A. K.; Lichtman, A. H. e Pillai, S. 2011. *Imunologia celular e molecular*. 7ª ed. Elsevier, Rio de Janeiro.
- Abbas, R. Z.; Colwell, D. D. e Gilleard, J. 2012. Botanicals: an alternative approach for the control of avian coccidiosis. *Worlds Poultr Sci J.* 68:203-215. doi:10.1017/S0043933912000268.
- Abbas, R. Z.; Iqbal, Z.; Blake, D.; Khan, M. N. e Saleemi, M. K. 2011. Anticoccidial drug resistance in fowl coccidia: The state of play revisited. *World's Poultry Science Journal* 67:337-350.
- Abdel-Haleem, H. M.; Aboelhadid, S. M.; Sakran, T.; El-Shahawy, G.; El-Fayoumi, H.; Al-Quraishy, S. e Abdel-Baki, A. S. 2017. Gene expression, oxidative stress and apoptotic changes in rabbit ileum experimentally infected with *Eimeria intestinalis*. *Folia Parasitologica* 64:1-7.
- ABPA. 2018. Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório anual 2018. Brasil. Disponível em: < > Acessado em 20/03/2019.
- Adibi, S. A. 2003. Regulation of expression of the intestinal oligopeptide transporter (Pept-1) in health and disease. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 285:G779-G788.
- Agu, R.; Cowley, E.; Shao, D.; Macdonald, C.; Kirkpatrick, D.; Renton, K. e Massoud, E. 2011. Proton-coupled oligopeptide transporter (POT) family expression in human nasal epithelium and their drug transport potential. *Molecular pharmaceutics* 8:664-672.
- Allen, P. C. 1987. Physiological Responses of chicken gut tissue to coccidial infection: Comparative effects of *Eimeria acervulina* and *Eimeria mitis* on mucosal mass, carotenoid content, and brush border enzyme activity. *Poultry Science* 66:1306-1315.
- Allen, P. C. 1997. Production of free radical species during *Eimeria maxima* infections in chickens. *Poultry Science* 76:814-821.
- Allen, P. C. 1999. Effects of daily oral doses of L-Arginine on coccidiosis infections in chickens. *Poultry Science* 78:1506-1509.
- Allen, P. C. e Fetterer, R. H. 2000. Effect of *Eimeria acervulina* infections on plasma L-arginine. *Poultry Science* 79:1414-1417.
- Allen, P. C. e Fetterer, R. H. 2002. Interaction of dietary vitamin E with *Eimeria maxima* infections in chickens. *Poultry Science* 81:41-48.
- Allen, P. C. e Fetterer, R. H. 2002. Recent advances in biology and immunobiology of *Eimeria* species and in diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry. *Clinical Microbiology Reviews* 15:58-65.
- Alpers, D. H. 2000. Is glutamine a unique fuel for small intestinal cells?. *Current opinion in gastroenterology* 16:155-159.
- Arab, H. A.; Rahbari, S.; Rassouli, A.; Moslemi, M. H. e Khosravirad, F. 2006. Determination of artemisinin in *Artemisia sieberi* and anticoccidial effects of the plant extract in broiler chickens. *Tropical animal health and production* 38:497-503.
- Arackal, B. 2016. Small intestine. Disponível em: <<https://www.slideshare.net/brissomathewarackal/small-intestine-66619485>>. Acessado em: 20 mar, 2019.

- Arendt, M. K.; Sand, J. M.; Marcone, T. M. e Cook, M. E. 2016. Interleukin-10 neutralizing antibody for detection of intestinal luminal levels and as a dietary additive in *Eimeria* challenged broiler chicks. *Poultry Science* 95:430-438.
- Artoni, S. M. B.; Nakaghi, L. S.; Borges, L. L. e Macari, M. 2014. Sistema digestório das aves. p. 1-17. In: *Nutrição de não ruminantes*. 1^a ed. Sakomura, N. K.; Silva, J. H. V.; Costa, F. G. P.; Fernandes, J. B. K e Hauschild, L., ed., Funep, Jaboticabal.
- Asahi, M.; Fujii, J.; Suzuki, K.; Seo, H. G.; Kuzuya, T.; Hori, M.; Tada, M.; Fujii, S. e Taniguchi, N. 1995. Inactivation of glutathione peroxidase by nitric oxide. Implication for cytotoxicity. *The Journal of biological chemistry* 270:21035-21039.
- Ashida, H.; Mimuro, H.; Ogawa, M.; Kobayashi, T.; Sanada, T.; Kim, M. e Sasakawa, C. 2011. Cell death and infection: a double-edged sword for host and pathogen survival. *The Journal of Cell Biology* 195:931-942.
- Awad, W. A.; Hess, C. e Hess, M. 2017. Enteric pathogens and their toxin-induced disruption of the intestinal barrier through alteration of tight junctions in chickens. *Toxins (Basel)* 9:1-22.
- Baião, N. C. e Lara, L. J. C. 2005. Oil and fat in broiler nutrition. *Brazilian Journal of Poultry Science* 7:129-141.
- Bala, P. A.; Foster, J.; Carvelli, L. e Henry, K. L. 2013. SLC6 Transporters: structure, function, regulation, disease association and therapeutics. *Molecular Aspects of Medicine* 34:197-219.
- Barbot, L.; Windsor, E.; Rome, S.; Tricottet, V.; Reynès, M.; Topouchian, A.; Huneau, J. F.; Gobert, J. G.; Tomé, D. e Kapel, N. 2003. Intestinal peptide transporter PepT1 is over-expressed during acute cryptosporidiosis in suckling rats as a result of both malnutrition and experimental parasite infection. *Parasitology Research* 89:364-370.
- Bar-Shira, E.; Sklan, D. e Friedman, A. 2003. Establishment of immune competence in the avian GALT during the immediate post-hatch period. *Developmental and Comparative Immunology* 27:147-157.
- Bauer, A. J. 2008. Mentation on the immunological modulation of gastrointestinal motility. *Neurogastroenterol Motil* 20:81-90.
- Beckman, J. S.; Beckman, T. W.; Chen, J.; Marshall, P. A. e Freeman, B. A. 1990. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87:1620-1624.
- Befus, A. D.; Johnston, N.; Leslie, G. A. e Bienenstock, J. 1980. Gut-associated lymphoid tissue in the chicken. *The Journal of Immunology* 125:2626-2632.
- Berlett, B. S. e Stadtman, E. R. 1997. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry* 272:20313-20316.
- Bertechini, A. G. 2012. *Nutrição de monogástricos*. 2^a ed. UFLA, Lavras.
- Bröer, A.; Juelich, T.; Vanslambrouck, J. M.; Tietze, N.; Solomon, P. S.; Holst, J.; Bailey, C. G.; Rasko, J. E. J. e Bröer, S. 2011. Impaired nutrient signaling and body weight control in a NA⁺ neutral amino acid cotransporter (SLC6A19)-deficient mouse. *The Journal of biological chemistry* 286:26638-26651.
- Bröer, A.; Klingel, K.; Kowalczyk, S.; Rasko, J. E. J.; Cavanaugh, J. e Bröer, S. 2004. Molecular cloning of mouse amino acid transport system b0, a neutral amino acid transporter related to Hartnup disorder. *The Journal of Biological Chemistry* 279:24467-24476.

- Bröer, S. 2002. Adaptation of plasma membrane amino acid transport mechanisms to physiological demands. *Pflügers Archiv: European journal of physiology* 444:457-466.
- Bröer, S. 2008. Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. *Physiological reviews* 88:249-286.
- Bröer, S. 2009. The role of the neutral amino acid transporter B0AT1 (SLC6A19) in Hartnup disorder and protein nutrition. *IUBMB life* 61:591-599.
- Bröer, S. e Bröer, A. 2017. Amino acid homeostasis and signalling in mammalian cells and organisms. *The Biochemical Journal* 474:1935-1963.
- Bröer, S. e Palacín, M. 2011. The role of amino acid transporters in inherited and acquired diseases. *The Biochemical Journal* 436:193-211.
- Brosnan, J. T. e Brosnan, M. E. 2006. The sulfur-containing amino acids: An overview. *The Journal of Nutrition* 136:1636S-1640S.
- Brown, G. C. 1995. Reversible binding and inhibition of catalase by nitric oxide. *European journal of biochemistry/FEBS* 232:188-191.
- Bun, S. D.; Guo, Y. M.; Guo, F. C.; Ji, F. J. e Cao, H. 2011. Influence of organic zinc supplementation on the antioxidant status and immune responses of broilers challenged with *Eimeria tenella*. *Poultry Science* 90:1220-1226.
- Caldwell, D. J.; Danforth, H. D.; Morris, B. C.; Ameiss, K. A e McElroy, A. P. 2004. Participation of the intestinal epithelium and mast cells in local mucosal immune responses in commercial poultry. *Poultry Science* 83:591-599.
- Camargo, S. M. R.; Singer, D.; Makrides, V.; Huggel, K.; Pos, K. M.; Wagner, C. A.; Kuba, K.; Danilczyk, U.; Skovby, F.; Kleta, R.; Penninger, J. M. e Verrey, F. 2009. Tissue-specific amino acid transporter partners ACE2 and collectrin differentially interact with Hartnup mutations. *Gastroenterology* 136:872-882.
- Chapman, H. D. 2014. Milestones in avian coccidiosis research: A review. *Poultry Science* 93:501-511.
- Chen, H.; Pan, YX.; Wong, E. A.; Bloomquist, J. R. e Webb, K. E. Jr. 2002. Molecular cloning and functional expression of a chicken intestinal peptide transporter (cPepT1) in *Xenopus* oocytes and chinese hamster ovary cells. *The Journal of Nutrition* 132:387-393.
- Chen, H.; Wong, E. A. e Webb, K. E. Jr. 1999. Tissue distribution of a peptide transporter mRNA in sheep, dairy cows, pigs, and chickens. *Journal of Animal Science* 77:1277-1283.
- Chen, Q.; Dai, W.; Sun, Y.; Zhao, F.; Liu, J. e Liu, H. 2018. Methionine partially replaced by methionyl-methionine dipeptide improves reproductive performance over methionine alone in methionine-deficient mice. *Nutrients* 10:1-14.
- Chen, J.; Tellez, G.; Richards, J. D. e Escobar, J. 2015. Identification of potential biomarkers for gut barrier failure in broiler chickens. *Frontier in Veterinary Science* 2:1-14.
- Chipuk, J. E. e Green, D. R. 2008. How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization?. *Trends in Cell Biology*, 18:157-164.
- Closs, E. I.; Boissel, J. P.; Habermeier, A. e Rotmann, A. 2006. Structure and function of cationic amino acid transporters (CATs). *The Journal of Membrane Biology* 213:67-77.
- Cooper, G. M. 2000. *The cell: A molecular approach*. 2^a ed., Sunderland (MA), Sinauer Associates.
- Corfield, A. P.; Carroll, D.; Myerscough, N. e Probert, C. S. 2001. Mucins in the gastrointestinal tract in health and disease. *Frontiers in bioscience* 6:1321-1357.

- Costa, F. G. P.; Silva, J. H. V.; Goulart, C. C.; Nogueira, E. T. e Sá, L. M. 2014. Exigências de aminoácidos para aves. p. 241-261. In: Nutrição de não ruminantes. Sakomura, N. K.; Silva, J. H. V.; Costa, F. G. P.; Fernandes, J. B. K. e Hauschild, L., ed. Funep, Jaboticabal.
- Dabrowski, K.; Lee, K. J. e Rinchard, J. 2003. The smallest vertebrate, teleost fish, can utilize synthetic dipeptide-based diets. *The Journal of Nutrition* 133:4225-4229.
- Dabrowski, K.; Terjesen, B. F.; Zhang, Y.; Phang, J. M. e Lee, K-J. 2005. A concept of dietary dipeptides: a step to resolve the problem of amino acid availability in the early life of vertebrates. *The Journal of Experimental Biology* 208:2885-2894.
- Dalloul, R. A e Lillehoj, H. S. 2006. Poultry coccidiosis: recent advancements in control measures and vaccine development. *Expert review of vaccines* 5:143-163.
- Dalloul, R. A. e Lillehoj, H. S. 2005. Recent advances in immunomodulation and vaccination strategies against coccidiosis. *Avian Diseases* 49:1-8.
- Daniel, H. 2004. Molecular and integrative physiology of intestinal peptide transport. *Annual review of physiology* 66:361-384.
- Daniel, H. e Kottra, G. 2004. The proton oligopeptide cotransporter family SLC15 in physiology and pharmacology. *Pflügers Archiv: European journal of physiology* 447:610-618.
- del Cacho, E.; Gallego, M.; López-Bernad, F.; Quílez, J. e Sánchez-Acedo, C. 2004. Expression of anti-apoptotic factors in cells parasitized by second-generation schizonts of *Eimeria tenella* and *Eimeria necatrix*. *Veterinary Parasitology* 125:287-300.
- Del Vesco, A. P.; Gasparino, E.; Grieser, D. O.; Zancanela, V.; Soares, M. A. M. e Oliveira-Neto A. R. 2015b. Effects of methionine supplementation on the expression of oxidative stress-related genes in acute heat stress-exposed broilers. *British Journal of Nutrition* 113:549-559.
- Del Vesco, A. P.; Gasparino, E.; Grieser, D. O.; Zancanela, V.; Voltolini, D. M.; Khatlab, A. S.; Guimarães, S. E. F.; Soares, M. A. M. e Oliveira-Neto, A. R. 2015a. Effects of methionine supplementation on the expression of protein deposition-related genes in acute heat stress-exposed broilers. *PLoS ONE* 10:1-10.
- Denbow, D. M. 1994. Peripheral regulation of food intake in poultry. *The Journal of Nutrition* 124:1349S-1354S.
- Deplancke, B. e Gaskins H. R. 2001. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *The American journal of clinical nutrition* 73:1131S:1141S.
- Dharmani, P.; Srivastava, V.; Kisson-Singh, V. e Chadee, K. 2009. Role of intestinal mucins in innate host defense mechanisms against pathogens. *Journal of innate immunity* 1:123-135.
- Dilger, R. N. e Baker, D. H. 2007. DL-methionine is as efficacious as l-methionine, but modest l-cystine excesses are anorexigenic in sulfur amino acid-deficient purified and practical-type diets fed to chicks. *Poultry Science* 86:2367-2374.
- Dusse, L. M.; Vieira, L. M e Carvalho, M. G. 2003. Revisão sobre óxido nítrico. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 39:343-350.
- Elliott, M. R. e Ravichandran, K. S. 2010. Clearance of apoptotic cells: implications in health and disease. *The Journal of Cell Biology* 189:1059-1070.
- Elmore, S. 2007. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic pathology* 35:495-516.

- Elphick, D. A.; Mahida, Y. R. 2005. Paneth cells: their role in innate immunity and inflammatory disease. *Gut* 54:1802-1809.
- Eurell, J. A. e Frappier, B. L. 2012. *Histologia veterinária de Dellmann*. 6ª ed. Manole, São Paulo.
- Fairweather, S. J.; Bröer, A.; Subramanian, N.; Tumer, E.; Cheng, Q.; Schmoll, D.; O'Mara, M. L. e Bröer, S. 2015. Molecular basis for the interaction of the mammalian amino acid transporters B⁰AT1 and B⁰AT3 with their ancillary protein collectrin. *The Journal of Biological Chemistry* 290:24308-24325.
- Fang, Y. Z.; Yang, S. e Wu, G. 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 18:872-879.
- Faria, M. H. G.; Patrocínio, R. M. S. V.; Filho, M. O. M. e Rabenhorst, S. H. B. 2006. Expressão das proteínas BCL-2 e BAX em tumores astrocíticos humanos. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 42:271-278.
- Feng, T.; Cong, Y.; Alexander, K. e Elson, C. O. 2012. Regulation of Toll-like receptor 5 gene expression and function on mucosal dendritic cells. *PLoS One* 7:1-9.
- Fernandes, J. I. M.; Murakami, A. E.; Rorig, A.; Bordignon, H. L. F.; Ribeiro, M. V.; Kaneko, I. N. e Santos, T. C. 2018. Effect of dietary glutamine supplementation associated with threonine levels in the intestinal mucosa of broilers challenged with *Eimeria* sp. from 22 to 42 days of age. *Semina: Ciências Agrárias* 39:1239-1254.
- Fernando, M. A. e McCraw, B. M. 1973. Mucosal morphology and cellular renewal in the intestine of chickens following a single infection of *Eimeria acervulina*. *The Journal of Parasitology* 59:493-501.
- Foltz, M.; van der Pijl, P. C. e Duchateau, G. S. 2010. Current in vitro testing of bioactive peptides is not valuable. *The Journal of Nutrition* 140:117-118.
- Forder, R. E.; Nattrass, G. S.; Geier, M. S.; Hughes, R. J. e Hynd, P. I. 2012. Quantitative analyses of genes associated with mucin synthesis of broiler chickens with induced necrotic enteritis. *Poultry Science* 91:1335-1341.
- Freitas, F. L. C. 2014. Metabolic alterations in broiler chickens experimentally infected with sporulated oocysts of *Eimeria maxima*. *Brazilian journal of veterinary parasitology* 23:309-314.
- Frenhani, P. B. e Burini, R. C. 1999. Mecanismos de absorção de aminoácidos e oligopeptídios. Controle e implicações na dietoterapia humana. *Arquivos de Gastroenterologia* 36:227-237.
- Furlan, R. L. e Macari, M. 2002. Lipídios: digestão e absorção. p. 143-148. In: *Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte*. 1ª ed. Macari, M.; Furlan, R. L. e Gonzales E. ed., Funep/Unesp, Jaboticabal.
- Ganapathy, V. e Leibach, F. H. 1985. Is intestinal peptide transport energized by a proton gradient?. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 249:G153-G160.
- Gazzinelli, R. T. e Denkers, E. Y. 2006. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. *Nature reviews. Immunology* 6:895-906
- Gebert, A.; Rothkötter, H. J. e Pabst, R. 1996. M Cells in Peyer's patches of the intestine. *International Review of Cytology* 167:91-159.
- Georgieva, N. V.; Gabrashanska, M.; Koinarski, V. e Ermidou-Pol, S. 2011. Antioxidant status in *Eimeria acervulina* infected chickens after dietary selenium treatment. *Trace Elements and Electrolytes* 28:42-48.

- Georgieva, N. V.; Koinarski, V. e Gadjeva, V. 2006. Antioxidant status during the course of *Eimeria tenella* infection in broiler chickens. *The Veterinary Journal* 172:488-492.
- Gilbert, E. R.; Li, H.; Emmerson, D. A.; Webb, K. E. Jr. e Wong, E. A. 2007. Developmental regulation of nutrient transporter and enzyme mRNA abundance in the small intestine of broilers. *Poultry Science* 86:1739-1753.
- Gilbert, E. R.; Wong, E. A. e Webb, K. E. Jr. 2008. Board-invited review: Peptide absorption and utilization: Implications for animal nutrition and health. *Journal of Animal Science* 86:2135-2155.
- Gottardo, E. T.; Prokoski, K.; Horn, D.; Viott, A. D.; Santos, T. C. e Fernandes, J. I. 2016. Regeneration of the intestinal mucosa in *Eimeria* and *E. Coli* challenged broilers supplemented with amino acids. *Poultry Science* 95:1056-1065.
- Grimble, R. F. 2006. The effects of sulfur amino acid intake on immune function in humans. *The Journal of Nutrition* 136:1660S-1665S.
- Grimble, R. F. e Grimble, G. K. 1998. Immunonutrition: Role of sulfur amino acids, related amino acids, and polyamines. *Nutrition* 14:605-610.
- Gruys, E.; Toussaint, M. J. M.; Niewold, T. A. e Koopmans, S. J. 2005. Acute phase reaction and acute phase proteins. *Journal of Zhejiang University. Science* 6:1045-1056.
- Guetg, A.; Mariotta, L.; Bock, L.; Herzog, B.; Fingerhut, R.; Camargo, S. M. R. e Verrey, F. 2015. Essential amino acid transporter Lat4 (Slc43a2) is required for mouse development. *The Journal of physiology* 593:1273-1289.
- Guyton, A. C. e Hall, J. E. 2006. *Tratado de Fisiologia Médica*. 11ª ed. Elsevier, Rio de Janeiro.
- Györke, A.; Kalmár, Z.; Pop, L. M. e Şuteu, O. S. 2016. The economic impact of infection with *Eimeria* spp. in broiler farms from Romania. *Revista Brasileira de Zootecnia* 45:273-280.
- Habib, S. e Ali, A. 2011. Biochemistry of nitric oxide. *Indian journal of clinical biochemistry* 26:3-17.
- Halliwell, B. 1994. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?. *Lancet* 344:721-724.
- Hatzoglou, M.; Fernandez, J. e Yaman, I. 2004. Regulation of cationic amino acid transport: The story of the CAT-1 transporter. *Annual review of nutrition* 24:377-399.
- Hermier, D. 1997. Lipoprotein metabolism and fattening in poultry. *The Journal of Nutrition* 127:805S-808S.
- Heussler, V. T.; KuEenzi, P. e Rottenberg, S. 2001. Inhibition of apoptosis by intracellular protozoan parasites. *International Journal for Parasitology* 31:1166-1176.
- Hirst, B. H. 1993. Dietary regulation of intestinal nutrient carriers. *Proceedings of the Nutrition Society* 52:315-324.
- Hong, Y. H.; Lillehoj, H. S.; Lee, S. H.; Dalloul, R. A. e Lillehoj, E. P. 2006. Analysis of chicken cytokine and chemokine gene expression following *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella* infections. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 114:209-223.
- Hu, K.; Johnson, J.; Florens, L.; Fraunholz, M.; Suravajjala, S.; DiLullo, C.; Yates, J.; Roos, D. S. e Murray, J. M. 2006. Cytoskeletal components of an invasion machine--the apical complex of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathogens* 2:0121-0138.
- Hu, Y.; Smith, D. E.; Ma, K.; Jappar, D.; Thomas, W. e Hillgren, K. M. 2008. Targeted disruption of peptide transporter Pept1 gene in mice significantly reduces dipeptide absorption in intestine. *Molecular pharmaceutics* 5:1122-1130.

- Humphrey, B. D.; Stephensen, C. B.; Calvert, C. C. e Klasing, K. C. 2004. Glucose and cationic amino acid transporter expression in growing chickens (*Gallus gallus domesticus*). Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology 138:515-525.
- Hyde, R.; Taylor, P. M. e Hundal, H. S. 2003. Amino acid transporters: roles in amino acid sensing and signalling in animal cells. The Biochemical Journal 373:1-18.
- Ighodaro, O. M. e Akinloye, O. A. 2018. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. Alexandria Journal of Medicine 54:287-293.
- Iqbal, M.; Philbin, V. J. e Smith, A. L. 2005. Expression patterns of chicken Toll-like receptor mRNA in tissues, immune cell subsets and cell lines. Veterinary Immunology and Immunopathology 104:117-127.
- Jafari, R. A.; Kiani, R.; Shahriyari, A.; Asadi, F. e Hamidi-Nejat, H. 2012. Effect of dietary vitamin E on *Eimeria tenella*-induced oxidative stress in broiler chickens. African Journal of Biotechnology 11:9265-9.
- Jando, J.; Camargo, S. M. R.; Herzog, B. e Verrey, F. 2017. Expression and regulation of the neutral amino acid transporter B⁰AT1 in rat small intestine. PLoS ONE 12:1-22.
- Junqueira, L. C. e Carneiro, J. 2017. Histologia básica: texto e atlas. 13^a ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Kamat, J. P. 2006. Peroxynitrite: a potent oxidizing and nitrating agent. Indian Journal of Experimental Biology 44:436-447.
- Kiela, P. R. e Ghishan, F. K. 2016. Physiology of Intestinal Absorption and Secretion. Best practice & research. Clinical gastroenterology 30:145-159.
- Kim, C. J.; Kovacs-Nolan, J.; Yang, C.; Archbold, T.; Fan, M. Z. e Mine, Y. 2009. L-cysteine supplementation attenuates local inflammation and restores gut homeostasis in a porcine model of colitis. Biochimica et Biophysica Acta 1790:1161-1169.
- Kim, Y. S. e Ho, S. B. 2010. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. Current gastroenterology reports 12:319-330.
- Kitessa, S. M.; Natrass, G. S.; Forder, R. E.; McGrice, H. A.; Wu, S. B. e Hughes, R. J. 2014. Mucin gene mRNA levels in broilers challenged with *Eimeria* and/or *Clostridium perfringens*. Avian Diseases 58:408-414.
- Kleta, R.; Romeo, E.; Ristic, Z.; Ohura, T.; Stuart, C.; Arcos-Burgos, M.; Dave, M. H.; Wagner, C. A.; Camargo, S. R.; Inoue, S.; Matsuura, N.; Helip-Wooley, A.; Bockenbauer, D.; Warth, R.; Bernardini, I.; Visser, G.; Eggermann, T.; Lee, P.; Chairoungdua, A.; Jutabha, P.; Babu, E.; Nilwarangkoon, S.; Anzai, N.; Kanai, Y.; Verrey, F.; Gahl, W. A. e Koizumi, A. Mutations in SLC6A19, encoding B⁰AT1, cause Hartnup disorder. Nature genetics 36:999-1002.
- Kodera, T.; Hara, H.; Nishimori, Y. e Nio, N. 2006. Amino acid absorption in portal blood after duodenal infusions of a soy protein hydrolysate prepared by a novel soybean protease D3. Journal of Food Science 71:S517-S525.
- Kogut, M. H.; Iqbal, M.; He, H.; Philbin, V.; Kaiser, P. e Smith, A. 2005. Expression and function of Toll-like receptors in chicken heterophils. Developmental and comparative immunology 29:791-807.
- Koháryová, M. e Kollárová, M. 2008. Oxidative stress and thioredoxin system. General physiology and biophysics 27:71-84.

- Koinarski, V.; Georgieva, N.; Gadjeva, N. e Petkov, P. 2005. Antioxidant status of broiler chickens, infected with *Eimeria acervulina*. *Revue de Médecine Vétérinaire* 156:498-502.
- Krehbiel, C. R. e Matthews, J. C. 2003. Absorption of amino acids and peptides. p. 41-70. In: *Amino acids in animal nutrition*. 2^a ed. D'Mello, J. P. F., ed. CABI Publishing, Wallingford.
- Krogdahl, A. 1985. Digestion and absorption of lipids in poultry. *The Journal of nutrition* 115:675-685.
- Kuss, F. 2005. Agentes oxidantes e antioxidantes. Seminário apresentado na disciplina bioquímica do tecido animal, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em 2005.
- Lang, T.; Hansson, G. C. e Samuelsson, T. 2006. An inventory of mucin genes in the chicken genome shows that the mucin domain of Muc13 is encoded by multiple exons and that ovomucin is part of a locus of related gel-forming mucins. *BMC Genomics*. 7:1-10.
- Latorre, R.; Sternini, C.; De Giorgio, R. e Greenwood-Van Meerveld, B. 2016. Enteroendocrine cells: a review of their role in brain-gut communication. *Neurogastroenterol Motil* 28:620-630.
- Leirião, P.; Rodrigues, C. D.; Albuquerque, S. S. e Mota, M. M. 2004. Survival of protozoan intracellular parasites in host cells. *EMBO reports* 5:1142-1147.
- Lemme, A.; Hoehler, D.; Brennan, J. J. e Mannion, P. F. 2002. Relative effectiveness of methionine hydroxy analog compared to DL-Methionine in broiler chickens. *Poultry Science* 81:838-845.
- Levine, R. L.; Moskovitz, J. e Stadtman, E. R. 2000. Oxidation of methionine in proteins: roles in antioxidant defense and cellular regulation. *IUBMB Life* 50:301-307.
- Levine, R. L.; Mosoni, L.; Berlett, B. S. e Stadtman, E. R. 1996. Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:15036-40.
- Lillehoj, H. S. 1987. Effects of immunosuppression on avian coccidiosis: cyclosporin a but not hormonal bursectomy abrogates host protective immunity. *Infection and Immunity* 55:1616-1621.
- Lillehoj, H. S. e Chung, K. S. 1992. Postnatal development of T-lymphocyte subpopulations in the intestinal intraepithelium and lamina propria in chickens. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 31:347-360.
- Lillehoj, H. S. e Lillehoj, E. P. 2000. Avian coccidiosis. A review of acquired intestinal immunity and vaccination strategies. *Avian Diseases* 44:408-425.
- Lillehoj, H. S. e Trout, J. M. 1996. Avian gut-associated lymphoid tissues and intestinal immune responses to eimeria parasites. *Clinical Microbiology Reviews* 9:349-360.
- Lillehoj, H. S. e Trout, J. M. 1993. Coccidia: A review of recent advances on immunity and vaccine development. *Avian Pathology* 22:3-31.
- Lillehoj, H. S.; Lee, S. H.; Jang, S. I.; Kim, D. K. e Lee, K. W. 2011. Recent progress in understanding host mucosal response to avian coccidiosis and development of alternative strategies to mitigate the use of antibiotics in poultry production. *Korean Journal of Poultry Science* 3:275-284.
- Lillehoj, H. S.; Min, W. e Dalloul, R. A. 2004. Recent progress on the cytokine regulation of intestinal immune responses to *Eimeria*. *Poultry Science* 83:611-623.

- Luo, S. e Levine, R. L. 2009. Methionine in proteins defends against oxidative stress. *FASEB Journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23:464-472.
- Luquetti, B. C.; Alarcon, M. F. F.; Lunedo, R.; Campos, D. M. B.; Furlan, R. L. e Macari, M. 2015. Effects of glutamine on performance and intestinal mucosa morphometry of broiler chickens vaccinated against coccidiosis. *Scientia Agricola* 73:322-327.
- Mabbott, N. A.; Donaldson, D. S.; Ohno, H.; Williams, I. R. e Mahajan, A. 2013. Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal Immunology* 6:666-677.
- Maiorka, A. 2004. Impacto da saúde intestinal na produtividade avícola. p.119-129. In: V Simpósio Brasil Sul de Avicultura, Santa Catarina.
- Major, J. R. Jr. e Ruff, M. D. 1978. Disaccharidase activity in the intestinal tissue of broilers infected with coccidia. *The Journal of Parasitology* 64:706-711.
- Major, P.; Tóth, S.; Goldová, M.; Révajová, V.; Kožárová, I.; Levkut, M.; Mojžišová, J.; Hisira, V. e Mihok, T. 2011. Dynamic of apoptosis of cells in duodenal villi infected with *Eimeria acervulina* in broiler chickens. *Biologia* 66:696-700.
- Mamaug, R. E. P.; Gao, J.; Nguyen, B. T. e Ragaza, J. A. 2012. Supplementations of DL-Methionine and methionine dipeptide in diets are effective for the development and growth of larvae and juvenile Red Sea Bream, *Pagrus major*. *Journal of the World Aquaculture Society* 43:362-374.
- Martins, J. M. S.; Litz, F. H.; Castilhano, H.; Campos, D. F.; Taveira, R. Z. e Neto, O. J. S. 2012. Melhoramento genético de frangos de corte. *PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia* 6:1-20.
- Martínez, Y.; Xue Li, X.; Liu, G.; Bin, P.; Yan, W.; Más, D.; Valdivié, M.; Hu, C-A. A.; Ren, W. e Yin, Y. 2017. The role of methionine on metabolism, oxidative stress, and diseases. *Amino Acids* 49:2091-2098.
- Mastrototaro, L.; Sponder, G.; Saremi, B. e Aschenbach, J. R. 2016. Gastrointestinal methionine shuttle: priority handling of precious goods. *IUBMB Life* 68:924-934.
- Matthews, M. D. e Adibi, S. A. 1976. Peptide absorption. *Gastroenterology* 71:151-161.
- Matthews, J. C. 2000. Amino acid and peptide transport systems. p. 3-23. In: *Farm animal*. D'Mello, J. P. F., ed. CABI Publishing, Wallingford.
- McDougald, L. R. 1998. Intestinal Protozoa Important to Poultry. *Poultry Science* 77:1156-1158.
- Meirelles, H. T.; Albuquerque, R.; Borgatti, L. M. O.; Souza, L. W. O.; Meister, N. C. e Lima, F. R. 2003. Performance of broilers fed with different levels of methionine hydroxy analogue and DL-methionine. *Brazilian Journal of Poultry Science* 5:69-74.
- Mencalha, R.; Helmbrecht, A.; Arruda, N.; Batista, L. e Bertechini, A. 2016. Comparing bioefficacy of different sources of methionine relative to DL-methionine in the grower phase (22 to 42 days) of broilers chickens. *Poultry Science Association 1st Latin American Scientific Conference Abstracts*, São Paulo.
- Menezes, R. C. A. A. 2018. Coccídios. p. 143-156. In: *Parasitologia na medicina veterinária*. 2ª ed. Gonzalez, S. M., ed. Roca, Rio de Janeiro.
- Merlin, D.; Si-Tahar, M.; Sitaraman, S. V.; Eastburn, K.; Williams, I.; Liu, X.; Hediger, M. A. e Madara, J. L. 2001. Colonic Epithelial hPepT1 Expression occurs in inflammatory bowel disease: transport of bacterial peptides influences expression of MHC class 1 molecules. *Gastroenterology* 120:16660-1679.

