

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
CÂMPUS DE BOTUCATU

INFLUÊNCIA DAS FONTES E INCLUSÕES DE COBRE, ZINCO E MANGANÊS  
NO DESEMPENHO, RENDIMENTO DE CARCAÇA E PERFIL DE  
METALOPROTEÍNAS EM FRANGOS DE CORTE

ARMANDO CARLOS CONTIN NETO

Tese apresentada ao Programa de  
Pós Graduação em Zootecnia  
como parte das exigências para  
obtenção do título de Doutor em  
Zootecnia.

BOTUCATU – SP  
Agosto – 2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
CÂMPUS DE BOTUCATU

INFLUÊNCIA DAS FONTES E INCLUSÕES DE COBRE, ZINCO E MANGANÊS  
NO DESEMPENHO, RENDIMENTO DE CARCAÇA E PERFIL DE  
METALOPROTEÍNAS EM FRANGOS DE CORTE

ARMANDO CARLOS CONTIN NETO  
ZOOTECNISTA

Orientador: Prof. Dr. Antonio Celso Pezzato

Tese apresentada ao Programa de  
Pós Graduação em Zootecnia  
como parte das exigências para  
obtenção do título de Doutor em  
Zootecnia.

BOTUCATU – SP  
Agosto – 2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Contin Neto, Armando Carlos.

Influência das fontes e inclusões de cobre, zinco e manganês no desempenho, rendimento de carcaça e perfil de metaloproteínas em frangos de corte / Armando Carlos Contin Neto. - Botucatu, 2023

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Antonio Celso Pezzato

Coorientador: José Henrique Stringhini

Coorientador: Pedro de Magalhães Padilha

Capes: 50403001

1. Marcadores bioquímicos. 2. Suplementos dietéticos - nutrição animal. 3. Metaloproteínas. 4. Minerais. 5. Proteômica.

Palavras-chave: Biomarcadores; Hidroxicloreto; Metal Binding Protein; Mineral; Proteômica.

## Biografia do Autor

Armando Carlos Contin Neto nasceu no dia 02 de setembro de 1993, em Santa Cruz do Rio Pardo/SP, filho de Silvia Contin. Em março/2012 ingressou no curso de Zootecnia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, UNESP, Campus de Botucatu, concluindo em dezembro/2016. Durante a graduação foi bolsista de iniciação científica, e treinamento técnico e participou de projetos de extensão, com bolsa financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e do Programa Institucional de Iniciação Científica (PIBIC), respectivamente. Em março/2017 iniciou o curso de mestrado pelo Programa de Pós Graduação em Zootecnia da FMVZ – UNESP, Campus de Botucatu, com ênfase em nutrição e digestibilidade de dietas de frangos de corte, com bolsa de estudos e financiamento da pesquisa pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), tendo concluído em fevereiro/2019. Em março/2020 iniciou o curso de doutorado pelo Programa de Pós Graduação em Zootecnia da FMVZ – UNESP, Campus de Botucatu, também com ênfase em nutrição de frangos de corte e proteômica aplicada à nutrição e metabolismo animal.

## **Dedicatória**

Dedico, especialmente, à minha mãe ***Silvia*** e ao meu padrasto ***Edvaldo*** por sempre me apoiarem e acreditarem em mim. Dedico também aos meus avós, sr. ***Armando*** e sra. ***Maria do Carmo***, por entenderem a minha ausência além de serem a minha maior torcida e referência.

Sem o apoio e amor de vocês eu jamais conseguiria e por isso esse trabalho também é de vocês e por vocês.

Com todo meu carinho,

Neto

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à toda minha família pelo grande suporte e torcida. Por entenderem a minha ausência e acreditarem que tudo era para um bem maior.

Agradeço ao meu orientador, prof. Dr. *Antonio Celso Pezzato* por ter aceito o desafio de me orientar, pelos conselhos, amizade e toda contribuição para que esta pesquisa se tornasse possível. Agradeço sobretudo à sua disposição em me atender e, sempre transmitir tranquilidade e compreensão. Sem dúvida essas características do senhor muito me ajudaram e me inspiraram!

Agradeço ao meu coorientador prof. Dr. *José Roberto Sartori* por toda a ajuda e conhecimento compartilhado, pela compreensão e apoio em todas as decisões tomadas até a conclusão dessa pesquisa. Agradeço pelos bons anos desde a graduação que muito contribuíram para minha formação profissional e pessoal.

Agradeço também o professor Dr. *Pedro de Magalhães Padilha* por ceder gentilmente e prontamente seu laboratório e muito nos ajudar no entendimento dos achados; ao prof. Dr. *José Henrique Stringhini* pela amizade e boas conversas que muito me incentivaram a continuar. Agradeço também ao amigo Dr. *José Cavalcante Sousa Vieira* pela paciência e por toda ajuda durante as análises.

Ao *Programa de Pós Graduação em Zootecnia*, em especial à *Claudia Cristina Moreci* por me ajudar com o cumprimento dos prazos e deveres, sempre com um olhar maternal.

Agradeço aos amigos *Izabela da Cunha Bataglioli (Ximit)* e *Rafael Bernardo de Mello (Preguinho)* por todos esses anos de amizade e por todo o suporte ao longo de todo esse tempo, sempre ouvindo minhas queixas e sempre com uma palavra amiga e de conforto para me acolher. Sem sombra de dúvidas vocês fizeram a diferença na minha caminhada até aqui e por isso sempre estarei presente, seja em pensamento ou oração. Espero compartilhar com vocês o fruto de cada conquista que está por vir!

Agradeço aos amigos *Marcos, Gustavo e Daniel* pelos almoços aos domingos, as conversas e os cafés. Vocês ajudaram que tudo se tornasse mais leve.

Às amigas de “trouwbalho” *Laura, Taymara e Deborah* pela amizade, pela paciência e por me apioarem e acreditarem em mim!

Agradeço aos amigos do *Laboratório de Nutrição de Aves* em todas as atividades do experimento, em especial à amiga *Lais Cordeiro* por toda disposição, proatividade e empenho. À amiga *Julianna Batistiolli* por se fazer presente mesmo longe e ser uma amiga que quero levar pra toda a vida.

Agradeço ao amigo *Wanderley Thiago da Silva* por sempre estar presente e muito me aconselhar. Suas “implicancias” fizeram a diferença e sou grato por tudo.

Agradeço a todo pessoal da *Supervisão de Fazendas, Fábrica de Ração e Abatedouro Experimental* pela prontidão em me ajudar.

Agradeço à profa Dra. *Ibiara Correia de Lima Almeida Paz* pelas conversas, amizade e orientação durante o PAADS. A senhora foi fundamental para que tudo isso se concretizasse.

Agradeço à *Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Campus de Botucatu por me permitir uma vivência tão rica e prazerosa e por realizar um sonho. Espero, de coração, que muitos outros tenham as mesmas oportunidades que eu tive com ensino, pesquisa e extensão de qualidade e excelência.

Agradeço à empresa *Trouw Nutrition Brasil Nutrição Animal* pelo financiamento dessa pesquisa, em especial à dra. *Karolina Von Zuben Augusto* por confiar em mim para execução do experimento.

À todos os amigos e pessoas que cruzaram por mim durante esses anos na terra dos bons ares. Minha estadia por esta cidade me transformou em uma pessoa melhor e por isso toda minha gratidão e carinho por essa cidade tão especial.

Por fim, agradeço a todos novamente. A contribuição de cada um me motivou e permitiu que esse ciclo chegasse ao fim.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## **EPÍGRAFE**

*A sorte favorece os corajosos!*  
*Seja forte e corajoso!*



## RESUMO GERAL

A suplementação de microminerais é indispensável para atender as exigências de frangos de corte. Cobre, Zinco e Manganês desempenham uma série de funções bioquímicas que permitem o bom funcionamento do organismo animal, garantindo suporte estrutural, fisiológico, regulatório e catalítico. Porém nem todas as fontes de microminerais disponíveis comercialmente apresentam características que favoreçam sua absorção. Os hidroximenerais (HCM) representam a terceira geração da suplementação mineral devido suas características químicas diferenciadas das fontes usuais que trazem benefícios sobre os parâmetros de desempenho e saúde das aves. Diversas pesquisas já foram conduzidas a fim de elucidar o efeito das fontes e níveis de microminerais sobre os parâmetros zootécnicos, status de saúde e bem-estar de frangos de corte. No entanto, nenhum estudo avaliou os efeitos das diferentes fontes e níveis de Cu, Zn e Mn sobre o metabolismo de metaloproteínas em frangos de corte. Esta pesquisa corresponde ao estudo de desempenho zootécnico e estudo proteômico de tecido hepático e plasmático de frangos de corte, divididos em três capítulos principais, respectivamente.

**Capítulo II** – O objetivo dessa pesquisa foi avaliar o efeito de diferentes fontes (hidroxicloreto e sulfato) e diferentes níveis de Cobre, Zinco e Manganês sobre o desempenho de frangos de corte, rendimento de partes de carcaça, bem como avaliar o potencial antimicrobiano do Cobre. Foram utilizados 1080 pintos de um dia de idade (COBB 500), distribuídos em quatro tratamentos experimentais: Controle + (15 ppm Cu, 80 ppm Zn e 80 ppm Mn na forma sulfato + 50 ppm de avilamicina), Controle – (15 ppm Cu, 80 ppm Zn e 80 ppm Mn na forma sulfato), Baixo HCM (15 ppm Cu, 40 ppm Zn e 40 ppm Mn na forma hidroxicloretos), Alto HCM (15 ppm Cu, 80 ppm Zn e 80 ppm Mn na forma hidroxicloreto). As avaliações de desempenho foram feitas semanalmente e no 42º dia de criação três aves foram escolhidas ao acaso para avaliação do rendimento de partes. A avaliação de desempenho e rendimento de partes demonstrou que os hidroxicloretos apresentam o mesmo resultado que a fonte sulfato mesmo com adição de aditivo promotor. A suplementação de minerais na forma hidroxicloretos podem ser feitas em 50% do nível recomendado pelos guias nutricionais. Desse modo, é possível dispensar o uso de promotor de crescimento e suplementar Cu, Zn e Mn em 50% abaixo do recomendado quando usado as fontes hidroxicloretos.

**Capítulo III** – O objetivo dessa pesquisa foi avaliar o proteoma plasmático de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de Cobre, Zinco e Manganês, utilizando ferramentas metaloproteômicas. Foram considerados três tratamentos: Sulf Controle (15 ppm Cu, 80 ppm Zn e 80 ppm Mn na forma sulfato), Baixo HCM (15 ppm Cu, 40 ppm Zn e 40 ppm Mn na forma hidroxicloretos) e HCM Controle (15 ppm Cu, 80 ppm Zn e 80 ppm Mn na forma hidroxiclreto). Para a pesquisa, foram feitos três *pools* de plasma de 9 aves/tratamento no 42º dia de idade. Os *pools* foram submetidos aos procedimentos de extração proteica para obtenção do proteoma e posterior caracterização, identificação dos níveis funcionais, via metabólicas e interações das proteínas associadas com os minerais estudados. A análise proteômica demonstrou indução de proteínas associadas com sistema imune e o crescimento celular (IGLL1 – imunoglobulina lambda cadeia leve e cadeia pesada e RC3H1 – Ring finger and CCCH-type domains 1), proteínas envolvidas no metabolismo do oxigênio (HBE e HBG2 – hemoglobina subunidade alfa e hemoglobina subunidade beta) e transporte de nutrientes (RBP4 – retinol binding protein 4), sugerindo envolvimento dessas proteínas com os minerais estudados e a chance de serem possíveis biomarcadores.

**Capítulo IV** – O objetivo dessa pesquisa foi avaliar o proteoma hepático de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de Cobre, Zinco e Manganês utilizando ferramentas metaloproteômicas. Foram considerados três tratamentos (Sulf Controle (15 ppm Cu, 80 ppm Zn e 80 ppm Mn na forma sulfato), Baixo HCM (15 ppm Cu, 40 ppm Zn e 40 ppm Mn na forma hidroxicloretos) e HCM Controle (15 ppm Cu, 80 ppm Zn e 80 ppm Mn na forma hidroxiclreto). Para a pesquisa foram feitos três *pools* de fígado de 9 aves/tratamento, no 42º dia de idade. Os *pools* foram submetidos aos procedimentos de extração proteica para obtenção do proteoma e posteriormente caracterização, identificação dos níveis funcionais, via metabólicas e interações das proteínas associadas com os minerais estudados. A análise proteômica demonstrou indução de proteínas associadas os processos biológicos e componente celular, com funções de transporte de nutrientes e produção de energia como a ALDOB (frusctose-biphosfate aldolase B) e ATP Sintetase Subunidade  $\beta$  (ATP5b), respectivamente, sugerindo envolvimento dessas proteínas com os minerais estudados e a chance de serem possíveis biomarcadores.

**Palavras Chave:** biomarcadores, hidroxiclreto, mineral, *metal binding protein*, proteômica.

## ABSTRACT

Micromineral supplementation is essential to meet the requirements of broiler chickens. Copper, Zinc and Manganese perform a series of biochemical functions that allow the animal organism to function properly, ensuring structural, physiological, regulatory and catalytic support. However, not all sources of commercially available microminerals have characteristics that favor their absorption. The hydroxyminerals represent the third generation of mineral supplementation due to their chemical characteristics different from the usual sources that bring benefits on the parameters of performance and health of the birds. Several studies have already been conducted in order to elucidate the effect of sources and levels of microminerals on the zootechnical parameters, health status and well-being of broiler chickens. However, no study has evaluated the effects of different sources and levels of Cu, Zn and Mn on metal binding protein metabolism in broiler chickens. This study corresponds to the study of zootechnical performance and the proteomic study of liver and plasma tissue of broiler chickens, divided into three main chapters, respectively.

**Paper II** – The objective of this study was to evaluate the effect of different sources (hydroxychloride and sulfate) and different levels of Copper, Zinc and Manganese on the performance of broilers, yield of parts, as well as to evaluate the antimicrobial potential of Copper. A total of 1080 one-day-old chicks (COBB 500) were used, divided into four experimental treatments: Control + (15 ppm Cu, 80 ppm Zn and 80 ppm Mn in sulfate form + 50 ppm of avilamycin), Control – (15 ppm Cu, 80 ppm Zn and 80 ppm Mn in sulfate form), Low HCM (15 ppm Cu, 40 ppm Zn and 40 ppm Mn in hydroxychloride form), High HCM (15 ppm Cu, 80 ppm Zn and 80 ppm Mn in hydroxychloride form). Performance evaluations were made weekly and on the 42nd day of rearing, three birds were chosen at random to evaluate the yield of parts. The evaluation of the performance and yield of parts showed that the hydroxychlorides present the same result as the sulphate sources even with the addition of a promoter additive. Supplementation of minerals in the form of hydroxychlorides can be done at 50% of the level recommended by nutritional guides. Thus, it is possible to dispense with the use of growth promoter and supplement Cu, Zn and Mn at 50% below the recommended level when using hydroxychloride sources.

**Paper III** – The aim of this study was to evaluate the plasma proteome of broilers supplemented with different sources and levels of Copper, Zinc and Manganese, using

metalloproteomics tools. Three treatments were considered: Sulf Control (15 ppm Cu, 80 ppm Zn and 80 ppm Mn in sulfate form), Low HCM (15 ppm Cu, 40 ppm Zn and 40 ppm Mn in hydroxychloride form) and HCM Control (15 ppm Cu, 80 ppm Zn and 80 ppm Mn in the hydroxychloride form). For the study, three plasma pools of 9 birds/treatment were made. The pools were subjected to protein extraction procedures to obtain the proteome and subsequent characterization, identification of functional levels, metabolic pathways and interactions of proteins associated with the studied minerals. Proteomic analysis demonstrated induction of proteins associated with the immune system and cell growth (IGLL1 – lambda immunoglobulin light chain and heavy chain and RC3H1 – Ring finger and CCCH-type domains 1), involved in oxygen metabolism (HBE and HBG2 – hemoglobin subunit alpha and hemoglobin beta subunit) and nutrient transport (RBP4 – retinol binding protein 4), suggesting involvement of these proteins with the studied minerals and the chance of being possible biomarkers.

**Paper IV** – The aim of this study was to evaluate the hepatic proteome of broiler chickens supplemented with different sources and levels of Copper, Zinc and Manganese using metalloproteomics tools. Three treatments were considered (Sulf Control (15 ppm Cu, 80 ppm Zn and 80 ppm Mn in sulfate form), Low HCM (15 ppm Cu, 40 ppm Zn and 40 ppm Mn in hydroxychloride form) and HCM Control (15 ppm Cu, 80 ppm Zn and 80 ppm Mn in the hydroxychloride form). For the study, three liver pools of 9 birds/treatment were made. The pools were submitted to protein extraction procedures to obtain the proteome and later characterization, identification of the functional levels, via Metabolic reactions and interactions of proteins associated with the minerals studied. Proteomic analysis demonstrated induction of proteins associated with biological processes and cellular component, with nutrient transport functions and production of such as ALDOB (fructose-biphosphate aldolase B) and ATP Synthetase Subunit  $\beta$  (ATP5b), respectively, suggesting involvement of these proteins with the minerals studied and the chance of being possible biomarkers.

**Key words:** biomarkers, hydroxychloride, mineral, metal binding protein, proteomics.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO III

**Figura 1.** Rede de interação entre proteínas identificadas na comparação entre o grupo Sulf. Controle vs Baixo HCM e diferencialmente expressas no plasma de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de cobre, zinco e manganês .....70

**Figura 2.** Rede de interação entre proteínas identificadas na comparação entre o grupo Sulf. Controle vs Controle HCM e diferencialmente expressas no plasma de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de cobre, zinco e manganês .....72

**Figura 3.** Rede de interação entre proteínas identificadas na comparação entre o grupo Baixo HCM vs Controle HCM e diferencialmente expressas no plasma de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de cobre, zinco e manganês .....73

### CAPÍTULO IV

**Figura 1.** Anotação funcional das proteínas identificadas na comparação entre Sulf. Contole vs Baixo HCM do tecido hepático de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de Cobre, Zinco e Manganês .....109

**Figura 2.** Anotação funcional das proteínas identificadas na comparação entre Sulf. Contole vs HCM Controle do tecido hepático de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de Cobre, Zinco e Manganês .....110

**Figura 3.** Anotação funcional das proteínas identificadas na comparação entre Baixo HCM vs. HCM Controle do tecido hepático de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de Cobre, Zinco e Manganês .....110

**Figura 4.** Rede de interação entre proteínas identificadas na comparação entre o grupo Sulf. Controle vs Baixo HCM e diferencialmente expressas no tecido hepático de frangos de cprte suplementados com diferentes fontes e níveis de cobre, zinco e manganês ...111

**Figura 5.** Rede de interação entre proteínas identificadas na comparação entre o grupo Sulf. Controle vs HCM Controle e diferencialmente expressas no tecido hepático de frangos de cprte suplementados com diferentes fontes e níveis de cobre, zinco e manganês .....112

**Figura 6.** Rede de interação entre proteínas identificadas na comparação entre o grupo Sulf. Controle vs HCM Controle e diferencialmente expressas no tecido hepático de frangos de cprte suplementados com diferentes fontes e níveis de cobre, zinco e manganês .....113

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

|                                                                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1.</b> Níveis de suplementação (mg/kg) e fontes de Cu, Mn e Zn em dietas experimentais de frangos de corte .....                        | 46 |
| <b>Tabela 2.</b> Ingredientes (kg) e composição nutricional (por quilo de ração) das dietas experimentais .....                                   | 46 |
| <b>Tabela 3.</b> Desempenho de frangos de corte de 1-21 dias de idade suplementados com diferentes fontes e níveis de minerais Cu, Zn e Mn .....  | 49 |
| <b>Tabela 4.</b> Desempenho de frangos de corte de 1-42 dias de idade suplementados com diferentes fontes e níveis de minerais Cu, Zn e Mn .....  | 50 |
| <b>Tabela 5.</b> Rendimentos de cortes de frangos de corte aos 42 dias de idade suplementados com diferentes níveis e fontes de Cu, Zn e Mn ..... | 51 |

### CAPÍTULO III

|                                                                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1.</b> Tratamentos experimentais e níveis de suplementação (mg/kg) e fontes de Cu, Mn e Zn em dietas de frangos de corte .....                                      | 67 |
| <b>Tabela S1.</b> Expressão de proteínas frente à análise dos termos de ontologia genética e status de expressão frente às comparações com os tratamentos experimentais ..... | 85 |

### CAPÍTULO IV

|                                                                                                                                                                                                                                                                  |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tabela S1.</b> Expressão de proteínas de tecido hepático de frangos de corte frente à análise dos termos de ontologia genética e status de expressão frente às comparações com os tratamentos experimentais (diferentes níveis e fontes de Cu, Zn e Mn) ..... | 120 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                           |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>CAPÍTULO I .....</b>                                                                                                                   | <b>17</b> |
| CONSIDERAÇÕES INICIAIS .....                                                                                                              | 18        |
| 1 REVISÃO DE LITERATURA .....                                                                                                             | 19        |
| 1.1 <i>Minerais Hidroxicloreto</i> s .....                                                                                                | 19        |
| 1.2 <i>Cobre (Cu)</i> .....                                                                                                               | 20        |
| 1.3 <i>Manganês (Mn)</i> .....                                                                                                            | 22        |
| 1.4 <i>Zinco (Zn)</i> .....                                                                                                               | 24        |
| 1.5 <i>Proteômica aplicada na avicultura</i> .....                                                                                        | 26        |
| 2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVO .....                                                                                                          | 29        |
| 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....                                                                                                         | 30        |
| <b>CAPÍTULO II.....</b>                                                                                                                   | <b>40</b> |
| <i>“Suplementação de Cobre, Zinco e Manganês sobre o desempenho e rendimento de partes de frangos de corte desafiados com coccidiose”</i> |           |
| RESUMO .....                                                                                                                              | 41        |
| INTRODUÇÃO.....                                                                                                                           | 42        |
| MATERIAL E MÉTODOS.....                                                                                                                   | 45        |
| <i>Aves, Dietas e Tratamentos Experimentais</i> .....                                                                                     | 45        |
| <i>Avaliação de Desempenho</i> .....                                                                                                      | 48        |
| <i>Avaliação Rendimento de Partes de Carcaça</i> .....                                                                                    | 48        |
| <i>Análise Estatística</i> .....                                                                                                          | 49        |
| RESULTADOS .....                                                                                                                          | 49        |
| <i>Desempenho</i> .....                                                                                                                   | 49        |

|                                                                                                                                          |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <i>Rendimento de Partes da Carcaça</i> .....                                                                                             | 50         |
| DISCUSSÃO .....                                                                                                                          | 51         |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                                                                                         | 56         |
| <b>CAPÍTULO III</b> .....                                                                                                                | <b>62</b>  |
| <i>“Perfil de metaloproteínas de plasma de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de Cobre, Zinco e Manganês”</i> |            |
| RESUMO .....                                                                                                                             | 63         |
| INTRODUÇÃO .....                                                                                                                         | 64         |
| MATERIAL E MÉTODOS .....                                                                                                                 | 66         |
| <i>Aves, Dietas e Tratamentos Experimentais</i> .....                                                                                    | 66         |
| <i>Coleta de Amostras</i> .....                                                                                                          | 67         |
| <i>Extração e Quantificação de Proteínas</i> .....                                                                                       | 67         |
| <i>Digestão de Proteínas em Solução</i> .....                                                                                            | 68         |
| <i>Identificação e Análise de Bioinformática e Expressão de Proteínas</i> .....                                                          | 69         |
| RESULTADOS .....                                                                                                                         | 69         |
| DISCUSSÃO .....                                                                                                                          | 74         |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                                                                                         | 79         |
| MATERIAL SUPLEMENTAR .....                                                                                                               | 85         |
| <b>CAPÍTULO IV</b> .....                                                                                                                 | <b>102</b> |
| <i>“Perfil de metaloproteínas de fígado de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de Cobre, Zinco e Manganês”</i> |            |
| RESUMO .....                                                                                                                             | 103        |
| INTRODUÇÃO .....                                                                                                                         | 104        |



|                                                                                 |     |
|---------------------------------------------------------------------------------|-----|
| MATERIAL E MÉTODOS .....                                                        | 105 |
| <i>Aves, Dietas e Tratamentos Experimentais</i> .....                           | 105 |
| <i>Coleta de Amostras</i> .....                                                 | 106 |
| <i>Extração e Quantificação de Proteínas</i> .....                              | 107 |
| <i>Digestão de Proteínas em Solução</i> .....                                   | 107 |
| <i>Identificação e Análise de Bioinformática e Expressão de Proteínas</i> ..... | 108 |
| RESULTADOS .....                                                                | 109 |
| DISCUSSÃO.....                                                                  | 113 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                                | 116 |
| MATERIAL SUPLEMENTAR .....                                                      | 119 |
| IMPLICAÇÕES .....                                                               | 123 |

## **CAPÍTULO I**

## CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A nutrição representa umas das principais ferramentas que permitem resultados satisfatórios ao Brasil em relação à produção de frangos de corte. Além de sua essencialidade, a nutrição contribui significativamente nos custos da produção. Optar por estratégias nutricionais mais assertivas e tecnológicas, que atendam às exigências nutricionais, mantenham bom status de saúde e reduzam os riscos ambientais, permitem melhorar o desempenho de frangos de corte e tornar a produção ainda mais lucrativa.