- Métayer, S.; Seiliez, I.; Collin, A.; Duchêne, S.; Mercier, Y.; Geraert, P. A. e Tesseraud, S. 2008. Mechanisms through which sulfur amino acids control protein metabolism and oxidative status. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 19:207-215.
- Metzstein, M. M.; Stanfield, G. M. e Horvitz, H. R. 1998. Genetics of programmed cell death in *C. elegans*: past, present and future. *Trends in Genetics* 14:410-416.
- Min, W.; Dalloul, R. A. e Lillehoj, H. S. 2004. Application of biotechnological tools for coccidia vaccine development. *Journal of Veterinary Science* 5:279-288.
- Miner-Williams, W. M.; Stevens, B. R. e Moughan, P. J. 2014. Are intact peptides absorbed from the healthy gut in the adult human?. *Nutrition Research Reviews* 27:308-329.
- Mirzaaghatabar, F.; Saki, A. A.; Zamani, P.; Aliarabi, H. e Matin, H. R. M. 2011. Effect of different levels of diet methionine and metabolisable energy on broiler performance and immune system. *Food and Agricultural Immunology* 22:93-103.
- Miska, K. B. e Fetterer, H. R. 2018. The effect of *Eimeria maxima* infection on the expression of amino acid and sugar transporters aminopeptidase, as well as the di- and tri-peptide transporter PepT1, is not solely due to decreased feed intake. *Poultry Science* 97:1-10.
- Miska, K. B. e Fetterer, R. H. 2017. The mRNA expression of amino acid and sugar transporters, aminopeptidase, as well as the di- and tri-peptide transporter PepT1 in the intestines of *Eimeria* infected broiler chickens. *Poultry Science* 96:465-473.
- Moilanen, E. e Vapaatalo, H. 1995. Nitric oxide in inflammation and immune response. *Annals of medicine* 27:359-367.
- Moncada, S.; Higgs, A. e Furchgott, R. 1997. XIV. International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. *Pharmacological Reviews* 49:137-142.
- Morris, B. C.; Danforth, H. D.; Caldwell, D. J.; Pierson, F. W. e McElroy, A. P. 2004. Intestinal mucosal mast cell immune response and pathogenesis of two *Eimeria acervulina* isolates in broiler chickens. *Poultry Science* 83:1667-1674.
- Morris, G. M.; Woods, W. G.; Richards, D. G. e Gasser, R. B. 2007. Investigating a persistent coccidiosis problem on a commercial broiler-breeder farm utilising PCR-coupled capillary electrophoresis. *Parasitology Research* 101:583-589.
- Morrison, D. A. 2009. Evolution of the Apicomplexa: where are we now?. *Trends in Parasitology* 25:375-382.
- Mykkänen, J.; Torrents, D.; Pineda, M.; Camps, M.; Yoldi, M. E.; Horelli-Kuitunen, N.; Huoponen, K.; Heinonen, M.; Oksanen, J.; Simell, O.; Savontaus, M. L.; Zorzano, A.; Palacín, M. e Aula, P. 2000. Functional analysis of novel mutations in y(+)LAT-1 amino acid transporter gene causing lysinuric protein intolerance (LPI). *Human molecular genetics* 9:431-438.
- Nakao, L. S.; Iwaic, L. K.; Kalilc, J. e Augusto, O. 2003. Radical production from free and peptide-bound methionine sulfoxide oxidation by peroxynitrite and hydrogen peroxide/iron(II). *FEBS Letters* 547:87-91.
- Nelson, D. L. e Cox, M. M. 2011. *Lehninger Principles of biochemistry*. 5^a ed. Worth Publishers, New York.
- Nezami, B. G. e Srinivasan, S. 2010. Enteric nervous system in the small intestine: pathophysiology and clinical implications. *Current Gastroenterology Reports* 12:358-365.

- Ogihara, H.; Saito, H.; Shin, B. C.; Terada, T.; Takenoshita, S.; Nagamachi, Y.; Inui, K-i. e Takata, K. 1996. Immuno-localization of H⁺/peptide cotransporter in rat digestive tract. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 220:848-852.
- O'Reilly, E. L. e Eckersall, P. D. 2014. Acute phase proteins: a review of their function, behaviour and measurement in chickens. *World's Poultry Science Journal* 70:27-44.
- Okumura, R. e Takeda, K. 2017. Roles of intestinal epithelial cells in the maintenance of gut homeostasis. *Experimental & Molecular Medicine* 49:1-8.
- Oliveira-Neto, A. R. 2014. Metabolismo e exigência de metionina. p. 186-217. In: *Nutrição de não ruminantes*. Sakomura, N. K.; Silva, J. H. V.; Costa, F. G. P.; Fernandes, J. B. K. e Hauschild, L., ed. Funep, Jaboticabal.
- Opferman, J. T. e Kothari, A. 2017. Anti-apoptotic BCL-2 family members in development. *Cell Death And Differentiation* 25:37-45.
- Pant, S.; Bhatt, P.; Shekhar, S. e Krishna, G. 2018. Epidemiological investigation of poultry coccidiosis in and around Tarai region of Uttarakhand. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 7:374-380.
- Paris, N. E. e Wong, E. A. 2013. Expression of digestive enzymes and nutrient transporters in the intestine of *Eimeria maxima*-infected chickens. *Poultry Science* 92:1331-1335.
- Pelicano, E. R. L., Souza, P. A.; Borba, Hirasilva.; Oba, Alexandre.; Norkus, E. A.; Kodawara, L. M. e Lima, T. M. A. 2003. Morfometria e ultra-estrutura da mucosa intestinal de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes probióticos. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* 98:125-134.
- Pluske, J. R.; Hampson, D. J. e Williams, I. H. 1997. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. *Livestock Production Science* 51:215-236.
- Prolo, C.; Álvarez, M. N. e Radi, R. 2013. Peroxynitrite, a potent macrophage-derived oxidizing cytotoxin to combat invading pathogens. *Biofactors* 40:215-225.
- Quiroz-Castañeda, R. E. e Dantán-González, E. 2015. Control of avian coccidiosis: future and present natural alternatives. *BioMed Research International* 2015:1-11.
- Radi, R.; Beckman, J. S.; Bush, K. M. e Freeman, B. A. 1991. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2:481-487.
- Ramachandran, A.; Madesh, M. e Balasubramanian, K. A. 2000. Apoptosis in the intestinal epithelium: its relevance in normal and pathophysiological conditions. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 15:109-120.
- Rasheed, M. S. A. 2012. assessment of the level of protection against coccidiosis in broiler breeders conferred by a live anticoccidial vaccine, and its influence on early growth and development. Tese (D.Sc.). University of Arkansas, Fayetteville, Arkansas, Estados Unidos.
- Rath, N. C.; Anthony, N. B.; Kannan, L.; Huff, W. E.; Huff, G. R.; Chapman, H. D.; Erf, G. F. e Wakenell, P. 2009. Serum ovotransferrin as a biomarker of inflammatory diseases in chickens. *Poultry Science* 88:2069-2074.
- Renehan, A. G.; Bach, S. P. e Potten, C. S. 2001. The relevance of apoptosis for cellular homeostasis and tumorigenesis in the intestine. *Canadian journal of gastroenterology* 15:166-176.
- Richards, M. P. e Augustine, P. C. 1988. Serum and liver zinc, copper, and iron in chicks infected with *Eimeria acervulina* or *Eimeria tenella*. *Biological Trace Element Research* 17:207-219.

- Robertson, A. M. e Wright, D. P. 1997. Bacterial glycosulphatases and sulphomucin degradation. *Canadian journal of gastroenterology* 11:361-366.
- Rochell, S. J. 2015. *Eimeria acervulina* infection and amino acid nutrition in broiler chickens. Tese (D.Sc.). University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana e Champaign, Illinois, Estados Unidos.
- Rock, K. L. e Kono, H. 2008. The inflammatory response to cell death. *Annual Review of Pathology* 3:99-126.
- Rosário, M. F.; Silva, M. A. N.; Coelho, A. A. D. e Savino, V. J. M. 2008. Síndrome ascítica em frangos de corte: uma revisão sobre a fisiologia, avaliação e perspectivas. *Ciência Rural* 34:1987-1996.
- Rose, M. E e Hesketh, P. 1979. Immunity to coccidiosis: T-lymphocyte- or B-lymphocyte-deficient animals. *Infection and immunity* 26:630-637.
- Rosen, G. M.; Pou, S.; Ramos, C. L.; Cohen, M. S. e Britigan, B. E. 1995. Free radicals and phagocytic cells. *FASEB Journal* 9:200-209.
- Rubin, L. L.; Canal, C. W.; Ribeiro, A. L. M.; Kessler, A.; Silva, I.; Trevizan, L.; Viola, T.; Raber, M.; Gonçalves, T. A. e Krás, R. 2007. Effects of methionine and arginine dietary levels on the immunity of broiler chickens submitted to immunological stimuli. *Brazilian Journal of Poultry Science* 9:241-247.
- Ruff, M. D.; Witlock, D. R. e Smith, R. R. 1976. *Eimeria acervulina* and *E. tenella*: effect on methionine absorption by the avian intestine. *Experimental parasitology* 39:244-251.
- Ruth, M. R e Field, C. J. 2013. The immune modifying effects of amino acids on gut-associated lymphoid tissue. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 4:1-10.
- Sakamoto, M.; Faria, D. E.; Nakagi, V. S. e Murakami, A. E. 2014. Sources of trophic action on performance and intestinal morphometry of broiler chickens vaccinated against coccidiosis. *Brazilian Journal of Poultry Science* 16:389-396.
- Sand, J. M.; Arendt, M. K.; Repasy, A.; Deniz, G. e Cook, M. E. 2016. Oral antibody to interleukin-10 reduces growth rate depression due to *Eimeria* spp. infection in broiler chickens. *Poultry Science* 95:439-46.
- Schmidt, N. S. e Silva, C. L. 2018. Pesquisa e desenvolvimento na cadeia produtiva de frangos de corte no Brasil. *Revista de Economia e Sociologia Rural* 56:467-482.
- Shelk, V. M. 2018. Prevention and control of coccidiosis in poultry production. Disponível em: <<http://agrilife24.com/2018/2018-03-19-12-26-20/483-prevention-and-control-of-coccidiosis-in-poultry-production.html>>. Acesso em: 26/03/2019.
- Shi, Y. 2004. Caspase activation, inhibition, and reactivation: a mechanistic view. *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 13:1979-1987.
- Shirley, M. W.; Smith, A. L. e Tomley, F. M. 2005. The Biology of avian *Eimeria* with an emphasis on their control by vaccination. *Advances in Parasitology* 285-330.
- Shirley, M. W.; Ivens, A.; Gruber, A.; Madeira, A. M.; Wan, K. L.; Dear, P. H. e Tomley, F. M. 2004. The *Eimeria* genome projects: a sequence of events. *Trends in Parasitology* 20:199-201.
- Silva, J. H. V.; Costa, F. G. P. e Lima, R. B. 2014. Digestão e absorção das proteínas. p. 97-109. In: *Nutrição de não ruminantes*. 1ª ed. Sakomura, N. K.; Silva, J. H. V.; Costa, F. G. P.; Fernandes, J. B. K e Hauschild, L., ed. Funep, Jaboticabal.
- Silva, M. A.; Pessotti, B. M. S.; Zanini, S. F.; Colnago, G. L.; Rodrigues, M. R. A.; Nunes, L. C.; Zanini, M. S. e Martins, I. V. F. 2009. Intestinal mucosa structure of broiler chickens infected experimentally with *Eimeria tenella* and treated with essential oil of orégano. *Ciência Rural* 39:1471-1477.

- Silva, P. C.; Shiraishi, C. S.; Silva, A. V.; Gonçalves, G. F.; Sant'Ana, D. M. e Araújo, E. J. 2010. *Toxoplasma gondii*: a morphometric analysis of the wall and epithelial cells of pigs intestine. *Experimental parasitology* 125:380-383.
- Silva, V.; Mencialha, R.; Arruda, N.; Alcebíades, S. Bertechini, A. 2016. Bioefficacy of different sources of methionine relative to DL-methionine in starter phase (1 to 21 days) of broilers chickens. *Poultry Science Association 1st Latin American Scientific Conference Abstracts*, São Paulo.
- Simoyi, M. F.; Van Dyke, K. e Klandorf, H. 2002. Manipulation of plasma uric acid in broiler chicks and its effect on leukocyte oxidative activity. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 282:R791-R796.
- Siqueira-Catania, A.; Barros, C. R. e Ferreira, S. R. G. 2009. Vitaminas e minerais com propriedades antioxidantes e risco cardiometabólico: controvérsias e perspectivas. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia* 53:550-559.
- Sleisenger, M. H.; Burston, D.; Dalrymple, J. A.; Wilkinson, S. e Matthews, D. M. 1976. Evidence for a single common carrier for uptake of a dipeptide and a tripeptide by hamster jejunum *in Vitro*. *Gastroenterology* 71:76-81.
- Smith, D. E.; Cléménçon, B. e Hediger, M. A. 2013. Proton-coupled oligopeptide transporter family SLC15: physiological, pharmacological and pathological implications. *Molecular Aspects of Medicine* 34:323-336.
- Smulikowska, S. 1998. Relationship between the stage of digestive tract development in chicks and the effect of viscosity reducing enzymes on fat digestion. *Journal of Animal and Feed Sciences* 7:125-134.
- Spanier, B. e Rohm, F. 2018. Proton coupled oligopeptide transporter 1 (pept1) function, regulation, and influence on the intestinal homeostasis. *Comprehensive Physiology* 8:843-869.
- Stadtman, E. R. e Levine, R. L. 2003. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 25:207-218.
- Stipanuk, M. H. 2004. Sulfur amino acid metabolism: Pathways for production and removal of homocysteine and cysteine. *Annual Review of Nutrition* 24:539-577.
- Strous, G. J. e Dekker, J. 1992. Mucin-type glycoproteins. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 27:57-92.
- Su, S.; Miska, K. B.; Fetterer, R. H.; Jenkins, M. C. e Wong, E. A. 2014. Expression of digestive enzymes and nutrient transporters in *Eimeria acervulina*-challenged layers and broilers. *Poultry Science* 93:1217-1226.
- Sun, X. M.; Pang, W.; Jia, T.; Yan, W. C.; He, G.; Hao, L. L.; Bentué, M. e Suo, X. 2009. Prevalence of *Eimeria* species in broilers with subclinical signs from fifty farms. *Avian Diseases* 53:301-305.
- Swain, B. K. e Johri, T. S. 2000. Effect of supplemental methionine, choline and their combinations on the performance and immune response of broilers. *British Poultry Science* 41:83-88.
- Tan, J.; Applegate, T. J.; Liu, S.; Guo, Y. e Eicher, S. D. 2014. Supplemental dietary L-arginine attenuates intestinal mucosal disruption during a coccidial vaccine challenge in broiler chickens. *The British Journal of Nutrition* 112:1098-1109.
- Terada, T.; Shimada, Y.; Pan, X.; Kishimoto, K.; Sakurai, T.; Doi, R.; Onodera, H.; Katsura, T.; Imamura, M. e Inui, K. 2005. Expression profiles of various transporters for oligopeptides, amino acids and organic ions along the human digestive tract. *Biochemical pharmacology* 70:1756-63.

- Torrents, D.; Estévez, R.; Pineda, M.; Fernández, E.; Lloberas, J.; Shi, Y. B.; Zorzano, A. e Palacín, M. 1998. Identification and characterization of a membrane protein (γ^+ L amino acid transporter-1) that associates with 4F2hc to encode the amino acid transport activity γ^+ L. A candidate gene for lysinuric protein intolerance. *The Journal of Biological Chemistry* 273:32437-32445.
- Toumi, F.; Neunlist, M.; Denis, M. G.; Oreshkova, T.; Laboisse, C. L.; Galmiche, J. P. e Jarry, A. 2004. Vasoactive intestinal peptide induces IL-8 production in human colonic epithelial cells via MAP kinase-dependent and PKA-independent pathways. *Biochemical and biophysical research communications* 317:187-191.
- Trevizan, A. R.; Vicentino-Vieira, S. L.; Watanabe, P. S.; Góis, M. B.; Melo, G. A. N.; Garcia, J. L.; Araújo, E. J. A. e Sant'Ana, D. M. G. 2016. Kinetics of acute infection with *Toxoplasma gondii* and histopathological changes in the duodenum of rats. *Experimental Parasitology* 165:22-29.
- Tsiagbe, V. K.; Cook, M. E.; Harper, A. E. e Sunde, M. L. 1987. Enhanced immune responses in broiler chicks fed methionine-supplemented diets. *Poultry Science* 66:1147-1154.
- Turk, D. E e Stephens, J. F. 1967. Upper intestinal tract infection produced by *E. acervulina* and absorption of ^{65}Zn and ^{131}I -labeled oleic acid. *The Journal of Nutrition* 93:161-165.
- Ulluwishewa, D.; Anderson, R. C.; McNabb, W. C.; Moughan, P. J.; Wells, J. M. e Roy, N. C. 2011. Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components. *The Journal of Nutrition* 141:769-776.
- Uni, Z.; Platin, R. e Sklan, D. 1998. Cell proliferation in chicken intestinal epithelium occurs both in the crypt and along the villus. *Journal of comparative physiology. B, Biochemical, systemic, and environmental physiology* 168:241-247.
- Uni, Z. 1999. Functional development of the small intestine in domestic birds: cellular and molecular aspects. *Avian and Poultry Biology Reviews* 10:167-179.
- Ursula, C. O. 2011. *Eimeria* spp. De coelho e galinha domésticos: desenvolvimento de ensaios moleculares e caracterização filogenética. Tese (D.Sc.). Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Van der Sluis, M.; De Koning, B. A.; De Bruijn, A. C.; Velcich, A.; Meijerink, J. P.; Van Goudoever, J. B.; Büller, H. A.; Dekker, J.; Van Seuningen, I.; Renes, I. B. e Einerhand, A. W. 2006. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology* 131:117-1129.
- Vaux, D. L. e Strasser, A. 1996. The molecular biology of apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:2239-2244.
- Verrey, F.; Closs, E. I.; Wagner, C. A.; Palacín, M.; Endou, H. e Kanai, Y. 2004. CATs and HATs: the SLC7 family of amino acid transporters. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 447:532-542.
- Wagner, C. A.; Lang, F. e Bröer, S. 2001. Function and structure of heterodimeric amino acid transporters. *American journal of physiology. Cell physiology* 281:C1077-C1093.
- Walton, K. D.; Freddo, A. M.; Wang, S. e Gumucio, D. L. 2016. Generation of intestinal surface: an absorbing tale. *Development* 143:2261-2272.
- Wang, C.; Zhao, F.; Liu, J. e Liu, H. 2018. Dipeptide (Methionyl-Methionine) transport and its effect on β -casein synthesis in bovine mammary epithelial cells. *Cellular Physiology and Biochemistry* 49:479-488.

- Wang, J.; Yan, X.; Lu, R.; Meng, X e Nie, G. 2017. Peptide transporter 1 (PepT1) in fish: A review. *Aquaculture and Fisheries* 2193-206.
- Wang, S-T.; Chen, H-W.; Sheen, L-Y. e Lii, C-K. 1997. Methionine and cysteine affect glutathione level, glutathione-related enzyme activities and the expression of glutathione s-transferase isozymes in rat hepatocytes. *The Journal of Nutrition* 127:2135-2141.
- Watanabe, C.; Kato, Y.; Ito, S.; Kubo, Y.; Sai, Y. e Tsuji, A. 2005. Na⁺/H⁺ exchanger 3 affects transport property of H⁺/oligopeptide transporter 1. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 20:443–451.
- Watanabe, N.; Miura, S.; Zeki, S. e Ishii, H. 2001. Hepatocellular oxidative DNA injury induced by macrophage-derived nitric oxide. *Free Radical Biology e Medicine* 30:1019-1028.
- Weber, E.; Neunlist, M.; Schemann, M. e Frieling, T. 2001. Neural components of distension-evoked secretory responses in the *Guinea-Pig* distal colon. *Journal of Physiology* 536:741-751.
- Weissbach, H.; Resnick, L. e Brot, N. 2005. Methionine sulfoxide reductases: history and cellular role in protecting against oxidative damage. *Biochimica et Biophysica Acta* 1703:203-212.
- Wu, G. 1998. Intestinal mucosal amino acid catabolism. *The Journal of Nutrition* 128:1249-1252.
- Yan, Z.; Ming-xue, Z.; Zhi-yong, X.; Huan-cheng, X.; Xiao-zhen, C.; Sha-sha, Y.; Wen-long, Z.; Shan, L.; Qiang-hua, L. e Rui, B. 2015. Relationship between *Eimeria tenella* development and host cell apoptosis in chickens. *Poultry Science* 94:2970-2979.
- Yang, JX.; Wang, CH.; Xu, QB.; Zhao, FQ.; Liu, JX. e Liu, HY. 2015. Methionyl-Methionine promotes α -s1 casein synthesis in bovine mammary gland explants by enhancing intracellular substrate availability and activating JAK2-STAT5 and mTOR-mediated signaling pathways. *The Journal of Nutrition* 145:1748-1753.
- Yin, J.; Ren, W.; Duan, J.; Wu, L.; Chen, S.; Li, T.; Yin, Y. e Wu, G. 2014. Dietary arginine supplementation enhances intestinal expression of SLC7A7 and SLC7A1 and ameliorates growth depression in mycotoxin-challenged pigs. *Amino Acids* 46:883-892.
- Yuan, C.; Zhang, X.; He, Q.; Li, J.; Lu, J. e Zou, X. 2015. L-arginine stimulates CAT-1-mediated arginine uptake and regulation of inducible nitric oxide synthase for the growth of chick intestinal epithelial cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* 399:229-236.
- Yun, C. H.; Lillehoj, H. S. e Choi, K. D. 2000. *Eimeria tenella* infection induces local gamma interferon production and intestinal lymphocyte subpopulation changes. *Infection and Immunity* 68:1282-1288.
- Zhang, S. 2016. Physiological and Biochemical Aspects of Methionine Isomers and Precursors in Broilers. Tese (D.Sc.). Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia, Estados Unidos.
- Zhang, S.; Saremi, B.; Gilbert, E. R. e Wong, E. A. 2017. Physiological and biochemical aspects of methionine isomers and a methionine analogue in broilers. *Poultry Science* 96:425-439.
- Zhou, Z-y.; Hu, S-j.; Wang, Z-y.; Guo, Z-l.; Qin, B. e Nie K. 2014. Expression of chicken toll-like receptors and signal adaptors in spleen and cecum of young chickens infected with *Eimeria tenella*. *Journal of Integrative Agriculture* 13:904-910.

Zwarycz, B. e Wong, E. A. 2013. Expression of the peptide transporters PepT1, PepT2, and PHT1 in the embryonic and posthatch chick. *Poultry Science* 92:1314-1321.

III.OBJETIVOS

Objetivos Gerais:

Os objetivos gerais deste trabalho foram avaliar o desempenho de frangos de corte machos, peso relativo de órgãos, a expressão gênica, biomarcadores do estresse oxidativo, atividade de enzimas antioxidantes, parâmetros morfométricos do jejuno e parâmetros sanguíneos de frangos de corte desafiados por *Eimeria* spp. e alimentados com diferentes fontes de metionina.

Objetivos Específicos:

Capítulo IV: Avaliar os efeitos do desafio por *Eimeria* spp. e das dietas suplementadas com metionina na sua forma livre e de dipeptídeo, sobre o desempenho animal, o peso relativo de órgãos, a atividade das enzimas antioxidantes e produção de biomarcadores do estresse oxidativo no jejuno, bem como avaliar no jejuno os efeitos dos tratamentos sobre a expressão de genes envolvidos no processo de absorção de peptídeos e aminoácidos: transportador de peptídeos 1 (*PEPT1*), transportador de aminoácidos neutros e catiônicos 1 (γ^+ *LATI*), transportador de aminoácidos neutros 1 (*B⁰ATI*) e transportador de aminoácidos catiônicos 1 (*CAT - 1*). Sobre os genes envolvidos com o sistema antioxidante: superóxido dismutase 1 (*SOD1*), catalase (*CAT*), e o gene óxido nítrico sintase induzível (*iNOS*). Sobre os genes relacionados com o sistema imune: receptor toll like 2 (*TLR2*), receptor toll like 5 (*TLR5*), interleucina 1 β (*IL1B*), interleucina 2 (*IL2*),

interferon gama (*INFG*), fator TNF induzido por lipopolissacarídeo (*LITAF*). E também os genes relacionados com a barreira intestinal claudina 1 (*CLDN1*) e ocludina (*OCLN*), em frangos de corte machos com 20 dias de idade, seis dias depois da inoculação com oocistos esporulados de quatro espécies de *Eimeria*.

Capítulo V: Avaliar os efeitos do desafio por *Eimeria* spp. e das dietas suplementadas com metionina na sua forma livre e de dipeptídeo, sobre o desempenho animal, a morfometria do jejuno, contagem de células caliciformes e linfócitos intraepiteliais no jejuno, atividade das enzimas aspartato aminotransferase e creatina quinase no plasma sanguíneo, os níveis plasmáticos de ácido úrico e creatinina, o conteúdo de proteínas totais e mucoproteínas sérica, bem como a atividade da enzima lactato desidrogenase no soro. E avaliar os efeitos dos tratamentos sobre a expressão dos genes: mucina 2 (*MUC2*), caspase 3 (*CASP3*), linfoma de células B 2 (*BCL2*), alvo mecanicista da rapamicina (*MTOR*) e proteína ribossomal quinase B1 (*RPS6KB1*), no jejuno de frangos de corte machos com 20 dias de idade, seis dias depois da inoculação com oocistos esporulados de quatro espécies de *Eimeria*.

IV. DIETARY SUPPLEMENTATION WITH FREE METHIONINE OR METHIONINE
DIPEPTIDE MITIGATES INTESTINAL OXIDATIVE STRESS INDUCED BY
EIMERIA SPP. CHALLENGE IN BROILER CHICKENS

(Journal of Animal Science and Biotechnology)

Abstract

Background: This study evaluated the effects of *Eimeria* spp. challenge and dietary supplementation with free methionine or methionine dipeptide on animal performance; expression of genes associated with the immune system, antioxidant system, and amino acid transport in the jejunum; and redox status of the jejunum of broiler chickens.

Methods: A randomized, 2 × 3 factorial design was used, in which *Eimeria* spp. challenge was the first factor (*Eimeria*-challenged, EC, or unchallenged, UC, broilers) and methionine supplementation was the second factor (non-supplemented, NS; free *DL*-methionine, *DL*-Met; and methionine dipeptide, *DL*-methionyl-*DL*-methionine, *DL*-MMet). At 14 days of age, chickens were inoculated orally with sporulated oocysts of *Eimeria acervulina*, *Eimeria praecox*, *Eimeria maxima*, and *Eimeria mitis*. Birds were killed by cervical dislocation 144 h post-inoculation (PI), and the jejunum was collected for biochemical and molecular analyses.

Results: EC broilers had a 13% lower feed intake (FI), 37% lower body weight gain (BWG), and 39% higher feed conversion ratio (FCR) than UC broilers. Chickens fed the *DL*-Met diet had higher BWG (about 12% higher) and better FCR (about 12% lower) than chickens fed the NS diet. EC chickens had lower relative weight of the bursa of Fabricius (51.8%) and higher relative weights of the spleen and whole intestine (53.6% and 26.3%, respectively) than UC chickens. *Eimeria* spp. challenge led to an increase in the levels of oxidative substances, such as nitrite and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), in the jejunum of chickens 144 h PI. Among UC chickens, those fed the *DL*-Met diet had higher total antioxidant capacity (TAC) and lower catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activities. EC chickens that received the NS diet had higher carbonylated protein content (CP). This result was associated with their lower TAC and catalase activity. The lower TAC in EC chickens might have been due to reduced expression of catalase (*CAT*) and superoxide dismutase 1 (*SOD1*) genes. Chickens fed the *DL*-Met and *DL*-MMet diets had lower nitrite content. *Eimeria* spp. challenge suppressed neutral

amino acid transporter (B^0AT1), peptide transporter 1 (*PEPT1*), toll-like receptor 5 (*TLR5*), interleukin 2 (*IL2*), and occludin (*OCLN*) gene expression and enhanced cationic amino acid transporter 1 (*CAT - 1*) and interferon gamma (*IFNG*) gene expression. The highest *PEPT1* expression level was observed in broilers fed the DL-MMet diet, and the lowest *TLR5* expression level was found in broilers fed the NS diet.

Conclusion: Our results show for the first time that supplementation with methionine as free amino acid or dipeptide helps protect the intestinal cells of broilers under *Eimeria spp.* challenge from the oxidative damage induced by free radicals, mainly through modulation of the antioxidant system.

Keywords: Antioxidant; Coccidiosis; Gut; *IFNG*; *PEPT1*

Background

Coccidiosis, an intestinal infection caused by several species of coccidian protozoa of the genus *Eimeria* [1], can disturb metabolic and physiological homeostasis in broilers. During the infection, the immune [1] and antioxidant systems are activated [2], and alterations in nutrient digestion and absorption occur [3-5]. Several studies reported that animals with coccidiosis show changes in intestinal morphology [6, 7], alterations in the expression of genes encoding digestive enzymes and transport proteins in the small intestine [5, 8], increased formation of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) [9], alterations in antioxidant enzyme activities [2, 10], and reduced concentrations of non-enzymatic antioxidants [11]. These changes are associated with poor animal performance, low efficiency, and increased mortality, causing global economic losses every year [12]. Although various anticoccidial drugs are available, they are not able to completely eliminate the disease. Alternative products have been tested for their immune stimulating, anti-inflammatory, and antioxidant properties [13]. Many antioxidants are used as supplements in poultry diets. Methionine, the first-limiting amino acid in corn and soybean meal broiler diets, has been highlighted as an important nutrient for the immune system [14] and antioxidant defense system [15]. Because of the crucial roles of methionine in physiological processes, *DL*-methionine, *L*-methionine, and methionine hydroxy analog

(MHA) have been used for dietary supplementation. Methionine dipeptide has also been used as a dietary supplement [16, 17].

Because it is a small molecule, methionine dipeptide is absorbed mainly by peptide transporter 1 (PepT 1), present in the enterocyte membranes, whereas free amino acids are absorbed by specific transporters [18]. Some studies have shown differences in the absorption efficiencies of dipeptides and free amino acids [17, 19]. Small peptides may be faster absorbed, as PepT 1 has a higher V_{max} than the transport systems used by free amino acids [20]. In addition, competition for the same transporter could reduce the absorption efficiency of specific amino acids [21]. Another advantage of dipeptides over free amino acids is that their absorption is less affected by intestinal mucosal lesions [22]. In previous studies, we showed the antioxidant effects of supplementation with MHA or *DL*-methionine in heat stress-exposed broilers [23, 24]. In this study, we hypothesize that methionine supplementation can help alleviate the negative effects of *Eimeria* spp. challenge, and we test whether there are differences between the effects of free methionine supplementation and methionine dipeptide supplementation. In the case of diseases associated with reduced intestinal absorption, the administration of di- or tripeptides could be a protective factor against protein malnutrition [21]. Despite the importance of small peptides to animal health, few studies have investigated dipeptide supplementation. To the best of our knowledge, this is the first study reporting the biochemical and molecular effects of methionine dipeptide supplementation in broilers challenged with *Eimeria* spp.

Methods

This study was approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA n° 4000170615) of the State University of Maringá, Brazil.

Animals and experimental design

A total of 384 one-day-old unvaccinated Cobb 500 male broilers were used. The chicks were raised in a temperature-controlled environment at an initial temperature of 33 °C with 24 h of artificial light per day. The temperature was gradually reduced according to bird age, as recommended by Cobb 500 management guidelines. Birds were housed in raised floor cages of 1.0 m² (8 chickens per cage). Chicks were raised conventionally up to 10

days of age, after which they were reared following a completely randomized, 2×3 factorial design with eight replicates of eight birds per treatment. The first factor was *Eimeria* spp. challenge (*Eimeria*-challenged, EC, or unchallenged, UC, broilers) and the second factor was methionine supplementation (non-supplemented, NS; free *DL*-methionine, *DL*-Met; and *DL*-methionyl-*DL*-methionine, *DL*-MMet). Before birds were submitted to the respective treatments, they were fasted for 6 h and weighed.

At 14 days of age, one group of chicks from each diet treatment ($n = 64$) were inoculated orally with 1 mL of a solution containing sporulated oocysts of *Eimeria* spp. (EC group; 2×10^4 *Eimeria acervulina*, 2×10^4 *Eimeria praecox*, 1.6×10^4 *Eimeria maxima*, and 4×10^4 *Eimeria mitis*). UC chickens received orally 1 mL of saline solution. Each group was housed separately to avoid cross-infection. All birds were killed by cervical dislocation 144 h post-inoculation (PI) at 20 days of age. Birds had free access to water and feed throughout the experimental period. Experimental diets containing corn and soybean meal were formulated according to Rostagno et al. [25], and no anticoccidial drugs were added to the diets. Diet composition is shown in Table 1, and analyzed and calculated nutrient compositions are shown in Table 2.

Table 1 Composition of experimental diets, %, as is, fed to 10–20 day old broilers

Ingredient, kg	NS ^a	DL-Met	DL-MMet
Corn, 7.8%	54.89	54.89	54.89
Soybean meal, 46%	37.30	37.30	37.30
Soybean oil	3.80	3.80	3.80
<i>L</i> -Lysine HCl, 78%	0.16	0.16	0.16
<i>L</i> -Threonine, 98.5%	0.04	0.04	0.04
<i>DL</i> -Methionyl- <i>DL</i> -Methionine, 95%, dipeptide	-	-	0.29
<i>DL</i> -Methionine, 99%	-	0.28	-
Dicalcium phosphate, 20%	1.53	1.53	1.53
Limestone, 38%	1.16	1.16	1.16
Salt	0.45	0.45	0.45
Vitamin–mineral premix ^b	0.40	0.40	0.40
Inert filler	0.30	0.02	0.01
Total	100.00	100.00	100.00

^aNS = non-supplemented diet (control diet); DL-Met = diet supplemented with *DL*-methionine 99%; DL-MMet = diet supplemented with *DL*-methionyl-*DL*-methionine 95%.