Dentre todos os componentes da ração, apesar de serem exigidos em pequenas quantidades, os microminerais são indispensáveis para manter a produtividade na avicultura. Os microminerais estão presentes nos ingredientes de dietas de frangos de corte porém são encontrados em pequenas quantidades e, desse modo, a suplementação é obrigatória para atender a demanda fisiológica das aves (SUTTLE, 2010).

Os minerais são vitais para que todas as funções bioquímicas aconteçam normalmente, provendo suporte estrutural, regulatório e catalítico (SUTTLE, 2010), especialmente os microminerais como o Zinco (Zn), essencial para crescimento normal, reprodução, ossificação, síntese de DNA, divisão celular, expressão gênica e melhora da resposta imune através de linfócitos e anticorpos (ABD EL-HACK, 2017); o Cobre (Cu), também é essencial para o crescimento normal, bom funcionamento do sistema nervoso e como cofator de diversas enzimas do sistema imunológico, assim como o Manganês (Mn), mineral traço fundamental para o sistema antioxidante e sistema imune, formação óssea e como cofator de diversas enzimas (SUTTLE, 2010).

A suplementação de minerais em dietas animais começou ainda na década de 1920, tentando encontrar as exigências das aves, e as formas iniciais usadas eram as fontes inorgânicas. Até hoje, as fontes minerais comumente usadas nas dietas são as fontes inorgânicas (sulfatos, carbonatos, cloretos e óxidos). Mas, estes possuem pouca biodisponibilidade e por isso necessitam serem usados em altas concentrações para atender as necessidades fisiológicas das aves. Indiretamente, o excedente dos minerais suplementados que não é absorvido acaba sendo excretado criando problema ambiental, podendo ter efeito detrimental em plantas, microorganismos, animais e seres humanos. (SWAIN et al., 2020).

O fato dos minerais inorgânicos serem menos aproveitados pelo organismo das aves se deve pelas propriedades químicas dessas fontes. Elas são formadas por ligações iônicas altamente reativas que facilmente se dissociam no início do trato gastrointestinal das aves, favorecendo a interação com outros nutrientes, possibilitando a formação de quelatos entre minerais e/ou entre

minerais e proteínas ou aminoácidos por exemplo, reduzindo a absorção (COHEN e STEWARD, 2014; AGAPITO e SEYBOTH, 2017).

Em decorrência dos pontos negativos dos minerais inorgânicos, novas fontes passaram a ser estudadas, como os hidroxicloretos. Eles possuem ligações covalentes entre o mineral e grupos hidroxilas (OH). São menos reativos, e possuem ligações entre suas moléculas suficientemente fortes para evitar interações com outros nutrientes da dieta e as condições do trato gastrointestinal e, suficientemente fracas de modo que facilite sua dissociação e absorção no local desejado, proporcionando maior estabilidade e biodisponibilidade em comparação às demais fontes de minerais (COHEN e STEWARD, 2014; AGAPITO e SEYBOTH, 2017).

Sendo assim, com base na essencialidade dos microminerais Cu, Zn e Mn e, de acordo com as particularidades de cada fonte, esta pesquisa pretende avaliar: 1) o efeito de diferentes níveis e fontes sobre os parâmetros de desempenho e rendimento de partes de frangos de corte; 2) o potencial antimicrobiano do Cu em relação ao aditivo melhorador de crescimento e, 3) perfil de proteínas ligadas a metais (*metal binding protein*) de frangos de corte desafiados com superdosagem de vacina contra coccidiose.

## 1 REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1. *Minerais Hidroxicloretos*

A suplementação de microminerais na dieta é crucial para manter bom status de saúde e desempenho na avicultura e, apesar de serem exigidos em pequenas quantidades, são essenciais para manter funcional o sistema antioxidante, imunológico, crescimento, produção e reprodução de frangos de corte.

Os minerais são comumente suplementados em dietas na forma inorgânica, que podem causar irritação na mucosa intestinal, formação de quelatos que reduzem a disponibilidade da dieta e aumentam a excreção por meio das excretas. Já na forma orgânica apresentam maior biodisponibilidade porém seu custo na produção é maior podendo inviabilizar seu uso (MWANGI et al., 2017; SUN et al., 2020).

Os hidroximinerais, apesar de serem considerados minerais inorgânicos por não estarem associados com molécula de carbono em sua estrutura, surgiram com a proposta diferente das fontes usuais (como os sulfatos, óxidos e carbonatos) por serem mais disponíveis. A biodisponibilidade determina a eficiência da forma do mineral usado e é definida pela porção ingerida e absorvida para ser utilizada nas funções metabólicas normais do organismo de frangos de corte. Nos animais monogástricos, os hidroximinerais apresentam baixa interação com

antagonistas no trato gastrointestinal e sua disponibilidade aumenta nas porções iniciais do intestino onde é absorvido e direcionado para diversas funções biológicas no corpo, diferentemente das demais fontes (REDDY et al., 2021).

Os estudos com hidroxicloretos deram início em 1990, quando descobriu-se um novo sal que resultava em um complexo mineral inorgânico hidrolisado, chamado de hidroxicloreto. Os hidroxicloretos, quimicamente formados por uma molécula tridimensional, são altamente estáveis, fazendo ligações covalentes suficientemente fortes para evitar interações negativas com outros nutrientes e ao mesmo tempo, permitem que o mineral esteja disponível no intestino, seu campo de absorção (COHEN & STEWARD, 2014).

Alguns pontos positivos relacionados ao uso de hidroxicloretos em dietas (aumento a estabilidade) e nos animais (melhora a biodisponibilidade e até a palatabilidade) já foram confirmadas em outras pesquisas quando comparadas com fontes inorgânicas convencionais (LU et al., 2010; SHAEFFER et al., 2017; CARAMALAC et al., 2017).

Franklin et al. (2022) constataram que frangos de corte recebendo diferentes fontes e níveis de minerais (Cu, Mn e Zn) apresentaram melhores resultados de ganho de peso final, ganho de peso diário e reduziram a excreção desses minerais quando suplementados com níveis mais baixos e com fontes de hidroxicloretos em comparação às fontes sulfatos. Assim como Oluyinka et al. (2018) também compararam duas fontes de Cu e Zn (sulfato e hidroxicloreto) e dois níveis (80 e 20 ppm) em dietas de frangos de corte com 35 dias de idade, observaram que houve melhora na conversão alimentar e rendimento de peito das aves que receberam a fonte hidroxicloreto.

Santos et al. (2021) observaram que os hidroxicloretos Cu e Zn suplementados em dietas de frangos de corte apresentaram maior biodisponibilidade mineral melhorando o desempenho e garantindo bom rendimento de carcaça, com 150 ppm de Zn e 80 ppm de Cu, respectivamente, devido principalmente às características químicas desses minerais.

Desse modo, busca-se entender a essencialidade e a interação de cada mineral estudado com o organismo dos frangos de corte, bem como os resultados que a sua aplicação tem sobre os parâmetros de saúde e desempenho.

## **1.2. Cobre (Cu)**

A essencialidade do Cu foi identificada pela primeira vez em 1928, relacionando-o com a formação da hemoglobina e prevenção de vários distúrbios clínicos e patológicos em diversas espécies animais (SUTTLE, 2010). Segundo Byerne e Murphy (2022), o Cu está envolvido com diversas reações metabólicas incluindo a respiração celular, pigmentação de tecidos, formação de

células sanguíneas e desenvolvimento de tecidos conectivos, além de ser componente de diversas enzimas metal dependentes e proteger as células contra o estresse oxidativo.

A recomendação de Cu para frangos de corte, segundo Rostagno et al. (2017) é de 11,86mg, 10,54 mg, 8,31mg, 7,79 mg e 6,08 mg/kg de ração durante as fases pré inicial, inicial, crescimento I, crescimento II e final, respectivamente.

Em frangos de corte a absorção do Cu ocorre no pró-ventrículo e no duodeno por meio de difusão simples ou por meio de transportadores metal divalente específicos e não específicos, sendo estes transportadores importantes reguladores das concentrações de cobre de acordo com a necessidade do organismo. Os mecanismos que regulam a absorção do Cu são definidos de acordo com a disponibilidade do mineral na dieta, sendo que em altas concentrações a absorção acontece por difusão simples e, em baixas concentrações o transporte ativo é acionado (GOOF, 2018).

Demais minerais, como o Zn e o Ferro (Fe), também podem competir com o Cu pelos transportadores de membrana, reduzindo sua absorção e, concentrações em excesso desses minerais podem resultar em deficiência de Cu no organismo (LESSON, 2009).

Após absorvido, o Cu se liga a albumina plasmática e é carregado até o fígado e então incorporado com a ceruloplasmina e liberado para a circulação. O Cu pode permanecer estocado para trocas sanguíneas e, segundo Buckley (1991) sua concentração encontrada no fígado é de 8 a 9%. O reaproveitamento do Cu circulante acontece nos tubos renais de forma eficiente e pouco eficiente nas secreções biliares, uma vez que a bile é sua rota de excreção quando as concentrações de Cu no fígado estão em seu nível máximo (LESSON, 2009; BYRNE & MURPHY, 2022).

O Cu participa de diversos processos enzimáticos como cofator, por exemplo, indispensável para a metaloenzima citocromo oxidase que age no processo de respiração celular, é cofator catalítico da enzima superóxido dismutase do sistema antioxidante e está correlacionado com a formação da hemoglobina, servindo como catalisador da ceruloplasmina (SCOTTÁ et al., 2014). Segundo McDowell (2003), 90% de todo o Cu do organismo animal está associado a ceruloplasmina, transportando o mineral para os órgãos alvos, permitindo a oxidação do íon ferroso em íon férrico, ligando-o com a transferrina formando nova molécula de hemoglobina.

Na avicultura o Cu também é usado em níveis supranutricionais por ter a capacidade de melhorar a conversão alimentar e ter efeito melhorador de desempenho. Segundo Mehring et al. (1960) a suplementação de Cu em níveis abaixo do considerado tóxico às aves (500ppm) possui efeito similar aos antibióticos.

O Cu foi proposto como antimicrobiano por liberar íons que induzem a perda do potencial de membrana do conteúdo citoplasmático de bactérias, ocorrendo o influxo de íons de Cu no interior

da célula e posterior dano oxidativo dos componentes celulares e lise do DNA (LUO et al., 2017; PARRA et al, 2018).

Por conta das suas funções, o interesse pelo uso do Cu com ação antimicrobiana se tornou cada vez maior, aliado ao decrescente uso e crescentes restrições impostas aos antimicrobianos convencionais. Segundo Kim et al. (2022) a suplementação de 100 ppm de Cu melhora o desempenho de frangos de corte de modo semelhante a avilamicina, sugerindo o mineral como possível substituto aos antimicrobianos convencionais.

Também é relatado na literatura que o Cu tenha efeito estimulando o ganho de peso de frangos de corte por participar da síntese da hemoglobina, ajudando a melhor oxigenar os tecidos e promover adequado crescimento (KWIECIEN et al., 2014). O Cu também aumenta a expressão de genes do hormônio do crescimento na glândula pituitária, promovendo modificações pós traducionas regulatórias de peptídeos (EIPPER & MAINS, 1988).

Nesse sentido, Nguyen et al. (2020) afirmaram que a suplementação Cu na forma hidroxicloreto nos níveis de 15 ppm e 200 ppm é efetivo em melhorar o desempenho de frangos de corte, aumentando o ganho de peso e a conversão alimentar, justamente por ser mais biodisponível e aumentar as concentrações de Cu nos tecidos.

Lu et al., (2010) também constataram que a suplementação de Cu na forma hidroximineral para frangos de corte melhorou o desempenho das aves devido o efeito promotor de crescimento do Cu em alterar a microbiota intestinal reduzindo a susceptibilidade das aves às doenças e melhorando a absorção de nutrientes por consequência.

### **1.3. Manganês (Mn)**

O Mn é o quinto elemento mineral mais abundante e essencial para os animais. Em frangos de corte, o Mn desempenha importante papel na formação de ossos e em vários processos bioquímicos como ativador de enzimas: como por exemplo a piruvato carboxilase que faz parte do metabolismo de lipídeos produzindo oxalacetato (JASEK et al., 2019) e, a enzima superóxido dismutase importantíssima para o sistema antioxidante neutralizando radicais livres (SUTTLE 2010; ZHU et al., 2016). É essencial para o desenvolvimento embrionário, crescimento normal do corpo e ossos, funções reprodutivas, agindo no metabolismo de carboidratos e lipídeos, além de prevenir a perose (OLGUN, 2017).

A recomendação de Mn para frangos de corte, segundo Rostagno et al. (2017) é de 81,99mg, 73,98mg, 58,36mg, 47,68mg e 42,72 mg/kg de ração durante as fases pré inicial, inicial, crescimento I, crescimento II e final, respectivamente.

Por conta da sua essencialidade, a suplementação de Mn passou a ser uma preocupação aos nutricionistas, principalmente pelo rápido crescimento dos frangos de corte modernos. Normalmente, os ingredientes utilizados nas dietas de frangos de corte são relativamente ricos em Mn, no entanto, a absorção desse micromineral é baixa, principalmente devido à formação de complexos com fitatos e fibras, assim como demais nutrientes da dieta como Cálcio (Ca) e Fósforo (P), que podem inibir absorção do Mn, seja diluindo a concentração desse mineral ou competindo pelo mesmo sítio de absorção (MACARI et al, 2002).

A absorção do Mn acontece nas células da mucosa do intestino delgado, principalmente no íleo, onde transportadores de íons metálicos específicos carregam o Mn do lúmen intestinal para dentro do enterócito, uma vez que sem os transportadores apenas 5% do mineral seria aproveitado de forma passiva (TUFARELLI e LAUDADIO, 2017).

Após a absorção, o Mn é oxidado a  $Mn^{3+}$ , ligando-se à transferrina e distribuído aos tecidos. Os tecidos ricos em mitocôndrias são os que possuem maior concentração do mineral uma vez que estas os retêm e os direcionam para o metabolismo celular (OBERLEAS et al., 1999).

O Mn está distribuído em vários tecidos, mas o tecido ósseo é o local de maior reserva desse mineral, seguido pelo tecido hepático. Também há altas reservas de Mn em glândulas como a pineal e pituitária e, em pintainhos as maiores concentrações são no fígado, rim e ossos (SUTTLE, 2010).

Frangos de corte possuem capacidade de armazenar o excesso de Mn, principalmente pelos ossos. No entanto, a excreção do Mn excedente é regulada por duas vias, sendo a excreção pela bile a principal delas, onde o fígado absorve rapidamente o Mn e o incorpora com o fluido biliar. Já a outra via é formada através das rotas gastrointestinais auxiliares (SUTTLE, 2010).

Quando a concentração de Mn fica abaixo do exigido nutricionalmente pela ave, frangos de corte apresentam grande redução no desenvolvimento ósseo, causando perose e condrodistrofia. Também pode haver redução na fertilidade e eclodibilidade dos ovos, prejuízo no metabolismo de lipídeos e carboidratos e, em galinhas poedeiras, queda na produção de ovos e piora nos índices de qualidade interna e externa dos ovos (SINGH et al, 2015; TUFARELLI & LAUDADIO, 2017).

A suplementação de Mn, além de agir no sistema enzimático também pode ter efeito sobre os parâmetros de desempenho e rendimento de carcaça de frangos de corte. Jasek et al. (2019) afirmam que níveis acima de 40ppm de hidroxicloretos de Mn tem impacto positivo no desempenho de frangos de corte, principalmente nas fases finais melhorando a conversão alimentar e aumentando a deposição de Mn nos ossos, atribuindo tal fato à maior exigência de manutenção dos frangos nessa idade além acreção muscular e do rápido crescimento ósseo.



Kim et al. (2022) suplementando diferentes níveis de Mn (60, 120 e 200 ppm) não observaram diferença no desempenho de frangos de corte. No entanto, notou-se redução na porcentagem de gordura abdominal e intramuscular das aves e, redução das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em frangos suplementados com 200ppm, reforçando a interação do Mn com as enzimas do sistema antioxidante, como a superóxido dismutase reduzindo a oxidação lipídica da carne e a atividade de lipoproteína lipase, enzima relacionada com a deposição de gordura, melhorando os parâmetros de qualidade de carne.

Maiores níveis de Mn (100 e 200 ppm) suplementados em dietas de frangos também reduzem a incidência de anormalidade nas patas de frangos de corte em comparação aos frangos sem suplementação, evidenciando os efeitos da deficiência de Mn bem como a sua ação nas enzimas da matriz óssea (LU et al., 2007).

O Mn também é requerido pelas enzimas do sistema imunológico, uma vez que é importante elemento para suporte normal das funções desse sistema (KIDD, 2004) e, interage com neutrófilos e macrófagos, células envolvidas na resposta imune (SUNDER et al., 2006). Burin Junior et al. (2019) observaram que a suplementação de Mn apresentou maior eficiência na resposta imune de frangos de corte após o desafio de vacina contra coccidiose e enterite necrótica, uma vez que o Mn é benéfico durante os desafios entéricos devido ao seu papel na produção de mucopolissacarídeos.

#### **1.4. Zinco (Zn)**

O Zn é componente ou cofator em mais de 200 processos enzimáticos além de ser vital para o metabolismo de lipídeos e enzimas, ácidos nucleicos, proteínas e indispensável para diversas metaloenzimas. Possui importante função na ação da insulina, glucagon, hormônios corticotróficos, folículo estimulante e luteinizante (PEZZATO et al., 2004; AO & PIERCE, 2013).

O modo de ação do Zn inclui manter crescimento normal, incluindo bom desenvolvimento esquelético, da pele e saúde das patas, ação imunomoduladora aumentando a resitência à processos infecciosos, alterando o metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos e, melhora no status antioxidante por meio da expressão de enzimas que atuam no sistema digestivo e antioxidante, respectivamente (TABATABAIE et al., 2007).

Segundo Rostagno et al. (2017) a recomendação de Zn para frangos de corte é de 76,15 mg, 68,72 mg, 54,21 mg, 44,29 mg e 39,67 mg/kg de ração para as fases pré iniciais, iniciais, crescimento I, crescimento II e final, respectivamente.

No entanto, em animais não ruminantes como os frangos de corte, nem todo o Zn da dieta pode ser aproveitado e tal processo pode não ser tão eficiente devido aos fatores antagonistas,

especialmente a presença de fitatos e à forma como esse micromineral é suplementado na dieta das aves, que acabam formando complexos insolúveis com o mineral (SUTTLE, 2010).

Além dos fitatos, a biodisponibilidade do Zn pode ser afetada inclusive por outros minerais com mesma similaridade química, competindo pelos mesmos mecanismos de transporte, facilitando ou impedindo a absorção pelo epitélio (GLOVER et al., 2003).

Os fatores que alteram a disponibilidade do Zn em dietas, seja natural ou suplementar, são classificados como intrínsecos ou extrínsecos, como idade; pH do trato gastro intestinal e fatores como quantidade ingerida; forma química e relações com demais nutrientes da dieta, respectivamente (BALTACI et al., 2019).

É de extrema importância a manutenção dos níveis adequados de Zn no sangue e no fígado. Por isso, quando as concentrações ficam abaixo das exigências requeridas pelos animais de produção ocorre mobilização das reservas ósseas (BALTACI et al., 2019). A ampla via metabólica dependente do Zn ligada à proteínas e suas inter-relações regulam a homeostase e distribuição do mineral. Tais mecanismos regulatórios são efetivos na sua absorção, distribuição e excreção, prevenindo o organismo contra deficiências e excessos de minerais (GLOVER & HOGSTRAND, 2002).

O Zn chega ao trato gastrointestinal via dieta e é absorvido no duodeno pela superfície da borda em escova por um processo ativo, mediado por carreadores (SUTTLE, 2010). Em pintainhos, o Zn pode ser absorvido também pelo pro-ventrículo (MAIORKA & MACARI, 2002).

A concentração de Zn no interior das células é regulada por metalotioneínas intestinais e pela proteína intestinal rica em cisteína (CRIP). Em situações em que a concentração está alta, o mineral se liga as metalotioneínas e, em seguida, é eliminado junto com as fezes e células descamadas. Por outro lado, quando as concentrações de Zn estão baixas, as metalotioneínas regulam a transferência do zinco para as CRIP's, agindo como um carreador intracelular de zinco, aumentando dessa maneira a velocidade de absorção, transportando o Zn em seguida para a corrente sanguínea (MAFRA & COZZOLINO, 2004).

A síntese de metalotioneína é influenciada pela concentração de Zn dietético (sendo este a principal forma de controle), concentração de Zn plasmático e também pela quantidade de Zn absorvido, garantindo a homeostase do mineral (McDOWELL, 2003; COZZOLINO, 2020). As metalotioneínas também agem como principal fonte de armazenamento de Zn no fígado, podendo ser rapidamente mobilizadas durante necessidades metabólicas (MAIORKA & MACARI, 2002).

Após ser absorvido o Zn é liberado dos enterócitos e atravessa até os capilares mesentéricos e chega ao sistema sanguíneo, sendo transportado pela albumina, e então captado pelo

fígado e direcionado ao plasma e aos sítios celulares para executar funções específicas. O Zn no plasma está cerca de 90% associado à albumina e 10% ligado à Alfa-2-macroglobulina e aos aminoácidos, principalmente a cisteína e a histidina (ISLAM & LOOTS, 2007).

De modo geral, os animais de produção assim como as aves, conseguem regular as concentrações de Zn corporal por meio de transportadores detectáveis pelo mRNA (SUTTLE, 2010). O Zn está distribuído em todos os tecidos e em situações de deficiência, há grande redução das concentrações de Zn plasmático. Nessas condições de escassez, metalotioneínas e o Zn reservado nos tecidos ósseos e musculares são mobilizados e possíveis excedentes são liberados para normalizar a homeostase (UNDERWOOD & SUTTLE, 1999).