^bThe diets supplied the following compounds (per kg): retinyl acetate, 3.44 mg; cholecalciferol, 50 µg; *DL*- α -tocopherol, 15 mg; thiamine, 1.63 mg; riboflavin, 4.9 mg; pyridoxine, 3.26 mg; cyanocobalamin, 12 µg; D-pantothenic acid, 9.8 mg; D-biotin, 0.1 mg; menadione, 2.4 mg; folic acid, 0.82 mg; niacinamide, 35 mg; selenium, 0.2 mg; iron, 35

mg; copper, 8 mg; manganese, 60 mg; zinc, 50 mg; iodine, 1 mg; and butylated hydroxy toluene, 80 mg

Table 2 Calculated and analyzed nutrient composition, g/kg, as is, of experimental diets fed to 10–20 day old broilers

Nutrients	NS ^a	DL-Met	DL-MMet
<i>Analyzed composition^b, g/kg</i>			
Crude protein	217	220	216
Lysine	12.87 (100) ^c	12.78 (100)	12.59 (100)
Methionine	3.05 (24)	5.78 (45)	5.84 (46)
Methionine + cystine	6.53 (51)	9.10 (71)	9.17 (73)
Threonine	8.54 (66)	8.73 (68)	8.41 (67)
Tryptophan	2.81 (22)	2.85 (22)	2.79 (22)
Valine	10.39 (81)	10.56 (83)	10.12 (80)
Isoleucine	9.56 (74)	9.75 (76)	9.27 (74)
Arginine	14.52 (113)	14.89 (117)	14.34 (114)
<i>Calculated composition</i>			
AME ^d , kcal/kg	3,053	3,052	3,052
Calcium, g/kg	8.76	8.76	8.76
Available phosphorus, g/kg	4.50	4.50	4.50
Sodium, g/kg	2.00	2.00	2.00

^aNS = non-supplemented diet (control diet); DL-Met = diet supplemented with *DL*-methionine 99%; DL-MMet = diet supplemented with *DL*-methionyl-*DL*-methionine 95%

^bFeeds were formulated using the total amino acid contents of corn and soybean meal determined by near infrared reflectance spectroscopy. The total amino acid and other nutrient values are shown as gram per kilogram and not as a percentage of the diets. Total amino acid compositions were analytically determined by Evonik Industries (Hanau, Germany) using wet chemistry (high-performance liquid chromatography)

^cValues in parentheses indicate the amino acid-to-lysine ratios (ideal protein concept).

^dAME = apparent metabolizable energy

Coprological analysis for coccidiosis diagnosis and histological analysis of the duodenum and jejunum

A pool of fresh excreta samples was randomly withdrawn from the cages of EC animals, and another pool was withdrawn from the cages of UC animals, 144 h PI. Coprological analysis was performed for the qualitative detection (presence or absence) of oocysts in excreta, as described by Gordon and Whitlock [26] with modifications. Approximately 2 g of feces was dissolved in 15 mL of distilled water and centrifuged at 2500 rpm for 2 min. The supernatant was discarded, and the pellet was dissolved in 10 mL of sucrose solution (density 1.18). This mixture was centrifuged again at 2500 rpm for 2 min. Then, the material was placed on a histological slide for oocyst detection. An Olympus BX50 Optical

P1 microscope coupled to an Olympus PMC 35 B camera (40× objective lens) was used for visual analysis.

Duodenum and jejunum samples were collected immediately after slaughter (144 h PI) for histological analysis. Samples were cut longitudinally, carefully washed with cold sterile physiological saline, and fixed in Bouin's solution for 6 h. After fixation, samples were dehydrated through a graded ethanol series, diaphanized in xylol, and embedded in paraffin. Semi-serial histological sections in the longitudinal sense of 3 µm thickness were obtained. Samples were stained with Hematoxylin-Eosin, and histological images were captured using the Olympus BX 50 P1 Optical microscope coupled to the Olympus PMC 35 B camera (4× and 40× objective lenses).

Animal performance and relative weight of organs

Animals were weighed at days 14 and 20 after a 6 h fasting period, during which they had free access to water. For performance evaluation, each cage (eight birds per cage, $n = 8$) was considered an experimental unit. Feed intake (FI) was calculated as the amount of feed offered at the beginning of the experimental period (day 14) minus the feed residue at the end of the experimental period (day 20). Body weight gain (BWG) was calculated by the difference between the mean initial weight (day 14) and mean final weight (day 20). Feed conversion ratio (FCR) was calculated as the ratio of FI to BWG.

For analysis of relative organ weight, each bird was considered an experimental unit ($n = 8$), birds were selected according on the body weight average of each replicate. At 20 days of age (144 h PI), chickens were fasted for 6 h and then killed by cervical dislocation. The liver, whole intestine, spleen, and bursa of Fabricius were collected and weighed. The relative weight of the organs was calculated using the equation organ weight/body weight \times 100.

Analysis of the redox state of the jejunum

Six birds from each treatment, chosen on the basis of the average body weight of each replicate group, were killed by cervical dislocation 144 h PI. The jejunum was collected, washed with cold sterile physiological saline, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until analysis.

Sample preparation

Nitrite (NO_2^-) content, catalase (CAT) activity, superoxide dismutase (SOD) activity, and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) content were determined. Briefly, 100 mg of jejunum was added to 1,000 μL of 0.1 mol/L potassium phosphate buffer, pH 7.4. The solution was homogenized using a Van Potter homogenizer until complete dissociation and centrifuged at $10,000 \times g$ for 10 min at 4 °C. The supernatant was collected in a clean eppendorf tube and used as a sample.

For analysis of carbonylated proteins (CP), 200 mg of jejunum was added to 1,000 μL of 0.05 mol/L phosphate buffer with 0.001 mol/L ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), pH 6.7. The solution was homogenized using a Van Potter homogenizer until complete dissociation. Then, the homogenate was centrifuged at $10,000 \times g$ for 10 min at 4 °C. The supernatant was collected in a clean eppendorf tube and used as a sample.

Analysis of CAT and SOD activities

CAT activity was assessed by evaluating the ability of the enzyme to convert hydrogen peroxide (H_2O_2) to water and molecular oxygen. Twenty microliters of supernatant was added to 980 μL of the reaction mixture (1 mol/L Tris buffer containing 0.005 mol/L EDTA, pH 8.0, and H_2O_2). Enzyme activity was monitored using an EvolutionTM 300 UV-VIS spectrophotometer (Thermo Fisher ScientificTM), and readings were performed at 240 nm for 60 s. CAT activity was expressed as the amount of H_2O_2 consumed per minute per milligram of protein ($\epsilon = 33.33 \text{ mol/L}\cdot\text{cm}$) [27].

SOD activity was measured as the ability of the enzyme to inhibit the autoxidation of pyrogallol, which generates superoxide anions ($\text{O}_2^{\bullet-}$). SOD competes with the detection system for $\text{O}_2^{\bullet-}$. The absorbance increase was measured at 420 nm for 180 s using a microplate reader (VersaMaxTM, Molecular Devices). The jejunum supernatant was added to 0.2 mol/L Tris-HCl buffer containing 0.002 mol/L EDTA, pH 8.2, and 0.015 mol/L pyrogallol. The analysis was performed in duplicate at room temperature. A unit of SOD (U) was defined as the amount of enzyme required to inhibit the autoxidation rate of pyrogallol by 50%. SOD activity was expressed as U/mg of protein [28].

Determination of biomarkers of oxidative stress and total antioxidant capacity (TAC)

Analysis of NO_2^- , one of the two stable and non-volatile primary products of nitric oxide degradation, was performed to assess the formation of nitric oxide during infection, as it is a potential inducer of oxidative stress [29]. NO_2^- determination was based on the diazotization reaction described by Griess [30]. Briefly, 50 μL of a sulfanilamide solution (1% sulfanilamide diluted in 5% phosphoric acid; Sigma–Aldrich) was added to microplate wells containing 25 μL of the sample. The microplate was incubated for 10 min at room temperature in the dark. Then, a solution of 0.1% *N*-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride (NED) (Sigma–Aldrich) in milli-Q water was added to the reaction, and samples were read at 540 nm using a microplate reader (VersaMax™, Molecular Devices). The concentration of nitrite in the jejunum was calculated from a standard curve prepared using sodium nitrite (NaNO_2). The results were expressed as μmol nitrite/mg of protein.

Lipid peroxidation was assessed as described by Buege and Aust [31], on the basis of the ability of thiobarbituric acid to bind to oxidized lipids. Samples were read at 535 nm using the Evolution™ 300 UV-VIS spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific™). TBARS content was determined using a molar extinction coefficient of 1.56×10^5 mol/L·cm, according to the Beer–Lambert law. Results were expressed as nmol TBARS/mg of protein.

For analysis of protein oxidation, we measured the formation of carbonyl derivatives using the reagent 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH, Sigma–Aldrich), as described by Levine et al. [32]. Readings were performed at 370 nm on the Evolution™ 300 UV-VIS spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific™). Carbonylated protein (CP) concentration was determined using the Beer–Lambert equation, $A = C \times b \times \epsilon$, where A is the absorbance of the sample minus that of the control, C is the concentration of carbonylated proteins, b is the optical path length, and ϵ is the molar extinction coefficient (22,000 mol/L·cm). Results were expressed as nmol carbonylated protein/mg of protein.

Total antioxidant capacity (TAC) was measured by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma–Aldrich) radical scavenging assay, according to the method described by Brand-Williams et al. [33], with modifications. Briefly, 100 mg of jejunum was added to 1,000 μL of methanol. The solution was homogenized using a Van Potter homogenizer and centrifuged at $10,000 \times g$ for 10 min at 4 °C. Then, 1,850 μL of a 6×10^{-5} mol/L DPPH

solution was added to an eppendorf tube containing 150 μL of the supernatant obtained from the samples. The solution was kept in the dark for 30 min. Subsequently, samples were read at 515 nm using the EvolutionTM 300 UV-VIS spectrophotometer (Thermo Fisher ScientificTM). The antioxidant capacity of each sample was calculated as follows: % Antioxidant activity = $(1 - (\text{absorbance of the sample} / \text{absorbance of DPPH})) \times 100$.

The Bradford method [34] was used to determine total protein content and correct NO_2^- , CAT, SOD, carbonylated protein, and TBARS results.

Gene expression

The jejunum of six birds from each treatment, selected on the basis of the average body weight of each replicate group, was collected 144 h PI, washed with cold sterile saline, and added to an eppendorf tube containing 1 mL of TRIzolTM (Invitrogen, Carlsbad CA, USA). Samples were stored at -80°C until total RNA extraction.

Total RNA was extracted according to the manufacturer's recommendations and quantified spectrophotometrically at 260 nm on a NanoDrop 2000c spectrophotometer (Thermo Fisher ScientificTM). RNA integrity was assessed on a 1% agarose gel stained with SYBRTM Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) and visualized under ultraviolet light using a photodocumentation system for electrophoresis gel (L-PIX TOUCH, Locus Biotechnology). To eliminate genomic DNA contamination, we treated 1 μg of total RNA with DNase I, Amplification Grade (Invitrogen, Carlsbad CA, USA), according to the manufacturer's instructions. Subsequently, complementary DNA (cDNA) synthesis was performed using the SuperScriptTM III First-Strand Synthesis SuperMix kit (Invitrogen Corporation, Brazil) according to the manufacturer's instructions. cDNA concentration was determined at 260 nm using the NanoDropTM 2000c spectrophotometer (Thermo FisherScientificTM). cDNA samples were stored at -20°C until amplification.

RT-qPCR was performed using 5 μL of cDNA diluted to 40 or 80 ng/ μL , 0.5 μL or 1 μL of 10 μmol forward primer and 10 μmol reverse primer (final concentrations of 200 nmol and 400 nmol, respectively), 12.5 μL of SYBRTM Green PCR Master Mix (Applied BiosystemsTM, USA), and UltraPureTM DEPC-treated water (InvitrogenTM, Carlsbad CA, USA) to complete the volume to 25 μL . RT-qPCR reactions were performed on a StepOneTM real-time PCR system version 2.3 (Applied BiosystemsTM), and the thermal

cycle for all genes was set to 95 °C for 10 min followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 15 s and annealing and extension at 60 °C for 1 min, ending with heating from 65 °C to 95 °C for melting curve analysis.

Primers specific to the genes that code for superoxide dismutase 1 (*SOD1*), catalase (*CAT*), peptide transporter 1 (*PEPT1*), neutral and cationic amino acid transporter 1 (y^+ *LAT-1*), neutral amino acid transporter 1 (*B⁰ATI*), cationic amino acid transporter 1 (*CAT - 1*), toll-like receptor 2 (*TLR2*), toll-like receptor 5 (*TLR5*), interleukin 1 beta (*IL1B*), interleukin 2 (*IL2*), interferon gamma (*IFNG*), lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor (TNF)-alpha factor (*LITAF*), claudin-1 (*CLDN1*), occludin (*OCLN*), and inducible nitric oxide synthase (*iNOS*) were designed on the basis of gene sequences deposited in the National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) database (Table 3) using the Integrated DNA Technologies system (<http://www.idtdna.com>). The β -actin gene (*ACTB*) was used as an endogenous control. All analyses were performed in duplicate, and results were expressed as arbitrary units, AU. The $2^{-\Delta CT}$ method was used to evaluate gene expression [35].

Table 3 Primer sequences used for RT-qPCR

Gene	Primer sequences, 5'→3'	Amplicon, bp ^a	Accession n ^o
<i>SOD1</i> ^b	F: AGATGGCAGTGGGAAATGAG R: ACTCAAGACAGCAGAGTAGTAATG	110	NM_205064.1
<i>CAT</i>	F: GAGGAACCCTCAGACTCATTG R: CCATCAGGAATACCACGATCAC	117	NM_001031215.2
<i>PEPT1</i>	F: CCCCTGAGGAGGATCACTGTT R: CAAAAGAGCAGCAGCAACGA	66	KF366603.1
<i>y⁺LAT-1</i>	F: TGTTGGAGCCAGAGAAGGA R: CACAAGGAGATAAAGCAAAGTC	118	XM_418326.6
<i>B⁰AT1</i>	F: TCTATTGAAGATTCGGGCAC R: AATGGTAAGCACAAAGGTATGG	153	XM_419056.6
<i>CAT - 1</i>	F: CGTGGCATCTCTGCTCATC R: CTCCATCCCAACCTACATACTTA	134	NM_001145490.1
<i>TLR2</i>	F: ACTGCCTGCAACGGTCAT R: CATCAGCTTCATTGTTGGTTTCTGT	75	NM_204278.1
<i>TLR5</i>	F: ACACGGCAATAGTAGCAACACATAT R: ACACCTGGAACCTTGAAAAGAACAT	91	XM_025148815.1
<i>IL1B</i>	F: GTCAACATCGCCACCTACAA R: CGGTACATACGAGATGGAAACC	90	XM_015297469.1
<i>IL2</i>	F: CCTCAAGAGTCTTACGGGTCTA R: AGTTGGTCAGTTCATGGAGAAA	104	GU119890.1
<i>IFNG</i>	F: TGAGGTGATGTTTACCGAGTTT R: GCTTAGAGCTGAGCAGGTATG	94	NM_205149.1
<i>LITAF</i>	F: GAGCGTTGACTTGGCTGTC R: AAGCAACAACCAGCTATGCAC	64	NM_204267.1
<i>CLDNI</i>	F: ACTCCTGGGTCTGGTTGGT R: GACAGCCATCCGCATCTTCT	100	AY750897.1
<i>OCN</i>	F: ACGGCAGCACCTACCTCAA R: GGGCGAAGAAGCAGATGAG	123	D21837.1
<i>iNOS</i>	F: TCCTGAGTTCTGTGCCTTTG R: GTTCATCTCCTTCACCCACTG	92	U46504.1
<i>ACTB</i>	F: GCCAACAGAGAGAAGATGAC R: CACCAGAGTCCATCACAATAC	130	L08165.1

^abp = base pairs

^b*SOD1* = superoxide dismutase 1 gene; *CAT* = catalase gene; *PEPT1* = peptide transporter 1 gene; *y⁺LAT-1* = neutral and cationic amino acid transporter 1 gene; *B⁰AT1* = system B⁰ neutral amino acid transporter 1 gene; *CAT - 1* = cationic amino acid transporter 1 gene; *TLR2* = toll-like receptor 2 gene; *TLR5* = toll-like receptor 5 gene; *IL1B* = interleukin 1 beta gene; *IL2* = interleukin 2 gene; *IFNG* = interferon gamma gene; *LITAF* = lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha factor gene; *CLDNI* = claudin-1 gene; *OCN* = occludin gene; *iNOS* = inducible nitric oxide synthase gene; F = forward; R = reverse

Statistical analysis

The Shapiro–Wilk test was applied to verify the normality of data distribution. Data were analyzed by two-way ANOVA, which considers the main effects (*Eimeria* spp. challenge and methionine supplementation) and the interaction between the factors. Means were compared by the Tukey test ($P < 0.05$) using SAS 2002 version 9.00 (SAS Inst. Inc., Cary, NC).

Results

The absence of oocysts in the excreta of UC broilers validates their use as controls (Fig. 1A). The infection caused by *Eimeria* spp. in EC broilers was confirmed by the presence of oocysts in the excreta samples (Fig. 1B), histological alterations in the intestinal mucosal (Fig. 1C), and the presence of *Eimeria* spp. structures in duodenal enterocytes (Fig. 1D) and in jejunal enterocytes and lamina propria (Fig. 1F). The jejunal villi of UC broilers were normal, confirming the absence of infection and the integrity of the intestinal epithelium (Fig. 1E).

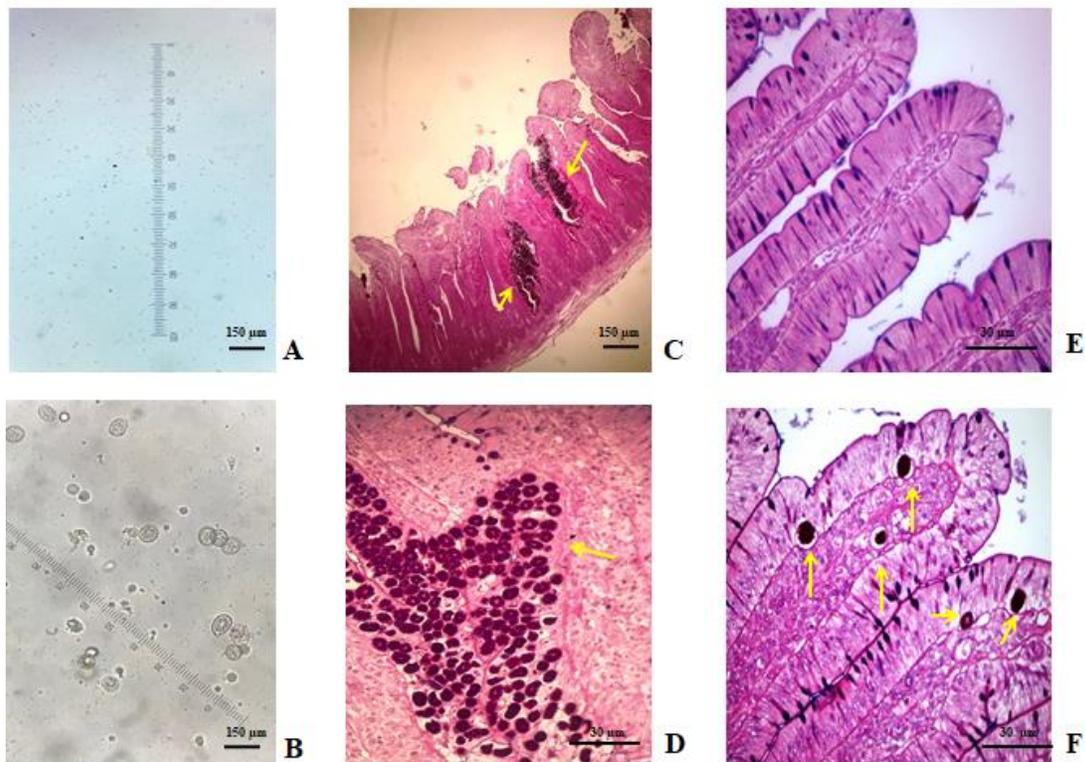


Fig. 1 Oocysts detection in the feces of unchallenged, UC **A** and *Eimeria*-challenged, EC **B** broiler chickens 144 h post-inoculation (PI). **C**, **D** Histological images of duodenal villi and **E**, **F** jejunal villi in broiler chickens 144 h PI, 40× magnification. Note the presence of

Eimeria structures (yellow arrows) in the duodenal and jejunal mucosa of EC broilers. **E** Intact jejunal villi in UC broilers. Hematoxylin-Eosin staining. **A, B, C** Scale bars represent 150 μ m. **D, E, F** Scale bars represent 30 μ m

Animal performance and relative weight of organs

Eimeria spp. challenge and methionine supplementation showed no interaction effect on performance parameters (Table 4). However, FI, BWG, and FCR values of EC chickens were respectively 13% lower, 37% lower, and 39% higher ($P < 0.0001$) than those of UC chickens. Methionine supplementation had a significant effect on BWG ($P = 0.0038$) and FCR ($P = 0.0190$), as chickens fed the DL-Met diet had higher BWG (about 12% higher) and better FCR (about 12% lower) than chickens fed the NS diet. No differences were observed between chickens fed DL-Met and DL-MMet diets.

Table 4 Performance of broilers 144 h post-inoculation with *Eimeria* spp.

		FI, kg ^c		BWG, kg ^d		FCR ^e	
		Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
UC ^f	NS ^h	0.470	0.011	0.295	0.009	1.593	0.016
	DL-Met ⁱ	0.498	0.009	0.333	0.006	1.515	0.042
	DL-MMet ^j	0.493	0.015	0.315	0.015	1.568	0.115
EC ^g	NS	0.428	0.006	0.183	0.009	2.378	0.108
	DL-Met	0.420	0.009	0.213	0.003	1.987	0.047
	DL-MMet	0.415	0.006	0.198	0.005	2.101	0.069
<i>Main effects</i>							
Challenge	UC	0.487 ^a	0.007	0.314 ^a	0.007	1.558 ^b	0.038
	EC	0.421 ^b	0.004	0.198 ^b	0.005	2.155 ^a	0.064
Diet	NS	0.449	0.010	0.239 ^b	0.022	1.985 ^a	0.157
	DL-Met	0.459	0.016	0.273 ^a	0.023	1.751 ^b	0.094
	DL-MMet	0.454	0.016	0.256 ^{ab}	0.023	1.834 ^{ab}	0.118
<i>P-value</i>							
Challenge		<0.0001		<0.0001		<0.0001	
Diet		0.6033		0.0038		0.0190	
Challenge \times Diet		0.1487		0.9062		0.1155	

^{a,b} Means in the same column followed by different letters differ significantly by the Tukey test, $P < 0.05$. Results are presented as mean \pm standard error, SE. Each cage was considered an experimental unit, $n = 8$. No mortality was observed during the experimental period

^cFI = feed intake

^dBWG = body weight gain

^eFCR = feed conversion ratio. Performance data were calculated taking into consideration a period of 6 days, that is, the period of 144 h post-inoculation, PI with *Eimeria* spp.

^fUC = unchallenged broilers

^gEC = *Eimeria*-challenged broilers

^hNS = non-supplemented diet

ⁱDL-Met = diet supplemented with free methionine, *DL*-methionine 99%

^jDL-MMet = diet supplemented with methionine dipeptide, *DL*-methionyl-*DL*-methionine 95%

The effects of *Eimeria* spp. challenge and methionine supplementation on the relative weight of organs are presented in Fig. 2A and Fig. 2B, respectively. *Eimeria* spp. challenge had significant effects on the relative weight of the bursa of Fabricius ($P < 0.0001$), spleen ($P < 0.0001$), and whole intestine ($P < 0.0001$) (Fig. 2A). EC birds had lower relative weight of the bursa of Fabricius and higher relative weight of the spleen and whole intestine than UC birds (Fig. 2A). There was no effect of *Eimeria* spp. challenge on liver weight (Fig. 2A). Methionine supplementation had no effect on the relative weight of the organs ($P > 0.05$) (Fig. 2B).

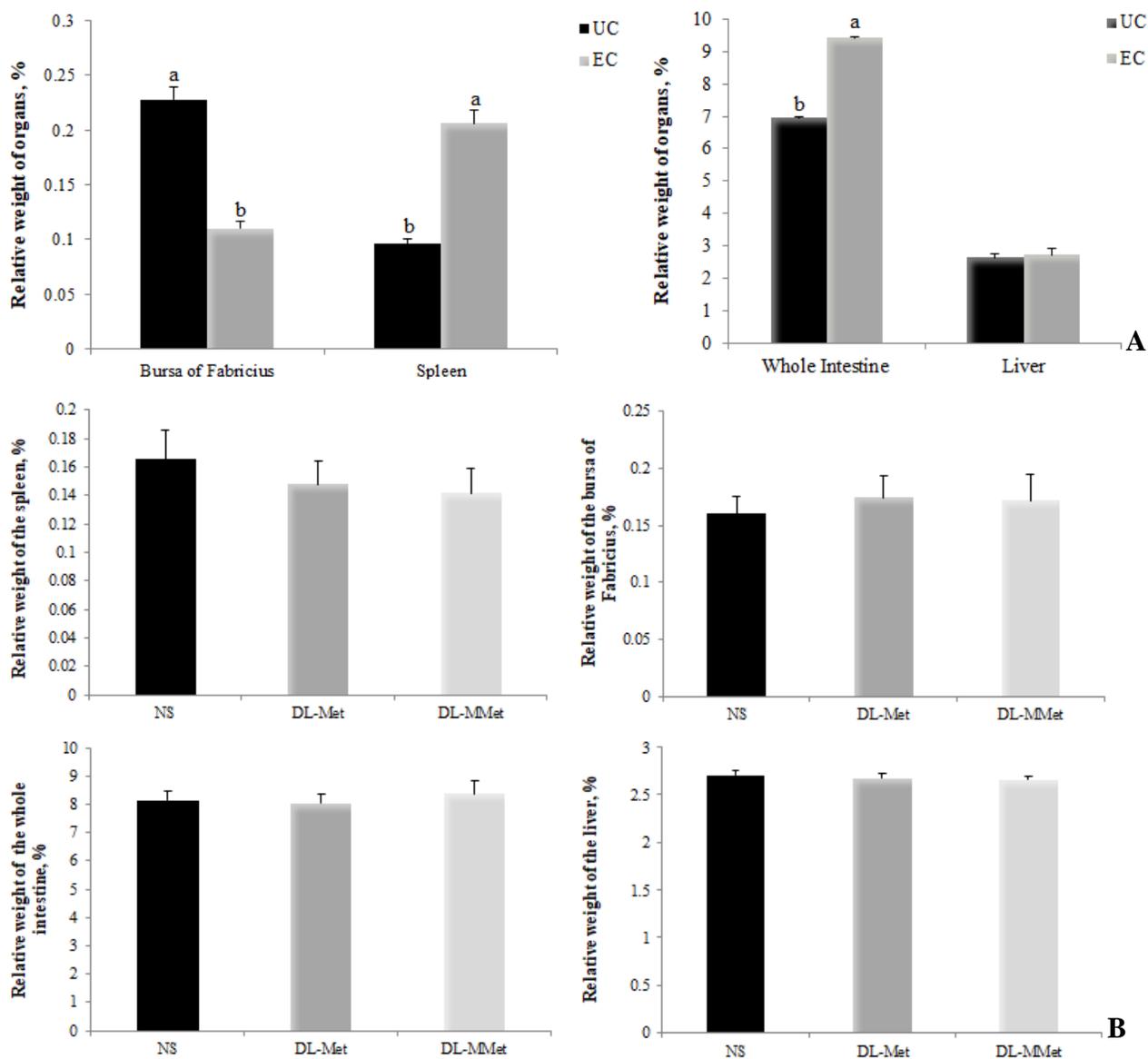


Fig. 2 Effects of *Eimeria* spp. challenge **A** and methionine supplementation **B** on the relative weight of organs of broilers. Results are presented as mean and standard error. ^{a,b} Different letters represent significant differences between treatments by the Tukey test, $P < 0.05$. UC = unchallenged broilers; EC = *Eimeria*-challenged broilers; NS = non-supplemented diet; DL-Met = diet supplemented with free methionine; DL-MMet = diet supplemented with methionine dipeptide

Redox state of the jejunum

An interaction effect between *Eimeria* spp. challenge and methionine supplementation on TAC, CP, and CAT and SOD activities in the jejunum of chickens was observed (Table 5). Within the UC group, there was no effect of diet on CP; however, chickens fed the DL-Met diet had higher TAC and lower CAT and SOD activities. Regarding EC chickens, the

highest level of carbonylated protein was found in the jejunum of chickens fed the NS diet. This result was associated with lower TAC and CAT activity. EC chickens fed the DL-Met and DL-MMet diets had CP levels similar to those of UC chickens fed the same diets, indicating the role of methionine as an antioxidant in the metabolism of EC chickens.

Table 5 Carbonylated protein, CP, total antioxidant capacity, TAC, and antioxidant enzyme activities in the jejunum of broilers 144 h post-inoculation with *Eimeria* spp.

		CP ^d		TAC ^e		Catalase ^f		SOD ^g	
		Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
UC ^h	NS ^j	1.05 ^{bc}	0.11	64.36 ^c	3.52	28.27 ^a	2.06	4.49 ^{ab}	0.09
	DL-Met ^k	1.04 ^{bc}	0.17	81.89 ^a	2.15	21.47 ^{bc}	1.42	3.82 ^c	0.04
	DL-MMet ^l	1.27 ^{ab}	0.16	71.39 ^{bc}	1.69	27.78 ^a	1.28	3.69 ^c	0.13
EC ⁱ	NS	1.43 ^a	0.10	65.27 ^c	2.10	19.62 ^c	1.25	4.72 ^a	0.05
	DL-Met	0.85 ^c	0.15	67.45 ^c	3.06	24.77 ^{ab}	1.94	4.32 ^b	0.11
	DL-MMet	0.90 ^{bc}	0.07	78.32 ^{ab}	2.52	22.38 ^{bc}	0.49	3.59 ^c	0.14
<i>P</i> -value									
Challenge × Diet		0.0200		0.0008		0.0012		0.0214	

^{a,b,c} Means in the same column followed by different letters differ significantly by the Tukey test, $P < 0.05$. Results are presented as mean \pm standard error, SE. Each bird was considered an experimental unit, $n = 6$

^dExpressed as nmol of carbonyl groups/mg of protein

^eTAC = total antioxidant capacity, expressed as percentage, %

^fCatalase activity, expressed as the amount of hydrogen peroxide, H₂O₂ consumed per minute per milligram of protein

^gSOD = superoxide dismutase activity, expressed as SOD unit/mg of protein

^hUC = unchallenged broilers

ⁱEC = *Eimeria*-challenged broilers

^jNS = non-supplemented diet

^kDL-Met = diet supplemented with free methionine (DL-methionine 99%)

^lDL-MMet = diet supplemented with methionine dipeptide (DL-methionyl-DL-methionine 95%)

The lower TAC observed in EC chickens might also be associated with the reduced expression of *CAT* ($P < 0.0001$) and *SOD1* ($P = 0.0036$) genes (Fig. 3). There was no effect of methionine supplementation on the expression of these genes.

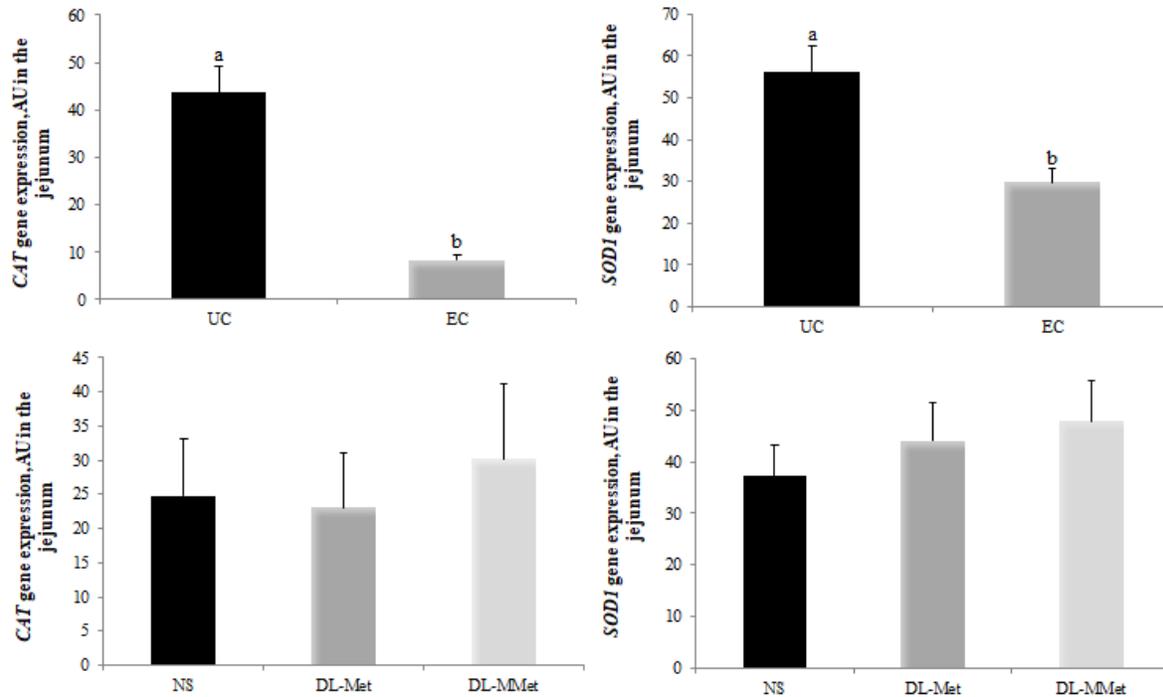


Fig. 3 Expression of catalase, *CAT* and superoxide dismutase 1, *SOD1* genes in the jejunum of broiler chickens. Results are expressed as arbitrary units, AU, and are presented as mean and standard error. ^{a,b} Different letters represent significant differences between treatments by the Tukey test, $P < 0.05$. UC = unchallenged broilers; EC = *Eimeria*-challenged broilers. NS = non-supplemented diet; DL-Met = diet supplemented with free methionine; DL-MMet = diet supplemented with methionine dipeptide

EC chickens had higher nitrite and TBARS contents than UC chickens. Birds fed the DL-Met and DL-MMet diets showed lower nitrite contents than birds fed the NS diet. There was no effect of methionine supplementation on TBARS content (Fig. 4).