A suplementação ineficiente de Zn caracteriza redução no consumo e na utilização dos nutrientes da dieta, retardando o crescimento das aves (SAHIN & KUCUK, 2003). Nesse sentido, Sahoo et al. (2014) e Akhavan-Salamat & Ghasemi (2019) evidenciaram que a deficiência de Zn afeta negativa o status imunológico e antioxidante de frangos de corte, uma vez que o Zn também está relacionado com a produção e atividade hormonal do timo, anticorpos, sendo considerado micromineral primordial na resposta imunológica primária e na cicatrização, além da proliferação celular uma vez que é cofator da DNA polimerase e RNA transcriptase (COZZOLINO, 2020; VOGT, 2005).

Já em situações de excesso de Zn no organismo, o mineral é armazenado no tecido ósseo e também nas metalotioneínas no fígado, permitindo que seja liberado ao organismo conforme a necessidade. Além dessas duas formas de armazenamento, o Zn também pode ser armazenado no tecido muscular (FERNANDES, 2012). Apesar disso, as aves tem considerável tolerância às altas concentrações de Zn (SUTTLE 2010). No entanto, Dean e Hargis (1991), suplementando frangos de corte com 500 ppm de Zn observaram que níveis elevados reduziram o consumo e por consequência, houve queda no desempenho, pré dispendo as aves à endocrinopatias. Já Sunder et al. (2008) afirmam que 320 ppm de Zn prejudica a deposição mineral na tíbia.

### **1.5. *Proteômica aplicada na avicultura***

Pesquisas envolvendo o estudo da proteômica iniciaram na década de 1990 em virtude de grande quantidade de sequências peptídicas catalogadas em diversos bancos de dados por meio de áreas como a eletroforese bidimensional, espectrometria de massas e pesquisa em alta escala com genoma. Esses dados passaram a ser trabalhados com bioinformática, obtendo perfis de expressão de proteínas que são ferramentas chaves para esta linha de estudo (MANSO et al., 2005).

O estudo da proteômica permite compreender as propriedades das proteínas, seus níveis de expressão e modificações pós traducionais, caracterizando qualitativamente e

quantitativamente o perfil proteico, permitindo a compreensão de mecanismos moleculares que alteram os fenótipos. A síntese proteica permite que um mesmo genoma tenha ampla possibilidade de sintetizar proteínas com diversas funções (NAABY-HANSEN et al., 2001; PRASAD et al., 2017).

Já o termo metaloproteômica é o estudo de proteínas associadas com metais (*metal-binding proteins* ou metaloproteínas) que agem como cofator metálico. Nesses casos, a proteína precisa estar obrigatoriamente ligada ao metal para exercer sua função, diferentemente das proteínas associadas com metais, onde o metal não imprime nenhuma função à proteína (MOUNICOU et al., 2009).

As metaloproteínas representam grande porcentagem dentre todas as proteínas e, segundo Banci (2003), cerca de 40% de todas as proteínas e enzimas dependem de um íon metálico em sua estrutura para desempenharem a função designada (KENNEDY & GIBNEY, 2001). Evidenciando assim a importância e dependência do funcionamento do organismo em relação às metaloproteínas e seus íons metálicos (GARCIA et al., 2006).

A aplicação da proteômica em estudos com animais de produção permite o entendimento da interação de proteínas com características relacionadas à saúde, desempenho produtivo e bem-estar dos animais (ALMEIDA et al., 2015). A proteômica pode auxiliar, por exemplo, na avaliação das interações de diferentes estratégias nutricionais sobre as alterações no proteoma de células, tecidos ou fluídos corporais, elucidando como estas mudanças influenciam as características produtivas ou os produtos gerados (ALMEIDA & BENDIXEN, 2012).

Na avicultura, a proteômica tem grande importância no entendimento de biomecanismos de doenças e patógenos, performance e parâmetros de saúde e bem-estar que impactam economicamente este setor, seja através da caracterização desses patógenos ou identificando biomarcadores que auxiliem na compreensão dos fenômenos biológicos/fisiológicos (MIOTTO et al., 2010).

Em galinhas poedeiras, Qiu et al. (2012) identificaram por meio do estudo proteômico a formação do complexo lisozima-ovoalbumina em decorrência dos dias de armazenamento de ovos sob altas temperaturas que contribui negativamente para durabilidade do ovo, sendo importante indicador para mensurar as características internas de qualidade do ovo.

Em outro estudo também com poedeiras, foi identificado duas proteínas principais na casca dos ovos (inibidor de protease tipo *Kunitz* e ovolixina 32) ambas com funções antimicrobianas que podem ser relevantes para a predição/seleção de ovos mais resistentes ao armazenamento, ou ainda, ao processo de incubação (ROSE-MARTEL et al., 2012).

Já em frangos de corte também é possível identificar biomarcadores associados com a rápida ou lenta taxa de crescimento de diferentes linhagens de frangos de corte (PHONGPAN-NGAN et al., 2011), bem como proteínas associadas com a degradação *post mortem* da carne de frangos de corte (MOLLETE et al., 2003), e identificação de biomarcadores associados com o estresse e bem-estar, ou características de desempenho de frangos de corte (HAZARD et al., 2011), permitindo aplicações futuras como a seleção de aves mais resistentes à doenças, mais produtivas ou com características desejáveis para qualidade de carcaça que tornem a avicultura industrial ainda mais lucrativa.

Ainda nesse sentido, a aplicação da proteômica em suínos identificou que a suplementação de Zn (2.000 mg/kg) causa alta concentração do mineral no fígado e altera a expressão de certos genes, aumentando as proteínas peroxiredoxinas (PXDR4) e glioxalases (GLO1) que estão relacionadas à resposta do corpo animal ao estresse oxidativo (BONDZIO et al., 2013). O acúmulo de Zn no fígado também está associado com redução na expressão de genes de *heat Shock proteins* (HSP70) e aumento de chaperonas – enzimas importes na resposta causada por situações estressoras (SOTI & CSERMELY, 2003).

A fonte de mineral usada pode alterar o resultado proteômico no metabolismo animal. A suplementação de Zn orgânico em comparação ao Zn inorgânico em dietas de frangos de corte apresentou maior expressão de proteínas relacionadas com o sistema imune e correto metabolismo celular (divisão, transporte e ciclo intracelular), especialmente para os enterócitos, permitindo maior absorção dos nutrientes da dieta convertendo em melhor desempenho (JAROZ et al., 2022).

Além da fonte, o nível de micromineral suplementado em dietas de aves pode modular o metabolismo animal. Frangos de corte suplementados com alto nível de Cu (330 mg/kg) apresentaram maior atividade de apoptose nas células dos rins. Por meio do estudo proteômico foi possível identificar mais de 62 metabólitos *Cu-dependentes* associados com apoptose no tecido renal que resultou em pior desempenho e score de carcaça (LIAO et al., 2021).

Porém, ao suplementar frangos de corte com níveis mais baixos de Cu orgânico (7,5 mg/kg) El-Katcha et al (2020) observaram maior concentração de lisozima no soro, indicando estímulo do sistema imunológico, além de aumentar a expressão de genes específicos de enzimas responsáveis por esse sistema.

As proteínas identificadas a partir da proteômica podem ser consideradas biomarcadores nutricionais pois podem auxiliar no entendimento de mecanismos fisiológicos e bioquímicos envolvidos na absorção, transporte e metabolismo de nutrientes. Além disso, podem funcionar como um parâmetro mensurável que relaciona uma exposição específica de um composto alimentar a um estado de saúde e, portanto, oferece um grande potencial para entender a relação

entre nutrição e saúde (KUSSMANN, et al., 2010). Nesse sentido, tecnologias empregadas nos estudos proteômicos em conjunto com uma variedade de técnicas inovadoras de detecção de metais, oferecem um potencial significativo na identificação de proteínas, metaloproteínas ou proteínas ligadas a metais como possíveis biomarcadores (HARVEY & McARDLE, 2008), uma vez que o metaloproteoma pode fornecer informações relevantes sobre o quanto dos minerais ingeridos foram absorvidos e incorporados às biomoléculas funcionais, por exemplo.

Assim, a tecnologia do estudo da proteômica é essencial na identificação de biomarcadores que podem ser ligados à qualidade carne, fatores estressores, presença de patógenos e doenças, proteínas relacionadas com a seleção de aves com melhor perfil produtivo e até mesmo avaliar a nível celular as interferências de fatores externos sobre o desempenho de frangos de corte e poedeiras. Por isso a identificação destes biomarcadores auxiliam para compreensão, mitigação ou ao menos controle de situações que podem ter algum impacto sobre os animais de produção, especialmente as aves.

## **2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVO**

A utilização de fontes inorgânicas de minerais é menos eficiente que fontes orgânicas em dietas de frangos de corte devido à sua reatividade com outros componentes e baixa disponibilidade. Já as fontes orgânicas não compartilham dos mesmos pontos negativos das fontes inorgânicas, no entanto tem um alto custo que muitas vezes acabam inviabilizando seu uso. Diante desse cenário, surgiu terceira geração de minerais: os hidroxicloretos minerais. Os hidroximerais são formados por ligações covalentes que os conferem baixa reatividade com os demais nutrientes da dieta, maior disponibilidade ao organismo e menor excreção no ambiente quando comparados com as fontes inorgânicas tradicionais. Já o estudo da proteômica permite avaliar o perfil de proteínas alteradas frente às estratégias nutricionais testadas.

Nesse sentido, de acordo com a essencialidade do Cu, Mn e Zn para o correto desenvolvimento de frangos de corte, este estudo teve como objetivo investigar os efeitos da suplementação desses microminerais em diferentes níveis e fontes em dietas de frangos de corte.

O Capítulo II foi intitulado “SUPLEMENTAÇÃO DE COBRE, ZINCO E MANGANÊS SOB O DESEMPENHO E RENDIMENTO DE PARTES DE FRANGOS DE CORTE DESAFIADOS COM COCCIDIOSE” e adequado de acordo com as normas estabelecidas pelo periódico científico British Poultry Science.

O Capítulo III foi intitulado “PERFIL METALOPROTEÔMICO DE PLASMA DE FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES FONTES E NÍVEIS DE

COBRE, MANGANÊS E ZINCO” e adequado de acordo com as normas estabelecidas pelo periódico científico British Poultry Science.

O Capítulo IV foi intitulado “PERFIL METALOPROTEÔMICO DE FÍGADO DE FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES FONTES E NÍVEIS DE COBRE, MANGANÊS E ZINCO” e adequado de acordo com as normas estabelecidas pelo periódico científico British Poultry Science.

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD EL-HACK, M. E.; ALAGAWANY, M.; ARIF, M.; CHAUDHRY, M. T.; EMAM, M.; PATRA, A. Organic or inorganic zinc in poultry nutrition: a review. **Word's Poultry Science Journal**. v. 73, p. 904 – 915, 2017.

AGAPITO, G. SEYBOTH, L. Hidroxi-minerais – uma nova abordagem para uso em todas as espécies animais. **Avicultura Industrial**, nº 2, 2017.

AKHAVAN-SALAMAT, H.; GHASEMI, H. A. Effect of different sources and contents of zinc on growth performance, carcass characteristics, humoral immunity and antioxidant status of broiler chickens exposed to high environmental temperatures. **Livestock Science**, v. 223, p. 76 – 83, 2019.

ALMEIDA, A. M., BENDIXEN, E. P. Proteomics: a review of a species in the crossroad between biomedical and food sciences. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 14, p. 4296 – 4314, 2012.

ALMEIDA, A. M.; BASSOLS, A.; BENDIXEN, E.; BHIDE, M.; CEILIANI, F.; CRISTOBAL, S.; ECKERSALL, P. D.; HOLLUNG, K.; LISACEK, F.; MAZZUCHELLI, G.; McLAUGHLIN, M.; MILLER, I.; NALLY, J. E.; PLOWMAN, J.; RENAUT, J.; RODRIGUES, P.; RONCADA, P.; STARIC, J.; TURK, R. Animal board invited review: advances in proteomics for animal and food sciences. **Animal**, v. 9, p. 1 – 17, 2015.

AO, T.; PIERCE, J. The replacement of inorganic mineral salts with mineral proteinates in poultry diets. **World's Poultry Science Journal**, v. 69, p. 5 – 16, 2013.

BALTACI, A. K.; MOGULKOC, R.; BALTACI, S. B. The role of zinc in the endocrine system. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 32, p. 231 – 239, 2019.

BANCI, L. Molecular dynamics simulations of metalloproteins. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 7, p. 143 – 149, 2003.

BONZIO, A.; PIPER, R.; GABLER, C.; WEISE, C.; SCHULZE, P.; ZENTEK, J.; EINSPIANIER, R. Feeding low or pharmacological concentrations of zinc oxide changes the hepatic proteomic profiles in weaned piglets. **PLoS One**, v. 8, p. e81202, 2013.

BUCKLEY, W. T. A kinetic model of copper metabolism in lactating dairy cows. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 71, p. 155 – 166, 1991.

BURIN JUNIOR, A. M.; FERNANDES, N. L. M.; SNAK, A.; FIREMAN, A.; HORN, D.; FERNANDES, J. I. M. Arginine and manganese supplementation on the immune competence of broilers immune stimulated with vaccine against Salmonella Enteritidis. **Poultry Science**, v. 98, p. 2160 – 68, 2019.

BYRNE, L.; MURPHY, R. A. Relative Bioavailability of Trace Minerals in Nutrition: A Review. **Animals**, v. 12, p. 1981 – 2027, 2022.

CARAMALAC, L. S.; NETTO, A. S.; MARTINS, P. G. M. A.; MORIEL, P.; RANCHES, J.; FERNANDES, H. J.; ARTHINGTON, J. D. Effects of hydroxychloride sources of copper, zinc and manganese on measures of supplement intake, mineral status, and pre and postweaning performance of beef calves. **Journal of Animal Science**, v. 95, p. 1739 – 1750, 2017.

COHEN, J.; STEWARD, F. A. Hydroxy Minerals - The newest development in mineral nutrition: feed science. **AFMA Matrix**, v. 23, p. 45-49, 2014.

COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de Nutrientes**. Manole, 6 ed, 960p, 2020.

DEAN, C. E.; HARGIS, P. S. Effects of zinc toxicity on thyroid function and histology in broiler chicks. **Toxicology Letters**, v. 57, p. 309 – 318, 1991.



EIPPER, B. A.; MAINS, R. E. Peptide  $\alpha$ -amidation. **Annual Review of Physiology**, v. 50, p. 333 - 344, 1988.

EL-KATCHA, M. I.; SOLTAN, M. A.; KHALIFA, E.; FADL, S. E.; HASSAN, A.; EL-SHIMEY, O. K.; EL-NAGGAR, K. Immune response of broiler chicks fed on oxidized oil and supplemented with different copper sources and levels. **Alexandria Journal of Veterinary Sciences**, v. 66, p. 15 – 26, 2020.

ISLAM, M. S.; LOOTS, D. T. Diabetes, metallothionein and zin interaction: a review. **Biofactors**, v. 29, n. 4, p. 203 – 212, 2007.

FERNANDES, M; N. S. Metabolismo de zinco na nutrição de frangos de corte e suas respostas no desempenho e no sistema imune. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 9, p. 2104 – 2115, 2012.

FRANKLIN, S. B.; YOUNG, M. B.; CIACCIARIELLO, M. The impact of different sources of Zinc, Manganese and Copper on broiler performance and excreta output. **Animals**, v. 12, n. 1067, p. 1 – 8, 2022.

GARCIA, J. S.; MAGALHÃES, C. S.; ARRUDA, M. A. Z. Trends in metal-binding and metalloprotein analyses. **Talanta**, v. 69, p. 1 – 15, 2006.

GLOVER, C. N.; BURY, N.R.; HOGSTRAND, C. Zinc uptake across the apical membrane of freshwater rainbow trout intestine is mediated by high affinity, low affinity, and histidine-facilitated pathways. **Biochemic et Biophysica Acta**, v. 1614, p. 211 – 219, 2003.

GLOVER, C. H.; HOGSTRAND, C. In vivo characterization f intestinal zinc uptake in freshwater rainbow trout. **Journal of Experimental Biology**, v. 205, p. 141 – 150, 2002.

GOFF, J. P. Invited review: Mineral absorption mechanisms, mineral interactions that affect acid-base and antioxidant status, and diet considerations to improve mineral status. **Journal of Dairy Science**, v. 101, p. 2763 – 2813, 2018.

HARVEY, L. J., McARDLE, H. J. Biomarkers of copper status: a brief update. **British Journal of Nutrition**, v. 99, p. S10 – S13, 2008.

HAZARD, D.; FERNANDEZ, X.; PINGUET, J.; CHAMBON, C.; LETISSE, F.; PORTAIS, J.; WADIH-MOUSSA, Z.; REMIGNON, H.; MOLETTE, C. Functional genomics of the muscle response to restraint and transport in chickens. **Journal of Animal Science**, v. 89, p. 2717 – 2730, 2011.

JAROSZ, L. S.; MICHALAK, K.; MAREK, A.; HEJDYSZ, M.; CISZEWSKI, A.; KACZMAREK, S.; KWIECIEN, M.; GRADZKI, Z. The effect of feed supplementation with zinc glycine chelate and zinc sulphate on hepatic proteome profiles in chickens. **Livestock Science**, v. 262, p. 104983, 2022.

JASEK, A.; COUFAL, C. D.; PARR, T. M.; LEE, J. T. Evaluation of increasing manganese hydroxychloride level on male broiler growth performance and tibia strength. **Journal Applied of Poultry Research**, v. 28, p. 1039 – 1047, 2019.

KENNEDY, M. L.; GIBNEY, B. R. Metalloprotein and redox protein design. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 11, p. 485 – 490, 2001.

KIDD, M. T. Nutritional modulation of immune function in broilers. **Poultry Science**, v. 85, p. 650 – 657, 2004.

KIM, M. J.; HOSSEINDOUST, A.; KIM, Y.; MOTURI, J.; LEE, J. H.; KIM, T. G.; MUN, J. Y.; CHAE, B. J. Improving the bioavailability of manganese and meat quality of broilers by using hot-melt extrusion nano method. **British Poultry Science**, v. 63, p. 211 – 217, 2022.

KUSSMANN, M., PANCHAUD, A., AFFOLTER, M. Proteomics in nutrition: status quo and outlook for biomarkers and bioactives. **Journal of Proteomic Research**, v. 9, p. 4876 – 4887, 2010.

KWIECIEN, M. A.; WINIARSKA-MIECZAN, K.; ZAWISLAK, K.; SROKA, S. Effect of copper glycinate chelate on biomechanical, morphometric and chemical properties of chicken femur. **Annals of Animal Science**, v. 14, p. 127– 139, 2014.

LEESON, S. Copper metabolism and dietary needs. Reviews. **Word's Poultry Science Association**. v. 65, p. 353 – 366, 2009.

LIAO, J.; YANG, F.; BAI, Y.; YU, W.; QIAO, N.; HAN, Q.; ZHANG, H.; GUO, J.; HU, L.; LI, Y.; PAN, J.; TANG, Z. Metabolomics analyses reveals the effect of cooper on mitochondria-mediated apoptosis in kidney of broiler chicken (*Gallus gallus*). **Journal of Inorganic Biochemistry**. V. 224, p. 111581, 2021.

LU, L.; WANG, R. L.; ZHANG, Z. J.; STEWARD, F. A.; LUO, X.; LIU, B. Effect of dietary supplementation with copper sulfate or tribasic copper chloride on the growth performance, liver cooper concentrations of broilers fed in flloor pens, and stabilities of vitamin E and phytase in feeds. **Biological Trace Element Research**, v. 138, p. 181 – 189, 2010.

LU, L.; LUO, X. G.; JI, C.; LIU, B.; XU, S. X. Effect of manganese supplementation and source on carcass traits, meat quality. and lipid oxidation in broilers. **Journal of Animal Science**, v. 85, p. 812 – 822, 2007.

LUO, J.; HEIN, C.; MUCKLICK, R.; SOLIOZ, M. Killing of bacteria by copper, cadmium, and silver surfaces reveals relevant physicochemical parameter. **Biointerphases**, v. 12, p. 020301, 2017.

MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte. 2 ed. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2002.

MAFRA, D.; COZZOLINO, S. M. F. Importância do zinco na nutrição humana. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 1, p. 79 – 87, 2004.

MAIORKA, A.; MACARI, M. Absorção de Minerais. In: MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E. **Fisiologia Aviaria aplicada a frangos de corte**. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 375 p. 2002.

MANSO, M. A.; LÉONIL, G. J.; GAGNAIRE, V. Application of proteomics to the characterization of milk and dairy products. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 845 – 855, 2005.

McDOWELL, L. R. **Minerals in Animal and Human Nutrition**, Elsevier, 2 ed, 660 p. 2003.

MEHRING, A. L.; BRUMBAUGH, J. H.; SUTHERLAND, A. J.; TITUS, H. W. The tolerance of growing chickens for dietary copper. **Poultry Science**, v. 39, p. 713 – 719, 1960.

MIOTTO, O.; HEINY, A. T.; ALBRECHT, R.; GARCÍA-SASTRE, A.; TAN, T. W.; AUGUST, J. T.; BRUSIC, V. Complete-Proteome Mapping of Human Influenza A Adaptative Mutatuiins: Implications for Human Transmissibility of Zoonotic Strains. **Plos One**, v. 5: e9025, 2010.

MOUNICOU, S.; SZPUNAR, J.; LOBINSKI, R. Metallomics: the concept and methodology, **Chemical Society Reviews**, v. 38, p. 1119 – 1138, 2009.

MWANGI, S.; TIMMONS, J.; AO, T.; PAUL, M.; MACALINTAL, L.; PESCATORE, A.; CANTOR, A.; FORD, M.; DAWSON, K. A. Effect of zinc imprinting and replacing inorganic zinc with organic zinc on early performance of broiler chicks. **Poultry Science**, v. 96, n. 4, p. 861 – 7868, 2017.

NAABY-HANSEN, S.; WATERFIELD, M. D.; CRAMER, R. Proteomics – post-genomic cartography to understand gene function. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 22, n. 7, p. 376–384, 2001.

NGUYEN, H. T. T.; MORGAN, N.; ROBERTS, J. R.; SWICK, R. A.; TOGHYANI, M. Copper hydroxychloride is more efficacious than copper sulfate in improving broiler chicken's growth performance, both at nutritional and growth-promoting levels. **Poultry Science**, v. 99, p. 6964 – 6973, 2020.

OBERLEAS, D. **Minerals: nutrition and metabolism**. New York: Vantage Press, 1 ed, 244 p. 1999.

OLGUN, O. Manganese in poultry nutrition and its effect on performance and eggshell quality. **World's Poultry Science Journal**, v. 73, p. 1 – 11, 2017.

OLUYINKA, O. A.; KUJIK, S. V.; HAN, Y. Copper and Zinc sources and levels of zinc inclusion influence growth performance, tissue trace mineral content, and carcass yield of broiler chickens. **Poultry Science**, n. 97, p. 3891 – 3898, 2018.

PARRA, A.; TORO, M.; JACOB, R.; NAVARRETE, P.; TRONCOSO, M.; FIGUEROA, G.; REYES-JARA, A. Antimicrobial effect of copper surfaces on bacteria isolated from poultry meat. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 113-118, 2018.

PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; FRACALOSSO, D. M.; CYRINO, F. E. P. Nutrição de Peixes. In: CYRYNO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSSO, D. M.; CASTAGNOLLI, N. **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. São Paulo? TecArt**, 2004, p. 74 – 169. SÁ, M. V. C.; PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; PADILHA, P. M. Optimum zinc supplementation level in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* juveniles diets. **Aquaculture**, v. 238. p. 385 – 401, 2004.

PHONGPA-NGAN, P.; GRIDER, A.; MULLIGAN, J. H.; AGGREY, S. E.; WICKER, L. Proteomic analysis and differential expression in protein extracted from chicken with a varying growth rate and water-holding capacity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 13181 – 13187, 2011.

PRASAD, T. S. K.; MOHANTY, A. K.; KUMAR, M.; SREENIVASAMURTHY, S. K.; DEY, G.; NIRUJOGI, R. S.; PINTO, S. M.; MADUGUNDU, A. K.; PATIL, A. H.; ADVANI, J.; MANDA, S. S.; GUPTA, M. K.; DWIVEDI, S. B.; KELKAR, D. S.; HALL, B.; JIANG, X.; PEERY, A.; RAJAGOPALAN, P.; YELAMANCHI, S. D.; SOLANKI, H. S.; RAJA, R.; SATHE, G. J.; CHAVAN, S.; VERMA, R.; PATEL, K. M.; JAIN, A. P.; SYED, N.; DATTA, K. K.; KHAN, A. A.; DAMMALI, M.; JAYARAM, S.; RADHAKRISHNAN, A.; MITCHELL, C. J.; NA, C.-H.; KUMAR, N.; SINNI, P.; SHARAKHOV, I. V.; WANG, C.; GOWDA, H.; TU, Z.; KUMAR, A.; PANDEY, A. Integrating transcriptomic and proteomic data for accurate assembly and annotation of genomes. **Genome Research**, v. 27, p. 133–144, 2017.

QIU, N.; MA, M.; ZHAO, L.; LIU, W.; LI, Y.; MINE, Y. Comparative proteomic analysis of egg white proteins under various storage temperatures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 7746 – 7753, 2012.

REDDY, B. V.; NAYAK, S.; KHARE, A.; PAL, P. P.; SHARMA, R.; CHOURASIYA, A.; NAMDEO, S.; THAKUR, S. Role of hydroxy trace mineral on health and production of livestock: a review. **Journal of Livestock Science**, v. 121, p. 279 – 286, 2021.

ROSE-MARTEL, M.; DU, J.; HINCKE, M. T. Proteomic analysis provides new insight into the chicken eggshell cuticle. **Journal of Proteomics**, v. 75, p. 2697–2706, 2012.

ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; HANNAS, M. I.; DONZELE, J. L.; SAKOMURA, N. K.; PERAZZO, F. G.; SARAIVA, A.; ABREU, M. L. T.; RODRIGUES, P. B.; OLIVEIRA, R. F.; BARRETO, S. L. T.; BRITO, C. O. **Tabelas Brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 4a Ed. Viçosa, MG: Departamento de Zootecnia, UFV. 488p.

SAHIN, K.; KUCUK, O. Zinc supplementation alleviates heat stress in laying Japanese quail. **Journal of Nutrition**, v. 133, p. 2808 – 2811, 2003

SAHOO, A.; SWAIN, R.; MISHRA, S. K. Effect of inorganic, organic and nano zinc supplemented diets on bioavailability and immunity status of broilers. **International Journal of Advanced Research**, v. 2, p. 828 – 837, 2014.

SANTOS, T. S.; AUGUSTO, K. V. Z.; HAN, Y.; SARTORI, M. M. P.; DENADAI, J. C.; SANTOS, T. C.; SOBRAL, N. C.; ROÇA, R. O.; SARTORI, J. R. High levels of copper and zinc supplementation in broiler diets on growth performance, carcass traits and apparent ileal mineral absorption. **British Poultry Science**, v. 62, n. 4, p. 579 – 588, 2021.

SCOTTÁ, B. A.; GOMIDE, A. P. C.; CAMPOS, P. F.; BARROCA, C. C.; FORMIGONI, A. S.; FERREIRA, S. V. Utilização de fitase na alimentação de aves e suínos. **Pubvet**, v. 8, p. 1- 14, 2014.

SHAEFFER, G. L.; LLOYD, K. E.; SPEARS, J. W. Bioavailability of zinc hydroxycarbonate relative to zinc sulfate in growing cattle fed a corn – cottonseed hull-based diet. **Animal Feed Science and Technology**, v. 58, p. 151 – 163, 2017.

SINGH, A. K.; GHOSH, T. K.; HALDAR, S. Effects of methionine chelate- or yeast protein-based supplement of copper, iron, manganese and zinc on broiler growth performance, their distribution in the tibia and excretion into the environment. **Biological Trace Element Research**, v. 164, p. 253-260, 2015.

SOTI, C.; CSERMELY, P. Aging and molecular chaperones. **Experimental Gerontology**, v. 38, p. 1037 – 1040, 2003.

SUN, W.; WANG, G.; PEI, X.; LUI, L.; XIAO, Z.; TAO, W.; PELLETIER, W. Effect of replacing inorganic with respective complexed glycinate minerals on apparent mineral bioavailability and deposition rate in tissues of broiler breeders. **Poultry Science**, v. 95, p. 1813 – 1824, 2020.

SUNDER, G. S.; PANDA, A. K.; GOPINATH, N. C. S.; RAJU, M. V. L. N.; RAMA RAO, S. V.; KUMAR, C. V. Effect of supplemental manganese and mineral uptake by tissues and immune response in broiler chickens. **The Journal of Poultry Science**, v. 43, p. 371 – 377, 2006.

SUNDER, G. S.; KUMAR, C. V. Effects of higher level of zinc supplementation on performance, mineral availability, and immune competence in broiler chickens. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 17, p. 79 -86, 2008.

SUTTLE, N. F. **The mineral nutrition of livestock**. 4 ed. Editora: CABI Publishing, Oxfordshire, 2010.

SWAIN, P. S.; PRUSTY, S.; RAO, S. B. N.; RAJENDRAN, D.; PATRA, A. K. Essential Nanominerals and Other Nanomaterial in Poultry Nutrition and Production. *In*: PATRA, A. K. **Advances in Poultry Nutrition Research**. 1 ed. Editora: IntechOpen, 2020. Cap. 5, p. 61-86.

TABATABAIE, M. M.; ALIARABI, H.; SAKI, A. A.; AHMADI, A.; SIYAR, S. A. Effect of different sources and levels of zinc on egg quality and laying hen performance. **Pakistan journal of Biological Sciences**, v. 10, p. 3476 – 3478, 2007.

TUFARELLI, V.; LAUDADIO, V. Manganese and its role in poultry: an overview. **Journal of Experimental Biology and Agricultural**, v. 5, p. 749 – 754, 2017.

UNDERWOOD, E. J.; SUTTLE, N. F. The Mineral nutrition of livestock. 3 ed. Wallingford: CAB International, 1999

VOGT, L. K. **Avaliação da imunocompetência e alternativas para a modulação nutricional de frangos de corte**. 2005. 160f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

ZHU, Y. W.; LU, L.; LI, W. X.; ZHANG, L. Y.; JI, C.; LIN, X.; LUO, X. G. Effect of dietary manganese on antioxidant status and expressions of heat shock proteins and factors in tissues of laying broiler breeders under normal and high environmental temperatures. **British Journal of Nutrition**, v. 116, p. 1851 – 1860, 2016.



**CAPÍTULO II**

**SUPLEMENTAÇÃO DE COBRE, ZINCO E MANGANÊS SOBRE O**

**DESEMPENHO E RENDIMENTO DE PARTES DE FRANGOS DE CORTE**

**DESAFIADOS COM COCCIDIOSE**

**Resumo:** A suplementação de microminerais é indispensável para atender as exigências de frangos de corte. Os hidroximinerais representam a terceira geração da suplementação mineral devido suas características químicas diferenciadas das fontes usuais que trazem benefícios sobre os parâmetros de desempenho e saúde das aves. O objetivo dessa pesquisa foi avaliar diferentes fontes e níveis de microminerais Cobre (Cu), Zinco (Zn) e Manganês (Mn), bem como o potencial antimicrobiano de Cu em dieta de frangos de corte desafiados com *overdose* de vacina contra coccidiose. Para isso, 1080 pintos (COBB 500) de 1 dia de idade foram alojados em 4 tratamentos experimentais (Controle +: 15, 80 e 80 ppm de Cu, Mn e Zn na forma sulfato e adição do antimicrobiano melhorador de crescimento Avilamicina - 50 mg/kg de ração; Controle -: 15, 80 e 80 ppm de Cu, Mn e Zn na forma sulfato; Baixo HCM (15, 40 e 40 ppm de Cu, Mn e Zn na forma hidroxicloreto mineral e Alto HCM: 15, 80, 80 ppm de Cu, Mn e Zn na forma hidroxicloreto mineral), avaliando fontes sulfato e hidroxicloreto em diferentes níveis de Cu, Zn e Mn sobre os parâmetros de desempenho e rendimento de partes. Não houve efeito de fonte e suplementação dos minerais suplementados sobre o desempenho e rendimento de partes. Sendo assim, é possível concluir que as fontes hidroxicloretos minerais podem ser suplementadas 50% abaixo do recomendado pelos manuais de linhagem, sem comprometer o desempenho ou rendimento de partes, mesmo quando há presença de aditivo melhorador de desempenho.

**Palavras Chave:** frangos de corte, hidroxicloretos, microminerais, nutrição, performance.

## INTRODUÇÃO

Os minerais desempenham uma série de funções bioquímicas que permitem o bom funcionamento do organismo animal, garantindo suporte estrutural, fisiológico, regulatório e catalítico (SUTTLE, 2010).

Cobre (Cu), Zinco (Zn) e Manganês (Mn) estão presentes em ingredientes comumente utilizados em dietas para aves, principalmente milho e soja, porém estão em pequenas concentrações e, suas quantidades dependem de alguns fatores como genótipo e estágio de maturidade da planta, solo e do clima (SUTTLE, 2010).

Inicialmente, a suplementação desses microminerais em dietas de aves para atender as exigências nutricionais se deu amplamente com as formas inorgânicas (óxidos e sulfatos) principalmente pelo custo-benefício. No entanto, estes possuem alta capacidade reativa, com minerais e outros nutrientes, reduzindo sua biodisponibilidade. Já os minerais orgânicos, apesar de serem menos reativos e mais biodisponíveis em relação às fontes inorgânicas, apresentam alto custo que muitas vezes inviabilizam o uso em produções comerciais (RAMIREZ et al., 2022).

Recentemente, surgiram os hidroxicloretos que passaram a representar nova fonte de suplementação de microminerais em dietas de aves, incluindo o Cu, Zn e Mn. Os hidroxicloretos possuem uma estrutura cristalizada em que o metal está associado a vários grupos hidroxil e de cloretos por ligações covalentes (LEISURE et al, 2014). Tais ligações são fortes o suficiente para evitar a formação de complexos insolúveis e, ao mesmo tempo, fracas o suficiente que permitem a liberação do mineral no intestino garantindo maior biodisponibilidade (COHEN & STWEARD, 2014; CALDEIRA et al., 2019).

Em frangos de corte Olukosi et al. (2018) constataram que os minerais Cu e Zn na forma hidroxicloretos minerais proporcionaram melhor eficiência alimentar e rendimento de peito em comparação à fonte sulfato.

Yu et al. (2021) também observaram que o Zn na forma hidroximineral melhorou o ganho de peso e a conversão alimentar de frangos de corte em comparação à fonte sulfato, além de melhorar em 10% a biodisponibilidade do mineral.

Esses microminerais são conhecidos por acabarem modulando direta ou indiretamente a saúde da microbiota intestinal, o metabolismo e o desempenho. Alguns produtores suplementam dietas de aves com níveis acima do recomendado (níveis supra nutricionais) por guias nutricionais e manuais de linhagem (acima de 125 mg/kg) a fim de melhorar os parâmetros de saúde intestinal. Cobre, Zn e Mn são os microminerais mais estudados nesse sentido, podendo agir diretamente sobre o patógeno ou indiretamente através do efeito antimicrobiológico ou imunomodulatório (PIERCE et al., 2009; AO & PIERCE, 2013).

Bortoluzzi et al. (2020) afirmaram que a suplementação de Cu, Zn e Mn em níveis acima dos regulares recomendados para frangos de corte podem neutralizar os efeitos negativos de coccidiose sobre os parâmetros de desempenho e status de saúde das aves.

As concentrações desses minerais são alteradas no corpo dos frangos de corte quando as aves estão sob desafio, indicando mobilização desses elementos em determinados locais do organismo e ação imunomoduladora. No entanto, a forma química e os níveis suplementados desses microminerais podem alterar a efetividade da resposta imunológica (BORTOLUZZI et al., 2020).

O Zn, na forma orgânica em comparação com a forma inorgânica, aumenta a expressão de genes anti-inflamatórios e reduz a expressão dos indutores inflamatórios,

além de reduzir a permeabilidade do lúmen intestinal em frangos de corte desafiados com coccidiose (PRASAD et al., 2011; BORTOLUZZI et al., 2019).

Já o Cu é usado de forma profilático para melhorar o desempenho e as vezes, como substituto aos antimicrobianos devido à ação positiva no status de saúde do trato gastrointestinal (BROOM et al., 2021). Klasing e Nazipipour (2010) ao compararem o nível de 150 ppm de Cu na forma sulfato e hidroximineral observaram que a fonte hidroximineral possui efeito bacteriostático contra *Escherichia coli*, atribuindo tal efeito à influência do Cu em alterar o pH intestinal e estimular enzimas com funções de proteção às células e ação imunológica, justamente pela fonte apresentar-se mais biodisponível.

O Mn melhora a imunidade direta ou indiretamente por dar suporte à fatores imunomodeladores, como as enzimas do sistema antioxidante associadas às respostas causadas por fatores inflamatórios como a coccidiose (KIDD, 2004). A suplementação de Mn também está associada em aumentar a altura dos vilos, redução da permeabilidade intestinal por aumentar a expressão de genes de ligação entre as células intestinais e alterar a microbiota intestinal favorecendo micro-organismos benéficos em detrimento dos micro-organismos nocivos (ZHANG et al., 2020).

Desse modo, em virtude a essencialidade desses microminerais para a nutrição de aves e sua importância no combate à patógenos, esta pesquisa teve o objetivo avaliar o potencial do Cu como promotor de crescimento, o efeito da fonte (hidroxicloreto mineral vs sulfato) e níveis de Cu, Zn e Mn sobre o desempenho e rendimento de partes de frangos de corte desafiados com *overdose* de vacina contra coccidiose.

## MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos executados nessa pesquisa foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética de Uso de Animais – CEUA/FMVZ, processo nº 0033/2020.

### ***Aves, Dietas e Tratamentos Experimentais***

Foram utilizados 1.080 frangos de corte (Cobb 500) de um dia de idade criados em galpão com piso de concreto coberto com cama de maravalha. O galpão foi dividido em boxes de 2m<sup>2</sup> cada (15 frangos/m<sup>2</sup>). Cada box foi equipado com comedouro tubular e bebedouros tipo *nipple* (5 bebedouros/box).

Os frangos foram distribuídos casualmente em quatro tratamentos experimentais com 9 repetições e 30 aves/repetição. Os tratamentos experimentais consistiam em Controle + (15, 80 e 80 ppm de Cu, Mn e Zn na forma sulfato e adição do promotor de crescimento Avilamicina - 50 mg/kg de ração); Controle – (15, 80 e 80 ppm de Cu, Mn e Zn na forma sulfato); Baixo HCM (15, 40 e 40 ppm de Cu, Mn e Zn na forma hidroxiclreto mineral) e Alto HCM (15, 80, 80 ppm de Cu, Mn e Zn na forma hidroxiclreto mineral), conforme demonstra Tabela 1.

As dietas foram isoproteicas e isoenergéticas formuladas a base de milho e farelo de soja seguindo as recomendações de Rostagno et al. (2017), diferindo apenas nos níveis dos minerais avaliados (conforme Tabela 1), adicionados no momento da fabricação da ração em substituição ao ingrediente inerte (veículo). O fornecimento da ração e água foram *ad libitum* durante os 42 dias de criação. A determinação dos níveis de Cu, Mn e Zn definidos como controle foi a partir da recomendação dos níveis nutricionais do

manual da linhagem Cobb 500. A composição e os níveis nutricionais das fases das dietas experimentais estão apresentados na Tabela 2, com exceção dos níveis dos minerais testados.

**Tabela 1.** Níveis de suplementação (mg/kg) e fontes de Cu, Mn e Zn em dietas experimentais de frangos de corte

| Tratamentos | AMD | Sulfato |    |    | Hidroxiclreto |    |    |
|-------------|-----|---------|----|----|---------------|----|----|
|             |     | Cu      | Mn | Zn | Cu            | Mn | Zn |
| Controle +  | +   | 15      | 80 | 80 |               |    |    |
| Controle -  | -   | 15      | 80 | 80 |               |    |    |
| Baixo HCM   | -   |         |    |    | 15            | 40 | 40 |
| Alto HCM    | -   |         |    |    | 15            | 80 | 80 |

Controle + = 15 ppm de Cu na forma sulfato + 80 ppm de Mn na forma sulfato + 80 ppm de Zn na forma sulfato + Avilamicina (50mg/kg de ração); Controle - = 15 ppm de Cu na forma sulfato + 80 ppm de Mn na forma sulfato + 80 ppm de Zn na forma sulfato; Baixo HCM = 15 ppm de Cu na forma hidroxiclreto + 80 ppm de Mn na forma hidroxiclreto +80 ppm de Zn na forma hidroxiclreto; Alto HCM = 15 ppm de Cu na forma hidroxiclreto + 40 ppm de Mn na forma hidroxiclreto +40 ppm de Zn na forma hidroxicloreto.

AMD = aditivo melhorador de desempenho.

**Tabela 2.** Ingredientes (kg) e composição nutricional (por quilo de ração) das dietas experimentais

|                                          | Pré Inicial | Inicial | Crescimento | Final  |
|------------------------------------------|-------------|---------|-------------|--------|
| Milho, fubá                              | 510,12      | 530,42  | 602,74      | 661,93 |
| Farelo de Soja 46%                       | 424,39      | 401,10  | 329,24      | 275,41 |
| Óleo de Soja                             | 26,78       | 3306    | 35,44       | 32,22  |
| Fosfato Bicálcico 18,44%                 | 13,51       | 10,97   | 8,73        | 7,97   |
| Calcário 38,42%                          | 10,96       | 10,54   | 10,26       | 10,02  |
| Sal Comum                                | 5,17        | 4,92    | 4,81        | 4,44   |
| DL-Metionina 99%                         | 3,17        | 3,08    | 2,66        | 2,30   |
| L-Lisina 99%                             | 1,48        | 1,69    | 2,11        | 2,34   |
| Premix Vitamínico e Mineral <sup>1</sup> | 2,00        | 1,80    | 1,60        | 1,20   |
| L-Treonina 98,5%                         | 0,67        | 0,72    | 0,74        | 0,70   |
| Cloreto de Colina 60%                    | 0,72        | 0,63    | 0,58        | 0,38   |
| Avilamicina <sup>3</sup>                 | 0,25        | 0,25    | 0,25        | -      |
| Fitase 10000 FTU                         | 0,05        | 0,05    | 0,05        | 0,05   |
| Sulfato de Manganês                      | -           | -       | -           | -      |
| Sulfato de Cobre                         | -           | -       | -           | -      |
| Sulfato de Zinco                         | -           | -       | -           | -      |
| Manganês Hidroximineral                  | -           | -       | -           | -      |

|                              |       |       |       |       |
|------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| Cobre Hidroximineral         | -     | -     | -     | -     |
| Zinco Hidroximineral         | -     | -     | -     | -     |
| Inerte                       | 0,45  | 0,45  | 0,45  | 0,67  |
| <b>Níveis Nutricionais</b>   |       |       |       |       |
| Energia Metabolizável (kCal) | 2.980 | 3.050 | 3.150 | 3.200 |
| Proteína Bruta (%)           | 24,20 | 23,31 | 20,60 | 18,60 |
| Extrato Etéreo (%)           | 5,30  | 5,96  | 6,38  | 6,22  |
| Fibra Bruta (%)              | 3,72  | 3,62  | 3,36  | 3,17  |
| Matéria Mineral (%)          | 5,97  | 5,58  | 5,04  | 4,67  |
| Cálcio (%)                   | 0,98  | 0,90  | 0,82  | 0,78  |
| Fósforo Disponível (%)       | 0,50  | 0,45  | 0,40  | 0,38  |
| Sódio (%)                    | 0,22  | 0,21  | 0,21  | 0,19  |
| Colina (%)                   | 1,75  | 1,65  | 1,48  | 1,26  |
| Metionina Digest.(%)         | 0,66  | 0,64  | 0,57  | 0,50  |
| Lisina Digest.(%)            | 1,31  | 1,27  | 1,26  | 1,02  |
| Metionina + Cistina (%)      | 0,97  | 0,94  | 0,83  | 0,75  |
| Treonina (%)                 | 0,27  | 0,26  | 0,74  | 0,67  |

<sup>1,2</sup> **Fase Pré Inicial:** *Premix mineral* (por quilo de ração): Ferro mín. 125,0 mg, Iodo mín. 2,5 mg, Selênio mín. 0,750 mg; *Premix vitamínico* (por quilo de ração): Vitamina A mín. 18.750,0 UI, Vitamina D3 mín. 4.750,0 UI, Vitamina E mín. 70,0 UI, Vitamina K3 mín. 3,76 mg, Vitamina B1 mín. 5,0 mg, Vitamina B2 mín. 12,5 mg, Vitamina B6 mín. 7,2 mg, Vitamina B12 mín. 0,03 mcg, Ácido Fólico mín. 1,75 mg, Ácido de Cálcio mín. 25,0 mg, Biotina mín. 0,176 mg, Niacina mín. 75,0 mg. **Fase Inicial:** *Premix Mineral* (por quilo de ração): Ferro mín. 112,500 mg; Iodo mín. 2,250 mg; Selênio mín. 0,675 mg; *Premix vitamínico* (por quilo de ração): Vit. A mín. 16.875,000 UI; Vit. D3 mín. 4.275,000 UI; Vit. E mín. 63,000 UI; Vit. K3 mín. 3,384 mg; Vit. B1 mín. 4,500 mg; Vit. B2 mín. 11,250 mg; Vit. B6 mín. 6,480 mg; Vit. B12 mín. 0,027 mcg; Niacina mín. 67,500 mg; Ác. Pantotênico mín. 0,0225 mg; Ác. Fólico mín. 1,575 mg; Biotina mín. 0,1584 mg; B.H.T. 27,000 mg. **Fase Crescimento:** *Premix Mineral* (por quilo de ração): Ferro mín. 100,000 mg; Iodo mín. 2,000 mg; Selênio mín. 0,600 mg; *Premix Vitamínico* (por quilo de ração): Vit. A mín. 15.000,000 UI; Vit. D3 mín. 3.800,000 UI; Vit. E mín. 56,000 UI; Vit. K3 mín. 3,008 mg; Vit. B1 mín. 4,000 mg; Vit. B2 mín. 10,000 mg; Vit. B6 mín. 5,760 mg; Vit. B12 mín. 0,024 mcg; Niacina mín. 60,000 mg; Ác. Pantotênico mín. 0,020 mg; Ác. Fólico mín. 1,400 mg; Biotina mín. 0,1408 mg; B.H.T. 24,000 mg. **Fase Final:** *Premix Mineral* (por quilo de ração): Ferro mín. 75,000 mg; Iodo mín. 1,500 mg; Selênio mín. 0,450 mg; *Premix Vitamínico* (por quilo de ração): Vit. A mín. 11.250,000 UI; Vit. D3 mín. 2.850,000 UI; Vit. E mín. 42,000 UI; Vit. K3 mín. 2,256 mg; Vit. B1 mín. 3,000 mg; Vit. B2 mín. 7,500 mg; Vit. B6 mín. 4,320 mg; Vit. B12 mín. 0,018 mcg; Niacina mín. 45,000 mg; Ác. Pantotênico mín. 0,015 mg; Ác. Fólico mín. 1,050 mg; Biotina mín. 0,1056 mg; B.H.T. 18,000 mg.