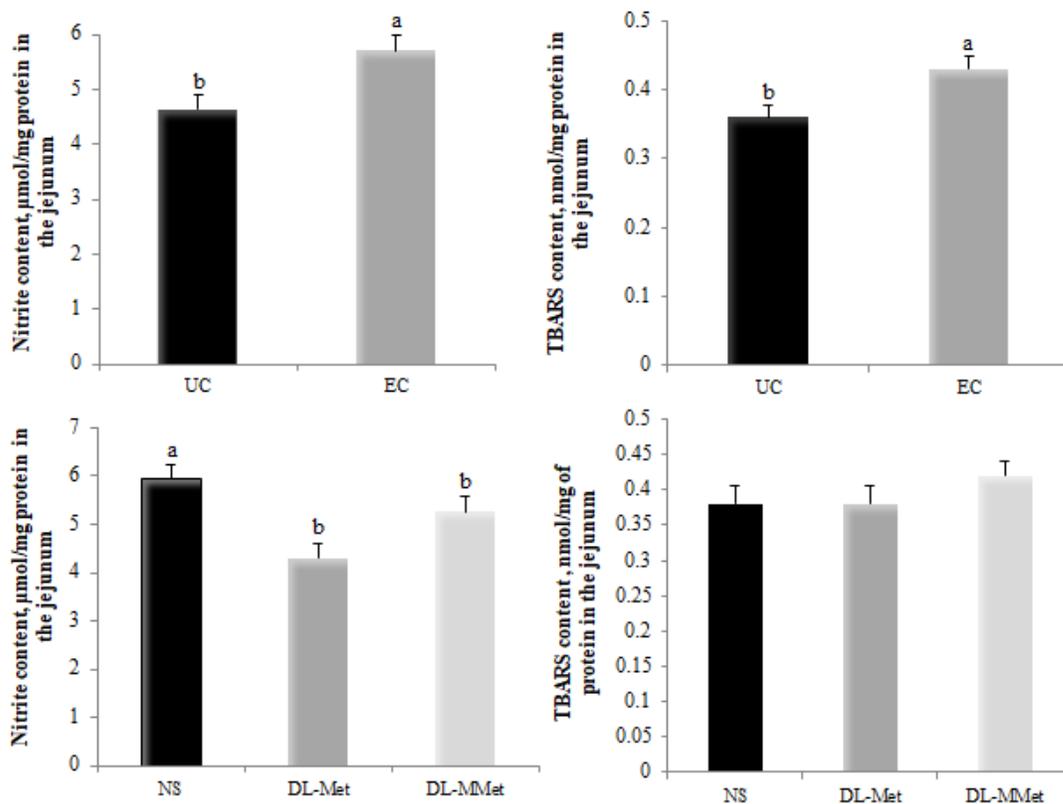


Fig. 4 Effect of *Eimeria* spp. challenge and methionine supplementation on nitrite, NO_2^- content and thiobarbituric acid reactive substances, TBARS content in the jejunum of broiler chickens 144 hours post-inoculation. Results are presented as mean and standard error. ^{a,b} Different letters represent significant differences by the Tukey test, $P < 0.05$. UC = unchallenged broilers; EC = *Eimeria*-challenged broilers; NS = non-supplemented diet; DL-Met = diet supplemented with free methionine; DL-MMet = diet supplemented with methionine dipeptide

Expression of genes associated with intestinal function and integrity

We investigated the effects of the treatments on the expression of genes related to the function and integrity of the intestinal tract. The expression of genes encoding γ^+LAT-1 , B^0AT1 , $CAT - 1$, and $PEPT1$ in the jejunum of broilers 144 h PI is shown in Fig. 5A and Fig. 5B. *Eimeria* spp. challenge affected the expression of B^0AT1 ($P = 0.0001$), $CAT - 1$ ($P = 0.0300$), and $PEPT1$ ($P < 0.0001$) (Fig. 5A). EC chickens showed lower B^0AT1 (0.1589 AU vs. 0.2166 AU) and $PEPT1$ (0.4644 AU vs. 2.5611 AU) and higher $CAT - 1$ (0.0028 AU vs. 0.0012 AU) gene expression than UC chickens. *Eimeria* spp. challenge had no significant effect on γ^+LAT-1 expression ($P > 0.05$) (Fig. 5A).

Methionine supplementation (Fig. 5B) influenced *PEPT1* expression ($P = 0.0467$): broilers fed the DL-MMet diet had higher expression levels of this gene. There was no effect of methionine supplementation on the expression of the genes y^+LAT-1 , *CAT-1*, and B^0AT1 ($P > 0.05$) (Fig. 5B).

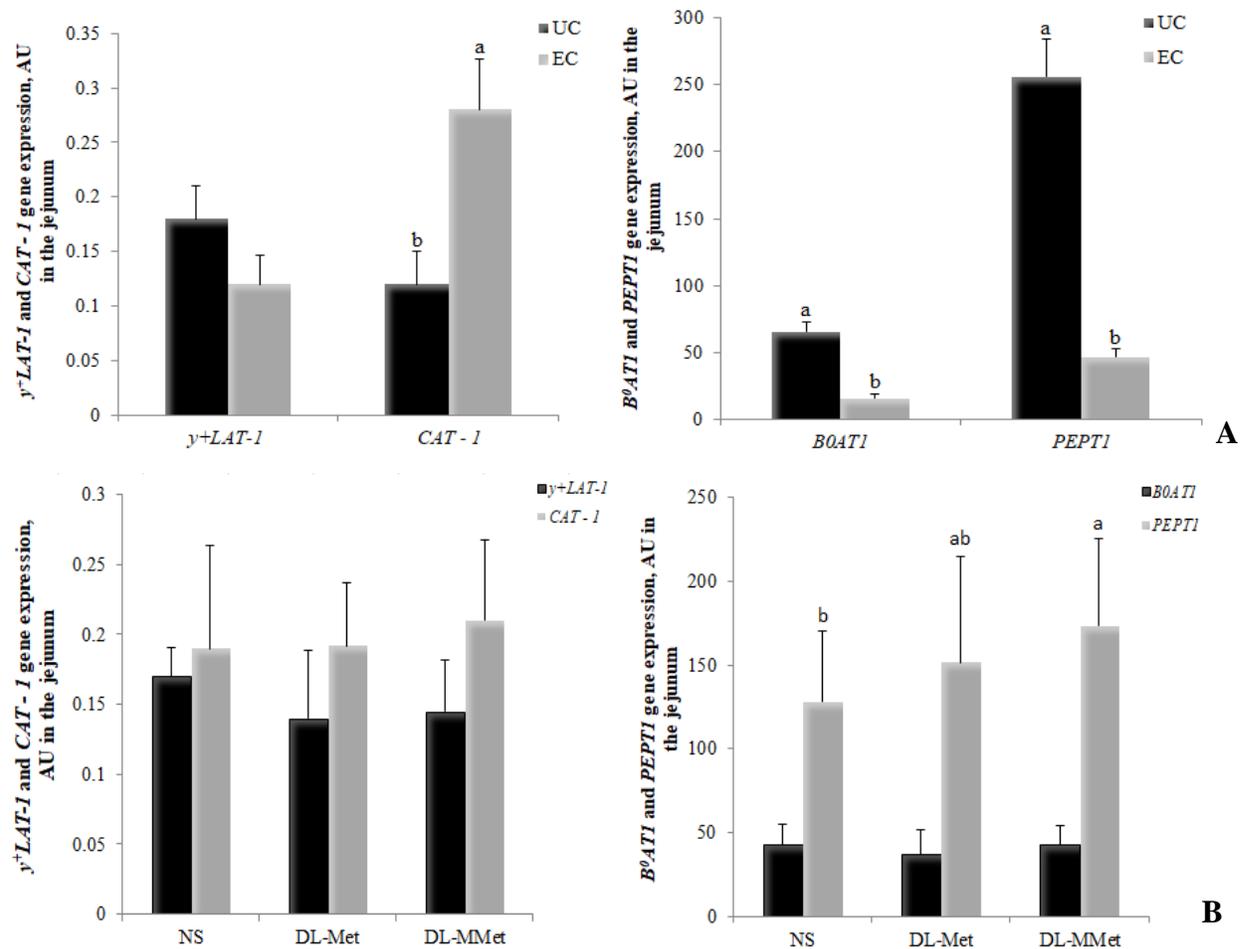


Fig. 5 Effect of *Eimeria* spp. challenge **A** and methionine supplementation **B** on the expression of genes encoding y^+LAT-1 , B^0AT1 , *CAT-1*, and *PEPT1* in the jejunum of broilers. Results are expressed as arbitrary units, AU, and are presented as mean and standard error. ^{a,b} Different letters represent significant differences between treatments by the Tukey test, $P < 0.05$. UC = unchallenged broilers; EC = *Eimeria*-challenged broilers. NS = non-supplemented diet; DL-Met = diet supplemented with free methionine; DL-MMet = diet supplemented with methionine dipeptide. y^+LAT-1 = neutral and cationic amino acid transporter 1 gene. *CAT-1* = cationic amino acid transporter 1 gene; B^0AT1 = system B⁰ neutral amino acid transporter 1 gene; *PEPT1* = peptide transporter 1 gene

Fig. 6 shows the results of *CLDN1* and *OCN* gene expression. EC chickens had decreased expression of *OCN* compared to UC chickens. There was no effect of *Eimeria* spp.

challenge on *CLDN1* expression ($P = 0.1825$), and no effect of methionine supplementation on the expression of *CLDN1* ($P = 0.6416$) and *OCLN* ($P = 0.1595$).

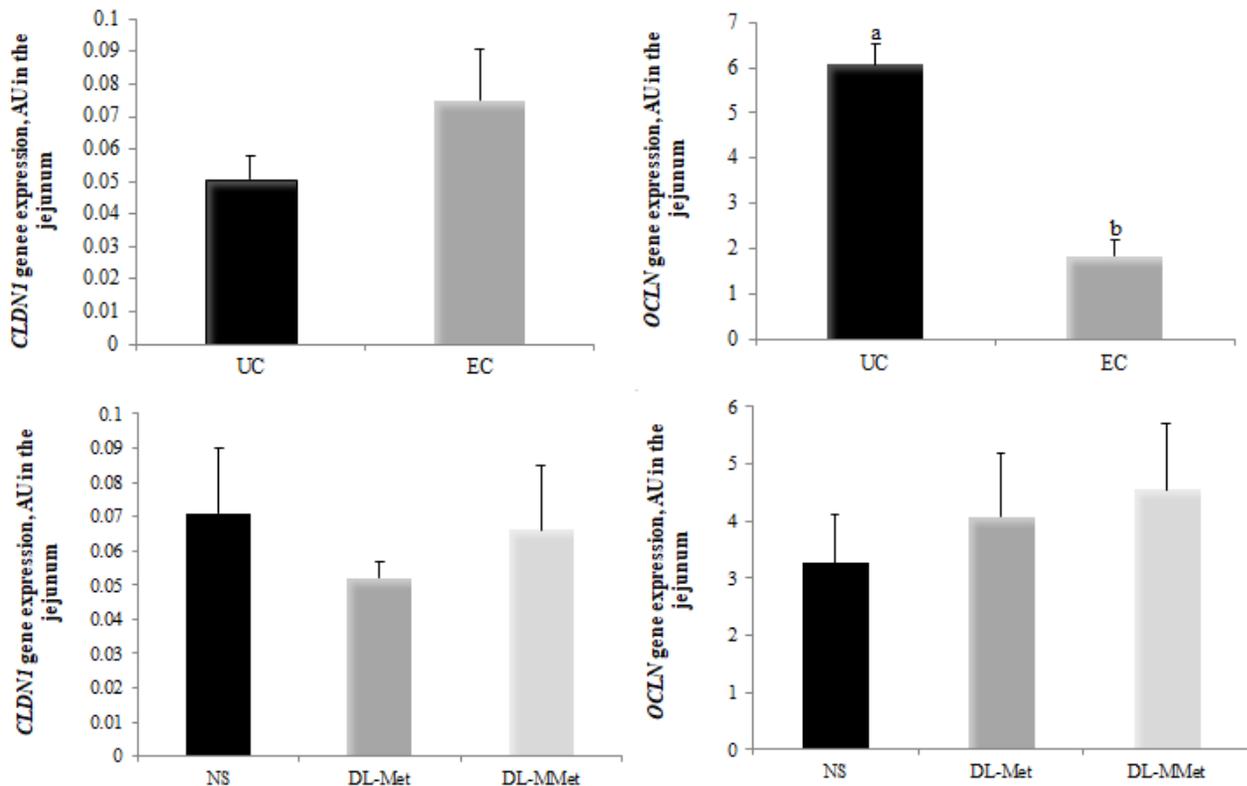


Fig. 6 Effect of *Eimeria* spp. challenge and methionine supplementation on the expression of genes encoding claudin-1, *CLDN1* and occludin, *OCLN* in the jejunum of broiler chickens 144 hours post-inoculation. Results are expressed as arbitrary units, AU, and are presented as mean and standard error. ^{a,b} Different letters represent significant differences between treatments by the Tukey test, $P < 0.05$. NS = non-supplemented diet; DL-Met = diet supplemented with free methionine; DL-MMet = diet supplemented with methionine dipeptide

Expression of genes associated with immune responses

The effects of *Eimeria* spp. challenge on the relative expression of *TLR2*, *TLR5*, *IL1B*, *IL2*, *LITAF*, and *IFNG* genes are shown in Fig. 7. *Eimeria* spp. challenge significantly reduced the expression of *TLR5* ($P = 0.0003$) and *IL2* ($P = 0.0001$) and significantly increased the expression of *IFNG* ($P = 0.0001$). However, no significant effect of *Eimeria* spp. challenge on the expression of *TLR2*, *IL1B*, and *LITAF* was observed ($P > 0.05$) (Fig. 7).

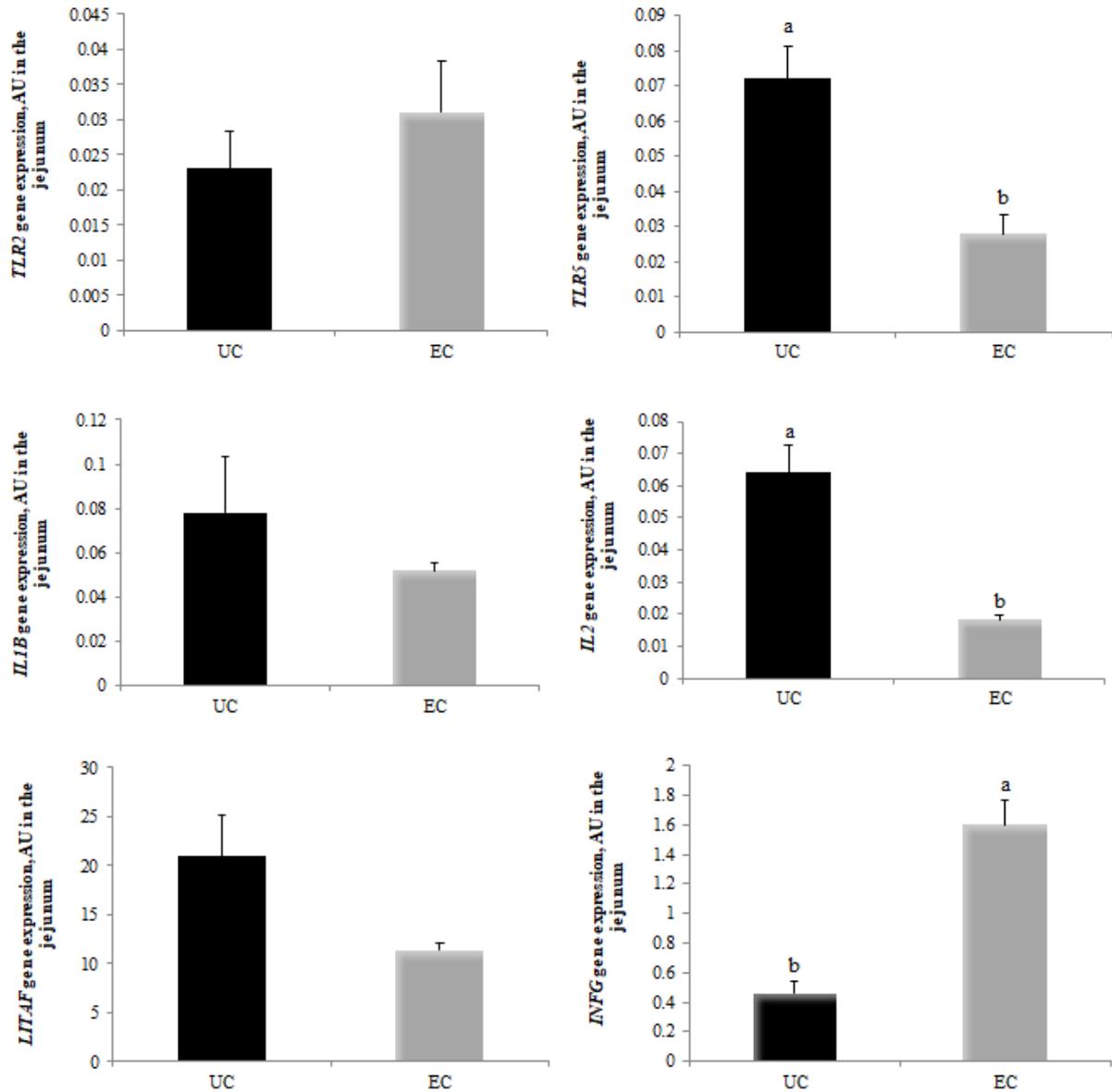


Fig. 7 Expression of genes associated with the immune system in the jejunum of broilers 144 h post-inoculation with *Eimeria* spp. Results are expressed as arbitrary units, AU, and are presented as mean and standard error. ^{a,b} Different letters represent significant differences between treatments by the Tukey test, $P < 0.05$. UC = unchallenged broilers; EC = *Eimeria*-challenged broilers. *TLR2* = toll-like receptor 2 gene; *TLR5* = toll-like receptor 5 gene; *IL1B* = interleukin 1 beta gene; *IL2* = interleukin 2 gene; *LITAF* = lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha factor gene; *IFNG* = interferon gamma gene

The effects of diet on the relative expression of *TLR2*, *TLR5*, *IL1B*, *IL2*, *LITAF* and *IFNG* genes are presented in Fig. 8. Chickens fed the NS diet had lower expression of *TLR5* than chickens fed the DL-MMet diet ($P = 0.0255$). There was no difference between

the sources of methionine. No significant effect was observed on the expression of *TLR2*, *IL1B*, *IFNG* and *LITAF* ($P > 0.05$) (Fig. 8).

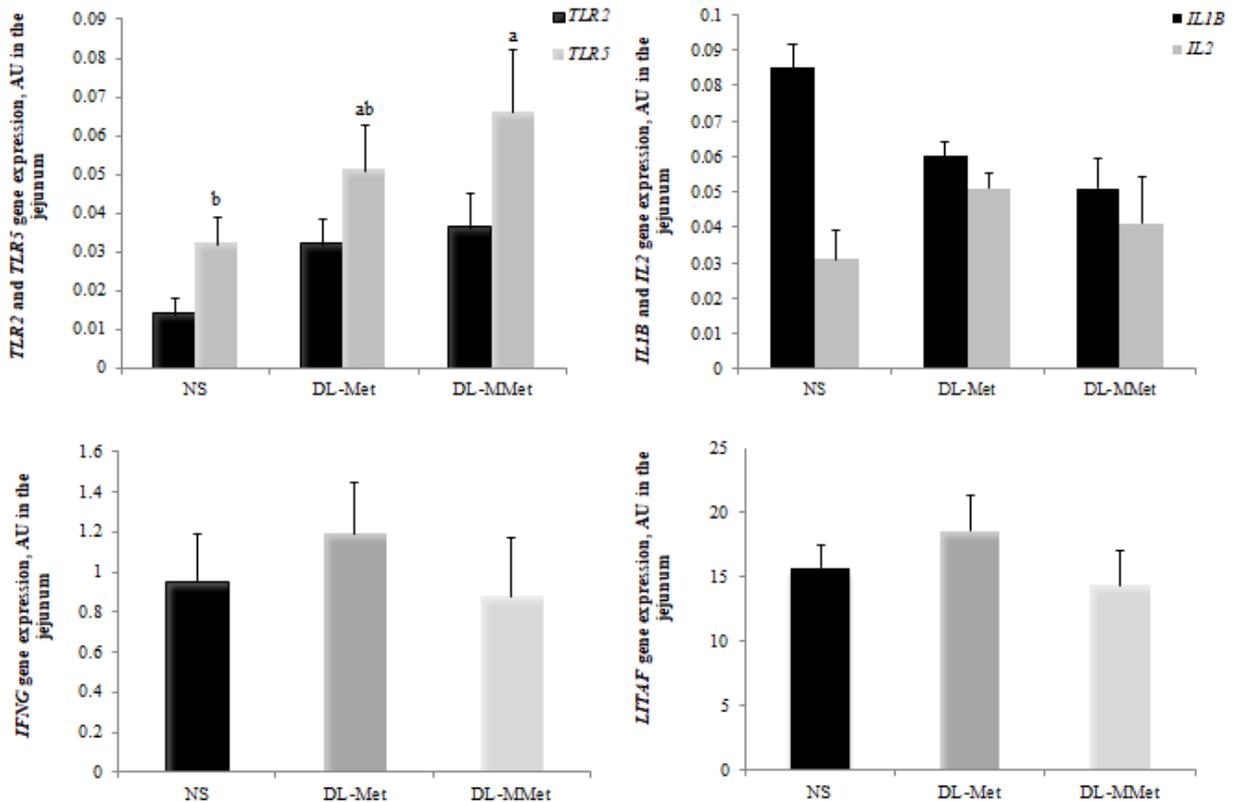


Fig. 8 Effect of methionine supplementation on the expression of the toll-like receptor 2 gene, *TLR2*, toll-like receptor 5 gene, *TLR5*, interleukin 1 beta gene, *IL1B*, interleukin 2 gene, *IL2*, interferon gamma gene, *IFNG*, and lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha factor, *LITAF* gene in the jejunum of broiler chickens. Results are expressed as arbitrary units, AU, and are presented as mean and standard error. ^{a,b} Different letters represent significant differences between treatments by the Tukey test, $P < 0.05$. NS = non-supplemented diet; DL-Met = diet supplemented with free methionine; DL-MMet = diet supplemented with methionine dipeptide

No effect of *Eimeria* spp. challenge or methionine supplementation was observed on the expression of the gene *iNOS* (Fig. 9) ($P > 0.05$).

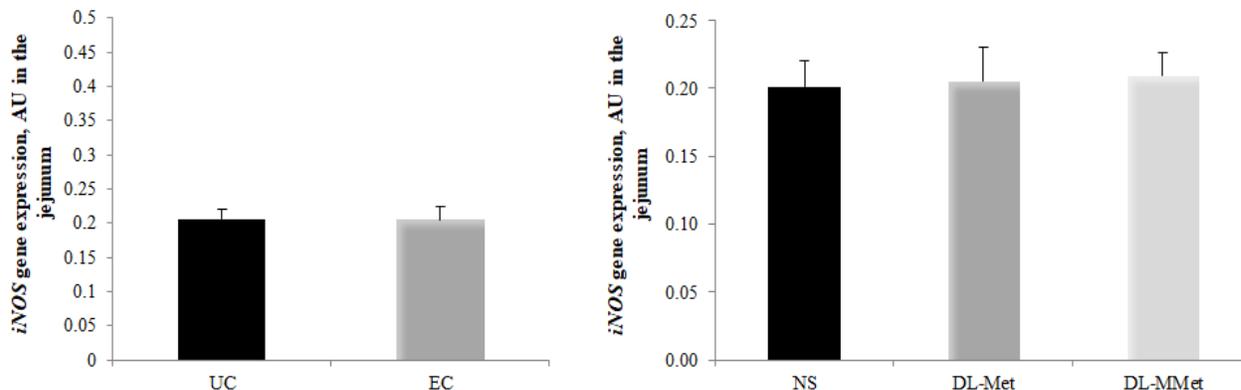


Fig. 9 Effect of *Eimeria* spp. challenge and methionine supplementation on the expression of inducible nitric oxide synthase gene, *iNOS* in the jejunum of broilers 144 h post-inoculation. Results are expressed as arbitrary units, AU, and are presented as mean and standard error. UC = unchallenged broilers; EC = *Eimeria*-challenged broilers. NS = non-supplemented diet; DL-Met = diet supplemented with free methionine; DL-MMet = diet supplemented with methionine dipeptide

Discussion

Previous studies showed that broilers challenged with *Eimeria* spp. have poor performance in part because of structural and functional changes that occur in the intestinal mucosa during the infection [5, 7, 8]. We observed that EC chickens had FI and BWG 13% and 37% lower than UC chickens, respectively. The decreased BWG in EC chickens was followed by an increase of 39% in FCR. The reduced FI in EC chickens might be related, among other factors, to the increase in plasma cholecystokinin secretion, a potent inhibitor of feeding [36]. Low BWG may have been caused by several factors, such as low FI and low expression of the genes *B⁰ATI* and *PEPT1* in the jejunum. *B⁰ATI* encodes the neutral amino acid transporter (B⁰AT1), and *PEPT1* encodes a protein responsible for the uptake of di- and tripeptides. Thus, a reduced expression of *B⁰ATI* and *PEPT1* genes could be associated with decreased absorption of amino acids and decreased protein synthesis.

PepT 1 is highly resilient to changes in the gut caused by intestinal damage [18, 21]. We hypothesized that DL-MMet supplementation could exert a beneficial effect on animal metabolism during *Eimeria* spp. challenge. No interaction effect between *Eimeria* spp. challenge and methionine supplementation on the expression of *PEPT1* was observed. However, there was a significant reduction in *PEPT1* expression in the jejunum of EC broilers compared with that of UC broilers and a higher expression in animals fed the DL-Met and DL-MMet diets than in those fed the NS diet. The lower *PEPT1* expression in EC

birds might be due to lower nutrient intake, as they exhibited lower FI. Chen et al. [37] suggest that end products of protein digestion (small peptides and amino acids) may be involved in *PEPT1* expression pathways. We suggest that methionine stimulates *PEPT1* expression and that, because PepT 1 is a low-affinity, high-capacity transporter, increased expression of these gene could be related to higher nutrient absorption [18]. Furthermore, we found that chickens fed diets with methionine supplementation had higher BWG and better FCR than chickens fed the NS diet. Although studies indicate that, in some species, dipeptides are more readily absorbed, and thus more readily available, than free amino acids [17, 21, 22] in this study we did not observe differences in the BWG of animals fed DL-Met or DL-MMet diets. This result may be related to the bioefficacy of methionine sources. Similar bioefficacy values were observed between chickens fed DL-M and DL-MM diets in a study by Silva et al. [38]. A thorough investigation on the nutritional and metabolic effects of dipeptide methionine supplementation for chickens is needed.

The effects of coccidiosis are not limited to poor animal performance. Several changes in the composition of organs and tissues were observed in animals infected with coccidia [39]. As the weight of lymphoid organs can be used as an indication of the body's ability to deliver lymphoid cells during immune responses [40], we evaluated the relative weight of the bursa of Fabricius and of the spleen. We observed that EC broilers showed lower relative weight of the bursa of Fabricius, as reported in other study [41], and higher relative weight of the spleen and whole intestine, which is also in agreement with the results of previous works [42, 43]. A low relative weight of the bursa of Fabricius can be attributed to organ atrophy caused by lymphocyte depletion or to micronecrosis and cell migration [44]. Increased relative weight of the spleen can represent the body's attempt to meet the requirements of the humoral and cellular immunity [42]. Increased intestine weight might be associated with edema formation, thickening of the mucosa [1], hypertrophy, or mucosal hyperplasia as a result of cell proliferation to replace damaged epithelial cells [45].

During the course of the infection, immunological reactions generate a microenvironment that is incompatible with the survival of pathogens and confer protective immunity against *Eimeria* spp. reinfection [1]. The immune system of a parasitized animal detects and responds rapidly to infection through innate immune receptors [46], such as the transmembrane TLRs, which play an important role in immune responses against *Eimeria*

spp. [47]. TLRs are expressed by most immune cells [48] as well as by intestinal epithelial cells (IECs) and lamina propria cells [49]. Recognition of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) triggers TLR signaling via myeloid differentiation primary response 88 (MyD88) and TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β (TRIF), inducing the expression of IL-12, IFNs, and TNF [50], which are important effector molecules in innate and adaptive immunity against pathogenic microorganisms [50, 51]. EC chickens showed lower *TLR5* expression than UC chickens. This result might be related to the time of sample collection (144 h PI). According to Netea et al. [52], the innate immune system is activated within minutes of invasion by the protozoan and remains active mainly during the first days of infection. On the other hand, chickens fed the NS diet had the lowest *TLR5* expression levels. Zhang et al. [50] suggested that high expression of *TLR5* can be caused by TLR5 recognition of flagellin in the normal intestinal flora of animals. According to Tang et al. [53], methionine influences the intestinal microflora by stimulating the growth of beneficial bacteria. Our results indicate that methionine deficiency negatively affects immune response activation, possibly because it causes changes in the intestinal flora normal of chickens. EC chickens showed lower *IL2* expression than UC chickens. According to Kaiser et al. [54], low IL2 levels can result in slower inflammatory responses in the intestine, allowing invasion of intestinal epithelial cells by *Eimeria* spp. and progression of the parasite life cycle. Our results may also be associated with the higher expression of the interleukin 10 (*IL10*) gene, which is generally observed in *Eimeria*-challenged chickens [51], as IL10 can inhibit the synthesis of cytokines including IL1 β , IL2, and TNF- α [55]. Sand et al. [56] suggested that the potentially inappropriate activation of IL10 is a defense strategy used by *Eimeria* spp. to escape immune detection in the intestinal tract of the host. Interferon gamma plays a critical role in mediating protective immunity against coccidiosis [57]. EC chickens had higher *IFNG* expression than UC chickens, a finding that can be explained by the importance of this cytokine as a mediator of resistance to protozoans, including those of the genus *Eimeria* [51]. Studies demonstrated that interferon gamma levels increase during coccidiosis and that this molecule plays a particular role in the activation of intracellular toxicity via free radical generation and decreasing oocyst production during primary infection with *Eimeria* spp. [57, 58]. However, the inflammatory process in the intestine of a parasitized animal is

accompanied by damages to the intestinal epithelium and tight junctions (TJs). Claudins and occludin are dynamic TJ proteins that function as a selective/semipermeable barrier that facilitates the transport of ions and solutes through the paracellular space while preventing the passage of luminal antigens, microorganisms, and toxins [59]. Chickens with coccidiosis have lower occludin gene expression levels as a consequence of multiple factors, including inflammation [60]. We suggest the low *OCN* expression observed in this study might be due to the immune responses triggered by interferon gamma. Low occludin levels are associated with the disruption of TJs in the jejunum and consequently with the passive loss of solutes and the osmotically driven flow of water into the intestine, resulting in diarrhea, one of the main signs of intestinal inflammation [60].

Interferon gamma also affects the intracellular replication of *Eimeria* spp. [57] because it is a potent activator of inducible nitric oxide synthase (iNOS), an enzyme responsible for the production of nitric oxide (NO), which in turn has been proposed to be the effector molecule against *Eimeria* spp. [61]. NO is a highly reactive free radical synthesized from L-arginine by nitric oxide synthases (NOS) [62, 63]. This free radical performs a variety of biological functions [64] and acts as a cytotoxic agent against tumor cells, bacteria, viruses, and parasites [63]. Because of its oxidizing effect and ability to react with intracellular compounds, NO is generated in large quantities during immunological reactions [65].

In this study, we quantified the nitrite content in the jejunum of EC and UC chickens and evaluated both *iNOS* and *CAT - 1* expression. The *CAT - 1* gene codes for CAT-1, a protein involved in the absorption of arginine, which is the substrate for NO synthesis. *Eimeria* spp. infection had no effect on *iNOS* expression but increased *CAT - 1* expression and nitrite content. The lack of significant results for *iNOS* expression can be due to the time of sampling (144 hours PI). Once expressed, *iNOS* produces high levels of NO for periods that can last from hours to days [62]. Overall, these results suggest that a highly complex and integrated intestinal defense mechanism is activated in an attempt to fight the coccidial infection via increased expression of *IFNG* and *CAT-1* and, consequently, enhanced production of NO_2^- , which is toxic for coccidians [61].