4 Adicionado apenas no tratamento 1.



### ***Avaliação de Desempenho***

O desempenho dos frangos de corte foi avaliado semanalmente. Aos 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias de idade foi avaliado o peso vivo (PC), ganho de peso (GP), consumo de ração (CR), conversão alimentar (CA), mortalidade (MORT) e índice de eficiência produtiva (IEP), determinado aos 42 dias por:

$$\text{IEP} = [(\text{GP (g)} \times \text{Viabilidade (\%)}) \div \text{CA}] \div 10$$

### ***Avaliação de Rendimento de Partes da Carcaça***

Aos 42 dias de idade três aves de cada box foram retiradas casualmente e submetidas a jejum alimentar de 8 horas, sendo posteriormente transportadas ao Abatedouro Experimental da FMVZ, Unesp, Campus de Botucatu, onde foram pesadas e insensibilizadas por eletronarcose, abatidas, depenadas e evisceradas.

O rendimento de carcaça foi determinado pela relação percentual do peso da carcaça após a retirada das penas, sangue, cabeça, pés, vísceras, pescoço, gordura abdominal e o peso vivo obtido antes do abate das aves.

Para determinar o rendimento de partes foi calculada a relação percentual entre o peso das partes individuais (como dorso, peito, asas, coxa e sobrecoxa) e o peso total da carcaça.

### **Análise Estatística**

Os dados obtidos foram tabulados e submetidos à análise de variância complementada pelo teste de médias Tukey ( $P < 0,05$ ), através do procedimento de Modelo Linear Generalizado (GLM) do software SAS 9.3. (SAS Institute. SAS OnlineDoc 9.3.).

## **RESULTADOS**

### **Desempenho**

Houve diferença para as variáveis de ganho de peso (PF, GPM, GPMD) no período de 1 a 21 dias de idade (Tabela 3). Os frangos de corte do tratamento controle positivo obtiveram melhores ( $P < 0,05$ ) resultados para ganho de peso em comparação aos frangos de corte dos demais tratamentos.

**Tabela 3.** Desempenho de frangos de corte de 1-21 dias de idade suplementados com diferentes fontes e níveis de minerais Cu, Zn e Mn.

| <b>Tratamento</b> | <b>PI</b> | <b>PF</b> | <b>GP</b> | <b>GPD</b> | <b>CR</b> | <b>CA</b> | <b>MORT</b> |
|-------------------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|-------------|
| Controle +        | 46,31     | 1014,31a  | 968,00a   | 46,095a    | 1245,00   | 1,294     | 2,59        |
| Controle -        | 46,09     | 972,60b   | 926,50b   | 44,119b    | 1196,30   | 1,298     | 2,22        |
| Baixo HCM         | 46,22     | 975,70b   | 929,40b   | 44,258b    | 1193,10   | 1,288     | 2,22        |
| Alto HCM          | 46,14     | 964,60b   | 918,50b   | 43,736b    | 1207,60   | 1,321     | 1,11        |
| <i>Desv Pad</i>   | 0,475     | 37,715    | 37,691    | 1,794      | 48,287    | 0,044     | 1,18        |
| <i>Valor de P</i> | 0,792     | 0,040     | 0,041     | 0,041      | 0,109     | 0,412     | 0,567       |

PI = peso inicial (g); PF = peso final (g); GP = ganho de peso (g); GPD = ganho de peso diário (g); CR = consumo de ração (g/ave); CA = conversão alimentar (g/g); MORT = mortalidade (%).

Letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si estatisticamente (Valor de  $p < 0,05$ ).

Não houve diferença para o desempenho de frangos de corte no período de 1 a 42 dias de idade (Tabela 4).

**Tabela 4.** Desempenho de frangos de corte de 1-42 dias de idade suplementados com diferentes fontes e níveis de minerais Cu, Zn e Mn.

| <b>Tratamento</b> | <b>PI</b> | <b>PF</b> | <b>GP</b> | <b>GPD</b> | <b>CR</b> | <b>CA</b> | <b>MORT</b> | <b>IEP</b> |
|-------------------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|-------------|------------|
| Controle+         | 46,31     | 3081,20   | 3034,89   | 72,26      | 4824,03   | 1,611     | 7,04        | 417,34     |
| Controle-         | 46,10     | 2996,77   | 2950,67   | 70,25      | 4676,55   | 1,620     | 8,89        | 396,05     |
| Baixo HCM         | 46,22     | 3032,96   | 2986,74   | 71,11      | 4710,88   | 1,601     | 6,30        | 416,10     |
| Alto HCM          | 46,15     | 2977,72   | 2931,57   | 69,80      | 4625,88   | 1,609     | 9,26        | 394,27     |
| <i>P Value</i>    | 0,792     | 0,134     | 0,135     | 0,135      | 0,171     | 0,861     | 0,408       | 0,265      |
| CV%               | 0,475     | 3,373     | 3,084     | 2,300      | 10,923    | 0,045     | 4,303       | 11,935     |

PI = peso inicial (g); PF = peso final (g); GP = ganho de peso (g); GPD = ganho de peso diário (g); CR = consumo de ração (g/ave); CA = conversão alimentar (g/g); MORT = mortalidade (%), e IEP = índice de eficiência produtiva.

Letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si estatisticamente (Valor de  $p < 0,05$ ).

### ***Rendimento de Partes***

Os dados de rendimento de partes dos frangos de corte aos 42 dias de idade estão apresentados na tabela 5.

Não houve diferença entre os tratamentos para as variáveis avaliadas.

**Tabela 5.** Rendimentos de cortes de frangos de corte aos 42 dias de idade suplementados com diferentes níveis e fontes de Cu, Zn e Mn.

| <b>Tratamento</b> | <b>%Carc</b> | <b>%Gord</b> | <b>%Peito</b> | <b>%Coxa</b> | <b>%Asas</b> | <b>%Dorso</b> |
|-------------------|--------------|--------------|---------------|--------------|--------------|---------------|
| Controle +        | 75,32        | 1,19         | 39,213        | 30,14        | 10,37        | 17,65         |
| Controle -        | 75,42        | 1.14         | 39,481        | 29,63        | 10,42        | 17,79         |
| Baixo HCM         | 75,74        | 1.23         | 38,182        | 30,09        | 10,50        | 18,03         |
| Alto HCM          | 74,28        | 1.14         | 39,118        | 30,08        | 10,65        | 17,65         |
| <i>P Value</i>    | 0,450        | 0,796        | 0,126         | 0,430        | 0,183        | 0,545         |
| CV%               | 2,020        | 0,375        | 2,105         | 1,278        | 0,499        | 1,119         |

%Carc = porcentagem de carcaça em relação ao peso vivo; %Gord = porcentagem de gordura em relação ao peso da carcaça; %Peito = porcentagem de peito em relação ao peso de carcaça; %Coxa e Sobrecoxa = porcentagem de coxa + sobrecoxa em relação ao peso de carcaça; %Asa = porcentagem de asa em relação ao peso de carcaça; %Dorso = porcentagem de dorso em relação ao peso de carcaça.

## DISCUSSÃO

No período de 1 a 21 dias de idade, a melhoria do ganho de peso observado para frangos de corte recebendo dieta Controle + (Tabela 3) se deu à inclusão do aditivo promotor de crescimento Avilamicina. A não observação de melhoria verificada para os tratamentos pode ser justificada pelo fato de que os níveis suplementados dos minerais Cu, Zn e Mn estavam de acordo com as recomendações do manual da linhagem Cobb 500.

O uso de antimicrobiano melhoradores de desempenho tem efeito profilático contra patógenos melhorando desempenho produtivo (CASTANON, 2007), uma vez que estes patógenos se desenvolvem no intestino delgado das aves resultando em pior absorção de nutrientes, queda no desempenho e maior taxa de mortalidade (BORTOLUZZI et al., 2020).

O Cu também é usado tradicionalmente na avicultura como melhorador de desempenho (SHARIF et al., 2020). No entanto, para se obter tal efeito do Cu, a indústria avícola usa dosagens supra nutricionais, com níveis acima do recomendado, de 125 a 250

mg de Cu/kg de ração (FENG et al., 2020; SHARIFE et al., 2021). Desse modo, como em todos os tratamentos experimentais dessa pesquisa, os níveis de Cu suplementados foram níveis nutricionais (15 ppm), não era esperado efeito promotor de crescimento do mineral durante o período de 1 a 21 dias de idade, atribuindo apenas ao promotor de crescimento do tratamento controle positivo o efeito de maior peso final das aves.

Considerando o período todo de criação, de 1 a 42 dias de idade, não houve diferença ( $p < 0,05$ ) para o desempenho das aves em comparação às dietas experimentais. Experimentos anteriores (LUO et al, 2005, M'SADEQ et al., 2018; NGUYEN et al., 2020) indicam que tanto aves quanto suínos são mais responsivos à suplementação de Cu na forma hidroxicloretos mineral em comparação ao Cu na forma sulfato, justamente pela composição química dessa fonte, resultando em menor reatividade do mineral com os demais nutrientes da dieta, assegurando resultados satisfatórios de desempenho, mesmo quando comparado com a fonte Controle + desse experimento.

Nguyen et al (2020) compararam diferentes fontes (sulfato e hidroxicloretos) e níveis (15, 50, 100, 150 e 200 mg/kg de ração) de Cu em dietas de frangos de corte. Estes autores não observaram efeito do Cu sobre os parâmetros de desempenho na dosagem de 15 mg/kg, assim como os resultados desse experimento. Estes mesmos autores ainda afirmaram que a predição do nível recomendado deste mineral para se obter ação promotora de crescimento e melhorar os índices de ganho de peso e conversão é de 109 mg/kg a 72 mg/kg de ração, respectivamente.

No entanto, mesmo níveis nutricionais de Cu em níveis de 8 a 15 mg/kg de ração, podem apresentar bons resultados para os índices de desempenho. Segundo Miles et al. (1998), os minerais na forma hidroxiclreto apresentam partículas 7 vezes menores em comparação às fontes sulfato. Isso permite maior superfície de contato e por

consequência maior exposição às enzimas, proteínas metais dependentes e transportadores, aumentando a absorção no trato gastrointestinal.

Olukosi et al (2018) encontraram que frangos de corte alimentados com 15 ppm de Cu na forma hidroxicloreto obtiveram maior rendimento de peito em comparação aos frangos alimentados com Cu na forma sulfato com mesmo nível e até com níveis de 125 ppm, relacionando tal achado com o efeito antimicrobiano do Cu contra bactérias patogênicas, mesmo sendo usado em dosagem nutricional, aumentando a absorção de nutrientes permitindo maior acreção de proteína (PANG & APPLEGATE, 2007). Tal achado corrobora com os achados desse experimento, uma vez que 15 ppm de Cu na forma hidroxicloreto proporcionou os mesmos resultados que as aves com adição de promotor de crescimento.

Em alguns estudos nota-se efeito positivo sob o desempenho com níveis crescentes de Zn suplementados em dietas de frangos de corte (HUANG et al., 2007, LIU et al., 2015). Porém é relatado na literatura que a absorção do Zn diminui proporcionalmente à medida que aumenta a concentração de Zn no lúmen intestinal (COPPEN & DAVIES, 1987) e, segundo Huang et al (2007), a expressão do transportador de Zn no pâncreas diminui acima de 80 ppm de Zinco suplementado, garantindo a homeostase do mineral em situações de excesso.

No entanto, nota-se nessa pesquisa que a suplementação de 40 ppm de Mn e Zn na forma hidroximineral no tratamento Baixo HCM, proporcionou os mesmos resultados que os frangos de corte suplementados com os níveis recomendados (80mg/kg de ração) tanto na forma sulfato quanto na forma hidroxicloreto.

Estes dados estão de acordo com Cupertino et al. (2005) que afirmam que 40 ppm de Mn é suficiente para atender às exigências das aves enquanto Gajula et al (2011)

recomendam 60 ppm. Franklin et al. (2022), notaram que a suplementação de níveis mais baixos de Zn e Mn (40 ppm e 60 ppm respectivamente) proporcionaram melhor desempenho (1,6 g de GPD) para frangos de corte em comparação à fonte inorgânica. Segundo estes mesmos autores, a suplementação de Zn e Mn na forma inorgânica convencional (sulfato e óxido) pode ser até duas vezes maior que a fonte hidroximineral sem causar diferenças no desempenho, corroborando com os achados desta pesquisa sugerindo maior biodisponibilidade da fonte hidroximineral por conta da sua estrutura cristalina que garante alta estabilidade na dieta reduzindo sua perda e de outros nutrientes como vitaminas e enzimas (COHEN & STEWARD, 2012).

Groff-Urayama et al (2022) afirmam que 40 ppm de Mn na forma hidroxicloreto levou aos mesmos resultados que os níveis de 80 e 120 ppm para absorção ileal aparente, além de aumentar o rendimento de peito. Estes autores ainda afirmam que, fontes de minerais hidroxicloreto são mais biodisponíveis em comparação às fontes sulfato e isso permite maior concentração mineral nos tecidos, além de permitir reduzir a inclusão da fonte hidroxicloreto em dietas animais sem comprometer ou afetar o desempenho.

Não houve diferença entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ) para rendimento de partes nesse experimento (Tabela 5), assim como outros trabalhos na literatura que avaliaram diferentes fontes e níveis destes minerais para aves (BOIAGO et al, 2013; ATTIA et al., 2019).

No entanto outros autores seguindo a mesma linha de investigação observaram efeito da suplementação desses minerais sobre o rendimento de partes de frangos de corte. Santos et al (2021) e Qudsieh et al. (2018) observaram que a suplementação de Zn hidroximineral beneficiou o rendimento de partes em relação à fonte sulfato. Groff-Uirama et al (2022) também observaram que altos níveis de Cu e Mn na forma

hidroxicloreto melhoraram o rendimento de peito, ao passo que baixos níveis de Mn hidroxicloreto aumentam o rendimento de dorso e asas.

O Zn está envolvido no metabolismo da síntese de proteínas estruturais, colágeno e queratina (SUTTLE, 2010), assim como o manganês está envolvido na formação do tecido ósseo que permite maior sustentação às aves, especialmente o frango de corte moderno que tem rápido crescimento. Já o Cu está envolvido no metabolismo de lipídeos e Skrivan et al. (2002) observaram redução na porcentagem de gordura abdominal em frangos de corte suplementados com Cu, favorecendo a qualidade da carne.

Mesmo sabendo da participação desses minerais no metabolismo das aves e a possibilidade de modularem o rendimento de partes da carcaça, nota-se que níveis de hidroximinerais desta pesquisa mesmo quando abaixo do recomendado pelos guias nutricionais (Tratamento Baixo HCM) proporcionaram desempenho igualmente às fontes sulfatos em níveis de acordo com o recomendado (Tratamento Controle – e Tratamento Alto HCM), sobretudo, quando houve inclusão de promotor de crescimento (Tratamento Controle +).

O uso de promotor de crescimento não favoreceu o desempenho de frangos de corte e, as fontes hidroxicloreto minerais, independente de níveis altos e baixos, também proporcionaram os mesmos resultados que o tratamento controle, além de não afetarem à porcentagem de partes.

Em função dos dados obtidos nessa pesquisa, é possível constatar que, ao suplementar dietas de frangos de corte com fonte hidroxicloreto mineral Zn e Mn pode-se usar dosagens 50% abaixo do recomendado em comparação às fontes sulfatos, mantendo o desempenho produtivo, o rendimento de partes e garantindo melhor utilização do mineral, evitando, possivelmente, problemas ambientais como a excreção do mineral excedente.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AO, T. and J. PERC. 2013. “The replacement of inorganic mineral salts with mineral proteinates in poultry diets”. *Worlds Poultry Science Journal* 69 (1): 5-16. doi: 10.1017/S0043933913000019.
- ATTIA, Y. A., N. F. ADDEO, A. AL-MAMID and F. BOVERA. 2019. “Effects of Phytase Supplementation to Diets with or without Zinc Addition on Growth Performance and Zinc Utilization of White Pekin Ducks”. *Animals* 9 (5): 280-292. doi: 10.3390/ani9050280.
- BOIAGO, M. N., H. BORBA, P. A. SOUZA, A. M. SCATOLINI, F. B. FERRARI and A. GIAMPIRETO-CANECO. 2013. “Desempenho de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes fontes de selênio, zinco e manganês, criados sob condições de estresse térmico”. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 65 (1): 241-247. doi: 10.1590/S0102-09352013000100034.
- BORTOLUZZI, C., B. LUMPKINS, G. F. MATHIS, W. D. KING, D. E. GRAUGNARD, K. A. DAWSON and T. J. APPLGATE. 2019. “Zinc source modulates intestinal inflammation and intestinal integrity of broiler chickens challenged with coccidia and *Clostridium perfringens*.” *Poultry Science* 98 (5): 2211 – 2219. doi: 10.3382/ps/pey587.
- BORTOLUZZI, C.; VIEIRA, B. S.; APPLGATE, T. J. “Influence of dietary Zinc, Copper and Manganese on the intestinal health of broilers under *Eimeria* challenge.” *Frontiers in Veterinary Science* 7 (13): 1 – 7. doi: 10.3389/fvets.2020.00013
- BROOM, L. J., A. MONTEIRO, and A. PIÑON. 2021. “Recent Advances in Understanding the Influence of Zinc, Copper, and Manganese on the Gastrointestinal Environment of Pigs and Poultry”. *Animals* 11 (5): 1276. Doi: 10.3390/ani11051276.

CALDEIRA, E., B. WEIGEL, V. N. KUCHARCZYK, K. S. SELLINS, S. L. ARCHIBEQUE, J. J. WAGNER, H. HAN, J. W. SPEARS and T. E. ENGLE. 2019. "Trace mineral source influences ruminal distribution of copper and zinc and their binding strength to ruminal digesta." *Journal of Animal Science* 97 (4): 1852 – 1864. doi: 10.1093/jas/skz072.

CASTANON, J. I. 2007. "History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds." *Poultry Science* 86 (11): 2466 – 2471. doi: 10.3382/ps.2007-00249.

COHEN, J. and F. A. STEWARD. 2012. "Hydroxy minerals—The newest development in mineral nutrition." Accessed 12 October 2022. <http://www.feedinfo.com/console/PageViewer.aspx?page=3090428>

COPPEN, D. E., and N. T. Davis. 1987. "Studies on the effects of dietary zinc dose on Zn absorption in vivo and on the effects of Zn status on Zn absorption and body loss in young rats." *British Journal of Nutrition* 57 (1): 35 – 44. Doi: 10.1079/bjn19870007.

CUPERTINO, E. S., P. C. GOMES, L. F. T. ALBINO, H. S. ROSTAGNO, P. R. CECON, and M. SCHIMIDT. 2005. "Exigências de manganês para frangos de corte nas fases de crescimento e terminação." *Revista Brasileira de Zootecnia* 34 (6): 2308 – 2315. doi: 10.1590/S1516-35982005000700017.

FRANKLIN, S. B., M. B. YOUNG and M. CIACCIARIELLO. 2022. "The impact of different sources of Zinc, Manganese and Copper on broiler performance and excreta output." *Animals* 12 (9): 1 – 8. doi: 10.3390/ani12091067.

FENG, J., W. Q. MA, H. H. NIU, X. M. WU, Y. WANG, J. FENG. 2010. Effects of zinc glycine chelate on growth, hematological, and immunological characteristics in broilers". *Biological Trace Elements Research* 133 (2): 203 – 211. doi: 10.1007/s12011-009-8431-9.

GAJULA, S. S., V. K. CHELASANI, A. K. PANDA, V. L. N. RAJU MANTENA and R. R. SAVARAM. 2011. "Effect of supplemental inorganic Zn and Mn ante their

interactions on the performance of broiler chicken, mineral bioavailability, and immune response.” *Biological Trace Element Research* 139 (2): 1754 – 1763. doi: 10.1007/s12011-010-8647-8.

GROFF-URAYAMA, P. M., J. M. CRUVINEL, C. Y. OURA, T. S. SANTOS, F. K. LIMA-KRENCHINSKI, J. S. BATISTIOLI, P. A. D. RODRIGUES, K. V. Z. AUGUSTO, Y. HAN, and J. R. SARTORI. 2022. “Sources and levels of copper and manganese supplementation influence performance, carcass traits, meat quality, tissue mineral content, and ileal absorption of broiler chickens. *Poultry Science* 102 (2): 102330. doi: 10.1016/j.psj.2022.102330.

HUANG, Y. L., L. LU and X. G. LUO and B. LIU. 2007. “An optimal dietary zinc level of broiler chicks fed a corn-soybean meal diet.” *Poultry Science* 86 (12): 2582 – 2589. doi: 10.3382/ps.2007-00088.

KIDD. M. 2004. “Nutritional modulation of immune function in broilers.” *Poultry Science* 83 (4): 650 – 657. doi: 10.1093/ps/83.4.650

KLASING. K., and C. NAZIPIPOUR. “An effect of dietary copper source and level on copper levels and ileal *E. coli* survival in broiler chickens”. *Poultry Science*, v. 89, p. 498, 2010.

LEISURE, N. J., C. C. JASCKON, M. HUANG, T. B. MOORE, and F. A. STEWARD. 2014. *Micronutrients supplement*. Abingdon: United States Patent US.

LIU, Z. H., L. LU, R. L. WANG, H. L. LEI, S. F. LI, and L. Y. ZHANG. 2015. “Effects of supplemental zinc source and level on antioxidant ability and fat metabolism-related enzymes of broilers”. *Poultry Science* 94 (11): 2686 – 2684. doi: 10.3382/ps/pev251.

LUO, X. G., F. JI, Y. X. LIN, F. A. STEWARD, L. LU, B. LIU, and S. X. YU. 2005. "Effects of dietary supplementation with copper sulfate or tribasic copper chloride on broiler performance, relative copper bioavailability, and oxidation stability of vitamin E in feed". *Poultry Science* 84 (6): 888 -893. doi: 10.1093/ps/84.6.888.

MILES, R. D., S. F. O'KEEFE, P. T. HENRY, C. B. AMMERMAN, and X. G. LUO. 1998. "The effect of dietary supplementation with copper sulfate or tribasic copper chloride on broiler performance, relative copper bioavailability, and dietary prooxidant activity". *Poultry Science* 77 (3): 416 – 425. doi: 10.1093/ps/77.3.416.

M'SADEQ, S. A., S. B. WU, M. CHOCT, and R. A. SWICK. 2018. "Influence of trace mineral sources on broiler performance, lymphoid organ weights, apparent digestibility, and bone mineralization". *Poultry Science* 97 (9): 3176 – 3182. Doi: /10.3382/ps/pey197.

NGUYEN, H. T. T., N. MORGAN, J. R. ROBERTS, and R. A. SWICK. 2020. "Copper hydroxychloride is more efficacious than copper sulfate in improving broiler chicken's growth performance, both at nutritional and growth-promoting levels". *Poultry Science* 99 (12): 6964 – 6973. Doi: 10.1016/j.psj.2020.09.053.

OLUKOSI, O. A., S. V. KIJIK, and H. YANMING. 2018. "Copper and Zinc sources and levels of zinc inclusion influence growth performance, tissue trace mineral content, and carcass yield of broiler chickens". *Poultry Science* 97 (11): 3891 – 3898. doi: 10.3382/ps/pey247.

PANG, Y. and, T. J. APPELGALTE. 2007. "Effects of Dietary Copper Supplementation and Copper Source on Digesta pH, Calcium, Zinc, and Copper Complex Size in the Gastrointestinal Tract of the Broiler Chicken". *Poultry Science* 86 (3): 531 – 537. doi: 10.1093/ps/86.3.531

PRASAD, A. S., B. BAO, F. W. J. BECK, and F. H. SARKAR. 2011. "Zinc-suppressed inflammatory cytokines by induction of A20-mediated inhibition of nuclear factor-k-B". *Nutrition* 27 (7-8): 816 – 823. doi: 10.1016/j.nut.2010.08.010.

PIERCE, J., P. AO, P. CHARLTON, and L. A. TUCKER. 2009. “Organic mineral for broilers and laying hens: reviewing the status of research so far”. *Worlds Poultry Science Journal* 65 (3): 493 – 498. doi: 10.1017/S004393390900035X.

QUDSIEH, R. I., D. P. SMITH, and J. BRAKE. 2018. “elevated Dietary Inorganic Zinc on Live Performance, Carcass Yield, and Quality of Male and Female Broilers”. *Poultry Science* 97 (11): 4122 – 4130. doi: 10.3382/ps/pey274.

RAMIREZ, S., W-B. LU, R. DAVIN, H. V. D. BROEK, and Y. G. LIU. 2022. “Effect of encapsulates trace minerals premix in comparison with inorganic and organic microminerals on growth performance and mineral excretion of broiler.” *Journal of Food Science and Nutrition Research* 5 (1): 341 – 350. doi: 10.26502/jfsnr.2642-11000085.

ROSTAGNO, H. S., M. I. HANNAS, J. L. DONZELE, N. K. SAKOMURA, F. G. PERAZZO, A. SARAIVA, M. L. TEIXEIRA, P. B. RODRIGUES, R. F. OLIVEIRA, S. L. BARRETO, and C. O. BRUTO. 2017. *Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais*. Viçosa: UFV.

SANTOS, T. S.; K. V. Z. AUGUSTO, Y. HAN, M. M. P. SARTORI, J. C. DENADAI, C. T. SANTOS, N. C. SOBRAL, R. O. ROÇA, and J. R. SARTORI. 2021. “High levels of cooper and zinc supplementation in broiler diets on growth performance, carcase traits and apparent ileal mineral absorption”. *British Poultry Science* 62 (4): 579 – 588. doi: 10.1080/00071668.2021.1887453.

SHARIFE, M., M. A. U. RAHMAN, B. AHMED, Z. ABBAS, and F. HASSAN. 2021. “Copper Nanoparticles as Growth Promoter, Antioxidant and Anti-Bacterial Agents in Poultry Nutrition: Prospects and Future Implications”. *Biological Trace Element Research* 199 (supl) 1 – 12. Doi: 10.1007/s12011-020-02485-1.

SKRIVAN, M., S. SEVCIKOVA, W. TUMOVA, V. SKRIVANOVA, and M. MAROUNEK. 2002. “Effect of Copper Sulphate Supplementation on Performance of Broiler Chickens, Cholesterol Content and Fatty Acid Profile of Meat”. *Czech Journal of Animal Science* 47 (7): 275 – 280. Doi: 10.1080/713654978.

SUTTLE, N. F. 2010. *The mineral nutrition of livestock*. Oxfordshire: CABI Publishing, Oxfordshire.

YU, L., J. YI, Y. CHEN, M. HUANG, and N. ZHU. 2021. “Relative bioavailability of broilers chickens fed with zinc hydroxychloride and sulfate sources for corn-soybean meal”. *Biological Trace Element Research* 200 (2): 4114 – 4125. Doi: 10.1007/s12011-021-03013-5.

ZHANG, H., S., PAN, K., ZHANG, J., MICHIELS, Q., ZENG, X., DING, J., WHANG, H., PENG, J., BAI, Y., XUAN, Z., SU, and S., BAI. 2020. “Impact of dietary manganese on intestinal barrier and inflammatory response in broilers challenged with *Salmonella typhimurium*”. *Microorganism* 18 (5): 757. doi: 10.3390/microorganisms8050757.

**CAPÍTULO III**

**PERFIL METALOPROTEÔMICO DE PLASMA DE FRANGOS DE**  
**CORTE SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES FONTES E NÍVEIS DE**  
**COBRE, MANGANÊS E ZINCO**

**Resumo:** A suplementação de microminerais como o Cobre (Cu), Zinco (Zn) e Manganês (Mn) em dietas de frangos de corte é indispensável para o funcionamento normal do metabolismo, extrapolando a função nutricional e agindo a nível celular. Considerando as muitas interações que os minerais podem ter com o corpo da ave, diferentes fontes de microminerais podem resultar em diferentes respostas. A interação de uma proteína com um íon metálico à configura como metaloproteína ou proteína metal ligante, e em alguns casos, existe a necessidade deste íon metálico para que essa proteína consiga expressar sua função biológica. Uma das formas de medir as interações entre os minerais e as metaloproteínas é através do estudo metaloproteômico. O objetivo desse estudo foi avaliar diferentes níveis e fontes de suplementação de microminerais Cu, Zn e Mn sobre o perfil de metaloproteínas no plasma de frangos de corte. Para isso, foi coletado plasma de frangos de corte submetidos aos procedimentos de extração proteica para obtenção do proteoma para caracterização das proteínas associadas aos minerais estudados, identificação de níveis funcionais, vias metabólicas e interações entre proteína-proteína ou identificação de biomarcadores responsivos às concentrações de Cu, Zn e Mn no tecido plasmático de frangos de corte, podendo produzir respostas mais confiáveis sobre a biodisponibilidade, essencialidade e toxicidade desses minerais. A análise metaloproteômica demonstrou indução de proteínas associadas com sistema imune e o crescimento celular (IGLL1 – imunoglobulina lambda cadeia leve e cadeia pesada e RC3H1 – Ring finger and CCCH-type domains 1), proteínas envolvidas no metabolismo do oxigênio (HBE e HBG2 – hemoglobina subunidade alfa e hemoglobina subunidade beta) e transporte de nutrientes (RBP4 – retinol binding protein 4), sugerindo envolvimento dessas proteínas com os minerais estudados e com potencial chance de serem possíveis biomarcadores.

**Palavras chave:** biomarcadores, hidroxicloretos minerais, metaloproteínas, *metal binding proteins*, *Shotgun*.



## INTRODUÇÃO

A suplementação de microminerais na nutrição de frangos de corte desempenha importante papel em muitos processos metabólicos no organismo. Os microminerais são essenciais para crescimento e desenvolvimento adequado das aves e, ainda que sejam exigidas em pequenas quantidades, pois as dietas à base de milho e farelo de soja não possuem quantidades suficientes de microminerais para atender as exigências das aves, é necessário que a suplementação seja feita através de premixes ou núcleos minerais (RAMIREZ et al., 2022; MAIORKA e MACARI, 2002).

Os microminerais mais estudados na nutrição de frangos de corte são o Cobre (Cu), Zinco (Zn) e Manganês (Mn), por exercerem diversos papéis e funções no metabolismo e por refletirem diretamente no desempenho produtivo caso não sejam suplementados de acordo com a exigência da ave (GENG et al., 2022; HU et al., 2022; MENG et al., 2021).

Cobre, Zn e Mn geralmente são suplementados em dietas de aves nas formas inorgânicas, como sulfatos, óxidos, carbonatos. Embora tenham baixo custo em comparação às fontes orgânicas, as fontes inorgânicas possuem baixa biodisponibilidade e seu uso acima do recomendado pode acarretar problemas no desempenho das aves e de poluição ambiental (LU et al., 2010; UNDERWOOD & SUTTLE, 1999).

Os hidroxicloretos representam a terceira geração das fontes minerais disponíveis comercialmente para dietas das aves e apresentam características diferentes das fontes usuais como baixa reatividade, baixa capacidade de formação de complexos nutricionalmente indisponíveis, menor higroscopicidade e solubilidade em água (PEREZ et al., 2017; OLUKOSI et al., 2019).

São muitas as possibilidades de interações entre estes minerais e demais componentes da dieta, além de interações com o próprio organismo animal. Dentre as

interações com o organismo há a influência da fonte e do nível do micromineral sobre o desempenho, rendimento de partes e de carcaça, qualidade de carne e concentração mineral em tecidos e órgãos. No entanto, há também a participação desses microminerais em vias metabólicas e ação sobre o perfil de algumas proteínas que quando associadas com o mineral desempenham uma função biológica específica (MOUNICOU et al., 2009; BAO & CHOCT, 2012).

Nesse sentido, a suplementação de dietas com microminerais afeta a expressão de genes que modulam o metabolismo animal e a proteômica é importante ferramenta que permite caracterizar as estruturas e funções do perfil proteico no organismo animal alterada por tais fatores externos e, uma série de proteínas foram identificadas permitindo correlacionar estratégias nutricionais com interações metabólicas (BARCELÓ-BLATORI & GOMES, 2009; WANG et al., 2019).

Os microminerais Cu, Zn e Mn agem no organismo como cofator ou constituintes de metaloenzimas. O Zn participa na síntese de colágeno e queratina, importantes proteínas para o sistema estrutural, como tecidos internos, ossos, penas, bico e unhas; o Cu está envolvido no processo de reticulação do colágeno e elastina além de cofator para diversas cuproenzimas (proteínas dependentes de Cobre) enquanto o Mn é essencial para a mineralização dos ossos, dentre outras funções essenciais (MANANGI et al., 2012).

No entanto, tais minerais imprimem diferentes respostas frente às diferentes fontes e níveis suplementados na indústria avícola. Nesse sentido, as exigências de microminerais para frangos de corte variam de acordo com os guias nutricionais disponíveis e desse modo, acaba criando-se uma lacuna no entendimento da relação entre perfil proteico frente os níveis e fontes desses microminerais. Desse modo, o objetivo

desta pesquisa foi avaliar a interação entre às fontes e níveis do microminerais Cu, Mn e Zn e o perfil de metaloproteínas do tecido plasmático de frangos de corte.

## MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos executados nesse estudo foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética de Uso de Animais – CEUA/FMVZ, processo nº 0033/2020.

### *Aves, Dietas e Tratamentos Experimentais*

Para o estudo proteômico foram utilizados 810 frangos de corte machos (Cobb 500). As aves foram distribuídas em 3 tratamentos com 9 repetições de 30 aves por repetição em esquema totalmente casualizado. Os frangos foram criados desde um dia de idade em galpão com piso de concreto cobertos com maravalha com área 2,0m<sup>2</sup>/box (15 frangos/m<sup>2</sup>) durante 42 dias. Cada box foi equipado com um comedouro tubular e bebedouros tipo *nipple* (5 bebedouros/box).

Os três tratamentos experimentais consistiam em duas fontes e diferentes níveis de Cu, Zn e Mn (níveis recomendados e níveis reduzidos de acordo com o indicado pelo manual da linhagem Cobb 500), conforme apresentados na Tabela 1 e descritos em: Sulf. Controle (15 ppm de sulfato Cu, 80 ppm de sulfato Mn e 80 ppm de sulfato Zn); Baixo HCM (15 ppm de hidroxiclreto Cu, 40 ppm de hidroxiclreto Mn e 40 ppm de hidroxiclreto Zn) e HCM Controle (15 ppm de hidroxiclreto Cu, 80 ppm de hidroxiclreto Mn e 80 ppm de hidroxiclreto Zn). As dietas foram isoproteicas e isoenergéticas formuladas a base de milho e farelo de soja seguindo as recomendações de Rostagno et al. (2017), diferindo apenas nos níveis dos minerais avaliados e divididas em quatro fases: pré inicial (1 a 7 dias); inicial (8 a 21 dias); crescimento (22 a 35 dias) e

final (36 a 42 dias). O fornecimento da ração e água foram *ad libitum* durante toda a execução da pesquisa.

**Tabela 1.** Tratamentos experimentais e níveis de suplementação (mg/kg) e fontes de Cu, Mn e Zn em dietas de frangos de corte.

| Trat.          | Sulfato |    |    | Hidroxi mineral |    |    |
|----------------|---------|----|----|-----------------|----|----|
|                | Cu      | Mn | Zn | Cu              | Mn | Zn |
| Sulf. Controle | 15      | 80 | 80 |                 |    |    |
| Baixo HCM      |         |    |    | 15              | 40 | 40 |
| HCM Controle   |         |    |    | 15              | 80 | 80 |

Sulf. = Sulfato; HCM = Hidroxicloreto mineral; Sulf. Controle+ = 15 ppm de Sulfato de Cobre + 80 ppm de Sulfato de Manganês + 80 ppm de sulfato de Zinco; BaixoHCM = 15 ppm de Cobre Hidroximineral + 40 ppm de Manganês Hidroximineral + 40 ppm de Zinco Hidroximineral; AltoHCM = 15 ppm de Cobre Hidroximineral + 80 ppm de Manganês Hidroximineral + 80 ppm de Zinco Hidroximineral.

### **Coleta de Amostras**

Aos 42º dias de idade foi coletado sangue de 3 aves por unidade experimental por punção da veia jugular utilizando seringas descartáveis. O plasma foi obtido após centrifugação a 2000 rpm por 10 minutos. Após a separação do plasma, as amostras foram acondicionadas em criotubos e armazenadas imediatamente em *freezer* -80 até a realização do estudo proteômico.

### **Extração e Quantificação de Proteínas**

Para a extração das proteínas foram homogeneizados aproximadamente 100 µl de cada pool do plasma em tampão de lise (uréia 7 mol L<sup>-1</sup>, tiouréia 2 mol L<sup>-1</sup>, ditiotreitól 40 mmol L<sup>-1</sup> e bicarbonato de amônio 50 mmol L<sup>-1</sup>). A mistura foi submetida a extração em desruptor de células por três ciclos de 20 segundos e descanso em gelo de um minuto entre os ciclos. Em seguida os extratos foram centrifugados durante 20 minutos, a 14 000 xg e 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e transferido para um novo

microtubo. Posteriormente as proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando albumina de soro bovino (BSA) como proteína padrão.

### ***Digestão de Proteínas em Solução***

A partir dos extratos proteicos, 50 µg de proteína de cada amostra foi diluída em 60 µL de bicarbonato de amônio (50 mmol L<sup>-1</sup>). Em seguida foram adicionados 25 µL de Rapigest (0,2% (v/v)) em cada amostra e transferidas para bloco aquecido a 37°C durante 60 minutos. Posteriormente, as proteínas presentes nas amostras foram reduzidas com a adição de 2,5 µL de ditioneitol (100 mmol L<sup>-1</sup>) sendo incubadas (37°C) por 40 minutos, e posteriormente alquiladas por meio da adição de 2,5 µL de iodoacetamida (300 mmol L<sup>-1</sup>). Logo após as etapas de redução e alquilação, os extratos proteicos foram incubados em temperatura ambiente, na ausência de luz, por 30 minutos. Na sequência foram adicionados 10 µL de solução de tripsina na concentração de 0,1 µg µL<sup>-1</sup> (1:50) procedendo-se imediatamente a digestão a 37°C por 16 horas. A digestão foi interrompida com 10 µL de ácido trifluoroacético 5% (v/v) e as amostras foram incubadas novamente durante 90 minutos a 37°C. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 14 000 rpm por 30 minutos em temperatura ambiente. Logo após a centrifugação os sobrenadantes foram separados e transferidos para um novo microtubo. As amostras foram dessalinizadas por meio de colunas Sep-Pak Vac C18 (Waters, Milford, EUA) conforme as recomendações do fabricante. As soluções contendo os peptídeos foram reduzidas por meio de centrifugação a vácuo e armazenadas a -20°C até a análise por espectrometria de massas em sequência acoplada com cromatografia líquida (LC-MS/MS).

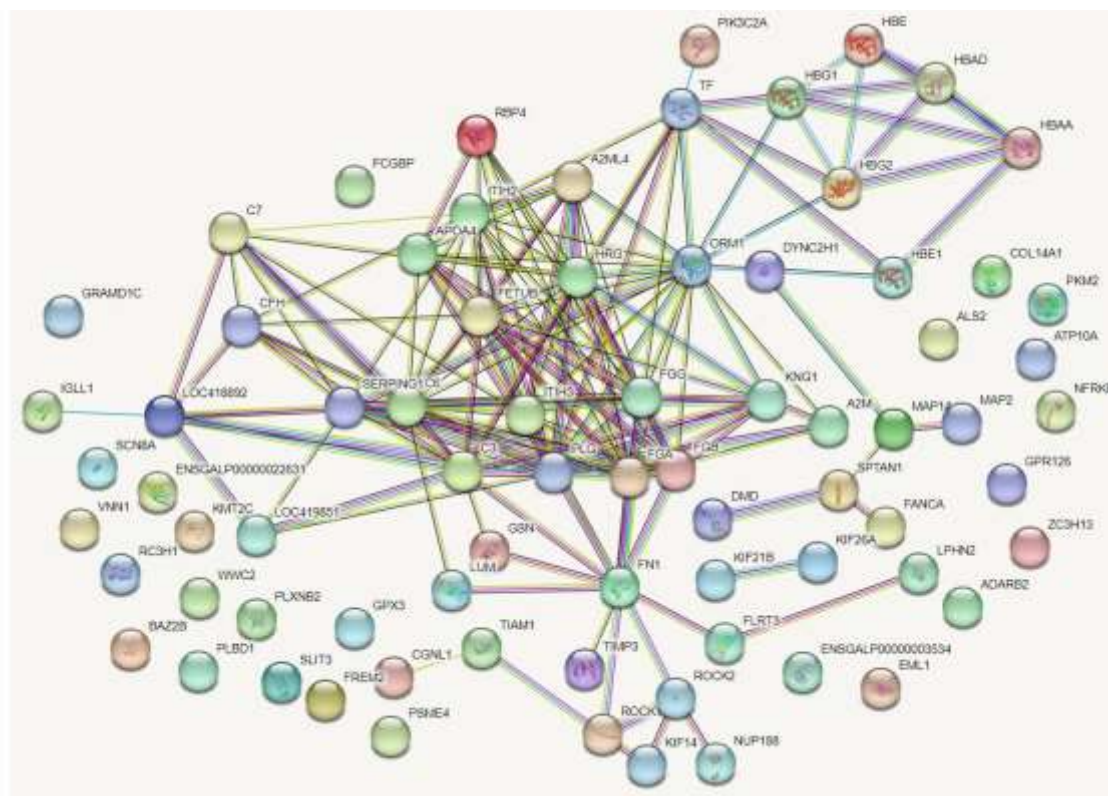
### ***Identificação e Análise de Bioinformática e Expressão de Proteínas***

A análise funcional das proteínas *upregulated* e *downregulated* (proteínas mais ou menos expressas) foi realizada utilizando o *software* Blast2GO v.6.0.3 a partir das sequências peptídicas FASTA das proteínas obtidas no banco de dados *Uniprot*. Por meio os termos GO (*Gene Ontology*) as proteínas foram classificadas em três níveis: processo biológico, função molecular e componente celular. A ferramenta online *String* (*string-db.org* v.11.5) foi utilizada para construir a rede de interação proteína-proteína utilizando o nível de confiança mais alto (0,900). A rede foi agrupada em 3 *clusters* utilizando o agrupamento *kmeans*. Os nós desconectados na rede foram ocultados. A análise de enriquecimento da via *KEGG* (Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto) foi realizada utilizando o *software* *Cytoscape* (v.3.9.1) com o plugin *String* para avaliar as vias metabólicas alteradas ( $FDR < 0,05$ ) pelas proteínas diferencialmente expressas.

## **RESULTADOS**

Os tratamentos avaliados foram confrontados para melhor visualização do perfil das proteínas identificadas, conforme a descrição a seguir: Sulf. Controle vs Baixo HCM; Sulf. Controle vs Controle HCM e por fim, Baixo HCM vs HCM Controle, e as figuras 1, 2 e 3 representam, respectivamente, a rede de interação de proteínas identificadas nas amostras de plasma de frangos de corte. Já o resultado com a expressão de todas as

proteínas evidenciadas nos tratamentos experimentais estão descritas no Tabela S1 (material suplementar).



**Figura 1.** Rede de interação entre proteínas identificadas na comparação entre o grupo Sulf. Controle vs Baixo HCM e diferencialmente expressas no plasma de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de cobre, zinco e manganês. Cada nó (esfera colorida) representa uma proteína com o nome do respectivo gene. As linhas que conectam cada nó indicam evidência da interação (quanto mais espessa maior o nível de confiança).

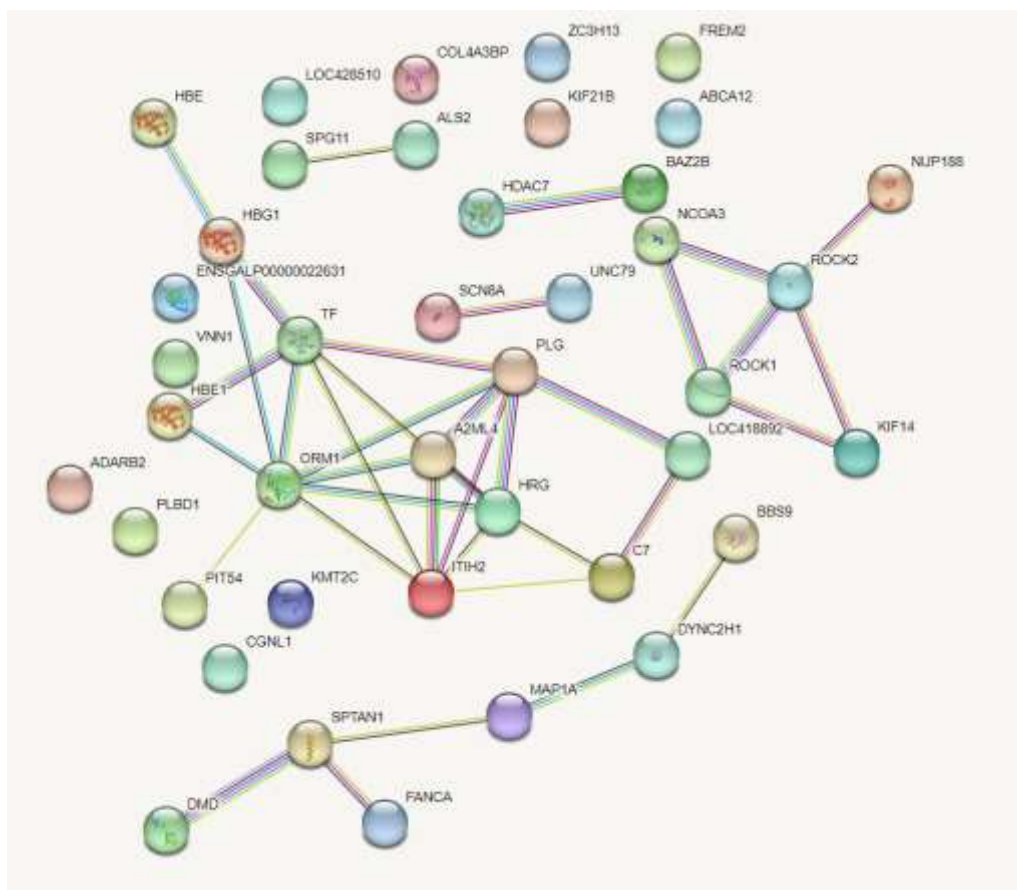
Na rede de interação de proteínas entre os tratamentos Sulf. Contre vs Baixo HCM, 75 proteínas foram evidenciadas. Tais proteínas, nos termos de ontologia genética, estão distribuídas entre os processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares das quais foram associadas. Em relação ao processo biológico, as proteínas estão envolvidas em resposta imune humoral (2,79%), regulação negativa de proteólise (3,35%), ativação da resposta imune (2,79%), regulação positiva da resposta imune (3,07%), processos catabólicos de regulação de hidrogênio (1,39%), regulação da

proteólise (3,63%), regulação da atividade da hidrolase (4,74%), detoxificação da oxidação celular (1,67%), resposta de defesa (3,91%), coagulação sanguínea (1,95%), processo efetor imunológico (2,73%), resposta a estímulos (12,29%), regulação negativa do processo metabólico de proteínas celulares (3,63%), coagulação do sangue – formação de coágulos de fibrina (0,83%), resposta a ferimentos (2,23%), resposta ao estresse (6,42%), ativação plaquetária (1,17%), regulação do processo do sistema imune (3,63%), agregação plaquetária (0,83%), resposta a outros organismos (3,07%), resposta imune inata (2,23%), adesão de células (3,07%), resposta imune (3,07%), adesão da célula ao substrato (1,39%), resposta inflamatória aguda (0,83%), processo metabólico do Pantotenato (0,55%), atividade de regulação catalítica (5,02%), resposta de defesa a outros organismos (2,51%), morfogêneses de células envolvidas em diferenciação (2,23%), desenvolvimento/crescimento de células (4,73%).