Studies evidenced the occurrence of oxidative stress in chickens challenged with *Eimeria* spp (2, 9, 10). Oxidative imbalance in chickens with coccidiosis is caused by reduced antioxidant enzyme activity; reduced levels of non-enzymatic antioxidants, such as

carotenoids, vitamin C, and vitamin E; increased lipid peroxidation; and increased NO_2^- and nitrate (NO_3^-) levels [2, 9-11]. In the present study, we found that EC chickens 144 h PI had higher TBARS and nitrite contents in the jejunum than UC chickens. These alterations may be due to the effects of NO and oxygen-derived radicals, which produce other toxic substances, such as the potent oxidizing agent peroxynitrite [66], and result in lipid peroxidation. Oxidative stress also causes damage to others biological molecules. Proteins are possibly the most immediate vehicle for inflicting oxidative damage on cells because they usually act as catalysts rather than as stoichiometric mediators [67]. Reactions between proteins and free radicals can lead to the formation of protein derivatives or peptide fragments that possess highly reactive carbonyl groups. In fact, the accumulation of carbonylated proteins has been observed in several diseases, including intestinal diseases [68, 69]. EC chickens fed the NS diet showed high carbonylated protein content, indicating that peroxynitrite formation might have occurred during the infection, causing severe oxidative damage to proteins. Moreover, this result shows that methionine deficiency enhances oxidative stress in the jejunum and is evidence of the importance of the amino acid for broiler health. Methionine residues have been shown to be potent endogenous antioxidants that regulate the activity of biological proteins [15]. In addition to the direct antioxidant effect of methionine residues in proteins, the organism has a highly sophisticated enzyme system that minimizes the deleterious effects of oxidation. SOD and CAT are examples of important antioxidant enzymes.

In our study, the lowest expression levels of *SOD1* and *CAT* were observed in EC chickens. EC broilers fed the NS diet had lower *CAT* activity but higher *SOD* activity than EC broilers fed the DL-Met or DL-MMet diets. The reduction in *CAT* expression and consequently in *CAT* activity might have been caused by NO production and as a result of cellular damage in the jejunum [70, 71], which allows us to infer that the formation of toxic substances during the coccidial infection exceeded the antioxidant capacity of the defense system. This condition might have been further aggravated by methionine deficiency and by the fact that NO can inhibit the enzyme glutathione peroxidase [72]. On the other hand, higher *SOD* activity seems to be useful to combat the excess free radicals produced during the infection, resulting in a lower expression of the *SOD1* gene. Another possible explanation for the high *SOD* activity observed is the existence of cellular compensatory

responses to the deficiency of methionine and other non-enzymatic antioxidants observed during the infection [11, 73]. Therefore, methionine deficiency and the inactivation of CAT can at least partially explain the lipid and protein oxidation observed in the jejunum of EC broilers fed the NS diet. Another interesting result of this study is that chickens fed the DL-Met and DL-MMet diets had lower nitrite content, which may be associated with the ability of methionine to react with RNS, thereby preventing cellular oxidation. This result highlights the importance of methionine, both as free amino acid and dipeptide, for the maintenance of intestinal epithelium. Furthermore, we observed that EC chickens fed the DL-MMet diet exhibited higher TAC, as did UC chickens fed the DL-Met and DL-MMet diets. These unprecedented results indicate that methionine dipeptide supplementation might play a key role in protecting the intestinal environment against oxidative stress in broilers challenged with *Eimeria* spp.

Conclusions

We concluded that the poor performance observed in chickens challenged with *Eimeria* spp. probably occurred as a consequence of inflammatory responses and oxidative stress in the jejunum, which in turn might have affected intestinal epithelial integrity. The main effect of methionine supplementation was on antioxidant metabolism. Our results showed for the first time that free methionine and methionine dipeptide supplementation is able to protect the enterocytes of broilers under *Eimeria* challenge from the oxidative damage induced by free radicals.

Abbreviations

ACTB: beta actin gene; ANOVA: Analysis of variance; BWG: Body weight gain; *B⁰AT1*: Neutral amino acid transporter gene; *CAT*: Catalase gene; CAT: Catalase; *CAT - 1*: Cationic amino acid transporter 1 gene; cDNA: Complementary DNA; *CLDN1*: Claudin-1 gene; CP: Carbonylated protein; DL-Met: free DL-methionine; DL-MMet: DL-methionyl-DL-methionine; DNA: Deoxyribonucleic acid; DNPH: 2,4-dinitrophenylhydrazine; DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; EC: *Eimeria*-challenged; EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid; FCR: feed conversion ratio; FI: Feed intake; HCl: Hydrochloric acid; H₂O₂: Hydrogen peroxide; *IL1B*: interleukin 1 beta gene; *IL2*: Interleukin 2 gene; IL-10: Interleukin 10;

IFNG: Interferon gamma gene; *iNOS*: Inducible nitric oxide synthase gene; *LITAF*: Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor (TNF)-alpha factor gene; MHA: Methionine hydroxy analog; MyD88: Myeloid differentiation primary response 88; NS: Non-supplemented; NaNO₂: Sodium nitrite; ng: Nanogram; NCBI: National Center for Biotechnology Information; nm: Nanometer; nmol: Nanomol; NED: *N*-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride; NO: nitric oxide; NOS: Nitric oxide synthases; NO₂⁻: Nitrite; NO₃⁻: nitrate; *OCLN*: Occludin; O₂^{-•}: Superoxide anion; *PEPT1*: Peptide transporter 1 gene; PI: Post-inoculation; PAMP: Pathogen-associated molecular patterns; RNA: Ribonucleic Acid; RNS: Reactive nitrogen species; ROS: Reactive oxygen species; RT-qPCR: Reverse transcription polymerase chain reaction quantitative real time; SOD: Superoxide dismutase; *SOD1*: Superoxide dismutase 1 gene; spp: Species; TAC: Total antioxidant capacity; TBARS: Thiobarbituric acid reactive substances; TJ: Tight junctions; TLR: Toll-like receptor; *TLR2*: Toll-like receptor 2 gene; *TLR5*: Toll-like receptor 5 gene; TNF: Tumor necrosis factor; TRIF: TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β; U: unit; UC: unchallenged; y⁺*LAT-1*: Neutral and cationic amino acid transporter gene;

Declarations

Ethics approval and consent to participate

This study was approved by the animal experiment was approved by the Ethics Committee on Animal Use (n° 4000170615) of the State University of Maringá (Maringá, Paraná, Brazil).

Availability of data and materials

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Consent for publication

Not applicable

Competing interest

The authors declare no conflict of interest.

Funding

This research was funded by the National Council of Technological and Scientific Development (CNPq), Brazil (Project n° 445322/2014-4).

Authors' contributions

EG conceived and designed the experiment. EG, ASK, APDV, ARON and RPMF performed the research. ASK, ARON, and EG conducted the experiment. ASK, APDV, ARON and EG collected the samples and data. ASK, APDV and RPMF carried out the biochemical and molecular. EG and ASK performed the statistical analysis. ASK, APDV and EG wrote the manuscript. All authors performed experiments, read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Department of Animal Science and the Postgraduate Program in Animal Science of the Maringá State University for technical support.

References

1. Lillehoj HS, Trout JM. Avian gut-associated lymphoid tissues and intestinal immune responses to *Eimeria* parasites. *Clin Microbiol Rev.* 1996;9:349-60.
2. Bun SD, Guo YM, Guo FC, Ji FJ, Cao H. Influence of organic zinc supplementation on the antioxidant status and immune responses of broilers challenged with *Eimeria tenella*. *Poult Sci.* 2011;90:1220-6.
3. Major JRJr, Ruff MD. Disaccharidase activity in the intestinal tissue of broilers infected with coccidia. *J Parasitol.* 1978;64:706-11.
4. Adams C, Vahl HA, Veldman A. Interaction between nutrition and *Eimeria acervulina* infection in broiler chickens: development of an experimental infection model. *Br J Nutr.* 1996;75:867-73.
5. Su S, Miska KB, Fetterer RH, Jenkins MC, Wong EA. Expression of digestive enzymes and nutrient transporters in *Eimeria*-challenged broilers. *Exp Parasitol.* 2015;150:13-21.
6. Morris BC, Danforth HD, Caldwell DJ, Pierson FW, McElroy AP. Intestinal mucosal mast cell immune response and pathogenesis of two *Eimeria acervulina* isolates in broiler chickens. *Poult Sci.* 2004;83:1667-74.
7. Gottardo ET, Prokoski K, Horn D, Viott AD, Santos TC, Fernandes JJ. Regeneration of the intestinal mucosa in *Eimeria* and *E. Coli* challenged broilers supplemented with amino acids. *Poult Sci.* 2016;95:1056-65.

8. Miska KB, Fetterer RH. The effect of *Eimeria maxima* infection on the expression of amino acid and sugar transporters aminopeptidase, as well as the di- and tri-peptide transporter PepT1, is not solely due to decreased feed intake. *Poultry Sci.* 2018;97:1712-21.
9. Allen PC. Production of free radical species during *Eimeria maxima* infections in chickens. *Poult Sci.* 1997;76:814-21.
10. Georgieva NV, Koinarski V, Gadjeva V. Antioxidant status during the course of *Eimeria tenella* infection in broiler chickens. *Vet J.* 2006;172:488-92.
11. Allen PC, Fetterer RH. Interaction of dietary vitamin E with *Eimeria maxima* infections in chickens. *Poult Sci.* 2002;8:41-8.
12. Lillehoj HS, Min W, Dalloul RA. Recent progress on the cytokine regulation of intestinal immune responses to *Eimeria*. *Poult Sci.* 2004;83:611-23.
13. Quiroz-Castañeda RE, Dantán-González E. Control of avian coccidiosis: future and present natural alternatives. *Biomed Res Int.* 2015;2015:1-11.
14. Swain BK, Johri TS. Effect of supplemental methionine, choline and their combinations on the performance and immune response of broilers. *Br Poult Sci.* 2000;41:83-8.
15. Levine RL, Mosoni L, Berlett BS, Stadtman ER. Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:15036-40.
16. Mamauag REP, Gao J, Nguyen BT, Ragaza JA. Supplementations of DL-methionine and methionine dipeptide in diets are effective for the development and growth of larvae and juvenile Red Sea Bream, *Pagrus major*. *J World Aquac Soc.* 2012;43:362-74.
17. Chen Q, Dai W, Sun Y, Zhao F, Liu J, Liu H. Methionine partially replaced by methionyl-methionine dipeptide improves reproductive performance over methionine alone in methionine-deficient mice. *Nutrients.* 2018;10:1-14.
18. Gilbert ER, Wong EA, Webb KEJr. Board-invited review: peptide absorption and utilization: Implications for animal nutrition and health. *J Anim Sci.* 2008;86:2135-55.
19. Dabrowski K, Lee KJ, Rinchard J. The smallest vertebrate, teleost fish, can utilize synthetic dipeptide-based diets. *J Nutri.* 2003;133:4225-9
20. Daniel H. Molecular and integrative physiology of intestinal peptide transport. *Annu Rev Physiol.* 2004;66:361-84.
21. Matthews DM, Adibi SA. Peptide absorption. *Gastroenterology.* 1976;71:151-61.

22. Barbot L, Windsor E, Rome S, Tricottet V, Reynès M, Topouchian A, Huneau JF, Gobert JG, Tomé D, Kapel N. Intestinal peptide transporter PepT1 is over-expressed during acute cryptosporidiosis in suckling rats as a result of both malnutrition and experimental parasite infection. *Parasitol Res.* 2003;89:364-70.
23. Del Vesco AP, Gasparino E, Grieser DO, Zancanela V, Soares MA, Neto ARO. Effects of methionine supplementation on the expression of oxidative stress-related genes in acute heat stress-exposed broilers. *Br J Nutr.* 2015;113:549-59.
24. Gasparino E, Del Vesco AP, Khatlab AS, Zancanela V, Grieser DO, Silva SCC. Effects of methionine hydroxy analogue supplementation on the expression of antioxidant-related genes of acute heat stress-exposed broilers. *Animal.* 2018;12:931-9.
25. Rostagno HS, Albino LFT, Donzele JL, Gomes PC, Oliveira RF, Lopes DC, Ferreira AS, Barreto SLT, Euclides RF. Brazilian tables for poultry and swine: composition of feedstuffs and nutritional requirements, 3rd ed. Viçosa: UFV; 2011.
26. Gordon H, Whitlock AV. A new technique for counting nematode eggs in sheep feces. *Journal Council Scientific Industry Research.* 1939;12:50-2.
27. Aebi H. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol.* 1984;105:121-6.
28. Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem.* 1974;47:469-74.
29. Watanabe N, Miura S, Zeki S, Ishii H. Hepatocellular oxidative DNA injury induced by macrophage-derived nitric oxide. *Free Radic Biol Med.* 2001;30:1019-28.
30. Griess P. Comments on the treatise of the HH. Weselsky and Benedikt "About some azo compounds" *Ber German Chem Ges.* 1879;12:426-8.
31. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978;52:302-10.
32. Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymol.* 1994;233:346-57.
33. Brand-Wiliams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci Technol.* 1995;28:25-30.
34. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analy Biochem.* 1976;72:248-54.

35. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*. 2001;25:402-8.
36. McDermott JR, Leslie FC, D'Amato M, Thompson DG, Grecis RK, McLaughlin JT. 2006. Immune control of food intake: enteroendocrine cells are regulated by CD4⁺ T lymphocytes during small intestinal inflammation. *Gut*. 2006;55:492-7.
37. Chen H, Pan Y, Wong EA, Webb KE Jr. Dietary protein level and stage of development affect expression of an intestinal peptide transporter (cPepT1) in chickens. *J Nutr*. 2005;135:193-8.
38. Silva V, Mencialha R, Arruda N, Alcebíades S, Bertechini A. Bioefficacy of different sources of methionine relative to DL-methionine in starter phase (1 to 21 days) of broilers chickens. *Poult. Sci.* 2016;95:144. (Abstr.).
39. Fetterer RH, Allen PC. *Eimeria tenella* infection in chickens: effect on plasma and muscle 3-methylhistidine. *Poult Sci*. 2001;80:1549-53.
40. Heckert RA1, Estevez I, Russek-Cohen E, Pettit-Riley R. Effects of density and perch availability on the immune status of broilers. *Poult Sci*. 2002;81:451-7.
41. Akhtar M, Awais MM, Anwar MI, Ehtisham-ul-Haque S, Nasir A, Saleemi MK, Ashraf K. The effect of infection with mixed *Eimeria* species on hematology and immune responses following Newcastle disease and infectious bursal disease booster vaccination in broilers. *Vet Q*. 2015;35:21-6.
42. Panda B, Combs GF. Effect of coccidiosis on different glands of the growing chick. *Avian Dis*. 1964;8:7-12.
43. Bozkurt M, Aysul N, Küçükyılmaz K, Aypak S, Ege G, Catli AU, Aksit H, Cöven F, Seyrek K, Cinar M. Efficacy of in-feed preparations of an anticoccidial, multienzyme, prebiotic, probiotic, and herbal essential oil mixture in healthy and *Eimeria spp.*-infected broilers. *Poult Sci*. 2014;93:389-99.
44. Nakamura K, Imada Y, Maeda M. Lymphocytic depletion of bursa of Fabricius and thymus in chickens inoculated with *Escherichia coli*. *Vet Pathol*. 1986;23:712-7.
45. Sun L, Dong H, Zhang Z, Liu J, Hu Y, Ni Y, Grossmann R, Zhao R. Activation of epithelial proliferation induced by *Eimeria acervulina* infection in the duodenum may be associated with cholesterol metabolism. *Oncotarget*. 2016;7:27627-40.

46. Gazzinelli RT, Denkers EY. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. *Nat Rev Immunol.* 2006;6:895-906.
47. Zhou Z-y, Hu S-j, Wang Z-y, Guo Z-l, Qin B, Nie K. Expression of chicken toll-like receptors and signal adaptors in spleen and cecum of young chickens infected with *Eimeria tenella*. *J Integr Agric.* 2014;13:904-10.
48. Iqbal M, Philbin VJ, Smith AL. Expression patterns of chicken Toll-like receptor mRNA in tissues, immune cell subsets and cell lines. *Vet Immunol Immunopathol.* 2005;104:117-27.
49. Feng T, Cong Y, Alexander K, Elson CO. Regulation of Toll-like Receptor 5 Gene Expression and Function on Mucosal Dendritic Cells. *PLoS One.* 2012;7:e35918.
50. Zhang L, Liu R, Ma L, Wang Y, Pan B, Cai J, Wang M. *Eimeria tenella*: expression profiling of toll-like receptors and associated cytokines in the cecum of infected day-old and three-week old SPF chickens. *Exp Parasitol.* 2012;130:442-8.
51. Hong YH, Lillehoj HS, Lee SH, Dalloul RA, Lillehoj EP. Analysis of chicken cytokine and chemokine gene expression following *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella* infections. *Vet Immunol Immunopathol.* 2006;114:209-23.
52. Netea MG, van der Graaf C, Van der Meer JW, Kullberg BJ. Toll-like receptors and the host defense against microbial pathogens: bringing specificity to the innate-immune system. *J Leukoc Biol.* 2004;75:749-55.
53. Tang L, Wang G.-X, Jiang J, Feng L, Yang L, Li S.-H, Kuang S.-Y, Zhou X.-Q. Effect of methionine on intestinal enzymes activities, microflora and humoral immune of juvenile Jian carp (*cyprinus carpio* var. Jian). *Aquac Nutr.* 2009;15:477-83.
54. Kaiser P, Rothwell L, Galyov EE, Barrow PA, Burnside J, Wigley P. Differential cytokine expression in avian cells in response to invasion by *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* and *Salmonella gallinarum*. *Microbiology.* 2000;146:3217-26.
55. Arendt MK, Sand JM, Marcone TM, Cook ME. Interleukin-10 neutralizing antibody for detection of intestinal luminal levels and as a dietary additive in *Eimeria* challenged broiler chicks. *Poult Sci.* 2016;95:430-8.
56. Sand JM, Arendt, MK, Repasy A, Deniz, G, Cook ME. Oral antibody to interleukin-10 reduces growth rate depression due to *Eimeria* spp. infection in broiler chickens. *Poult Sci.* 2016;95:439-46.

57. Lillehoj HS, Choi KD. Recombinant chicken interferon-gamma-mediated inhibition of *Eimeria tenella* development in vitro and reduction of oocyst production and body weight loss following *Eimeria acervulina* challenge infection. *Avian Dis.* 1998;42:307-14.
58. Dkhil M, Abdel-Baki AA, Delić D, Wunderlich F, Sies H, Al-Quraishy S. *Eimeria papillata*: upregulation of specific miRNA-species in the mouse jejunum. *Exp Parasitol.* 2011;127:581-6.
59. Groschwitz KR, Hogan SP. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;124:3-20.
60. John LJ, Fromm M, Schulzke JD. Epithelial Barriers in Intestinal Inflammation. *Antioxid Redox Signal.* 2011;15:1255-70.
61. Ovington KS, Smith NC. Cytokines, free radicals and resistance to *Eimeria*. *Parasitol Today.* 1992;8:422-6.
62. Kröncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clin Exp Immunol.* 1998;113:147-56.
63. MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:323-50.
64. Bredt DS. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free Radic Res.* 1999;31:577-96.
65. James SL. Role of nitric oxide in parasitic infections. *Microbiol Rev.* 1995;59:533-47.
66. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87:1620-4.
67. Galicia-Moreno M, Rosique-Oramas D, Medina-Avila Z, Álvarez-Torres T, Falcón D, Higuera-de la Tijera F, Béjar YL, Cordero-Pérez P, Muñoz-Espinosa L, Pérez-Hernández JL, David Kershenobich D, Gutierrez-Reyes G. Behavior of oxidative stress markers in alcoholic liver cirrhosis patients. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:1-10.
68. Keshavarzian A, Banan A, Farhadi A, Komanduri S, Mutlu E, Zhang Y, Fields JZ. Increases in free radicals and cytoskeletal protein oxidation and nitration in the colon of patients with inflammatory bowel disease. *Gut.* 2003;52:720-8.
69. Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids.* 2003;25:207-18.

70. Brown GC. Reversible binding and inhibition of catalase by nitric oxide. *Eur J Biochem.* 1995;232:188-91.
71. Çam Y, Atasever A, Eraslan G, Kibar M, Atalay O, Beyaz L, Inci A, Liman BC. *Eimeria stiedae*: experimental infection in rabbits and the effect of treatment with toltrazuril and ivermectin. *Exp Parasitol.* 2008;119:164-72.
72. Asahi M, Fujii J, Suzuki K, Seo HG, Kuzuya T, Hori M, Tada M, Fujii S, Taniguchi N. Inactivation of glutathione peroxidase by nitric oxide. Implication for cytotoxicity. *J Biol Chem.* 1995;270:21035-9.
73. Ruff MD, Witlock DR, Smith RR. *Eimeria acervulina* and *E. tenella*: effect on methionine absorption by the avian intestine. *Exp Parasitol.* 1976;39:244-51.

V. SUPLEMENTAÇÃO DE DIPEPTÍDEO DE METIONINA MELHORA A SAÚDE INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE DESAFIADOS POR *EIMERIA* SPP.

(Journal of Animal Science)

RESUMO: A coccidiose é uma enfermidade que afeta o intestino delgado e grosso das aves, produzindo consideráveis perdas na avicultura mundial. Dietas com nutrientes essenciais e suplementadas em níveis adequados são fundamentais, para aliviar os efeitos negativos produzidos por esses agentes patogênicos. Neste trabalho, foram utilizadas aves desafiadas (EC) ou não (UC) com *Eimeria* spp., e suplementadas com duas fontes de metionina: forma livre (DL-Met) e dipeptídeo de metionina (DL-MMet), e a dieta controle não suplementada com metionina (NS). O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x3, com oito repetições. As aves foram infectadas com oocistos esporulados de um mix de *Eimeria* (*E. acervulina*, *E. maxima*, *E. praecox* e *E. mitis*) aos 14 dias de idade. Seis dias depois da inoculação (6 dpi), foram realizadas as análises de desempenho, análises histológicas em microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura e transmissão do jejuno, expressão de genes relacionados à saúde intestinal (apoptose e proliferação celular) no jejuno, análises plasmáticas e sorológicas. Foi observado que os animais desafiados por *Eimeria* spp. apresentaram pior desempenho, independentemente da dieta consumida. Com relação à suplementação de metionina, os animais recebendo a dieta DL-Met apresentaram maior ganho de peso e menor conversão alimentar. Os animais do grupo EC recebendo dieta NS, apresentaram vilos mais baixos e mais largos, com maior valor de profundidade de cripta, menor relação vilo:cripta, menor área de superfície de absorção do jejuno, menor quantidade de células caliciformes neutras e menor expressão do gene mucina 2 (*MUC2*). Os animais desafiados que consumiram a dieta DL-MMet apresentaram maior altura dos enterócitos. Os animais desafiados por *Eimeria* spp. apresentaram maior largura da lâmina própria que os animais UC. Houve efeito da dieta sobre a largura da lâmina própria: animais recebendo a dieta DL-MMet apresentaram menor valor de largura da lâmina própria. Animais não desafiados que consumiram a dieta DL-Met apresentaram maior quantidade de células caliciformes ácidas, e os animais desafiados recebendo a dieta DL-MMet apresentaram a maior quantidade de linfócitos intraepiteliais (LIEs). Menor

expressão dos genes caspase 3 (*CASP3*), linfoma de células B2 (*BCL2*), alvo mecanicista da rapamicina (*MTOR*) e proteína ribossomal quinase B1 (*RPS6KB1*), foi observado nos animais EC. Também foi observado que a dieta influenciou a expressão do gene *MTOR*, sendo que a maior expressão desse gene foi observada nos animais que consumiram a dieta DL-MMet. A atividade das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e creatina quinase (CK), também foi influenciada pela presença do patógeno e pela dieta, com maiores valores em animais EC e NS. Nos animais EC, observamos menor conteúdo de ácido úrico no plasma e maior produção de mucoprotéínas no soro. O menor conteúdo de proteínas totais séricas foi observado nas aves EC recebendo a dieta DL-MMet, semelhante aos animais UC independentemente da dieta recebida. Em conclusão, os resultados demonstraram que os animais desafiados por *Eimeria* spp. apresentaram danos e alterações na mucosa intestinal, e que a suplementação de metionina na forma de dipeptídeo foi capaz de atenuar os efeitos nocivos do patógeno sobre a mucosa intestinal.

Palavras-chave: apoptose, coccidiose, jejuno, linfócitos intraepiteliais

ABSTRACT: Coccidiosis is a disease that affects the small and large intestines of birds, producing considerable losses in poultry farming worldwide. Balanced diets are important to alleviating the negative effects caused this disease. In this work unchallenged birds (UC) and birds challenged (EC) with *Eimeria* spp. and receiving diets supplemented with two sources of methionine: free form (DL-Met) and methionine dipeptide (DL-MMet), and the control diet not supplemented with methionine (NS) were used. The experiment was conducted in a completely randomized design in a 2x3 factorial scheme, with eight replicates. The birds were infected with sporulated oocysts from a mix of *Eimeria* (*E. acervulina*, *E. maxima*, *E. praecox* and *E. mitis*) at 14 days of age, and six days post inoculation (6 dpi) were performed the analyzes of performance, histological analysis of jejunum by light microscopy, scanning electron microscopy and transmission of jejunum, expression of genes related to intestinal health (apoptosis and cell proliferation) in the jejunum, plasma and serum analysis. It was observed that the animals challenged by *Eimeria* spp. presented worse performance independently of the diet consumed. With regard to methionine supplementation, the animals receiving the DL-Met diet presented higher weight gain and lower feed conversion ratio. EC group chickens receiving NS diet had lower and wider villi, with a higher crypt depth value, lower villus: crypt ratio, smallest surface area of jejunum absorption, smaller amount of neutral goblet cells and less expression of the mucin 2 gene (*MUC2*). EC animals fed DL-MMet diet showed higher height of the enterocytes. The animals challenged by *Eimeria* spp. presented greater lamina propria width than the UC animals. There was diet effect on the width of the lamina propria: animals consuming the diet DL-MMet had the lowest lamina propria width. UC animals fed DL-Met diet presented higher numbers of acidic goblet cells. EC chickens fed DL-MMet diet had the highest amount of intraepithelial lymphocytes (LIEs). Reduced expression of caspase 3 (*CASP3*), B2-cell lymphoma (*BCL2*), mechanistic target of rapamycin (*MTOR*) and ribosomal protein kinase B1 (*RPS6KB1*) genes was observed in EC animals. It was also observed that the diet influenced the expression of the *MTOR* gene, the highest expression of this gene was observed in the animals fed DL-MMet diet. There were challenge and diet effects on the activity of aspartate aminotransferase (AST) and creatine kinase (CK) enzymes, higher activity was observed in EC animals and in animals fed NS diet. EC animals had lower uric acid content and higher production of mucoproteins. The

lowest total serum protein content was observed in EC birds fed DL-MMet diet, similar to UC animals regardless of the diet received. In conclusion, the results showed that animal challenged by *Eimeria* spp. presented damage and alterations in the intestinal mucosa, and that the methionine supplementation in the dipeptide form was able to attenuate the harmful effects of the pathogen on the intestinal mucosa.

Key words: apoptosis, coccidiosis, intraepithelial lymphocytes, jejunum

INTRODUÇÃO

O intestino é um órgão altamente dinâmico, formado por vários tipos de células epiteliais que desempenham muitas funções, entre elas, a digestão dos alimentos e absorção de nutrientes, além de formarem uma barreira física e química que protege a mucosa intestinal (Okumura e Takeda, 2017). Em conjunto, as células que compõem o intestino são responsáveis por garantir a homeostase e saúde intestinal, atuando na prevenção de possíveis danos causados por microrganismos comensais e invasores (Okumura e Takeda, 2017). Diversas classes de patógenos são reconhecidas por atuar no ambiente intestinal das aves, causando redução na eficiência alimentar e alterações nas atividades do sistema imune local e sistêmico, além de tornar os animais mais susceptíveis aos demais estressores abióticos e bióticos (Fasina et al., 2008; Park et al., 2008; Belote et al., 2018). Entre esses patógenos, estão as *Eimeria* spp. que causam a coccidiose, que é considerada como uma doença de difícil controle e que causa grandes perdas econômicas na produção de aves todos os anos (Peek e Landman, 2011).

Alterações hematológicas, bioquímicas e na expressão de genes envolvidos com a produção de muco, apoptose, proliferação e migração celular, têm sido observadas em animais de diferentes espécies com coccidiose e outras infecções intestinais (Gomez-Bautista et al., 1986; Koynarski et al., 2007; Rath et al., 2009; Adamu et al., 2013; Kitessa et al., 2014; Tan et al., 2014; Chen et al., 2015; Melkamu et al., 2018). Também são observadas alterações histológicas na morfologia intestinal, que têm sido relacionadas com o processo de apoptose, que remove células danificadas ou indesejadas, funcionando como um mecanismo de defesa do hospedeiro contra agentes patogênicos durante a infecção (Idris et al., 1997; Sakamoto et al., 2014; Tan et al., 2014).

As respostas do animal a infecção e a injúria tecidual exigem grandes demandas do metabolismo dos aminoácidos (Grimble e Grimble, 1998). Dessa forma, o suporte nutricional na forma de proteínas e aminoácidos, pode alterar a disponibilidade de substratos para a síntese de proteínas e peptídeos fundamentais no processo inflamatório (Grimble e Grimble, 1998), contribuindo para a manutenção da saúde intestinal. Estudos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa vêm demonstrando que a suplementação de metionina contribui para o desempenho de frangos de corte sob condições ambientais adversas, devido as suas propriedades antioxidantes (Del Vesco et al., 2014; Del Vesco et

al., 2015a,b). A metionina pode contribuir para a saúde intestinal, bem como para a função imune, protegendo o intestino contra danos celulares ao atenuar a inflamação, o estresse oxidativo e por influenciar a permeabilidade intestinal (Grimble, 2006; Bauchart-Thevret et al., 2009; Ruth e Field, 2013; Bin et al., 2017; Seyyedin e Nazem, 2017).

Estudos têm demonstrado que a suplementação de aminoácidos na forma de dipeptídeos poderia ser vantajosa em condições específicas, como nos casos de doenças intestinais que causam a redução absorptiva pelos enterócitos (Silk et al., 1974; Matthews e Adibi, 1976). Nesses casos, a administração de dipeptídeos poderia atuar como fator de prevenção à desnutrição proteica, já que peptídeos podem ser absorvidos de maneira mais eficiente que os aminoácidos livres (Matthews e Adibi, 1976; Barbot et al., 2003). E isso pode estar relacionado ao sistema de absorção mediado pelo transportador de peptídeos 1 (PepT1), uma vez que o PepT1 apresenta maior resiliência no intestino, mantendo a expressão e níveis de atividade mesmo sob condição de dano intestinal (Barbot et al., 2003; Gilbert et al., 2008).

Apesar do dipeptídeo de metionina já estar sendo utilizado em dietas para organismos aquáticos (Mamaug et al., 2012; Nunes et al., 2018), ainda são escassas as informações sobre os efeitos desse dipeptídeo sobre os mecanismos fisiológicos, histológicos e moleculares em frangos de corte. Desta forma, este trabalho foi realizado para testar a hipótese de que a suplementação de metionina, tanto na forma livre ou de dipeptídeo, poderia aliviar os danos observados no ambiente intestinal de frangos de corte desafiados por *Eimeria* spp. Para testar esta hipótese, foi avaliado o desempenho animal, a morfometria do jejuno como um indicador da integridade da mucosa jejunal, a expressão de genes relacionados à produção de mucina, ao processo de apoptose, proliferação celular no jejuno, e alguns parâmetros sanguíneos em frangos de corte, seis dias depois da inoculação (6 dpi).

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado de acordo com as diretrizes do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA – nº 4000170615) da Universidade Estadual de Maringá, Brasil.

Animais e desenho experimental

Um total de 384 frangos de corte machos (Cobb 500) de um dia de idade, isentos de vacina anti coccidiana, foram utilizados para a realização deste estudo. Os animais foram alojados em gaiolas suspensas (1 m²) com bandeja coletora de fezes, em ambiente climatizado com 24 horas de iluminação artificial e temperatura inicial de 33°C. A temperatura ambiente foi gradualmente reduzida de acordo com a idade das aves, seguindo as recomendações da linhagem Cobb 500. Todos os animais foram criados de maneira convencional até os dez dias de idade. Nesse momento, os animais foram pesados após um período de jejum de seis horas, e em seguida, foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x3, com oito repetições, e oito aves por tratamento. O primeiro fator foi relacionado ao desafio sanitário por *Eimeria* spp.: desafio por *Eimeria* spp. = EC; e sem desafio = UC, e o segundo fator, relacionado às dietas: dieta sem suplementação de metionina = NS; com suplementação de metionina na forma de aminoácido livre, DL-Metionina 99% = DL-Met; e com suplementação do dipeptídeo de metionina, DL-Metionil-DL-Metionina 95% = DL-MMet. As rações utilizadas foram feitas com milho e farelo de soja, sendo formuladas de acordo com Rostagno et al. (2011). Aos 14 dias de idade, o grupo experimental EC foi inoculado por via oral com 1 mL de solução contendo oocistos esporulados de *Eimeria* spp. (2×10^4 *E. acervulina*, 2×10^4 *E. praecox*, $1,6 \times 10^4$ *E. maxima* e 4×10^4 *E. mitis*); o outro grupo (grupo experimental UC), recebeu por via oral 1 mL de solução salina. Os animais pertencentes ao tratamento EC e UC foram alojados separadamente para evitar infecção cruzada.

Todas as aves foram mortas por deslocamento cervical seis dias depois da inoculação (6 dpi) aos 20 dias de idade. Durante todo o período experimental, os animais tiveram livre acesso à água e à ração. Nenhum anticoccidiano foi adicionado às rações. A composição das dietas experimentais está apresentada na Tabela 1, e a composição nutricional analisada e calculada está apresentada na Tabela 2.

Tabela 1. Composição das rações experimentais

Ingredientes (kg)	10 – 20 dias ¹		
	NS ²	DL-Met	DL-MMet
Milho, 7,8%	54,89	54,89	54,89
Farelo de soja, 46%	37,30	37,30	37,30
Óleo de soja	3,80	3,80	3,80
<i>L</i> -Lisina HCl, 78%	0,16	0,16	0,16
<i>L</i> -Treonina, 98,5%	0,04	0,04	0,04
<i>DL</i> -Metionil- <i>DL</i> -Metionina, 95%, dipeptídeo	-	-	0,29
<i>DL</i> -Metionina, 99%	-	0,28	-
Fosfato bicálcico, 20%	1,53	1,53	1,53
Calcário calcítico, 38%	1,16	1,16	1,16
Sal	0,45	0,45	0,45
Premix vitamínico–mineral ³	0,40	0,40	0,40
Inerte	0,30	0,02	0,01
Total	100,00	100,00	100,00

¹As rações experimentais foram fornecidas aos animais dos 10 aos 20 dias de idade.

²NS = ração não suplementada com metionina; DL-Met = ração suplementada com o nível recomendado de metionina na forma de aminoácido livre (*DL*-Metionina 99%); DL-MMet = ração suplementada com dipeptídeo de metionina (*DL*-Metionil-*DL*-Metionina 95%).

³As dietas forneceram os seguintes componentes (por kg): acetato de retinil, 3,44 mg; colecalciferol, 50 µg; *DL*- α -tocoferol, 15 mg; tiamina, 1,63 mg; riboflavina, 4,9 mg; piridoxina, 3,26 mg; cianocobalamina, 12 µg; *D*-ácido pantotênico, 9,8 mg; *D*-biotina, 0,1 mg; menadiona, 2,4 mg; ácido fólico, 0,82 mg; niacinamida, 35 mg; selênio, 0,2 mg; ferro, 35 mg; cobre, 8 mg; manganês, 60 mg; zinco, 50 mg; iodo, 1 mg; e hidroxitolueno butilado, 80 mg.

Tabela 2. Composição nutricional analisada e calculada (g/kg), das rações experimentais

Nutrientes	10 – 20 dias ¹		
	NS ²	DL-Met	DL-MMet
<i>Composição analisada³(g/kg)</i>			
Proteína bruta	217	220	216
Lisina	12,87 (100) ⁴	12,78 (100)	12,59 (100)
Metionina	3,05 (24)	5,78 (45)	5,84 (46)
Metionina + cistina	6,53 (51)	9,10 (71)	9,17 (73)
Treonina	8,54 (66)	8,73 (68)	8,41 (67)
Triptofano	2,81 (22)	2,85 (22)	2,79 (22)
Valina	10,39 (81)	10,56 (83)	10,12 (80)
Isoleucina	9,56 (74)	9,75 (76)	9,27 (74)
Arginina	14,52 (113)	14,89 (117)	14,34 (114)
<i>Composição calculada</i>			
EMA ⁵ , kcal/kg	3,053	3,052	3,052
Cálcio, g/kg	8,76	8,76	8,76
Fósforo disponível, g/kg	4,50	4,50	4,50
Sódio, g/kg	2,00	2,00	2,00

¹As rações experimentais foram fornecidas aos animais dos 10 aos 20 dias de idade.

²NS = ração não suplementada com metionina; DL-Met = ração suplementada com o nível recomendado de metionina na forma de aminoácido livre (DL-Metionina 99%); DL-MMet = ração suplementada com dipeptídeo de metionina (DL-Metionil-DL-Metionina 95%).

³Formulação da ração foi feita com base nos aminoácidos totais do milho e farelo de soja, determinado por espectroscopia de refletância no infravermelho próximo (NIR). O total de aminoácidos e os valores dos outros nutrientes são mostrados como grama por quilograma e não como porcentagem das dietas. As composições de aminoácidos totais foram analiticamente determinadas pela Evonik Degussa (Hanau, Alemanha) usando cromatografia líquida de alta performance (HPLC).

⁴Os valores entre parênteses indicam a relação dos aminoácidos com a lisina (conceito de proteína ideal).

⁵EMA = energia metabolizável aparente.

Coleta de excretas e amostras biológicas

Para a análise coprológica, no sexto dia depois da inoculação, um *pool* de amostras de excretas frescas foi coletado aleatoriamente das gaiolas dos animais EC e outro *pool* foi coletado da mesma forma das gaiolas dos animais UC. Para as análises sanguíneas, histológicas e de expressão gênica, após o período de 6 dpi, os animais de todos os tratamentos foram abatidos por deslocamento cervical aos 20 dias de idade, e então amostras de sangue e do jejuno foram coletadas.

Análise coprológica qualitativa para diagnóstico da coccidiose

Esta análise foi realizada apenas para a detecção qualitativa referente à presença ou ausência de oocistos nas excretas dos animais. A técnica utilizada foi a descrita por Gordon e Whitlock (1939) com modificações. Aproximadamente, dois gramas de excretas foram dissolvidos em 15 mL de água destilada e centrifugada a 2500 rpm por 2 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pelet foi dissolvido em 10 mL de solução de sacarose (densidade 1,18). Essa mistura foi centrifugada novamente a 2500 rpm por 2 minutos. Após esse procedimento, o material foi colocado em lâmina histológica para detecção dos oocistos. A visualização das lâminas foi realizada utilizando o microscópio Óptico P1 *Olympus* BX 50, acoplado com a câmera *Olympus* PMC 35 B com objetiva de 40×.

Desempenho animal

Para as análises de desempenho, a gaiola (oito aves por gaiola) foi considerada como uma unidade experimental. O consumo de ração (CR) foi calculado como a diferença entre a quantidade de ração oferecida no 14º dia e os resíduos de ração ao final do período experimental (dia 20). Para calcular o ganho de peso (GP), os animais foram pesados aos 14 dias e aos 20 dias de idade. O GP foi calculado da seguinte forma: peso final médio (20 dias) – peso inicial médio (14 dias). A conversão alimentar (CA) foi calculada como a razão entre o CR e o GP.

Análises histológicas

Coleta e processamento das amostras

Para as análises histológicas, o jejuno, de seis animais por tratamento foi coletado, subsequentemente à eutanásia dos animais 6 dpi. As amostras de jejuno (fragmentos de aproximadamente 5 cm) obtidas entre a porção distal do duodeno e o divertículo de Meckel, foram coletadas, abertas longitudinalmente e lavadas cuidadosamente com solução fisiológica estéril gelada (4°C) e, em seguida, foram presas em placa de isopor, e fixadas em solução de *Bouin* por um período de seis horas. Após esse período, as amostras foram lavadas em álcool 70%, onde permaneceram até o momento do processamento. Após a fixação, as amostras foram submetidas a um processo de desidratação em séries crescentes

de álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina para obtenção de cortes histológicos semi-seriados no sentido longitudinal de três µm de espessura. Os cortes foram feitos em micrótomo manual (Leica BIOSYSTEMS, RM2125 RTS).

Morfometria do jejuno

Os cortes histológicos foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE). As medidas da altura e largura dos vilos do jejuno, da profundidade e largura das criptas (Figura 1A), foram determinadas em 20 vilos de cada animal (Gottardo et al., 2016). Os resultados estão expressos como µm. As imagens histológicas foram capturadas, utilizando o microscópio Óptico P1 *Olympus* BX 50 acoplado a uma câmera *Olympus* PMC 35 B, na objetiva de 4×. As mensurações morfométricas do jejuno foram realizadas por meio do sistema de análise de imagem computadorizada *Image Pro Plus* versão 4.0 (Média Cibertecnicos). A relação vilo:cripta foi obtida por meio da razão entre a altura do vilo e a profundidade da cripta. Para a obtenção da área de superfície de absorção da mucosa do jejuno, as seguintes medidas foram utilizadas: altura do vilo (AV), largura do vilo (LV) e largura da cripta (LC). O cálculo foi realizado de acordo com Kisielinski et al. (2002), da seguinte forma: área de superfície de absorção do jejuno = $((LV \times AV) + (LV \div 2 + LC \div 2)^2 - (LV \div 2)^2) \div ((LV \div 2 + LC \div 2)^2)$. Os resultados estão expressos como µm².

Para determinar a altura do enterócito e a largura da lâmina própria (Figura 1B), 120 medidas foram obtidas por tratamento. Os cortes histológicos foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE), e as imagens histológicas foram capturadas, utilizando o microscópio Óptico P1 *Olympus* BX 50 acoplado a uma câmera *Olympus* PMC 35 B, utilizando a objetiva de 40×. As mensurações de altura do enterócito e da largura da lâmina própria foram realizadas por meio do sistema de análise de imagem computadorizada *Image Pro Plus* versão 4.0 (Média Cibertecnicos). Os resultados estão expressos como µm.

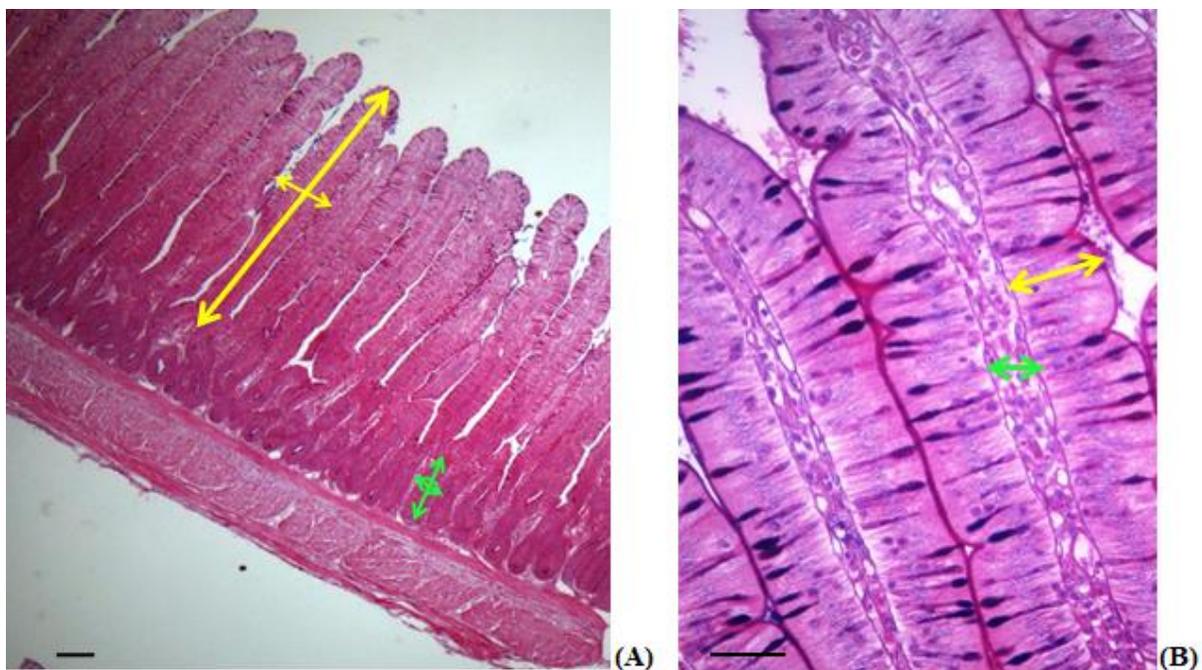


Figura 1. (A) Representação das medidas da altura e largura dos vilos (seta dupla amarela), profundidade e largura da cripta (seta dupla verde). Coloração Hematoxilina-Eosina, objetiva de 4 \times , barra = 150 μ m. (B) Medidas da altura do enterócito (seta dupla amarela) e da largura da lâmina própria (seta dupla verde), realizadas na mucosa do jejuno dos frangos de corte 6 dpi. Coloração Hematoxilina-Eosina, objetiva de 40 \times , barra = 30 μ m.

Quantificação de células caliciformes neutras e ácidas

Para a identificação e quantificação das células caliciformes neutras e ácidas presentes no jejuno, os cortes histológicos foram corados com Ácido Periódico-Reativo de Schiff (PAS) (contra corados com eosina), e Azul de Alcian (AB) (pH 2,5), respectivamente (Figura 2A e Figura 2B). As imagens histológicas foram capturadas, utilizando o microscópio Óptico P1 *Olympus* BX 50 acoplado a uma câmera *Olympus* PMC 35 B, utilizando a objetiva de 10 \times . A contagem das células caliciformes neutras e ácidas foi realizada em 20 vilos de cada animal, por meio do sistema de análise de imagem computadorizada *Image Pro Plus* versão 4.0 (Média Cibertecnicos).

Quantificação de linfócitos intraepiteliais (LIEs)

Os cortes histológicos foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE). Para quantificar os LIEs presentes no jejuno, foram obtidas 16 imagens histológicas por animal

na objetiva de 40×, e então 160 enterócitos foram contabilizados por imagem (2560 enterócitos). A quantidade de LIE presentes e contabilizados nos enterócitos do jejuno foi expressa como o número de LIE/100 células epiteliais (Ferguson e Murray, 1971; Sant'Ana et al., 2012). As imagens foram capturadas, utilizando o microscópio Óptico P1 *Olympus* BX 50 acoplado a uma câmera *Olympus* PMC 35 B. A contagem dos LIEs (Figura 2C) foi realizada por meio do sistema de análise de imagem computadorizada *Image Pro Plus* versão 4.0 (Média Cibertecnicos). Os resultados estão expressos como porcentagem (%).

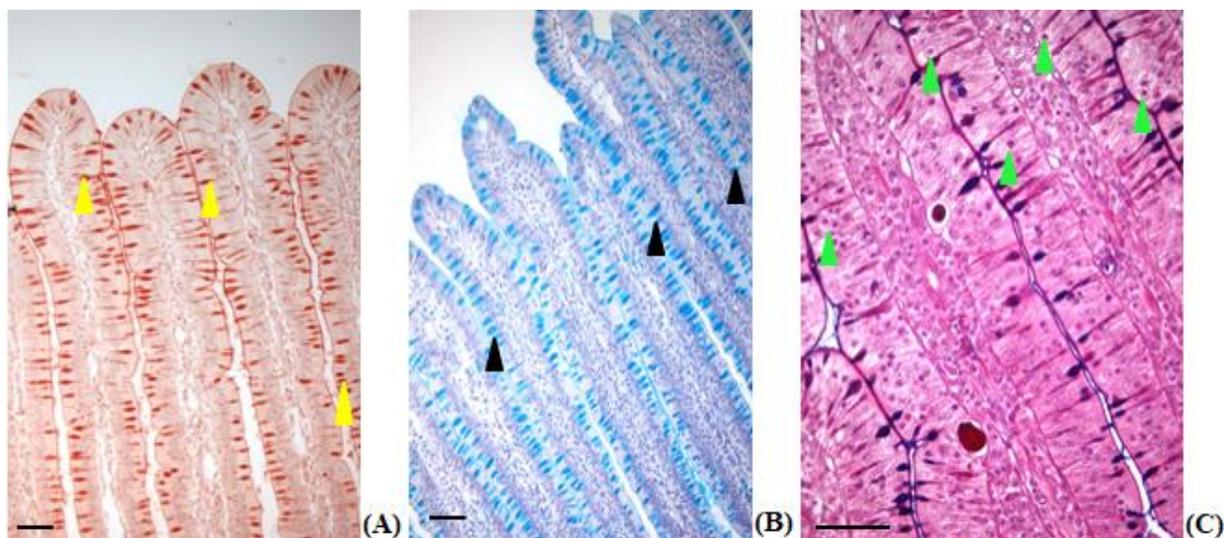


Figura 2. (A, B) Representação da contagem de células caliciformes neutras (cabeça de seta amarela) e ácidas (cabeça de seta preta), respectivamente nos vilos do jejuno dos animais. Objetiva de 10×, barra = 10 μ m. (A) Coloração Ácido Periódico-Reativo de Schiff (contra corado com eosina). (B) Coloração Azul de Alcian (pH 2,5). (C) Contagem de linfócitos intraepiteliais (cabeça de seta verde), no jejuno. Objetiva de 40×, barra = 30 μ m, coloração Hematoxilina-Eosina.

Microscopia eletrônica de transmissão (MET) e Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para as análises de microscopia eletrônica de transmissão e varredura, amostras do jejuno de três animais por tratamento foram coletadas. Fragmentos do jejuno de aproximadamente 5 cm, obtidas entre a porção distal do duodeno e o divertículo de Meckel, foram coletadas, abertas longitudinalmente e lavadas com solução fisiológica estéril gelada (4°C). Em seguida, as amostras foram fixadas durante duas horas à temperatura ambiente em uma solução de glutaraldeído a 2,5% em tampão de cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2.

As amostras foram armazenadas em geladeira, à temperatura de 4° até o momento das análises.

MET

Para esta análise, pequenos fragmentos do jejuno foram obtidos, com o auxílio de pinça e lâmina de bisturi, para serem fixados em solução contendo tetróxido de ósmio a 1% (OsO_4), ferrocianeto de potássio a 0,8% e cloreto de cálcio (CaCl_2) a 10 mM em tampão cacodilato 0,1 M. Em seguida, esses fragmentos do jejuno foram desidratados em concentrações crescentes de acetona e embebidos em resina Epon. Posteriormente, fragmentos ultrafinos do jejuno foram obtidos, e submetidos ao processo de contraste, utilizando acetato de uranila e citrato de chumbo. Após esse procedimento, as amostras de jejuno foram observadas no microscópio eletrônico de transmissão (JEOL JM 1400).

MEV

Fragmento de aproximadamente 1 cm² do jejuno, fixado como anteriormente descrito, foram desidratados por meio de um gradiente crescente de álcool etílico nas concentrações de 30, 50, 70, 90 e 100%, por um período de 15 minutos em cada concentração. Após o processo de desidratação, as amostras de jejuno foram submetidas ao processo de secagem durante dez ciclos, por meio do ponto crítico, utilizando dióxido de carbono (CO_2) (BAL-TEC Critical Point Dryer CPD-030). Para ser possível a visualização do oocisto no interior dos vilos do jejuno, após a secagem das amostras, pequenos cortes na posição vertical e horizontal do jejuno foram realizados. Esses pequenos fragmentos de jejuno foram então fixados em fita adesiva de carbono, previamente fixada em stub. Os fragmentos foram revestidos com uma fina camada de ouro durante três ciclos de 260 segundos a 27°C e a 50 mA (BAL-TEC Sputter Coater SCD-050).

As amostras de jejuno revestidas com ouro foram observadas no microscópio eletrônico de varredura modelo QUANTA 250 (FEI Company).

Expressão gênica

Para essa análise, após o período de 6 dpi, o jejuno (obtido entre a porção distal do duodeno e o divertículo de Meckel) de seis aves de cada tratamento foi coletado, lavado

com soro fisiológico estéril gelado (4°C), e adicionado em tubo eppendorf contendo 1 mL de TRIzol™ (Invitrogen TM, Carlsbad CA, USA), sendo subseqüentemente armazenado em freezer -80°C até o momento da extração do RNA total.

O RNA total foi extraído com o uso do reagente TRIzol™ (Invitrogen TM, Carlsbad CA, USA), seguindo as recomendações do fabricante. Após a extração, o RNA total, foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop™ 2000-c (Thermo Fisher Scientific™), no comprimento de onda de 260 nm. A integridade do RNA foi analisada em gel de agarose 1% corado com SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Invitrogen TM, Carlsbad CA, USA), e visualizada no fotodocumentador para gel de eletroforese (L-PIX TOUCH - Loccus Biotecnologia) sob luz ultravioleta.

Para evitar a contaminação das amostras com DNA genômico, 1 µg de RNA total foi tratado com o kit DNase I amplification grade (Invitrogen, Carlsbad CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Após esse procedimento, a síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada, utilizando o kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen Corporation, Brazil), de acordo com as instruções do fabricante. A concentração do cDNA foi mensurada via espectrofotômetro NanoDrop™ 2000-c (Thermo Fisher Scientific™), no comprimento de onda de 260 nm. As amostras de cDNA foram armazenadas em freezer a -20°C até o momento das reações de amplificação.

As reações em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real (RT-qPCR), consistiu de 5 µL de cDNA diluído para 40 ou 80 ng/µL, 0,5 ou 1 µL de cada primer (forward e reverse) a 10 µM (concentração final: 200 nM e 400 nM), 12,5 µL de SYBR™ Green PCR Master Mix (Applied Biosystems™, USA) e água ultra pura na quantidade suficiente para completar o volume final de cada reação de 25 µL. As reações de RT-qPCR foram realizadas no termociclador StepOne™ Real Time PCR System versão 2.3 (Applied Biosystems™), e os parâmetros do ciclo térmico para todos os genes foram os seguintes: início a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento/extensão a 60°C por 1 minuto, finalizando com a curva de melt entre 65 e 95°C.

Os primers utilizados nas reações de amplificação: mucina 2 (*MUC2*), linfoma de células B 2 (*BCL2*), caspase 3 (*CASP3*), alvo mecanicista da rapamicina (*MTOR*) e proteína ribossomal quinase B1 (*RPS6KB1*) foram desenhados com base nas sequências dos genes

depositadas no National Center for Biotechnology Information (NCBI) www.ncbi.nlm.nih.gov (Tabela 3), usando o site www.idtdna.com. O gene β -actina foi utilizado como controle endógeno (Tabela 3). Todas as análises foram realizadas em duplicatas, e os resultados foram expressos como unidade arbitrária (UA). O método $2^{-\Delta CT}$ (Livak e Schmittgen, 2001) foi utilizado para a análise de quantificação relativa de expressão dos genes.

Tabela 3. Sequência dos genes utilizados nas reações de RT-qPCR

Genes	Sequência do gene (5'→3')	Amplicon (pb) ¹	Número de acesso
<i>MUC2</i> ²	F: GGCATGAAATTCCTTGTGACG R: AGTGGGTGTTGGTATGGTG	128	JX284122.1
<i>BCL2</i>	F: GCTTTATCCTCCTGCCCTC R: CCTTTTCCTCCACCCTGTT	181	NM_205339.2
<i>CASP3</i>	F: TGGTATTGAAGCAGACAGTGGA R: GGAGTAGTAGCCTGGAGCAGTAGA	103	NM_204725.1
<i>MTOR</i>	F: TTGGGTTTGCTTTCTGTGGCTGTC R: ACAGACTTCTGCCTCTTGTGAGCA	119	XM_417614
<i>RPS6KB1</i>	F: TTTGCCTCCCTACCTCACACAAGA R: AAGAACGGGTGAGCCTGAACTTCT	123	NM_001030721.1
β -actina	F: GCCAACAGAGAGAAGATGAC R: CACCAGAGTCCATCACAATAC	130	L08165.1

¹Tamanho do amplicon em pares de bases (pb).

²*MUC2* = mucina 2; *BCL2* = linfoma de células B 2; *CASP3* = caspase 3, primer desenhado de acordo com Zuniga et al. (2018); *MTOR* = alvo mecanicista da rapamicina, primer desenhado de acordo com Lee (2012); *RPS6KB1* = proteína ribossomal quinase B1, primer desenhado de acordo com Lee (2012). F = forward; R = reverse.

Análises plasmáticas

A atividade das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e creatina quinase (CK), bem como o conteúdo de ácido úrico (AU) e creatinina (Cr), foram determinadas no plasma sanguíneo dos animais. Logo após a eutanásia dos animais (6 dpi), o sangue de oito animais de cada tratamento foi coletado a partir da veia jugular em tubo heparinizado. Em seguida, as amostras de sangue foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos, para obtenção do plasma que foi então armazenado a -20°C, até o momento das análises. As análises plasmáticas foram realizadas de acordo com as recomendações do fabricante (AST - MS10009010018; CK - MS10009010069; AU - MS10009010071 e Cr - MS10009010034 -

Labtest, Vista Alegre, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil). Essas análises foram mensuradas via espectrofotômetro Evolution™ 300 UV-VIS (Thermo Fisher Scientific™). Os resultados foram expressos como U/L para a atividade das enzimas AST e CK, e como mg/dL para as análises do conteúdo de AU e Cr.

Análises sorológicas

Para determinar o conteúdo de mucoproteínas (MUCO) e proteínas totais (PT), e a atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) no soro, logo após a eutanásia dos animais (6 dpi), o sangue de oito animais por tratamento foi coletado a partir da veia jugular em tubo de ensaio. As amostras de sangue foram mantidas sob refrigeração até a completa coagulação. Em seguida, as amostras de sangue foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos, a 4°C para obtenção do soro, que foi então armazenado a -20°C até o momento das análises. As análises do conteúdo de MUCO (MS80022230147) e de PT (MS80022230087), e a atividade da enzima LDH (MS80022230084), foram realizadas seguindo as instruções do fabricante (Gold Analisa, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil). As análises foram realizadas em espectrofotômetro Evolution™ 300 UV-VIS (Thermo Fisher Scientific™). Os resultados de MUCO, PT e LDH são expressos como mg/dL de mucoproteínas, g/L e U/L, respectivamente.

Análise estatística

O teste de Shapiro-Wilk foi aplicado para avaliar a normalidade dos dados, que foram analisados por 2-way ANOVA. Todos os efeitos foram considerados como fixos e a interação entre desafio por *Eimeria* spp. e dieta foi utilizada no modelo. As médias com diferenças significativas foram comparadas pelos testes de *t* e Tukey ($P < 0,05$) (SAS, 2002 versão 9.00, SAS Inst. Inc., Cary, NC).

RESULTADOS

Não foi observado nenhum oocisto nas excretas das aves pertencentes ao grupo UC, o que valida o uso dessas aves como um grupo controle (Figura 3A). A infecção causada por *Eimeria* spp. nos animais do grupo EC pode ser confirmada pela presença de oocistos nas

excretas (Figura 3B), e pelas imagens histológicas mostrando a presença de estruturas de *Eimeria* spp. em diferentes estágios (Figura 3D). A imagem dos vilos do jejuno das aves do grupo UC, mostra a morfologia preservada confirmando a ausência de infecção e a integridade da mucosa jejunal (Figura 3C).

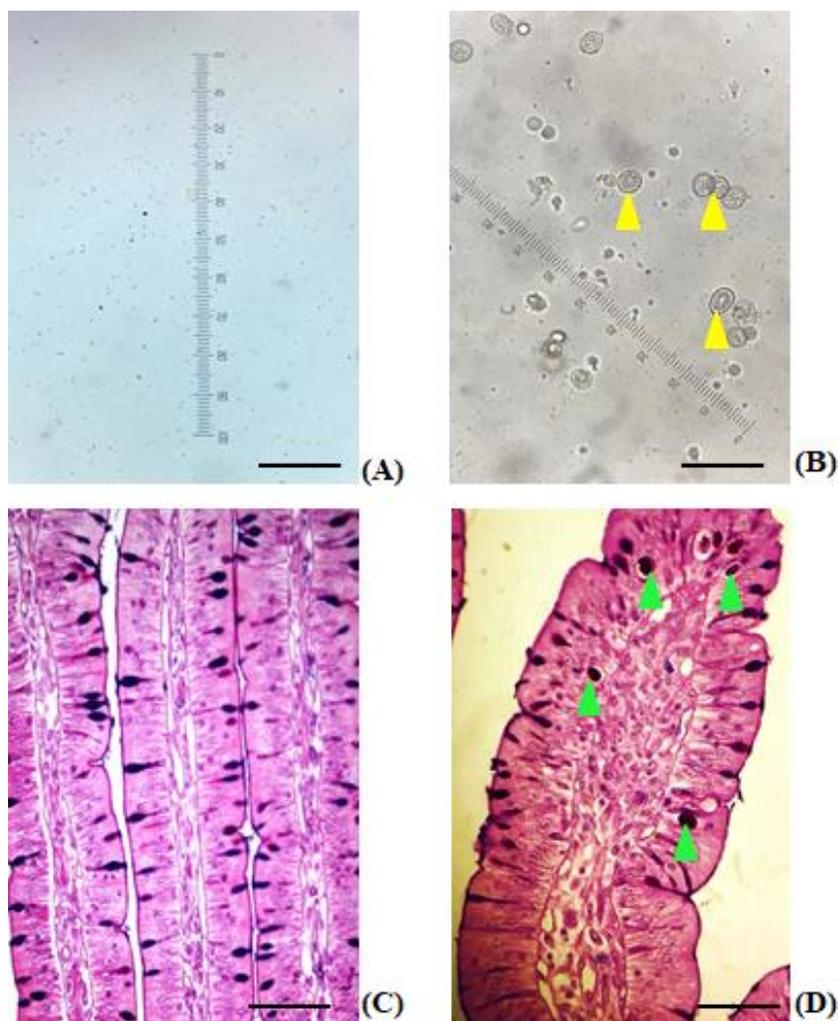


Figura 3. Imagens representativas da análise coprológica, demonstrando ausência de oocisto nas excretas das aves UC (A) e a presença de oocistos (cabeça de seta amarela) nas excretas das aves EC (B) 6 dpi. Objetiva de 40×, barra = 30 μm. (C) Representação de corte histológico do jejuno mostrando a morfologia preservada e integridade do vilos das aves UC. Objetiva de 40×, barra = 30 μm, coloração Hematoxilina-Eosina. (D) Imagem representativa do corte histológico de um vilos do jejuno do animal EC. Notar a presença de estruturas de *Eimeria* (cabeça de seta verde) no enterócito do jejuno de frangos desafiados por *Eimeria* spp. 6 dpi. Objetiva de 40×, barra = 30 μm, coloração Hematoxilina-Eosina.

Adicionalmente, a análise das imagens de MEV e histológica mostram a presença de oocisto de *E. maxima* no enterócito do jejuno (Figura 4A, Figura 4B e Figura 4C), e a ruptura celular através da imagem de MET (Figura 4D).

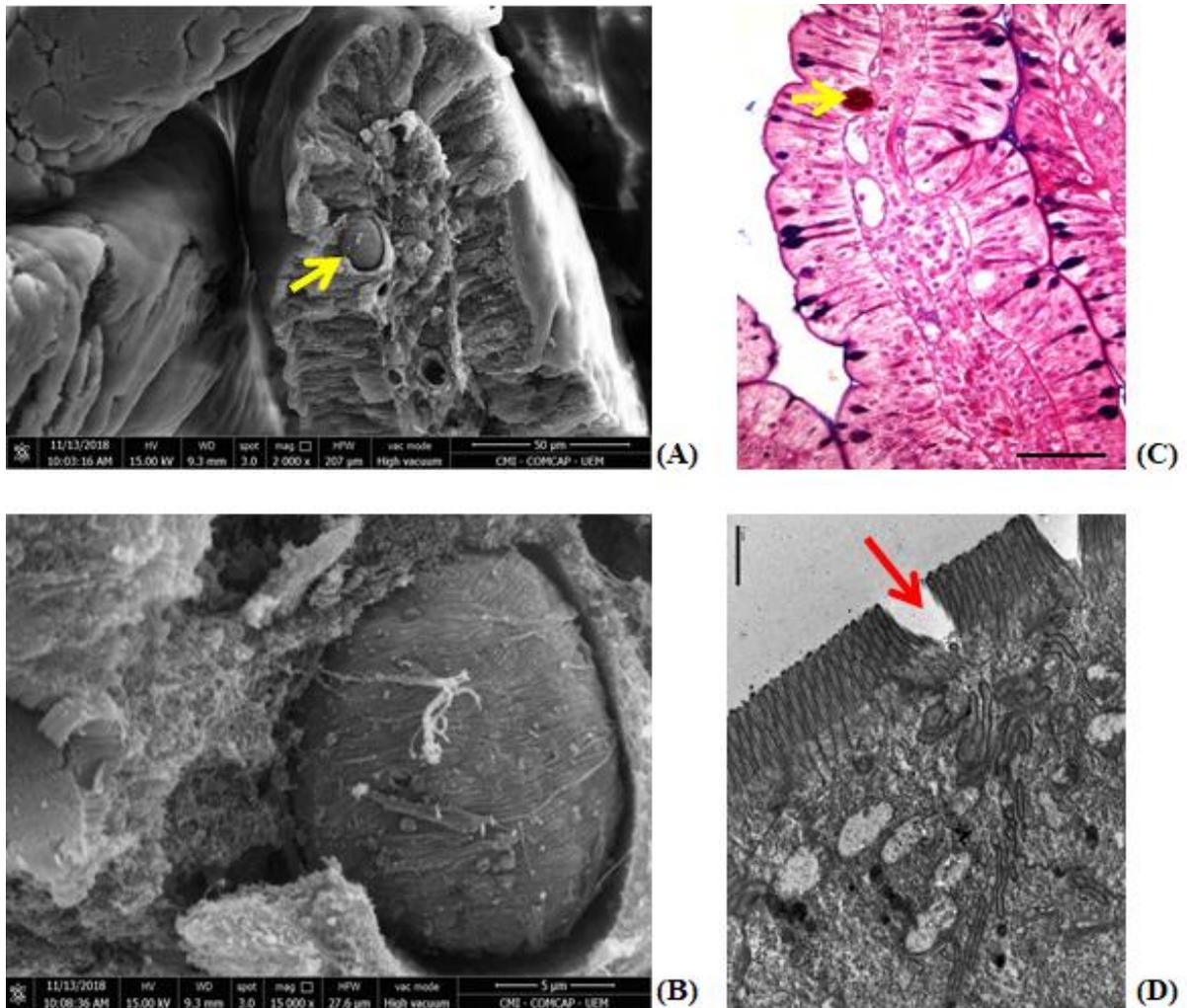


Figura 4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV), transmissão (MET) e microscopia óptica da mucosa do jejuno de frangos de corte 6 dias depois da inoculação (dpi) com oocistos esporulados de *Eimeria* spp. **(A, B)** MEV representativa do vilão do jejuno de animais EC, contendo oocisto não esporulado de *E. maxima* (seta amarela). **(A)** Magnificação 2000 \times , barra = 50 μ m. **(B)** Magnificação 15,000 \times , barra = 5 μ m. **(C)** Representação de corte histológico da mucosa jejunal dos animais EC, evidenciando oocisto de *Eimeria maxima* no enterócito (seta amarela). Coloração Hematoxilina-Eosina, objetiva de 40 \times , barra = 30 μ m. **(D)** MET do epitélio jejunal mostrando a ruptura da borda em escova e membrana apical do enterócito (seta vermelha). Magnificação de 10,000 \times , barra = 1 μ m.