Dentre as funções moleculares, destacam as funções: atividade inibidora de endopeptidase (15,49%), atividade reguladora de peptidade (16,90%), atividade carreadora de oxigênio (8,45%), ligação ao oxigênio (8,45%), atividade inibidora de endopeptidase tipo serina (8,45%), ligação heme (9,85%), atividade reguladora enzimática (19,71%), ligação de microtúbulo (9,85%) e atividade da proteína serina/treonina quinase dependente de Rho (2,81%).

E para as funções de componente celular, observam-se função de região extracelular (29,36%), espaço extracelular (19,84%), complexo de hemoglobinas (4,76%), complexo hepatoglobina-hemoglobina (3,96%), complexo de fibrinogênio (2,38%), matriz extra celular contendo colágeno (6,34%), matriz extracelular (7,14%) e complexo contendo proteínas (26,19%).





**Figura 2.** Rede de interação entre proteínas identificadas na comparação entre o grupo Sulf. Controle vs Controle HCM e diferencialmente expressas no plasma de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de cobre, zinco e manganês. Cada nó (esfera colorida) representa uma proteína com o nome do respectivo gene. As linhas que conectam cada nó indicam evidência da interação (quanto mais espessa maior o nível de confiança).

Na rede de interação de proteínas entre os tratamentos Sulf. Contre vs HCM Controle, 41 proteínas foram evidenciadas. Tais proteínas estão distribuídas entre as funções moleculares e componentes celulares das quais foram associadas.

Entre os processos moleculares em que estas proteínas estão envolvidas destacam-se as funções de atividade carreadora de oxigênio (17,64%), ligação oxigênio (17,64%), atividade motora (29,41%), atividade motora dos microtúbulos (23,52%) e atividade de proteína serina/treonina quinase dependente de Rho (11,76%).



(8,69%), resposta imune humoral (10,86%), transporte de lipídeos (13,04%), ativação da resposta imune (10,86%) e processo metabólico do Pantotenato (4,34%).

As funções dentro do processo de componente celular dessa rede de interação de proteica (Baixo HCM vs HCM Controle) são região extracelular (57,14%), espaço extracelular (35,71%) e complexo hemoglobina (7,14%). Enquanto as funções moleculares são atividade inibidora de endopeptidase (20%), atividade carreadora de oxigênio (10%), atividade transportadora de lipídeos (16,66%), ligação de oxigênio (10%), atividade inibidora de endopeptidase tipo serina (13,33%) e ligação de lipídeos (30%).

## DISCUSSÃO

Na presente pesquisa a suplementação de diferentes fontes e níveis de Cu, Mn e Zn promoveu mudanças na expressão de proteínas plasmáticas associadas a vários processos e funções biológicas. A análise de ontologia genética indicou a interação das proteínas em processos pertinentes como sistema imune, transporte de oxigênio, lipídeos e ação sobre o crescimento e desenvolvimento de células. A partir dessa análise, cinco proteínas foram associadas com a função de *metal binding protein*: IGLL1 (complexo imunoglobulina cadeia lâmbida), HBE e HBG2 (hemoglobina subunidade  $\beta$  e hemoglobina subunidade  $\alpha$ , respectivamente), RBP4 (*retinol binding protein 4*) e RC3H1 (*Ring finger and ccch-type zinc finger*).

As imunoglobulinas são moléculas que fazem parte do sistema imune inato capazes de reconhecer agentes estranhos e desencadear respostas imunológicas como a fagocitose e o sistema complemento. Cada molécula de imunoglobulina consiste em duas cadeias pesadas idênticas e duas cadeias leves idênticas e, há duas classes de cadeias leves: *kappa* e *lâmbida* (SANCHEZ & CAZENAVE, 1987; OBERDOEFFER et al.,

2003). Nesse estudo, a proteína IGLL1 foi expressa unicamente no grupo suplementado com menores níveis de hidroxicloreto mineral (Baixo HCM). Estudos proteômicos correlacionando a nutrição mineral com imunoglobulinas de frangos de corte são escassos. No entanto, Pozzi et al., (2015) observaram a presença de íons de zinco na cadeia pesada de imunoglobulinas do leite humano e segundo Mounicou et al. (2009), íons de Zn tem afinidade com grupos tiol e de hidrogênio, presentes na estrutura da hemoglobina. A atividade imunológica é significativamente influenciada pela dieta, especialmente pela suplementação de micronutrientes (CHOCT, 2009). O Zn é um micromineral que desempenha importante papel no processo fisiológico e patológico, modulando a resposta imune (FENG et al., 2009). Joraz et al (2022) observaram que a suplementação do Zn na forma orgânica aumentou a expressão de imunoglobulinas em frangos de corte em comparação às aves suplementadas com a forma inorgânica. O zinco na forma orgânica estimula a imunidade humoral pela ativação e diferenciação de linfócitos B em imunoglobulinas de forma mais eficiente que as fontes inorgânicas (LAMMERS et al., 2010). Como os hidroxicloretos possuem características químicas que conferem a eles funcionalidades semelhantes aos minerais orgânicos, é possível correlacionar a expressão exclusiva das proteínas IGLL1 ao grupo suplementado com hidroxicloretos minerais.

As proteínas HBE e HBG2 fazem parte do complexo de hemoglobinas. Essas metaloproteínas e suas subunidades são as principais responsáveis pela detecção, transporte e armazenamento do oxigênio nos animais vertebrados (GREENE et al., 2019). Tanto as proteínas HBE e HBG2 foram *down* reguladas no tratamento Sulf Controle em comparação ao grupo HCM controle. HBE e HBG2 são formadas pela incorporação de um íon ferro em protoporfirina IX. No entanto, no momento da formação do grupo heme no enterócito há também a formação de protoporfirina de zinco (metal proteína

dependente de um íon de Zn) que pode se ligar à globina ao invés do grupo heme. Essa ligação da protoporfirina de Zn é um indicador de alta biodisponibilidade de Fe e por consequência formação de hemoglobinas e correta oxigenação dos tecidos (VIEIRA et al., 2017). Na estrutura de hemoglobina há sítios de ligação com afinidade ao Zn. Esses sítios de ligação do Zn são resíduos de cisteína (sítio Cys-93) e histidina (sítio (His-146) afetando diretamente a capacidade e propriedades transportadoras de oxigênio pela hemoglobina caso o Zn não esteja ligado (NOVIKOVA et al., 2019).

Além do Zn, o Cu também está associado com as proteínas do complexo de hemoglobinas pois é essencial para sua síntese. Em estudo com ratos, Chen et al. (2018) demonstraram que os animais que receberam dietas deficientes em Cu apresentaram redução da concentração de hemoglobinas em comparação ao grupo controle, além de prejuízo no metabolismo do Fe, causando anemia aos animais desse tratamento, uma vez que o Cu também é componente de cuproenzimas e ferroxidases, que por sua vez, são constituintes das células vermelhas do sangue que garantem correta distribuição de oxigênio aos tecidos (MIYAJIMA et al., 2003, CHEN et al., 2018).

A correta distribuição de oxigênio pelas hemoglobinas é imprescindível para correto crescimento e desenvolvimento de tecidos, principalmente em linhagens de frangos de corte modernos com rápido crescimento e acresção muscular (OLKOWSKI et al., 1999). Nesse sentido, podemos inferir que as fontes hidroxicloretos, devido às suas características químicas e estruturais, como o tipo de ligação e tamanho da partícula, favoreceram o metabolismo do complexo de hemoglobinas, permitindo que as aves do tratamento HCM Controle obtivessem os mesmos resultados que as aves do grupo Sulf Controle.

A proteína RBP4, ou proteína de ligação 4 ao retinol desempenha importante papel no direcionamento e circulação do retinol (vitamina A) (GODA et al., 1993). De

acordo com os resultados desse estudo, a proteína RBP4 foi expressa exclusivamente no tratamento Baixo HCM quando comparado com o tratamento HCM Controle e Sulf Controle. A proteína RBP4 é expressa majoritariamente no fígado e no tecido adiposo, justamente onde a maioria das vitaminas hidrofóbicas são armazenadas, assim como a vitamina A, principal amina carregada por esta proteína (WU et al., 2009).

O retinol é armazenado no fígado na forma de ésteres de retinil e, quando precisam ser mobilizados do fígado até os demais tecidos, são hidrolizados novamente em vitamina A e ligados à proteína RBP4 no hepatócito, caindo na corrente sanguínea e distribuídos pelo corpo (STEINHOF et al., 2021).

A RBP4, além de carreador específico do retinol, também tem importante ação na adipocina (proteínas secretadas pelo tecido adiposo) que auxilia no ganho de peso e distribuição de energia (ANAND et al., 2021). Em pesquisas com matrizes suínas, Wang et al (2023) revelaram que além do envolvimento da *retinol binding protein 4* estar envolvida no metabolismo da vitamina A, também pode regular a proliferação, migração e apoptose de células do endométrio, tecidos com alto turnover, favorecendo a implantação de embriões. Desta forma, pode-se inferir que a RBP4 pode agir da mesma forma em células intestinais, que também possuem alto *turnover*. Segundo Goda et al. (1993), a expressão da proteína RBP4 já acontece logo no início do desenvolvimento do intestino de frangos de corte, modulando a absorção de nutrientes no lúmen, especialmente a absorção da vitamina A.

Já o grupo Baixo HCM expressou exclusivamente a proteína Ring Zinc Finger CCHC type (RC3H1) quando comparado com os demais tratamentos. Tal proteína exerce participação importante no processo biológico, ativando a resposta imune inata, mitigando infecções por agentes patogênicos (CHEN et al., 2022). Além da ação imunostimulante, a proteína RC3H1 suprime a transcrição do material genético de vírus

impedindo sua replicação. A família das proteínas Ring Finger Protein precisa da ligação de íon de zinco em sua estrutura para conferir estabilidade à proteína e permitir que exerça sua função (BARLOW et al., 1994), principalmente em induzir ou exacerbar respostas imunes ou proteger de certas desordens imunes (SMATTI et al., 2019).

Tal comportamento da proteína RC3H1 na resposta de ontologia genética deste experimento pode ter ocorrido devido as características químicas e estruturais do zinco hidroxicloreto por ser mais biodisponível e permitir a conexão do íon mineral com o sítio de ligação da proteína. Já o fato de níveis mais baixos dos minerais estudados aumentarem a expressão da proteína RC3H1, mesmo quando comparado com a fonte hidroxicloretos em níveis mais altos (HCM Controle), pode ter se dado devido a competição dos minerais por transportadores no lúmen intestinal quando suplementados em altos níveis, uma vez que alguns minerais compartilham os mesmos carreadores. Somado a isso, altos níveis de minerais, como o Zn por exemplo – essencial para metaloproteína HC3H1, imprimem *feedback* negativo e reduzem a expressão de transportadores como forma de garantir a homeostase do mineral (HUANG et al., 2007).

A suplementação de Cu, Zn e Mn na forma hidroxicloreto mineral, principalmente a suplementação em 50% de Zn e Mn, modulou positivamente a expressão das proteínas supracitadas. Novamente, este fato pode estar associado à maior biodisponibilidade dessa fonte devido às ligações químicas de sua estrutura, o tamanho da partícula do mineral e sua solubilidade, já confirmada previamente por alguns autores (GROFF-URAYAMA et al., 2022; VILLAGÓMEZ-ESTRADA et al., 2020; OLUKOSI et al., 2018; LU et al., 2010), que permitem maior absorção e incorporação dos minerais aos processos biológicos, especialmente aos processos e proteínas/enzimas metais dependentes.

Dessa forma, as proteínas descritas nessa pesquisa, apesar da necessidade de estudos complementares, podem ser possíveis biomarcadores que consigam mensurar molecularmente as interações de estratégias nutricionais sobre os processos fisiológicos e a conversão dessas respostas em parâmetros de desempenho, saúde e bem-estar de frangos de corte.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANAND, P., S. V. KUMNAR, K. RAVI, and T. SIMMI. 2021. “Differential gene expression in duodenum of colored broiler chicken divergently selected for residual feed intake”. *Tropical Animal Health and Production* 53 (59). Doi: 10.1007/s11250-020-02519-9
- BAO, Y. M., and M. CHOCT. 2009. “Trace mineral nutrition for broiler chickens and prospects of application of organically complexed trace minerals: a review”. *Animal Production Science* 49 (4): 269 – 282. doi: 10.1071/EA08204.
- BARCELÓ-BATTLORI, S., and R. GOMES. 2009. “Proteomics in obesity research”. *Proteomics Clinical Applications* 3 (2): 263 – 278. doi: 10.1002/prca.200800178.
- BARLOW, P. N., B. LUISI, A. MILNER, M. ELLIOTT, and R. EVERETT. 1994. “Structure of the C<sub>3</sub>HC<sub>4</sub> domain by <sup>1</sup>H-nuclear magnetic resonance spectroscopy: a new structural class of zinc-finger”. *Journal of Molecular Biology* 237 (2): 201 – 211. doi: 10.1006/jmbi.1994.1222.
- CHEN, H., G. HUANG, T. SU, H. GAO, Z. K. ATTIEH, A. T. McKIE, G. J. ANDERSON, and C. D. VULPE. 2023. “Decreased hephaestin activity in the intestine of copper-deficient mice causes systemic iron deficiency”. *The Journal of Nutrition* 136 (5): 1236 – 1241. doi: 10.1093/jn/136.5.1236.
- CHOCT, M. 2009. “Managing gut health through nutrition”. *British Poultry Science* 50 (1): 9 – 15. doi: 10.1080/00071660802538632.



FENG, J., W. Q. MA, H. H. NIU, X. M. WU, Y. WANG, and J. FENG. 2010. “Effects of zinc glycine chelate on growth, hematological, and immunological characteristics in broilers”. *Biological Trace Element Research* 133 (2): 203 – 211. doi: 10.1007/s12011-009-8431-9.

GENG, Y., X. SUN, L. LU, X. LIN, X. LIAO, L. ZHANG, R. WANG, and X. LUO. 2022. “Effect of in ovo manganese injection on the embryonic development, antioxidation, hatchability, and performances of offspring broilers under normal and high temperatures”. *Poultry Science*, 101(8): 101936. doi: 10.1016/j.psj.2022.101936.

GRENNE, E., J. FLEES, D. DADGAR, B. MALLMANN, S. ORLOWSKI, A. DHAMAD, S. ROCHELL, M. KIDD, C. LAURENDON, H. WHITFIELD, C. BREARLEY, N. RAJARAM, C. WALK, and S. DRIDI. 2019. “Quantum blue reduces the severity of woody breast myopathy via modulation of oxygen homeostasis-related genes in broiler chickens. 2019”. *Frontiers in Physiology* 10: 1251. doi: 10.3389/fphys.2019.01251.

GODA, T.; M. PACIFICI, and S. TAKASE. 1993. “Induction and distribution of cellular retinol-binding protein type two during villus-crypt development in the chick duodenum”. *Biologie of the Neonate* 64 (6): 392 – 398. doi: 10.1159/000244016.

GROFF-URAYAMA, P. M., J. M. CRUVINEL, C. Y. OURA, T. S. SANTOS, F. K. LIMA-KRENCHINSKI, J. S. BATISTIOLI, P. A. D. RODRIGUES, K. V. Z. AUGUSTO, Y. HAN, and J. R. SARTORI. 2022. “Sources and levels of copper and manganese supplementation influence performance, carcass traits, meat quality, tissue mineral content, and ileal absorption of broiler chickens”. *Poultry Science* 102 (2): 102330. doi: 10.1016/j.psj.2022.102330.

HU, Y., Z. CHEN, L. LU, L. ZHANG, T. LIU, X. LUO, and X. LIAO. 2022. “Determination of dietary copper requirement by the monoamine oxidase activity in kidney of broilers from 1 to 21 days of age”. *Animal Nutrition* 8 (1): 227–234. doi: 10.1016/j.aninu.2021.05.013

HUANG, Y. L., L. LU and X. G. LUO and B. LIU. 2007. “An optimal dietary zinc level of broiler chicks fed a corn-soybean meal diet.” *Poultry Science* 86 (12): 2582 – 2589. doi: 10.3382/ps.2007-00088.

JAROSZ, L. S., K. MICHALAK, A. MAREK, M. HEJDYSZ, A. CISZEWSKI, S. KACZMAREK, M. KWIECIÉN, and Z. GRADZKI. 2022. “The effect of feed supplementation with zinc glycine chelate and zinc sulphate on hepatic proteome profiles in chickens”. *Poultry Science* 262: 104983, 2022. doi: 10.1016/j.livsci.2022.104983.

LAMMERS, A., W. H. WIELAND, L. KRUIT, A. JANSMA, T. STRAETEMANS, A. SCHOTS, G. HARTOG, and H. K. PARMENTIER. 2010. “Successive immunoglobulin and cytokine expression in the small intestine of juvenile chicken”. *Developmental and Comparative Immunology* 34 (12): 1254 – 1256. doi: 10.1016/j.dci.2010.07.001.

LU, L., R. L. WANG, Z. J. ZHANG, F. A. STEWARD, X. LUO, and B. LIU. 2010. “Effect of dietary supplementation with copper sulfate or tribasic copper chloride on the growth performance, liver copper concentrations of broilers fed in floor pens, and stabilities of vitamin E and phytase in feeds”. *Biological Trace Element Research* 138 (1-3): 181 -189. doi: 10.1007/s12011-010-8623-3.

MAIORKA, A., and M. MACARI. “Absorção de Minerais”. In: MACARI, M.; R. L. FURLAN, E. GONZALES. *Fisiologia Aviária aplicada a frangos de corte*. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 375 p. 2002.

MANANGI, M. K., M. VASQUES-AÑÓN, J. D. RICHARDS, S. CARTER, R. E. BURESH, and K. D. CHRISTENSEN. 2012. “Impact of feeding lower levels of chelated trace minerals versus industry levels of inorganic trace minerals on broiler performance, yield, footpad health, and litter mineral concentration.” *Journal Applied of Poultry Research* 21 (4): 881 – 890. doi: 10.3382/japr.2012-00531.

MENG, T., L. GAO, C. XIE, Y. WANG, Y. HUANG, Y. ZHANG, and X. WU. 2021. “Manganese methionine hydroxy analog chelated affects growth performance, trace element deposition and expression of related transporters of broilers”. *Animal Nutrition*, 7(2), 481–487. doi: 10.1016/j.aninu.2020.09.005.

MIYAJIMA, H., Y. TAKAHASHI, and S. KONO. 2003. “Aceruloplasminemia, an inherited disorder of iron metabolism”. *Biometals* 16 (1): 205 – 213. doi: 10.1023/a:1020775101654.

MOUNICOU, S., J. SZPUNAR, and R. LOBINSKI. 2009. "Metallomics: the concept and methodology". *Chemical Society Reviews* 38 (4): 1119 – 1138. doi: 10.1039/b713633c.

NOVIKOVA, N. N., M. V. KOVALCHUK, E. A. YURIEVA, O. V. KONOVALOV, N. D. STEPINA, A. V. ROGACHEV, G. E. YALOVEGA, O. V. KOSMACHEVSKAYA, A. F. TOPUNOV, and S. N. YAKUNIN. 2019. "The enhancement of metal-binding properties in hemoglobin: the role of mild damaging factors". *The Journal of Physical Chemistry* 123: 8370 - 8377. doi: 10.1021/acs.jpcb.9b06571.

OBERDOERFFER, P., T. NOVOBRANTSEVA, and K. RAJEWSKY. 2003. "Expression of a target lambda 1 light chain gene is developmentally regulated and independent of Ig kappa rearrangements". *The Journal of Experimental Medicine* 197 (9): 1165 – 1172. Doi: 0.1084/jem.20030402.

OLKOWSKI, A. A., D. KORVER, B. RATHGEBER, and H. L. CLASSEN. 1999. Cardiac index, oxygen delivery, and tissue oxygen extraction in slow and fast growing chickens, and in chickens with heart failure and ascites: A comparative study". *Avian Pathology* 28 (2): 137 – 146. Doi: 10.1080/03079459994867.

OLUKOSI, A. O., S. V. KIJIK, and Y. HAN. 2018. "Copper and Zinc sources and levels of zinc inclusion influence growth performance, tissue trace mineral content, and carcass yield of broiler chickens". *Poultry Science* 97 (11): 3891 – 3898. doi: 10.3382/ps/pey247.

PEREZ, V., R. SHANMUGASUNDARAM, M. SAFRI, T. M. PARR, and R. K. SELVARAJ. 2017. "Effects of hydroxychloride and sulfate form of zinc and manganese supplementation on superoxide dismutase activity and immune responses post lipopolysaccharide challenge in poultry fed marginally lower doses of zinc and manganese". *Poultry Science* 96 (12): 4200 – 2022. doi: 10.3382/ps/pex244.

POZZI, C. M. C., C. P. BRAGA, J. C. S. VIEIRA, B. CAVECCI, J. V. QUEIROZ, H. S. BARBOSA, M. A. Z. ARRUDA, F. C. GOZO, P. M. PADILHA. 2015. "Metal ions bound to the human milk immunoglobulin A: a Metalloproteomic approach". *Food Chemistry* 166 (2015): 492 – 497. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.06.040.

RAMIREZ, S., W. B. LU, R. DAVIN, H. V. D. BROEK, and Y. G. LIU. 2022. “Effect of encapsulates trace mineral premix in comparison with inorganic and organic microminerals on growth performance and mineral excretion in broier.” *Journal of Food Science and Nutrition Research*, 5 (1): 341 – 350. Disponível em: <[https://www.academia.edu/72996222/Effect\\_of\\_Encapsulated\\_Trace\\_Minerals\\_Premix\\_in\\_Comparison\\_with\\_Inorganic\\_and\\_Organic\\_Microminerals\\_on\\_Growth\\_Performance\\_and\\_Mineral\\_Excretion\\_of\\_Broiler](https://www.academia.edu/72996222/Effect_of_Encapsulated_Trace_Minerals_Premix_in_Comparison_with_Inorganic_and_Organic_Microminerals_on_Growth_Performance_and_Mineral_Excretion_of_Broiler) - Academia.edu>. Acesso em 28 de dezembro de 2022.

UNDERWOOD, E. J., and N. F. SUTTLE. *The Mineral nutrition of livestock*. 3 ed. Wallingford: CAB International, 1999

SANCHEZ, P., and P. A. CAZENAVE. 1987. “A new variable region in mouse immunoglobulin lambda light chains”. *The Journal of Experimental Medicine* 166 (1): 265 – 270. Doi: 10.1084/jem.166.1.265.

SMATTI, M. K.; F. S. CYPRIAN, G. K. NASRALLAH, A. A. A. THANI, R. O. ALMISHAL, and H. M. YASSINE. 2019. “Viruses and autoimmunity: a review on the potêncial interaction and molecular mechanisms”. *Viruses* 11 (8): 762. doi: 10.3390/v11080762.

STEINHOFF, J. S., A. LASS, and M. SCHUPP. 2021. “Biological functions of RBP4 and its relevance for human diseases”. *Frontiers in Physiology* 11 (12): 659977. doi: 10.3389/fphys.2021.659977.

VIEIRA, J. C. S., C. P. BRAGA, G. OLIVEIRA, C. C. F. PADILHA, P. M. MORAES, L. F. ZARA, A. L. LEITE, M. A. R. BUZALAF, and P. M. PADILHA. 2017. “Mercury Exposure: protein biomarkers of Mercury exposure in Jaraqui fish from the amazon region”. *Biological Trace Element Research* 183: 164 – 171. doi: 10.1007/s12011-017-1129-5.