Desempenho animal

Na Figura 5 são apresentados os resultados de consumo de ração (CR), ganho de peso (GP) e da conversão alimentar (CA) dos animais 6 dpi. Não foi observado efeito de interação entre desafio por *Eimeria* spp. e dieta sobre o CR, GP e CA, contudo foi observado que o desafio por *Eimeria* spp. influenciou de forma negativa o CR ($P < 0,0001$), GP ($P < 0,0001$) e CA ($P < 0,0001$). Os animais desafiados por *Eimeria* spp. apresentaram menor CR, GP e maior (pior) CA. Também foi observado efeito da dieta sobre o GP ($P = 0,0059$) e CA ($P = 0,0051$), os animais consumindo a dieta DL-Met apresentaram maior GP e menor CA. Não foi observada diferença significativa entre as fontes de suplementação de metionina.

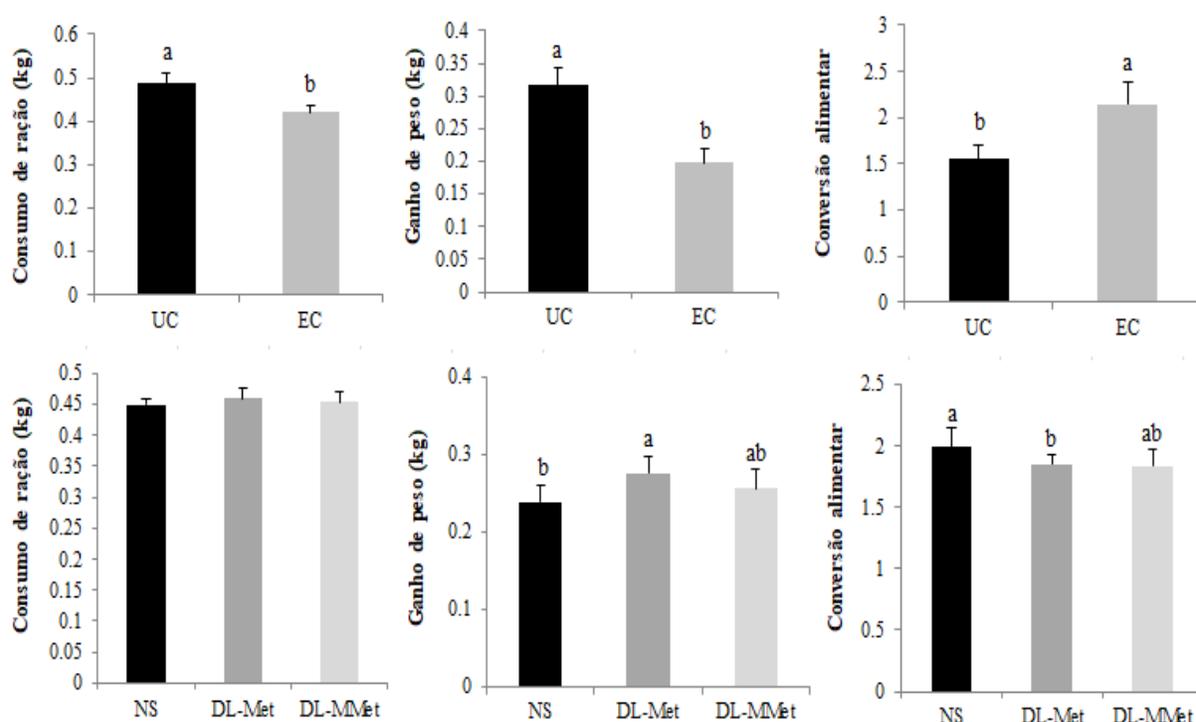


Figura 5. Efeitos do desafio por *Eimeria* spp. e dieta sobre o consumo de ração (CR), ganho de peso (GP) e conversão alimentar (CA) de frangos de corte com 20 dias de idade. ^{a,b}Letras diferentes significam médias diferentes pelos testes de *t* e Tukey ($P < 0,05$). UC = sem desafio; EC = desafio por *Eimeria* spp.; NS = dieta não suplementada com metionina; DL-Met = dieta suplementada com metionina na forma de aminoácido livre (DL-Metionina 99%); DL-MMet = dieta suplementada com dipeptídeo de metionina (DL-Metionil-DL-Metionina 95%).

Análises histológicas

Morfometria do jejuno

Os resultados morfométricos do jejuno estão apresentados na Tabela 4. Foi observado efeito de interação entre o desafio por *Eimeria* spp. e dieta sobre a altura do vilão ($P < 0,0001$), largura do vilão ($P < 0,0001$), profundidade de cripta ($P < 0,0001$), relação vilão:cripta ($P = 0,0012$), área de superfície de absorção do jejuno ($P > 0,0001$) e altura do enterócito ($P < 0,0001$). Animais do grupo EC que consumiram a dieta NS, apresentaram vilões mais baixos e mais largos, com maior valor de profundidade de cripta, menor valor da relação vilão:cripta e menor área de superfície de absorção do jejuno. E os animais EC que consumiram a dieta DL-MMet apresentaram a maior altura de enterócito.

Tabela 4. Morfometria e área de superfície de absorção da mucosa do jejuno de frangos de corte 6 dpi

		Altura do vilão	Largura do vilão	Profundidade	Vilão:cripta	Área de	Altura do
		(μm)	(μm)	de cripta (μm)		absorção (μm^2)	enterócito (μm)
		Média	Média	Média	Média	Média	Média
UC ¹	NS ³	652,89 ^c	87,01 ^c	145,49 ^c	4,56 ^{bc}	12,50 ^c	340,48 ^d
	DL-Met ⁴	829,41 ^{ab}	141,35 ^b	188,26 ^b	4,48 ^c	14,90 ^b	426,28 ^{bc}
	DL-MMet ⁵	788,36 ^b	93,14 ^c	144,24 ^c	5,60 ^a	17,18 ^a	441,23 ^c
EC ²	NS	395,59 ^f	162,90 ^a	209,20 ^a	1,96 ^f	6,50 ^f	417,64 ^b
	DL-Met	435,79 ^e	148,24 ^{ab}	197,72 ^b	2,25 ^e	7,17 ^e	432,72 ^{bc}
	DL-MMet	501,66 ^d	146,21 ^{ab}	196,68 ^b	2,61 ^d	8,17 ^d	471,28 ^a
Pooled EP ⁶		33,94	13,61	8,41	0,21	0,45	14,74
<i>Valor de P</i>		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

^{a,b,c,d,e,f} Médias na mesma coluna com letras sobrescritas diferentes são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Os resultados são apresentados como média e erro padrão médio (Pooled EP). A ave foi considerada como uma unidade experimental (n = 6).

¹UC = sem desafio.

²EC = desafio por *Eimeria* spp.

³NS = dieta não suplementada com metionina.

⁴DL-Met = dieta suplementada com metionina na forma de aminoácido livre (DL-Metionina 99%).

⁵DL-MMet = dieta suplementada com dipeptídeo de metionina (DL-Metionil-DL-Metionina 95%).

⁶Pooled EP = Erro padrão médio.

Não foi observado efeito de interação entre o desafio por *Eimeria* spp. e dieta sobre a largura da lâmina própria. Contudo, houve efeito do desafio por *Eimeria* spp. ($P < 0,0001$) e da dieta ($P = 0,0091$) sobre a largura da lâmina própria (Figura 6). Animais EC apresentaram maior valor de largura da lâmina própria que os animais UC, e os animais que consumiram a dieta DL-MMet apresentaram o menor valor de largura da lâmina própria.

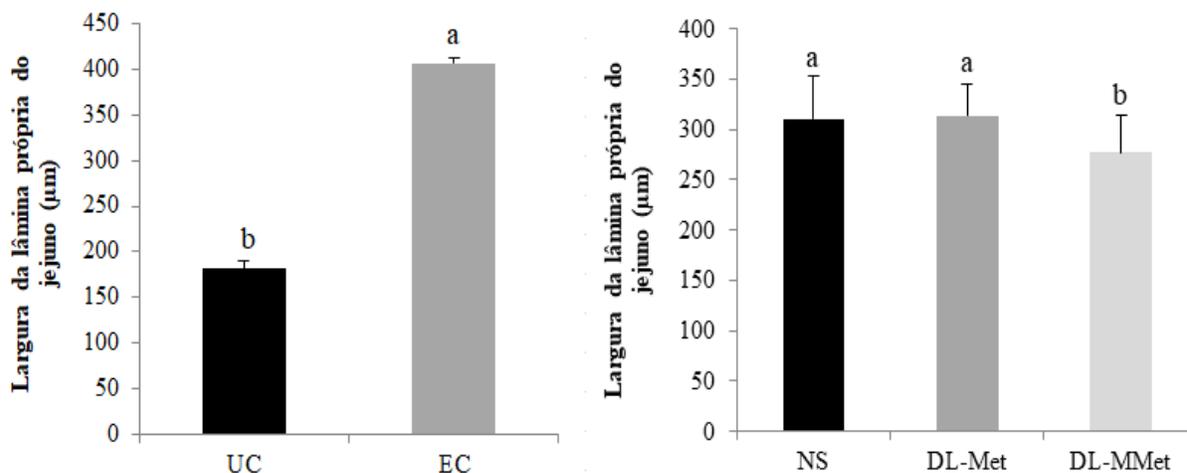


Figura 6. Efeitos do desafio por *Eimeria* spp. e dieta sobre a largura da lâmina própria do jejuno de frangos de corte com 20 dias de idade. ^{a,b}Letras diferentes significam médias diferentes pelos testes de *t* e Tukey ($P < 0,05$). UC = sem desafio; EC = desafio por *Eimeria* spp.; NS = dieta não suplementada com metionina; DL-Met = dieta suplementada com metionina na forma de aminoácido livre (DL-Metionina 99%); DL-MMet = dieta suplementada com dipeptídeo de metionina (DL-Metionil-DL-Metionina 95%).

Quantificação das células caliciformes neutras e ácidas, e dos linfócitos intraepiteliais (LIEs)

Para ampliar o entendimento dos efeitos dos tratamentos sobre o ambiente intestinal dos frangos de corte, foram quantificados as células caliciformes produtoras de muco neutro e ácido, bem como os LIEs no jejuno das aves 6 dpi (Tabela 5). Foi observado efeito de interação entre desafio por *Eimeria* spp. e dieta sobre as células caliciformes ácidas ($P = 0,0050$) e sobre os LIEs ($P = 0,0333$). Animais UC que consumiram a dieta DL-Met apresentaram maior quantidade de células caliciformes ácidas, e os animais EC recebendo a dieta DL-MMet apresentaram a maior porcentagem de LIEs. Houve efeito do desafio por *Eimeria* spp. ($P = 0,0483$) e da dieta ($P = 0,0164$) sobre as células caliciformes neutras. A menor quantidade de células caliciformes neutras foi observada nos animais EC e nos animais consumindo a dieta NS.

Tabela 5. Quantificação de células caliciformes neutras e ácidas, e de linfócito intraepitelial (LIE) no jejuno de frangos de corte 6 dpi

		Neutra		Ácida		LIE (%)	
		Média	EP	Média	EP	Média	EP
UC ¹	NS ³	62,15	8,44	57,60 ^b	8,52	11,89 ^d	0,47
	DL-Met ⁴	92,23	9,29	107,39 ^a	12,01	13,65 ^{cd}	1,05
	DL-MMet ⁵	93,30	7,07	80,40 ^b	5,27	18,37 ^{bcd}	1,30
EC ²	NS	65,42	3,72	62,53 ^b	2,45	25,92 ^b	2,88
	DL-Met	64,82	3,23	61,70 ^b	3,40	21,88 ^{bc}	1,67
	DL-MMet	86,83	12,38	71,90 ^b	7,88	43,51 ^a	6,79
Efeitos Principais							
Desafio	UC	84,57 ^a	5,84	85,12	7,52	14,75	0,91
	EC	71,50 ^b	4,48	64,99	2,78	29,67	3,13
Dieta	NS	64,11 ^b	3,79	60,56	3,51	20,31	2,84
	DL-Met	78,53 ^{ab}	6,25	84,55	9,10	17,77	1,56
	DL-MMet	90,07 ^a	6,81	76,15	4,70	30,94	5,31
Valor de P							
Desafio		0,0483		0,0026		<0,0001	
Dieta		0,0164		0,0193		0,0004	
Desafio × Dieta		0,1396		0,0050		0,0333	

^{a,b,c,d}Médias na mesma coluna com letras sobrescritas diferentes são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Os resultados são apresentados como média e erro padrão (EP). A ave foi considerada como uma unidade experimental ($n = 6$).

¹UC = sem desafio.

²EC = desafio por *Eimeria* spp.

³NS = dieta não suplementada com metionina.

⁴DL-Met = dieta suplementada com metionina na forma de aminoácido livre (DL-Metionina 99%).

⁵DL-MMet = dieta suplementada com dipeptídeo de metionina (DL-Metionil-DL-Metionina 95%).

Expressão gênica

Os resultados de expressão dos genes *MUC2*, *CASP3* e *BCL2* no jejuno de frangos de corte 6 dpi, estão apresentados na Tabela 6. Foi observado efeito de interação entre desafio por *Eimeria* spp. e dieta sobre a expressão do gene *MUC2* ($P = 0,0181$). Dentro do grupo não desafiado, não houve diferença significativa entre as dietas sobre a expressão do gene *MUC2*. Entretanto, com relação às aves desafiadas por *Eimeria* spp., aquelas recebendo a dieta NS apresentaram menor expressão desse gene, do que as aves recebendo dieta com suplementação de DL-Met e DL-MMet. Também foi observado que os animais desafiados por *Eimeria* spp., apresentaram menor valor de expressão dos genes *CASP3* e *BCL2* que

aves não desafiadas. Não foi observado efeito da dieta sobre a expressão dos genes *CASP3* ($P = 0,9905$) e *BCL2* ($P = 0,06797$).

Tabela 6. Expressão dos genes mucina (*MUC2*), caspase 3 (*CASP 3*) e linfoma de células B 2 (*BCL2*) no jejuno de frangos de corte 6 dpi

		<i>MUC2</i>		<i>CASP3</i>		<i>BCL2</i>	
		Média	EP	Média	EP	Média	EP
UC ¹	NS ³	0,730 ^a	0,009	0,128	0,014	0,005	0,001
	DL-Met ⁴	0,650 ^a	0,074	0,124	0,021	0,007	0,001
	DL-MMet ⁵	0,738 ^a	0,020	0,113	0,009	0,006	0,001
EC ²	NS	0,196 ^c	0,002	0,081	0,006	0,003	0,001
	DL-Met	0,334 ^b	0,003	0,081	0,008	0,003	0,001
	DL-MMet	0,348 ^b	0,022	0,093	0,013	0,004	0,001
Efeitos Principais							
Desafio	UC	0,706	0,026	0,122 ^a	0,008	0,006 ^a	0,001
	EC	0,293	0,025	0,085 ^b	0,005	0,003 ^b	0,001
Dieta	NS	0,463	0,119	0,104	0,012	0,004	0,001
	DL-Met	0,492	0,078	0,103	0,014	0,005	0,001
	DL-MMet	0,543	0,088	0,103	0,009	0,005	0,001
Valor de P							
Desafio		<0,0001		0,0045		<0,0001	
Dieta		0,0867		0,9905		0,0697	
Desafio × Dieta		0,0181		0,5751		0,0533	

^{a,b,c}Médias na mesma coluna com letras sobrescritas diferentes são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Os resultados são apresentados como média e erro padrão (EP). A ave foi considerada como uma unidade experimental ($n = 6$).

¹UC = sem desafio.

²EC = desafio por *Eimeria* spp.

³NS = dieta não suplementada com metionina.

⁴DL-Met = dieta suplementada com metionina na forma de aminoácido livre (DL-Metionina 99%).

⁵DL-MMet = dieta suplementada com dipeptídeo de metionina (DL-Metionil-DL-Metionina 95%).

Na Figura 7, estão apresentados os valores de expressão dos genes *MTOR* e *RPS6KB1*. Houve efeito do desafio sobre a expressão dos genes *MTOR* ($P < 0,0001$) e *RPS6KB1* ($P < 0,0001$) no jejuno dos frangos 6 dpi. O menor valor de expressão desses genes foi observado nos animais desafiados por *Eimeria* spp. Também foi observado efeito da dieta sobre a expressão do gene *MTOR* ($P = 0,0037$). Os animais consumindo a dieta

DL-MMet apresentaram a maior expressão desse gene. Não foi observado efeito da dieta sobre a expressão do gene *RPS6KB1* ($P = 0.0619$).

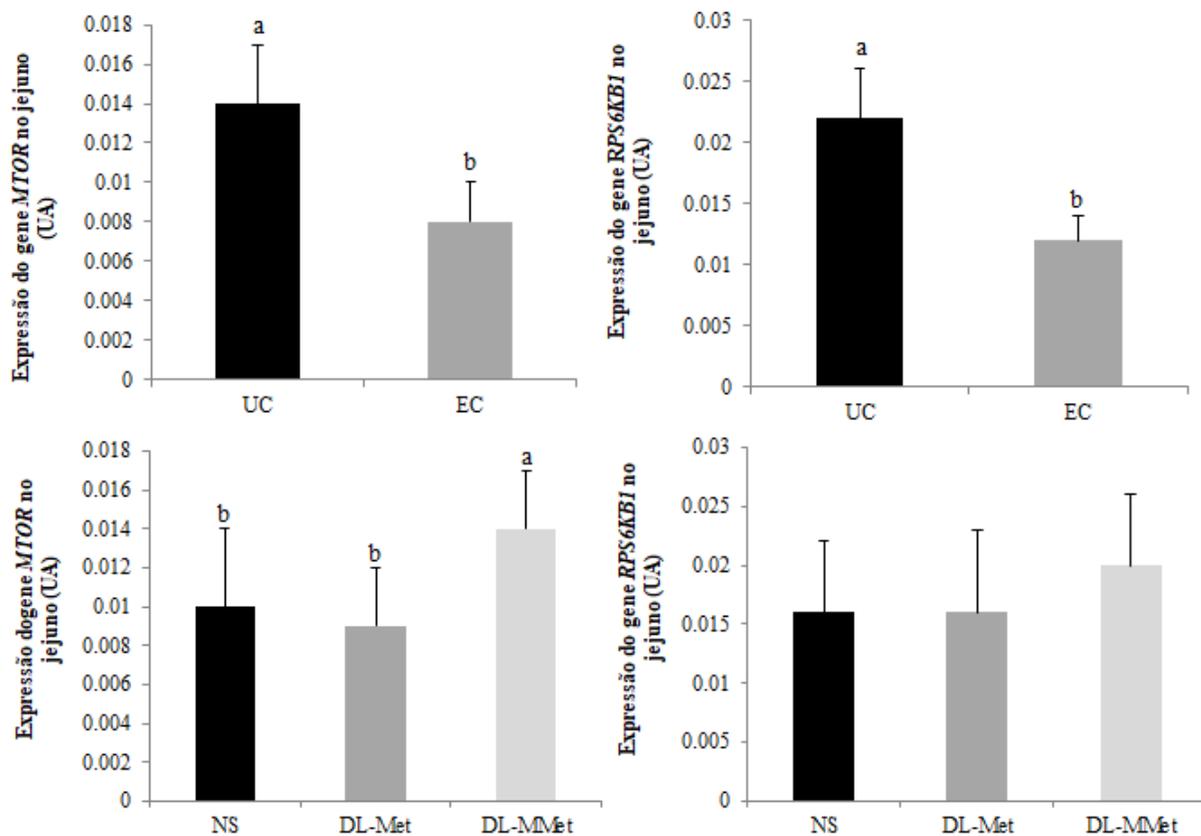


Figura 7. Efeitos do desafio por *Eimeria* spp. e da dieta sobre a expressão dos genes alvo mecanicista da rapamicina (*MTOR*) e proteína ribossomal quinase B1 (*RPS6KB1*) no jejuno de frangos de corte com 20 dias de idade. ^{a,b}Letras diferentes significam médias diferentes pelos testes de *t* e Tukey ($P < 0,05$). UC = sem desafio; EC = desafio por *Eimeria* spp.; NS = dieta não suplementada com metionina; DL-Met = dieta suplementada com metionina na forma de aminoácido livre (DL-Metionina 99%); DL-MMet = dieta suplementada com dipeptídeo de metionina (DL-Metionil-DL-Metionina 95%).

Análises sanguíneas

Os resultados da atividade das enzimas AST e CK, bem como o conteúdo de AU e Cr no plasma dos animais 6 dpi, são apresentados na Tabela 7. Houve efeito de interação entre desafio por *Eimeria* spp. e dieta, sobre a atividade da enzima CK ($P = 0,0489$). Os animais EC que consumiram a dieta NS apresentaram maior valor de atividade da enzima CK. Também foi observado efeito do desafio por *Eimeria* spp. sobre a atividade da enzima AST ($P = 0,0023$), e sobre o conteúdo de AU ($P = 0,0041$): animais EC apresentaram maior atividade da enzima AST e menor conteúdo de AU, do que os animais UC. A dieta também

influenciou a atividade da enzima AST ($P = 0,0052$), sendo observada maior atividade desta enzima no plasma dos animais que consumiram a dieta NS. Não foi observado efeito do desafio por *Eimeria* spp. e da dieta sobre o conteúdo de Cr.

Tabela 7. Atividade das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e creatina quinase (CK), conteúdo de ácido úrico (AU) e creatinina (Cr) no plasma de frangos de corte 6 dpi

		AST (U/L)		CK (U/L)		AU (mg/dL)		Cr (mg/dL)	
		Média	EP	Média	EP	Média	EP	Média	EP
UC ¹	NS ³	179,79	31,02	3103,66 ^{ab}	79,21	6,10	0,35	1,65	0,03
	DL-Met ⁴	129,29	5,09	2340,98 ^{bc}	294,83	6,55	1,07	1,67	0,03
	DL-MMet ⁵	129,14	6,40	2910,18 ^{ab}	542,15	7,99	0,93	1,69	0,02
EC ²	NS	236,48	31,02	4018,00 ^a	557,87	5,09	0,53	1,65	0,08
	DL-Met	184,18	12,31	1198,62 ^c	184,14	4,27	0,30	1,61	0,02
	DL-MMet	165,48	3,93	1585,93 ^c	450,15	5,89	0,73	1,61	0,03
Efeitos Principais									
Desafio	UC	145,01 ^b	12,07	2748,35	229,68	6,90 ^a	0,33	1,67	0,03
	EC	195,38 ^a	11,86	2164,54	384,94	5,08 ^b	0,52	1,62	0,02
Dieta	NS	210,71 ^a	22,54	3675,12	319,64	5,64	0,33	1,65	0,04
	DL-Met	159,23 ^b	10,26	1717,88	232,61	5,31	0,60	1,63	0,02
	DL-MMet	147,31 ^b	6,84	2248,06	408,16	6,94	0,68	1,65	0,02
<i>Valor de P</i>									
Desafio		0,0023		0,1122		0,0041		0,2015	
Dieta		0,0052		0,0006		0,0701		0,9309	
Desafio × Dieta		0,8251		0,0489		0,6434		0,5735	

^{a,b,c}Médias na mesma coluna com letras sobrescritas diferentes são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Os resultados são apresentados como média e erro padrão (EP). A ave foi considerada como uma unidade experimental ($n = 8$).

¹UC = sem desafio.

²EC = desafio por *Eimeria* spp.

³NS = dieta não suplementada com metionina.

⁴DL-Met = dieta suplementada com metionina na forma de aminoácido livre (DL-Metionina 99%).

⁵DL-MMet = dieta suplementada com dipeptídeo de metionina (DL-Metionil-DL-Metionina 95%).

Na Tabela 8, são apresentados os resultados das análises do conteúdo de MUCO e PT, e da atividade da enzima LDH, no soro dos frangos de corte 6 dpi. Observamos efeito de interação entre o desafio por *Eimeria* spp. e dieta sobre o conteúdo de PT ($P < 0,0001$). Entre os animais EC, o menor conteúdo de PT sérica foi observado nas aves que consumiram a dieta DL-MMet; valor semelhante aos animais UC independente da dieta

consumida. Também foi verificado efeito do desafio por *Eimeria* spp. ($P < 0,0001$) sobre o conteúdo de MUCO, os animais EC apresentaram maior conteúdo de MUCO que os animais UC. Não houve efeito da dieta sobre o conteúdo de MUCO ($P = 0,1743$). Nenhum efeito do desafio por *Eimeria* spp. ou da dieta foi observado sobre a atividade da enzima LDH.

Tabela 8. Conteúdo de mucoproteínas (MUCO) e de proteínas totais (PT), e atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) no soro de frangos de corte 6 dpi

		MUCO (mg/dL)		PT (g/L)		LDH (U/L)	
		Média	EP	Média	EP	Média	EP
UC ¹	NS ³	69,94	0,40	28,08 ^{bc}	0,67	946,78	323,09
	DL-Met ⁴	70,10	0,49	26,80 ^c	0,70	575,42	43,32
	DL-MMet ⁵	68,26	0,57	29,37 ^b	0,92	618,26	99,52
EC ²	NS	123,62	5,13	36,15 ^a	0,96	914,74	191,69
	DL-Met	125,45	3,62	36,25 ^a	1,38	614,88	73,46
	DL-MMet	114,14	6,90	27,43 ^{bc}	0,71	723,49	95,34
Efeitos Principais							
Desafio	UC	69,43 ^b	0,33	28,08	0,48	713,49	114,14
	EC	121,07 ^a	3,05	33,15	1,05	743,92	72,98
Dieta	NS	96,78	8,40	32,12	1,19	931,83	187,63
	DL-Met	97,77	8,50	31,21	1,45	595,15	42,78
	DL-MMet	91,20	7,66	28,40	0,62	670,87	70,18
Valor de P							
Desafio		<0,0001		<0,0001		0,8238	
Dieta		0,1743		0,0004		0,1208	
Desafio × Dieta		0,4000		<0,0001		0,9196	

^{a,b,c}Médias na mesma coluna com letras sobrescritas diferentes são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Os resultados são apresentados como média e erro padrão (EP). A ave foi considerada como uma unidade experimental ($n = 8$).

¹UC = sem desafio.

²EC = desafio por *Eimeria* spp.

³NS = dieta não suplementada com metionina.

⁴DL-Met = dieta suplementada com metionina na forma de aminoácido livre (DL-Metionina 99%).

⁵DL-MMet = dieta suplementada com dipeptídeo de metionina (DL-Metionil-DL-Metionina 95%).

DISCUSSÃO

Neste trabalho foram avaliados os danos na mucosa jejunal, causados pela infecção provocada pelas *Eimeria* spp. em animais suplementados ou não com metionina na forma livre e na forma de dipeptídeo. Os resultados mostraram claramente que aves desafiadas pelo patógeno apresentaram redução no CR e GP, e pior CA. Sob condição de desafio infeccioso, a redução do consumo de ração já é esperada, o que pode levar à ingestão inadequada de nutrientes essenciais (açúcares, ácidos graxos e aminoácidos) limitando, assim, o desenvolvimento animal (Miska e Fetterer, 2018). O menor GP nos animais EC também pode ter ocorrido devido às lesões na mucosa intestinal provocadas pelo patógeno, com alterações na expressão de genes que codificam enzimas digestivas e proteínas transportadoras de nutrientes no intestino delgado (Paris e Wong, 2013; Su et al., 2015; Miska e Fetterer, 2018).

Com relação às dietas, observamos que independentemente da fonte de metionina (DL-Met ou DL-MMet) utilizada, quando esse aminoácido é fornecido em quantidades adequadas à necessidade nutricional dos animais, a síntese de proteínas corporais é favorecida em relação à dieta NS, uma vez que esse aminoácido é capaz de modular o crescimento do animal, através da regulação de diversas vias metabólicas (Barnes et al., 1995; Ball et al., 2006; Tesseraud et al., 2011).

Assim como em outros estudos, também foi observado neste trabalho indícios de comprometimento da saúde e funcionalidade intestinal dos animais, através de múltiplas alterações morfométricas no jejuno das aves desafiadas por *Eimeria* spp. (Fernando e McCraw, 1973; Silva et al., 2009; Gottardo et al., 2016) consumindo dieta sem suplementação de metionina (Bauchart-Thevret et al., 2009). A menor altura dos vilos do jejuno observada neste estudo sugere uma maior perda celular ocasionada pelo desafio infeccioso e pela deficiência de metionina (Fernando e McCraw, 1973; Bauchart-Thevret et al., 2009). A maior largura dos vilos pode ter ocorrido como consequência da infecção e do estresse oxidativo, que por sua vez, pode ter sido exacerbada pela deficiência de metionina. Symons (1965) considera possível que uma rápida destruição e perda de células epiteliais, bem como a maior largura dos vilos, possam alterar a arquitetura dos vilos e estimular secundariamente a proliferação de células-tronco nas criptas. Assim, a maior profundidade de cripta e a menor relação vilo:cripta observada no presente estudo, indicam uma maior

necessidade de proliferação e migração de células epiteliais da cripta para as vilosidades, a fim de restaurar a mucosa intestinal (Silva et al., 2009). Esses resultados indicam que a demanda para renovação celular, excedeu a taxa normal de proliferação e substituição, explicando assim a alteração na arquitetura dos vilos. Além disso, esses resultados indicam que os animais EC que consumiram a dieta NS, não teriam o aporte nutricional necessário para permitir a renovação celular do jejuno. Conseqüentemente, as alterações nas vilosidades dos animais EC e NS, resultaram em menor área de superfície para absorção dos nutrientes, contribuindo assim para explicar o pior desempenho observado nestes animais.

Também foi observado que os animais desafiados, consumindo a dieta não suplementada com metionina, apresentaram menor quantidade de células caliciformes secretoras de mucina neutra (Tabela 5) e menor expressão do gene *MUC2* (Tabela 6) no jejuno 6 dpi. As células caliciformes sintetizam e secretam mucinas na superfície do epitélio intestinal, formando uma barreira física e química, para evitar a invasão da mucosa intestinal por microrganismos patogênicos, além de ajudar no transporte dos nutrientes digeridos para os enterócitos (Kim e Ho, 2010). Esses resultados podem ter ocorrido como consequência da deterioração da mucosa intestinal e da menor capacidade da cripta em reconstituir a perda celular, impedindo o restabelecimento da camada de muco e aumentando a susceptibilidade de infecção adicional (Forder et al., 2012). Neste estudo, nós também observamos maior quantidade de células caliciformes ácidas no jejuno dos animais UC consumindo a dieta DL-Met (Tabela 5). O maior número de células caliciformes é um indicativo de maior secreção de muco (Seyyedini e Nazem, 2015), o que sugere que a metionina contribui para a manutenção da saúde intestinal, uma vez que maior número de células caliciformes pode ser benéfico para o sistema de defesa do animal. Isso porque a mucina fornece uma barreira entre o epitélio e o conteúdo luminal, além de proteger as células epiteliais contra a translocação bacteriana, uma vez que mucina do tipo ácida parece ser menos degradada por glicosidases bacterianas (Robertson e Wright, 1997; Kim e Ho, 2010). Esse resultado sugere que a presença de metionina (DL-MET e DL-MMet) na dieta pode ter contribuído com o aumento na concentração de cisteína, o que pode explicar o maior número de células caliciformes no jejuno, já que essas células secretam mucinas ricas

em cisteína envolvidas na função imune do intestino (Van Klinken et al., 1998; Bauchart-Thevret et al., 2009).

Os animais EC, consumindo a dieta DL-MMet, apresentaram maior altura de enterócito (Tabela 4) e maior quantidade de LIEs no jejuno 6 dpi (Tabela 5). Esse resultado pode ter ocorrido como um mecanismo compensatório, em resposta à menor altura do vilo intestinal provocada pela infecção, na tentativa de aumentar a área de superfície de absorção (Silva et al., 2010). Embora o desafio por *Eimeria* spp. tenha reduzido a área de absorção do jejuno, foi observado que dentre os animais desafiados, aqueles recebendo a dieta DL-MMet mostraram maior área absorptiva do que os animais recebendo as dietas NS ou DL-Met (Tabela 4). Nós sugerimos que o dipeptídeo de metionina, foi capaz de manter a estrutura e integridade do enterócito em condição de desafio infeccioso, possivelmente via modulação do status antioxidante celular. Esse resultado pode ainda estar associado com o mecanismo de absorção do dipeptídeo, uma vez que o transporte intestinal do dipeptídeo apresenta vantagens no sistema de transporte exigindo menor gasto de energia (Daniel, 2004), que poderia por sua vez ser utilizada para o crescimento celular. Os enterócitos são as primeiras células a serem invadidas por protozoários intestinais, e seguida dessa invasão ocorre à secreção de citocinas e quimiocinas orquestrando a resposta imune (Stadnyk, 2002).

A maior porcentagem de LIEs observada neste estudo sugere o desencadeamento de uma resposta imune celular local, na tentativa de inibir a disseminação do parasita para outras células epiteliais do jejuno. Segundo Lillehoj e Chung (1992), a resposta imunológica mediada por células é eficaz contra o desafio infeccioso, sendo mediada principalmente por linfócitos intraepiteliais e linfócitos presentes na lâmina própria que consistem principalmente de células T, algumas células B e Natural Killer (NK). De acordo com Lillehoj e Trout (1996), os LIEs podem interagir com as células infectadas com *Eimeria*, a fim de eliminá-las, fornecendo fortes evidências de que essa resposta imune possa reduzir o número de esporozoítos intracelulares, e inibir a progressão do desenvolvimento do parasita. Dessa forma, esse resultado sugere que a utilização do dipeptídeo de metionina, nos casos de desafio infeccioso, poderia auxiliar as células epiteliais na execução da resposta imune. Possivelmente através de alguns de seus metabólitos como a glutatona (GSH), que têm importante propriedade imunomoduladora, através da defesa antioxidante capaz de proteger o ambiente intestinal dos danos oxidativos

durante reações imunológicas, e também por auxiliar a proliferação de células T (Grimble, 2006).

No presente estudo, também foi observado que o desafio por *Eimeria* spp., aumentou a largura da lâmina própria do jejuno 6 dpi (Figura 6). Essa maior largura da lâmina própria pode indicar à formação de edema e a presença de um maior número de células de defesa neste local (Trevizan et al., 2016), uma vez que as células residentes na lâmina própria também podem iniciar uma resposta celular ou humoral diante da infecção parasitária (Duszynski et al., 2005; Trevizan et al., 2016). Os animais, consumindo a dieta DL-MMet, apresentaram menor largura da lâmina própria (Figura 6), sugerindo que o dipeptídeo de metionina pode manter maior integridade e saúde intestinal, já que uma lâmina própria saudável apresenta menor largura, provavelmente por conter poucas células de defesa (Erben et al., 2014). Esse resultado pode ainda indicar que os animais, recebendo a dieta com dipeptídeo, possam ter contido o desenvolvimento da *Eimeria* no epitélio intestinal, pela maior produção de LIEs, sem a necessidade de ter que recrutar células de defesa adicionais oriundas da lâmina própria.

Estudos têm relacionado à perda celular do intestino com o mecanismo de apoptose (Yan et al., 2015; Abdel-Haleem et al., 2017). A apoptose é responsável pela eliminação de células danificadas que perderam suas funções, ou células indesejadas presentes nos tecidos biológicos (Vaux e Strasser, 1996). Além disso, esse processo pode atuar como um importante mecanismo de defesa por eliminar células infectadas por patógenos intracelulares (Williams, 1994). No entanto, as *Eimeria* spp. dispõem de estratégias para garantir o seu ciclo de vida dentro da célula, inibindo a via da apoptose (del Cacho et al., 2004). del Cacho et al. (2004), citam ainda que, quando necessário, esse patógeno inibe a via do fator de transcrição nuclear NF- κ B, a fim de desencadear a apoptose e facilitar sua liberação para o lúmen intestinal.

Importantes reguladores desse processo são os membros da família Bcl-2, que incluem o gene pró-apoptótico proteína X associada ao Bcl-2 (BAX), um ativador da apoptose, o membro anti-apoptótico linfoma de células B2 (BCL2) que está relacionado com a inibição de proteínas pró-apoptóticas, e caspase 3 (CASP3) que desempenha papel central na execução desse processo (Dolka et al., 2016). No jejuno dos animais EC, foi observada menor expressão dos genes *BCL2* e *CASP3*, seis dias depois da inoculação

(Tabela 6). Esses resultados sugerem que, com a menor expressão do gene *BCL2*, as células epiteliais do jejuno estivessem mais vulneráveis a sofrerem apoptose. E que possivelmente a *Eimeria* bloqueou a via da apoptose, com consequente inibição do gene *CASP3*, que codifica a proteína executora da apoptose, a fim de facilitar a sua sobrevivência e disseminação celular (Lüder et al., 2001). Por outro lado, a menor expressão do gene *CASP3* pode inibir que a *Eimeria* escape da célula e atinja outras células, o que retardaria a continuação do seu ciclo intracelular (del Cacho et al., 2004). Como os resultados deste estudo mostraram menor altura dos vilos nos animais desafiados, possivelmente como consequência da destruição celular, sugere-se a ocorrência de outro tipo de morte celular como a necrose, que é um mecanismo patológico ligado a perda da integridade das membranas celulares, causando dessa forma a liberação de conteúdo celular, dando início a um processo de inflamação a fim de reparar o tecido danificado (Heussler et al., 2001; Rock e Kono, 2008; Sharma et al., 2015).

Neste estudo, foi verificado que o desafio por *Eimeria* spp. reduziu a expressão dos genes *MTOR* e *RPS6KB1* no jejuno dos frangos 6 dpi (Figura 7). A mTOR atua como fundamental elemento da síntese proteica, por meio da fosforilação e ativação da proteína ribossomal quinase B1 (RPS6KB1), e da inibição da proteína 1 ligante do fator de iniciação eucariótico 4E (4E-BP1) (Showkat et al., 2014). A mTOR também tem sido relacionada com a melhoria da função da barreira intestinal, por aumentar a proliferação e diferenciação das células epiteliais (Yang et al., 2016; Shao et al., 2017). Entretanto, a ativação da via de sinalização da mTOR é dependente da disponibilidade de nutrientes e energia (Richards et al., 2010). Assim, esses resultados podem estar associados à destruição da mucosa intestinal provocada pelo patógeno (Tan et al., 2014), que por sua vez, pode ter causado redução na absorção dos nutrientes, afetando desta forma, a transcrição dos genes *MTOR* e consequentemente do *RPS6KB1* (Sharma e Fernando, 1973; Ruff et al., 1976; Bauchart-Thevret et al., 2010; Richards et al., 2010). Por outro lado, os animais que consumiram a dieta suplementada com o dipeptídeo de metionina apresentaram maior valor de expressão do gene *MTOR* no jejuno (Figura 7). Isso sugere que provavelmente o mecanismo de absorção e metabolismo do dipeptídeo no intestino, foi mais eficiente que do aminoácido livre, disponibilizando maior quantidade de metionina para as células, com maior conservação de energia metabólica, para ativação da via de sinalização mediada pela

mTOR no jejuno. Esse resultado pode ser evidenciado no presente estudo pela maior altura dos vilos e enterócitos, menor profundidade da cripta, bem como a maior área de superfície de absorção de nutrientes observados nos animais consumindo a dieta suplementada com DL-MMet.

Neste estudo, também foi observado que os animais desafiados que consumiram a dieta NS, apresentaram maior atividade das enzimas AST e CK no plasma (Tabela 7). Essas enzimas desempenham importantes funções no metabolismo de aminoácidos e energético respectivamente, e seus níveis no plasma sanguíneo têm sido relacionados a lesões hepáticas e musculares (Khan et al., 2013). Contudo, estudos também têm verificado a presença dessas enzimas no intestino dos animais (Samanta et al., 2014; Adeyemi et al., 2015). Essas enzimas são liberadas no sangue quando esses tecidos sofrem algum tipo de lesão (Khan et al., 2013). Assim, esses resultados podem ter ocorrido em função das injúrias celulares no jejuno, provocada pelas *Eimeria* spp. e pela deficiência de metionina, que pode ter resultado em perdas de componentes citoplasmáticos e mitocondriais para o plasma sanguíneo. Menor concentração de AU no plasma foi observada nos animais EC (Tabela 7), sugerindo que maior quantidade de ácido úrico, possa ter sido utilizada para combater o estresse oxidativo causado pelo desafio infeccioso, uma vez que esse metabólito exibe atividade antioxidante (Hooper et al., 1998; Settle e Klandorf, 2014), reduzindo assim a sua concentração no plasma.

Os animais EC, consumindo a dieta DL-MMet, apresentaram menor concentração de PT no soro semelhante aos animais UC, independentemente da dieta consumida (Tabela 8). Gomez-Bautista et al. (1986) observaram hiperproteinemia em coelhos desafiados por *Eimeria stiedai*, atribuindo as alterações nas PT séricas, principalmente à produção de anticorpos. Assim, esse resultado sugere que a suplementação das dietas com o dipeptídeo de metionina foi suficiente para suportar uma resposta imune local por meio do aumento dos LIEs, sem a necessidade de ter que recrutar substâncias imunes extras intestinais, como por exemplo, as proteínas de fase aguda. Também foi observada uma maior concentração de mucoproteínas no soro dos animais desafiados por *Eimeria* spp. (Tabela 8), provavelmente como resultado do processo inflamatório iniciado na mucosa intestinal, uma vez que essas glicoproteínas são produzidas no fígado após estímulo de citocinas pró-inflamatórias (Rath et al., 2009). As mucoproteínas são uma fração heterogênea de

glicoproteínas, relacionadas como proteínas de fase aguda. A resposta mediada por essas glicoproteínas é uma reação sistêmica precoce e inespecífica do sistema imune inato, a distúrbios locais ou sistêmicos, causados por diversos fatores, entre estes a infecção (Cray et al., 2009). Com o principal objetivo de restabelecer a homeostase e recuperação do tecido lesado (Cray et al., 2009).

Em resumo, os resultados fornecem evidências das lesões provocadas pelas *Eimeria* spp. na estrutura morfológica e funcional do jejuno, com prejuízos diretos sobre o desempenho produtivo dos animais. A suplementação da dieta com metionina permite melhor desempenho dos animais, possivelmente por meio de seus efeitos sobre a modulação do crescimento do animal. Conclui-se ainda, que a metionina suplementada na forma de dipeptídeo nas dietas de frangos, sobretudo em condições de desafios entéricos que causam destruição celular do intestino, com consequente redução da capacidade de absorção, poderia funcionar como um importante elemento capaz de manter a morfologia e função das células intestinais. Entretanto, visto que este é o primeiro estudo utilizando o dipeptídeo de metionina em frangos de corte com coccidiose, mais estudos são necessários para melhor compreender os efeitos dessa fonte de metionina sobre o ambiente intestinal de frangos de corte desafiados por *Eimeria* spp.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

LITERATURA CITADA

- Abdel-Haleem, H. M., S. M. Aboelhadid, T. Sakran, G. El-Shahawy, H. El-Fayoumi, S. Al-Quraishy, and A. S. Abdel-Baki. 2017. Gene expression, oxidative stress and apoptotic changes in rabbit ileum experimentally infected with *Eimeria intestinalis*. *Folia Parasitol.* 64:1-7. doi:10.14411/fp.2017.012.
- Adamu, M., C. Boonkaewwan, N. Gongruttananun, and M. Vongpakorn. 2013. Hematological, biochemical and histopathological changes caused by coccidiosis in chickens. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)*. 47:238-246.

- Adeyemi, O. T., O. Osilesi, O. O. Adebawo, F. D. Onajobi, S. O. Oyedemi¹, and A. J. Afolayan. 2015. Alkaline Phosphatase (ALP), aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) activities in selected tissues of rats fed on processed Atlantic Horse Mackerel (*Trachurus trachurus*). *Adv Biosci Biotechnol.* 06:139-152. doi:10.4236/abb.2015.63014.
- Ball, R. O., G. Courtney-Martin, and P. B. Pencharz. 2006. The in vivo sparing of methionine by cysteine in sulfur amino acid requirements in animal models and adult humans. *J Nutr.* 136:1682S-1693S. doi:10.1093/jn/136.6.1682S.
- Barbot, L., E. Windsor, S. Rome, V. Tricottet, M. Reynès, A. Topouchian, J. F. Huneau, J. Gobert, D. Tomé, and N. Kapel. 2003. Intestinal peptide transporter PepT1 is over-expressed during acute cryptosporidiosis in suckling rats as a result of both malnutrition and experimental parasite infection. *Parasitol Res.* 89:364-370. doi:10.1007/s00436-002-0776-3.
- Barnes, D. M., C. C. Calvert, K. C. Klasing. 1995. Methionine deficiency decreases protein accretion and synthesis but not tRNA acylation in muscles of chicks. *J Nutr.* 125:2623-2630. doi:10.1093/jn/125.10.2623.
- Bauchart-Thevret, C., B. Stoll, S. Chacko, and D. G. Burrin. 2009. Sulfur amino acid deficiency upregulates intestinal methionine cycle activity and suppresses epithelial growth in neonatal pigs. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 296:E1239-E1250. doi:10.1152/ajpendo.91021.2008.
- Bauchart-Thevret, C., L. Cui, G. Wu, and D. G. Burrin. 2010. Arginine-induced stimulation of protein synthesis and survival in IPEC-J2 cells is mediated by mTOR but not nitric oxide. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 299:E899-E909. doi:10.1152/ajpendo.00068.2010.
- Belote, B. L., A. Tujimoto-Silva, P. H. Hummelgen, A. W. D. Sanches, J. C. S. Wammes, R. M. Hayashi, and E. Santin. 2018. Histological parameters to evaluate intestinal health on broilers challenged with *Eimeria* and *Clostridium perfringens* with or without enramycin as growth promoter. *Poult Sci.* 97:2287-2294. doi:10.3382/ps/pey064.
- Bin, P., R. Huang, and X. Zhou. 2017. Oxidation resistance of the sulfur amino acids: methionine and cysteine. *Biomed Res Int.* 2017:1-6. doi:https://doi.org/10.1155/2017/9584932.

- Chen, J., G. Tellez, J. D. Richards, and J. Escobar. 2015. Identification of potential biomarkers for gut barrier failure in broiler chickens. *Front Vet Sci.* 2:1-10. doi:10.3389/fvets.2015.00014.
- Cray, C., J. Zaias, and N. H. Altman. 2009. Acute Phase Response in Animals: A Review. *Comp Med.* 59:517-526.
- Daniel, H. 2004. Molecular and integrative physiology of intestinal peptide transport. Annual review of physiology 66:361-384. doi:10.1146/annurev.physiol.66.032102.144149.
- del Cacho, E., M. Gallego, F. López-Bernad, J. Quílez, J. and C. Sánchez-Acedo. 2004. Expression of anti-apoptotic factors in cells parasitized by second-generation schizonts of *Eimeria tenella* and *Eimeria necatrix*. *Vet Parasitol.* 125:287-300. doi:10.1016/j.vetpar.2004.07.017.
- Del Vesco, A. P., E. Gasparino, D. O. Grieser, V. Zancanela, F. R. Gasparin, J. Constantin, and A. R. O Neto. 2014. Effects of methionine supplementation on the redox state of acute heat stress-exposed quails. *J Anim Sci.* 92:806-815. doi:10.2527/jas.2013-6829.
- Del Vesco, A. P., E. Gasparino, D. O. Grieser, V. Zancanela, D. M. Voltolini, A. S. Khatlab, S. E. F. Guimarães, M. A. M Soares, and Neto, A. R. O. 2015a. Effects of methionine supplementation on the expression of protein deposition-related genes in acute heat stress-exposed broilers. *PLoS One.* 10:1-11. doi: 10.1371/journal.pone.0115821.
- Del Vesco, A. P., E. Gasparino, D. O. Grieser, V. Zancanela, M. A. M. Soares, and A. R. O. Neto. 2015b. Effects of methionine supplementation on the expression of oxidative stress-related genes in acute heat stress-exposed broilers. *Br J Nutr.* 113:549-59. doi:10.1017/S0007114514003535.
- Dolka, I., M. Król, and R. Sapieryński. 2016. Evaluation of apoptosis-associated protein (Bcl-2, Bax, cleaved caspase-3 and p53) expression in canine mammary tumors: An immunohistochemical and prognostic study. *Res Vet Sci.* 105:124-133. doi:10.1016/j.rvsc.2016.02.004.
- Duszynski, D. W., L. Harrenstien, L. Couch, and M. M. Garner. 2005. A pathogenic new species of *Eimeria* from the pygmy rabbit, *Brachylagus idahoensis*, in Washington and

- Oregon, with description of the sporulated oocyst and intestinal endogenous stages. *J Parasitol.* 91:618-623. doi:10.1645/GE-435R.
- Erben, U., C. Loddenkemper, K. Doerfel, S. Spieckermann, D. Haller, M. M. Heimesaat, M. Zeitz, B. Siegmund, and A. A. Kühl. 2014. A guide to histomorphological evaluation of intestinal inflammation in mouse models. *Int J Clin Exp Pathol.* 7:4557-4576.
- Fasina, Y. O., P. S. Holt, E. T. Moran, R. W. Moore, D. E. Conner, and S. R. McKee. 2008. Intestinal cytokine response of commercial source broiler chicks to *Salmonella typhimurium* infection. *Poult Sci.* 87:1335-1346. doi:10.3382/ps.2007-00526.
- Ferguson, A., and Murray, D. 1971. Quantitation of intraepithelial lymphocytes in human jejunum. *Gut.* 12:988-994.
- Fernando, M. A., and B. M. McCraw. 1973. Mucosal morphology and cellular renewal in the intestine of chickens following a single infection of *Eimeria acervulina*. *J Parasitol.* 59:493-501.
- Forder, R. E., G. S. Nattrass, M. S. Geier, R. J. Hughes, and P. I. Hynd. 2012. Quantitative analyses of genes associated with mucin synthesis of broiler chickens with induced necrotic enteritis. *Poult Sci.* 91:1335-1341. doi:10.3382/ps.2011-02062.
- Gilbert, E. R., E. A. Wong, and K. E. Jr. Webb. 2008. Board-invited review: Peptide absorption and utilization: Implications for animal nutrition and health. *J Anim Sci.* 86:2135-2155. doi:10.2527/jas.2007-0826.
- Gomez-Bautista, M. G., M. V. Garcia, and F. A. Rojo-Vazquez. 1986. The levels of total protein and protein fractions in the serum of rabbits infected with *Eimeria stiedai*. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 61:393-400. doi:10.1051/parasite/1986614393.
- Gordon, H., and A. V. Whitlock. 1939. A new technique for counting nematode eggs in sheep feces. *J Counc Sci Ind Res.* 12:50-52.
- Gottardo, E. T., K. Prokoski, D. Horn, A. D. Viott, T. C. Santos, and J. I. Fernandes. 2016. Regeneration of the intestinal mucosa in *Eimeria* and *E. Coli* challenged broilers supplemented with amino acids. *Poult Sci.* 95:1056-1065. doi:10.3382/ps/pev356.
- Grimble, R. F. 2006. The effects of sulfur amino acid intake on immune function in humans. *J Nutr.* 136:1660S-1665S. doi:10.1093/jn/136.6.1660S.

- Grimble, R. F. and G. K. Grimble. 1998. Immunonutrition: Role of sulfur amino acids, related amino acids, and polyamines. *Nutrition* 14:605-610. doi:10.1016/S0899-9007(98)80041-5.
- Heussler, V. T., P. KuÈenzi, and S. Rottenberg. 2001. Inhibition of apoptosis by intracellular protozoan parasites. *Int J Parasitol.* 31:1166-1176.
- Hooper, D. C., S. Spitsin, R. B. Kean, J. M. Champion, G. M. Dickson, I. Chaudhry, and H. Koprowski. 1998. Uric acid, a natural scavenger of peroxynitrite, in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:675-680.
- Idris, A. B., D. I. Bounous, M. A. Goodwin, J. Brown, and E. A. Krushinskie. 1997. Quantitative pathology of small intestinal coccidiosis caused by *Eimeria maxima* in young broilers. *Avian Pathol.* 26:731-747. doi:10.1080/03079459708419249.
- Khan, H. A., A. S. Alhomida, S. H. Sobki, S. S. Habib, Z. A. Aseri, A. A. Khan, and A. A. Moghari. 2013. Serum markers of tissue damage and oxidative stress in patients with acute myocardial infarction. *Biomedical Research.* 24:15-20.
- Kim, Y. S., and S. B. Ho. 2010. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr Gastroenterol Rep.* 12:319-330. doi:10.1007/s11894-010-0131-2.
- Kisielinski, K., S. Willis, A. Prescher, B. Klosterhalfen, and V. Schumpelick. 2002. A simple new method to calculate small intestine absorptive surface in the rat. *Clin Exp Med.* 2:131-135. doi:10.1007/s102380200018.
- Kitessa, S. M., N. S. Gregory, R. E. A. Forder, H. A. McGrice, S-B. Wu, and R. J. Hughes. 2014. Mucin gene mRNA levels in broilers challenged with *Eimeria* and/or *Clostridium perfringens*. *Avian Dis.* 58:408-414. doi:10.1637/10757-122313-Reg.1.
- Koynarski, V., S. Stoev, N. Grozeva, T. Mirtcheva, H. Daskalov, J. Mitev, and P. Mantle. 2007. Experimental coccidiosis provoked by *Eimeria acervulina* in chicks simultaneously fed on ochratoxin A contaminated diet. *Res Vet Sci.* 82:225-231. doi:10.1016/j.rvsc.2006.07.004.
- Lee, J. 2012. Molecular basis of feed efficiency in meat-type chickens. Thesis. Faculty of the University of Georgia, Athens, Georgia, USA.

- Lillehoj, H. S., and J. M. Trout. 1996. Avian gut-associated lymphoid tissues and intestinal immune responses to *Eimeria* parasites. *Clin Microbiol Rev.* 9:349-360.
- Lillehoj, H. S., and K. S. Chung. 1992. Postnatal development of T-lymphocyte subpopulations in the intestinal intraepithelium and lamina propria in chickens. *Vet Immunol Immunopathol.* 31:347-360.
- Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods.* 25:402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262.
- Lüder, C. G., U. Gross, and M. F. Lopes. 2001. Intracellular protozoan parasites and apoptosis: diverse strategies to modulate parasite-host interactions. *Trends Parasitol.* 17:480-486.
- Major, J. R. Jr., and M. D. Ruff. 1978. Disaccharidase activity in the intestinal tissue of broilers infected with coccidia. *J Parasitol.* 64:706-711.
- Mamaug, R. E. P., J. Gao, B. T. Nguyen, and J. A. Ragaza. 2012. Supplementations of DL-Methionine and methionine dipeptide in diets are effective for the development and growth of larvae and juvenile Red Sea Bream, *Pagrus major*. *J World Aquac Soc.* 43:362-374. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2012.00563.x>
- Matthews, D. M and S. A. Adibi. 1976. Peptide absorption. *Gastroenterology.* 71:151-161.
- Melkamu, S., M. Chanie, and M. Asrat. 2018. Haematological changes caused by coccidiosis in experimentally infected broiler chickens. *Journal of Animal Research.* 8:345-351. doi:10.30954/2277-940X.06.2018.2.
- Miska, K. B., and R. H. Fetterer. 2018. The effect of *Eimeria maxima* infection on the expression of amino acid and sugar transporters aminopeptidase, as well as the di- and tri-peptide transporter PepT1, is not solely due to decreased feed intake. *Poult Sci.* 97:1712-1721. doi:10.3382/ps/pey015.
- Nunes, A. J. P., H. Sabry-Neto, F. H. P. Silva, A. R. Oliveira-Neto, and K. Masagounder. 2018. Multiple feedings enhance the growth performance and feed efficiency of juvenile *Litopenaeus vannamei* when fed a low-fish meal amino acid-supplemented diet. *Aquac. Int.* 27:337-347. doi:<https://doi.org/10.1007/s10499-018-0330-7>.
- Okumura, R., and K. Takeda. 2017. Roles of intestinal epithelial cells in the maintenance of gut homeostasis. *Exp Mol Med.* 49:1-8. doi:10.1038/emm.2017.20.

- Paris, N. E., and E. A. Wong. 2013. Expression of digestive enzymes and nutrient transporters in the intestine of *Eimeria maxima*-infected chickens. *Poult Sci.* 92:1331-1335. doi:10.3382/ps.2012-02966.
- Park, S. S., H. S. Lillehoj, P. C. Allen, D. W. Park, S. FitzCoy, D. A. Bautista, and Lillehoj, E. P. 2008. Immunopathology and cytokine responses in broiler chickens coinfectd with *Eimeria maxima* and *Clostridium perfringens* with the use of an animal model of necrotic enteritis. *Avian Dis.* 52:14-22. doi:10.1637/7997-041707-Reg.
- Peek, H. W., and Landman, W. J. M. 2011. Coccidiosis in poultry: anticoccidial products, vaccines and other prevention strategies. *Vet Q.* 31:143-161. doi:https://doi.org/10.1080/01652176.2011.605247.
- Rath, N. C., N. B. Anthony, L. Kannan, W. E. Huff, G. R. Huff, H. D. Chapman, G. F. Erf, and P. Wakenell. 2009. Serum ovotransferrin as a biomarker of inflammatory diseases in chickens. *Poult Sci.* 88:2069-2074. doi:10.3382/ps.2009-00076.
- Richards, M. P., R. W. Rosebrough, C. N. Coon, and J. P. McMurtry. 2010. Feed intake regulation for the female broiler breeder: In theory and in practice. *The Journal of Applied Poultry Research.* 19:182-193. doi:https://doi.org/10.3382/japr.2010-00167.
- Robertson, A. M., and Wright, D. P. 1997. Bacterial glycosulphatases and sulphomucin degradation. *Can J Gastroenterol.* 11:361-366.
- Rock, K. L., and H. Kono. 2008. The inflammatory response to cell death. *Annu Rev Pathol.* 3:99-126. doi:10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151456.
- Rostagno, H. S., L. F. T. Albino, J. L. Donzele, P. C. Gomes, R. F. Oliveira, D. C. Lopes, A. S. Ferreira, S. L. T. Barreto, and R. F. Euclides. 2011. Brazilian tables for poultry and swine: composition of feedstuffs and nutritional requirements, 3rd rev. ed. UFV, Viçosa, BR.
- Ruff, M. D., D. R. Witlock, and R. R. Smith. 1976. *Eimeria acervulina* and *E. tenella*: effect on methionine absorption by the avian intestine. *Exp Parasitol.* 39:244-251.
- Ruth, M. R. and C. J. Field. 2013. The immune modifying effects of amino acids on gut-associated lymphoid tissue. *J Anim Sci Biotechnol.* 4:1-10. doi:10.1186/2049-1891-4-27.
- Sakamoto, M., D. E. Faria, V. S. Nakagi, and A. E. Murakami. 2014. Sources of trophic action on performance and intestinal morphometry of broiler chickens vaccinated

- against coccidiosis. Rev. Bras. Ciênc. Avic. 16:389-396. doi:<http://dx.doi.org/10.1590/1516-635X1604389-396>.
- Samanta, P., S. Pal, A. K. Mukherjee, T. Senapati, and A. R. Ghosh. 2014. Effects of almix herbicide on metabolic enzymes in different tissues of three teleostean fishes *Anabas testudineus*, *Heteropneustes fossilis* and *Oreochromis niloticus*. International Journal of Scientific Research in Environmental Sciences. 2:156-163. doi:<http://dx.doi.org/10.12983/ijres-2014-p0156-0163>.
- Sant'Ana, D. M., M. B. Góis, J. N. Zanoni, A. V. Silva, C. J. Silva, and E. J. Araújo. 2012. Intraepithelial lymphocytes, goblet cells and VIP-IR submucosal neurons of jejunum rats infected with *Toxoplasma gondii*. Int J Exp Pathol. 93:279-286. doi:[10.1111/j.1365-2613.2012.00824.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2012.00824.x).
- Settle, T. and H. Klandorf. 2014. The Role of Uric Acid as an Antioxidant in Selected Neurodegenerative Disease Pathogenesis: A short review. Brain Disorders & Therapy. 3:1-5. doi:[10.4172/2168-975X.1000129](https://doi.org/10.4172/2168-975X.1000129).
- Seyyedini, S., and Nazem M. N. 2017. Histomorphometric study of the effect of methionine on small intestine parameters in rat: an applied histologic study. Folia Morphol. 76:620-629. doi: [10.5603/FM.a2017.0044](https://doi.org/10.5603/FM.a2017.0044).
- Shao, Y., P. G. Wolf, S. Guo, Y. Guo, H. R. Gaskins, and B. Zhang. 2017. Zinc enhances intestinal epithelial barrier function through the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in Caco-2 cells. J Nutr Biochem. 43:18-26. doi:[10.1016/j.jnutbio.2017.01.013](https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.01.013).
- Sharma, S., S. Azmi, A. Iqbal, N. Nasirudullah, and I. Mushtaq. 2015. Pathomorphological alterations associated with chicken coccidiosis in Jammu division of India. J Parasit Dis. 39:147-151. doi:[10.1007/s12639-013-0302-9](https://doi.org/10.1007/s12639-013-0302-9).
- Sharma, V. D., and M. A. Fernando. 1973. Effect of *Eimeria acervulina* infection on nutrient retention with special reference to fat malabsorption in chickens. Can J Comp Med. 39:146-154.
- Showkat, M., M. A. Beigh, and K. I. Andrabi. 2014. mTOR Signaling in protein translation regulation: implications in cancer genesis and therapeutic interventions. Mol Biol Int. 2014:1-14. doi:[10.1155/2014/686984](https://doi.org/10.1155/2014/686984).

- Silk, D. B., P. J. Kumar, D. Perrett, M. L. Clark, and A. M. Dawson. 1974. Amino acid and peptide absorption in patients with coeliac disease and dermatitis herpetiformis. *Gut*. 15:1-8
- Silva, J. M., A. V. Silva, E. J. A. Araújo, and D. M. G. Sant'Ana. 2010. Efeitos da infecção crônica por *Toxoplasma gondii* sobre a parede intestinal de gatos domésticos. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 19:55-61. doi:http://dx.doi.org/10.4322/rbpv.01901010.
- Silva, M. A., B. M. S. Pessotti, S. F. Zanini, G. L. Colnago, M. R. A. Rodrigues, L. C. Nunes, M. S. Zanini, and I. V. F. Martins. 2009. Intestinal mucosa structure of broiler chickens infected experimentally with *Eimeria tenella* and treated with essential oil of oregano. *Cienc. Rural*. 39:1471-1477. doi:http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782009005000135.
- Stadnyk, A. W. 2002. Intestinal epithelial cells as a source of inflammatory cytokines and chemokines. *Can J Gastroenterol*. 16:241-246. doi:10.1155/2002/941087.
- Su, S., K. B. Miska, R. H. Fetterer, M. C. Jenkins, and E. A. 2015. Expression of digestive enzymes and nutrient transporters in *Eimeria*-challenged broilers. *Exp Parasitol*. 150:13-21. doi:10.1016/j.exppara.2015.01.003.
- Symons, L. E. A. 1965. Kinetics of the epithelial cells, and morphology of villi and crypts in the jejunum of the rat infected by the nematode *Nippostrongylus brasiliensis*. *Gastroenterology* 49:158-168.
- Tan, J., T. J. Applegate, S. Liu, Y. Guo, and S. D. Eicher. 2014. Supplemental dietary L-arginine attenuates intestinal mucosal disruption during a coccidial vaccine challenge in broiler chickens. *Br J Nutr*. 112:1098-1109. doi:10.1017/S0007114514001846.
- Tesseraud, S., N. Everaert, S. B-O. Ezzine, A. Collin, S. Métayer-Coustard, and C. Berri. 2011. Manipulating tissue metabolism by amino acids. *Worlds Poult Sci J*. 67:243-252. doi:10.1017/S0043933911000274.
- Trevizan, A. R., S. L. Vicentino-Vieira, P. S. Watanabe, M. B. Góis, G. A. N. Melo, J. L. Garcia, E. J. A. Araújo, and D. M. G. Sant'Ana. 2016. Kinetics of acute infection with *Toxoplasma gondii* and histopathological changes in the duodenum of rats. *Exp Parasitol*. 165:22-29. doi:10.1016/j.exppara.2016.03.015.
- Van Klinken, B. J., A. W. Einerhand, H. A. Büller, and J. Dekker. 1998. Strategic biochemical analysis of mucins. *Anal Biochem*. 265:103-116.

- Vaux, D. L., and Strasser, A. 1996. The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:2239-2244.
- Williams, G. T. 1994. Programmed cell death: a fundamental protective response to pathogens. *Trends Microbiol.* 2:463-464.
- Yan, Z., Z. Ming-xue, X. Zhi-yong, X. Huan-cheng, C. Xiao-zhen, Y. Sha-sha, Z. Wen-long, L. Shan, L. Qiang-hua, and B. Rui. 2015. Relationship between *Eimeria tenella* development and host cell apoptosis in chickens. *Poult Sci.* 94:2970-2979. doi:<https://doi.org/10.3382/ps/pev293>.
- Yang, H., X. Xiong, X. Wang, and Y. Yin. 2016. Mammalian target of rapamycin signaling pathway changes with intestinal epithelial cells renewal along crypt-villus Axis. *Cell Physiol Biochem.* 39:751-759. doi: 10.1159/000445665.
- Zuniga, M. C., G. Raghuraman, and W. Zhou. 2018. Physiologic levels of resistin induce a shift from proliferation to apoptosis in macrophage and VSMC co-culture. *Surgery.* 163:906-911. doi:10.1016/j.surg.2017.10.051.

VI. CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados demonstraram os prejuízos causados pelo desafio por *Eimeria* spp., e como essa infecção prejudica o desempenho produtivo dos animais, provavelmente por induzir danos na mucosa intestinal e o estresse oxidativo, com conseqüente deformação e destruição celular, afetando a funcionalidade do jejuno. Adicionalmente, foi possível concluir que a suplementação de metionina para animais saudáveis, promove melhor desempenho, possivelmente por meio da sua função no metabolismo proteico. Os resultados também mostraram que a suplementação com metionina na forma de aminoácido livre ou de dipeptídeo, ajuda a proteger as células intestinais do dano oxidativo induzido por radicais livres, principalmente por meio da sua função antioxidante. Além disso, a suplementação de metionina na forma de dipeptídeo, sobretudo em condições de desafios entéricos, que causa a destruição celular e redução na capacidade de digestão e absorção, poderia funcionar como um importante elemento capaz de manter a morfologia e função das células intestinais.