- VILLAGÓMEZ-ESTRADA, S., J., F. PÉREZ, S. V. KUJIK, D. MELO-DÚRAN, R. KARIMIRAD, and D. SOLÀ-ORIOL. 2020. “Dietary Preference of Newly Weaned Pigs and Nutrient Interactions According to Copper Levels and Sources with Different Solubility Characteristics”. *Animals* 10(7): 1133. doi: 10.3390/ani10071133.
- WANG, L., B. CHENG, H. LI, and Y. WANG. 2019. “Proteomics analysis of preadipocytes between fat and lean broilers”. *British Poultry Science* 60 (5): 522 – 529. doi: 10.1080/00071668.2019.1621989.
- WANG, Y., S. XUE, Q. LIU, D. GAO, R. HUA, M. LEI. 2023. “Proteomic profiles and the function of RBP4 in endometrium during embryo implantation phases in pigs”. *BMC Genomics* 24 (200). Doi: 10.1186/s12864-023-09278-5.
- WU, Y.; H. LI, R. J. F. LOOS, Q. QI, F. B. HU, Y. LIU, X. LIN. 2009. “RBP4 variants are significantly associated with plasma RBP4 levels and hypertriglyceridemia risk in Chinese hans. *Journal of Lipid Research* 50 (7): 1479 – 1486. Doi: 10.1194/jlr.P900014-JLR200.

## MATERIAL SUPLEMENTAR

**Tabela S1.** Expressão de proteínas frente à análise dos termos de ontologia genética e status de expressão frente às comparações com os tratamentos experimentais.

| ACCESSION  | PROTEIN                                               | COMPARATION                | UNIQUE         | RATIO | P VALUE | REGULATION |
|------------|-------------------------------------------------------|----------------------------|----------------|-------|---------|------------|
| A0A1D5P1C6 | Phospholipase B-like                                  | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | SULF. CONTROLE |       |         |            |
| A0A1D5PK41 | Rho-associated protein kinase                         | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | SULF. CONTROLE |       |         |            |
| A0A1D5PUX4 | Cytoplasmic dynein 2 heavy chain 1                    | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | SULF. CONTROLE |       |         |            |
| A0A1D5PC47 | Dystrophin                                            | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | SULF. CONTROLE |       |         |            |
| A0A1D5NTV5 | Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 2B | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | SULF. CONTROLE |       |         |            |
| A0A3Q2TY16 | [Histone H3]-lysine(4) N-methyltransferase            | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | SULF. CONTROLE |       |         |            |
| A0A1D5NWB8 | Rho-associated protein kinase 2                       | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | SULF. CONTROLE |       |         |            |
| A0A1D5P0F4 | Collagen alpha-1(XIV) chain                           | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | SULF. CONTROLE |       |         |            |
| P32018     | Collagen alpha-1(XIV) chain                           | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | SULF. CONTROLE |       |         |            |
| Q9DE13     | Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 2B | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | SULF. CONTROLE |       |         |            |
| A0A3Q2TVB7 | Spectrin alpha chain_ non-erythrocytic 1              | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | SULF. CONTROLE |       |         |            |
| A0A3Q2U3B7 | Spectrin alpha chain_ non-erythrocytic 1              | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | SULF. CONTROLE |       |         |            |
| F1NLX0     | Fanconi_A_N domain-containing protein                 | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | SULF. CONTROLE |       |         |            |
| A0A1D5PQT5 | Sodium channel protein                                | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | SULF. CONTROLE |       |         |            |
| P07751     | Spectrin alpha chain_ non-erythrocytic 1              | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | SULF. CONTROLE |       |         |            |
| E1BXC5     | C3H1-type domain-containing protein                   | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | SULF. CONTROLE |       |         |            |
| A0A3Q2TWR1 | Dystrophin                                            | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | SULF. CONTROLE |       |         |            |
| A0A3Q2TT39 | [Histone H3]-lysine(4) N-methyltransferase            | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | SULF. CONTROLE |       |         |            |
| A0A3Q2TWQ7 | VWFD domain-containing protein                        | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | SULF. CONTROLE |       |         |            |
| A0A1D5PQ94 | Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 2B | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | SULF. CONTROLE |       |         |            |
| A0A3Q2UJC3 | Dystrophin                                            | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | SULF. CONTROLE |       |         |            |
| F1NRH6     | Rho-associated protein kinase                         | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | SULF. CONTROLE |       |         |            |

|            |                                                        |                            |                |  |  |  |
|------------|--------------------------------------------------------|----------------------------|----------------|--|--|--|
| A0A3Q2UL60 | Microtubule-associated protein                         | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| Q9PWM9     | Tyrosine-protein kinase                                | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| F1NHT3     | Spectrin alpha chain_ non-erythrocytic 1               | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| A0A3Q2ULM6 | Microtubule-associated protein                         | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| A0A3Q2UFA0 | Microtubule-associated protein                         | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| A0A3Q2TTH6 | Rho-associated protein kinase 2                        | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| D2W6W9     | Adenomatous polyposis coli 2                           | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| A0A1D5NZX5 | Cytoplasmic dynein 2 heavy chain 1                     | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| A0A1D5PVG1 | Spectrin alpha chain_ non-erythrocytic 1               | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| A0A3Q2U0M3 | Dystrophin                                             | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| A0A1D5PBH0 | Sodium channel protein                                 | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| A0A1D5PDT4 | Sodium channel protein                                 | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| A0A1D5NTK0 | Cytoplasmic dynein 2 heavy chain 1                     | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| Q98SN6     | Rho-associated coiled-coil forming kinase 1 (Fragment) | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| Q98SN5     | Rho-associated protein kinase 2 (Fragment)             | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| A0A3Q2UIC5 | [Histone H3]-lysine(4) N-methyltransferase             | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| A0A1D5PDR9 | Cytoplasmic dynein 2 heavy chain 1                     | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| A0A3Q2UPH9 | Dystrophin                                             | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| A0A3Q2U6V9 | Cytoplasmic dynein 2 heavy chain 1                     | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| A0A3Q2TUU4 | Dystrophin                                             | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| A0A3Q2U000 | Dystrophin                                             | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| F1NS97     | Dystrophin                                             | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| A0A3Q2U5Z2 | Spectrin alpha chain_ non-erythrocytic 1               | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| F1NK88     | Rho-associated protein kinase 2                        | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| A0A3Q2U342 | Spectrin alpha chain_ non-erythrocytic 1               | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| A0A3Q3ABK2 | Dystrophin                                             | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| P11533     | Dystrophin                                             | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| A0A3Q2UG14 | [Histone H3]-lysine(4) N-methyltransferase             | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | SULF. CONTROLE |  |  |  |

|            |                                                       |                            |                |  |  |  |
|------------|-------------------------------------------------------|----------------------------|----------------|--|--|--|
| A0A3Q2U4E0 | Cytoplasmic dynein 2 heavy chain 1                    | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| F1P2F7     | Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 2B | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| A0A3Q2U719 | Dystrophin                                            | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| K4Q293     | Histidine-rich glycoprotein                           | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| A0A1D5PQC3 | Spectrin alpha chain_ non-erythrocytic 1              | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| Q90933     | Neuron-glia cell adhesion molecule (Ng-CAM)           | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| A0A3Q2U4Z5 | [Histone H3]-lysine(4) N-methyltransferase            | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| A0A3Q3ARE0 | Cytoplasmic dynein 2 heavy chain 1                    | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| A0A3Q2U5S8 | Kinesin motor domain-containing protein               | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM      |  |  |  |
| Q4AEJ1     | Complement regulatory soluble protein                 | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM      |  |  |  |
| A0A1D5PNS4 | Gelsolin                                              | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM      |  |  |  |
| A0A3Q2U6J1 | A2M_recep domain-containing protein                   | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM      |  |  |  |
| F2YI34     | Toll-like receptor 3                                  | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM      |  |  |  |
| A0A1D5P331 | RING-type E3 ubiquitin transferase                    | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM      |  |  |  |
| A0A1D5NU50 | Fibronectin                                           | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM      |  |  |  |
| A0A1D5PUU6 | PH domain-containing protein                          | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM      |  |  |  |
| P26652     | Metalloproteinase inhibitor 3                         | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM      |  |  |  |
| F1NKF3     | Gelsolin                                              | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM      |  |  |  |
| A0A411H9Q7 | Tgf                                                   | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM      |  |  |  |
| A0A3Q2TZA4 | A2M_recep domain-containing protein                   | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM      |  |  |  |
| P41263     | Retinol-binding protein 4                             | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM      |  |  |  |
| A0A8C4HWG7 | Protogenin homolog b (Gallus gallus)                  | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM      |  |  |  |
| A0A3Q2TRY9 | Kinesin motor domain-containing protein               | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM      |  |  |  |
| Q90XG4     | Slit-3 (Fragment)                                     | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM      |  |  |  |
| A0A1D5P7H9 | Kinesin motor domain-containing protein               | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM      |  |  |  |
| P11722     | Fibronectin                                           | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM      |  |  |  |
| Q90750     | Beta-H globin gene 5'flanking region (Fragment)       | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM      |  |  |  |
| A0A3Q2TS72 | VAS domain-containing protein                         | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM      |  |  |  |



|            |                                                  |                            |           |  |  |  |
|------------|--------------------------------------------------|----------------------------|-----------|--|--|--|
| F1NA58     | Calponin-homology (CH) domain-containing protein | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM |  |  |  |
| P02001     | Hemoglobin subunit alpha-D                       | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM |  |  |  |
| Q90735     | Beta-globin protein (Fragment)                   | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM |  |  |  |
| F1NUK7     | Leucine-rich repeat transmembrane protein FLRT3  | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM |  |  |  |
| A0A8C4HUM9 | Protogenin homolog b (Gallus gallus)             | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM |  |  |  |
| E1BZI9     | RING-type E3 ubiquitin transferase               | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM |  |  |  |
| E1BZI6     | DEUBAD domain-containing protein                 | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM |  |  |  |
| B8ZX71     | Sixth complement component                       | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM |  |  |  |
| P51890     | Lumican                                          | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM |  |  |  |
| A0A1D5PA50 | VAS domain-containing protein                    | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM |  |  |  |
| A0A1L1RYW9 | Gelsolin                                         | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM |  |  |  |
| Q03696     | Neuronal-glial cell adhesion molecule            | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM |  |  |  |
| A0A1D5PHS1 | Phospholipid-transporting ATPase                 | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM |  |  |  |
| A0A3Q2UKP2 | MG2 domain-containing protein                    | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM |  |  |  |
| P00565     | Creatine kinase M-type                           | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM |  |  |  |
| P01994     | Hemoglobin subunit alpha-A                       | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM |  |  |  |
| A0A3Q2U4J3 | Sema domain-containing protein                   | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM |  |  |  |
| T1W1C3     | Polyprotein (Fragment)                           | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM |  |  |  |
| A0A3Q2TW07 | Fibronectin                                      | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM |  |  |  |
| A0A1D5NYA7 | Sema domain-containing protein                   | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM |  |  |  |
| A0A1D5PM04 | VAS domain-containing protein                    | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM |  |  |  |
| F1NW72     | Kinesin motor domain-containing protein          | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM |  |  |  |
| O93510     | Gelsolin                                         | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM |  |  |  |
| A0A3Q2TSE8 | A2M_recep domain-containing protein              | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM |  |  |  |
| A0A1D5PH32 | Gelsolin                                         | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM |  |  |  |
| F1NJT4     | Fibronectin                                      | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM |  |  |  |
| A0A3Q2U1V1 | Reverse transcriptase domain-containing protein  | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM |  |  |  |
| A0A1D5PFV8 | VAS domain-containing protein                    | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM |  |  |  |

|            |                                        |                            |           |          |      |                 |
|------------|----------------------------------------|----------------------------|-----------|----------|------|-----------------|
| A0A8C4NUA9 | Protogenin homolog b (Gallus gallus)   | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM |          |      |                 |
| A0A3Q2U6M6 | Creatine kinase                        | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM |          |      |                 |
| A0A3Q2UH03 | Ig-like domain-containing protein      | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM |           | 0,932394 | 0,02 | down regulation |
| A0A3Q3AN21 | Ig-like domain-containing protein      | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM |           | 0,932394 | 0,02 | down regulation |
| A0A3Q2UMU2 | Ig-like domain-containing protein      | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM |           | 0,697676 | 0,02 | down regulation |
| A0A3Q2TXP7 | Ig-like domain-containing protein      | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM |           | 0,941765 | 0,04 | down regulation |
| A0A3Q2TZA1 | Ig-like domain-containing protein      | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM |           | 0,941765 | 0,04 | down regulation |
| A0A3Q2UJK8 | Ig-like domain-containing protein      | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM |           | 0,941765 | 0,05 | down regulation |
| A0A3Q2UGD4 | Ig-like domain-containing protein      | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM |           | 0,941765 | 0,05 | down regulation |
| A0A3Q2U474 | Ig-like domain-containing protein      | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM |           | 0,951229 | 0,05 | down regulation |
| A0A3Q3AF81 | Ig-like domain-containing protein      | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM |           | 0,941765 | 0,05 | down regulation |
| Q5F3Q0     | Nup188 domain-containing protein       | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM |           | 3,781044 | 1    | Up regulation   |
| A0A3Q2UHW8 | Ig-like domain-containing protein      | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM |           | 2,363161 | 1    | Up regulation   |
| E1BQC2     | Ovotransferrin                         | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM |           | 1,404948 | 1    | Up regulation   |
| A0A3Q2U637 | Ig-like domain-containing protein      | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM |           | 4,095955 | 1    | Up regulation   |
| Q5ZHM4     | CN hydrolase domain-containing protein | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM |           | 5,473948 | 1    | Up regulation   |
| F1DQG4     | Complement component 7                 | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM |           | 4,0552   | 1    | Up regulation   |
| Q90864     | Beta-H globin                          | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM |           | 28,50273 | 1    | Up regulation   |
| P02128     | Hemoglobin subunit epsilon             | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM |           | 27,11264 | 1    | Up regulation   |
| P02127     | Hemoglobin subunit rho                 | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM |           | 27,66035 | 1    | Up regulation   |
| A0A3Q2TXQ0 | Ig-like domain-containing protein      | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM |           | 2,363161 | 1    | Up regulation   |
| A0A3Q2TX84 | Ig-like domain-containing protein      | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM |           | 4,0552   | 1    | Up regulation   |
| Q90WR3     | Hemopexin (Fragment)                   | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM |           | 3,896193 | 1    | Up regulation   |
| E1BUA6     | CN hydrolase domain-containing protein | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM |           | 5,20698  | 1    | Up regulation   |
| Q7LZ50     | Ornitho-kinin                          | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM |           | 2,181472 | 1    | Up regulation   |
| P02112     | Hemoglobin subunit beta                | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM |           | 29,66596 | 1    | Up regulation   |
| A0A3Q2U4V6 | Ig-like domain-containing protein      | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM |           | 2,801066 | 1    | Up regulation   |
| A0A290WNG2 | Complement component 4                 | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM |           | 2,138276 | 1    | Up regulation   |

|            |                                                 |                            |          |   |               |
|------------|-------------------------------------------------|----------------------------|----------|---|---------------|
| A0A3Q2TYH6 | Ig-like domain-containing protein               | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | 2,293319 | 1 | Up regulation |
| Q02020     | Fibrinogen beta chain (Fragment)                | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | 3,004166 | 1 | Up regulation |
| A0A3Q2TX54 | Ig-like domain-containing protein               | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | 2,2705   | 1 | Up regulation |
| A0A1D5PZ59 | Nup188 domain-containing protein                | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | 5,365556 | 1 | Up regulation |
| A2N887     | VH1 protein (Fragment)                          | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | 4,0552   | 1 | Up regulation |
| F1P4I7     | CN hydrolase domain-containing protein          | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | 5,259311 | 1 | Up regulation |
| A0A3Q2TTN1 | Ig-like domain-containing protein               | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | 2,2705   | 1 | Up regulation |
| A2N882     | VH1 protein (Fragment)                          | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | 3,669296 | 1 | Up regulation |
| A0A1D5PEU7 | CN hydrolase domain-containing protein          | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | 5,312168 | 1 | Up regulation |
| A0A3Q2U7A2 | Ig-like domain-containing protein               | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | 2,2705   | 1 | Up regulation |
| A0A1D5P9V0 | Pyruvate kinase                                 | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | 3,221993 | 1 | Up regulation |
| A0A3Q2U5M8 | Ig-like domain-containing protein               | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | 2,013753 | 1 | Up regulation |
| E1BV78     | Fibrinogen C-terminal domain-containing protein | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | 3,189933 | 1 | Up regulation |
| A0A3Q2TT43 | Ig-like domain-containing protein               | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | 2,2705   | 1 | Up regulation |
| A0A3Q2U540 | Ig-like domain-containing protein               | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | 2,293319 | 1 | Up regulation |
| Q4ADJ7     | Ovotransferrin                                  | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | 1,462285 | 1 | Up regulation |
| B3VE14     | Inter-alpha inhibitor heavy chain 2             | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | 2,363161 | 1 | Up regulation |
| Q4ADJ6     | Ovotransferrin                                  | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | 1,476981 | 1 | Up regulation |
| Q8JIG5     | Alpha-1-acid glycoprotein                       | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | 1,491825 | 1 | Up regulation |
| A7UEB0     | Alpha-1-acid glycoprotein                       | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | 1,506818 | 1 | Up regulation |
| P02789     | Ovotransferrin                                  | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | 1,404948 | 1 | Up regulation |
| A0A3Q2TUE3 | Ig-like domain-containing protein               | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | 2,339647 | 1 | Up regulation |
| A0A3Q2TX27 | Ig-like domain-containing protein               | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | 4,095955 | 1 | Up regulation |
| A0A3Q2TX22 | Ig-like domain-containing protein               | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | 2,773195 | 1 | Up regulation |
| A0A1D5P4A2 | Hemoglobin subunit epsilon                      | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | 27,93834 | 1 | Up regulation |
| A0A3Q2UD70 | Ig-like domain-containing protein               | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | 2,2705   | 1 | Up regulation |
| Q4ADG4     | Ovotransferrin                                  | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | 1,476981 | 1 | Up regulation |
| A0A1D5PTV2 | Nup188 domain-containing protein                | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | 2,2705   | 1 | Up regulation |

|            |                                                |                            |          |   |               |
|------------|------------------------------------------------|----------------------------|----------|---|---------------|
| P81475     | Complement factor B-like protease (Fragment)   | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | 3,158193 | 1 | Up regulation |
| F1NUL9     | Fibrinogen beta chain                          | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | 2,94468  | 1 | Up regulation |
| A0A1D5PCD2 | A2M_recep domain-containing protein            | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | 3,935351 | 1 | Up regulation |
| F1NWX6     | Plasminogen                                    | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | 3,004166 | 1 | Up regulation |
| A0A3Q2UEG8 | A2M domain-containing protein                  | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | 2,773195 | 1 | Up regulation |
| P10184     | Ovoinhbitor                                    | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | 3,189933 | 1 | Up regulation |
| A0A3Q2TYZ3 | Ig-like domain-containing protein              | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | 2,138276 | 1 | Up regulation |
| A0A3Q2U0N4 | Ig-like domain-containing protein              | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | 2,339647 | 1 | Up regulation |
| P14448     | Fibrinogen alpha chain                         | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | 2,50929  | 1 | Up regulation |
| A0A3Q2UFX8 | Ig-like domain-containing protein              | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | 2,117    | 1 | Up regulation |
| A0A3Q2UFX5 | Ig-like domain-containing protein              | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | 3,158193 | 1 | Up regulation |
| A0A3Q2UAE7 | Ig-like domain-containing protein              | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | 4,13712  | 1 | Up regulation |
| A0A3Q2U9E1 | Ig-like domain-containing protein              | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | 2,247908 | 1 | Up regulation |
| O93601     | Apolipoprotein AIV                             | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | 3,064854 | 1 | Up regulation |
| O93568     | Fibrinogen gamma chain                         | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | 3,254374 | 1 | Up regulation |
| A0A3Q3AV59 | Ig-like domain-containing protein              | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | 4,01485  | 1 | Up regulation |
| H1AC38     | A2M_recep domain-containing protein (Fragment) | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | 6,049647 | 1 | Up regulation |
| F1P587     | Anaphylatoxin-like domain-containing protein   | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | 2,247908 | 1 | Up regulation |
| A0A3Q2TW03 | Ig-like domain-containing protein              | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | 3,158193 | 1 | Up regulation |
| P00548     | Pyruvate kinase PKM                            | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | 3,287081 | 1 | Up regulation |
| F1P4V1     | Fibrinogen alpha chain                         | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | 2,745601 | 1 | Up regulation |
| Q90633     | Complement C3                                  | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | 5,640654 | 1 | Up regulation |
| A0A3Q2U743 | A2M_recep domain-containing protein            | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | 4,0552   | 1 | Up regulation |
| A0A1D5PGT8 | Nup188 domain-containing protein               | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | 5,812437 | 1 | Up regulation |
| A0A1D5PLM9 | CN hydrolase domain-containing protein         | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | 5,419481 | 1 | Up regulation |
| A0A3Q2U3K4 | Ig-like domain-containing protein              | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | 2,2705   | 1 | Up regulation |
| A0A3Q2U324 | A2M domain-containing protein                  | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | 2,801066 | 1 | Up regulation |
| F1NW43     | Pyruvate kinase                                | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | 3,254374 | 1 | Up regulation |

|            |                                                       |                               |                |          |   |               |
|------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------|----------------|----------|---|---------------|
| A0A3Q2TTU9 | Ig-like domain-containing protein                     | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM    |                | 2,2705   | 1 | Up regulation |
| P20763     | Ig lambda chain C region                              | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM    |                | 1,29693  | 1 | Up regulation |
| A0A3Q3AKX3 | Ig-like domain-containing protein                     | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM    |                | 2,2705   | 1 | Up regulation |
| R9PXM5     | Immunoglobulin lambda like polypeptide 1              | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM    |                | 2,718282 | 1 | Up regulation |
| A0A1D5P1C6 | Phospholipase B-like                                  | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |          |   |               |
| Q5ZHM4     | CN hydrolase domain-containing protein                | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |          |   |               |
| A0A1D5PK41 | Rho-associated protein kinase                         | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |          |   |               |
| F1DQG4     | Complement component 7                                | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |          |   |               |
| A0A1D5PUX4 | Cytoplasmic dynein 2 heavy chain 1                    | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |          |   |               |
| A0A1D5PC47 | Dystrophin                                            | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |          |   |               |
| A0A1D5NTV5 | Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 2B | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |          |   |               |
| F1NIU3     | Uncharacterized protein                               | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |          |   |               |
| E1BUA6     | CN hydrolase domain-containing protein                | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |          |   |               |
| F1P3R3     | Uncharacterized protein                               | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |          |   |               |
| A0A3Q2TY16 | [Histone H3]-lysine(4) N-methyltransferase            | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |          |   |               |
| A0A1D5NWB8 | Rho-associated protein kinase 2                       | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |          |   |               |
| E1BW44     | Uncharacterized protein                               | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |          |   |               |
| A0A3Q3ANZ2 | Uncharacterized protein                               | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |          |   |               |
| Q9DE13     | Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 2B | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |          |   |               |
| A0A3Q2TVB7 | Spectrin alpha chain_ non-erythrocytic 1              | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |          |   |               |
| A0A3Q2U3B7 | Spectrin alpha chain_ non-erythrocytic 1              | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |          |   |               |
| F1P4I7     | CN hydrolase domain-containing protein                | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |          |   |               |
| F1NLX0     | Fanconi_A_N domain-containing protein                 | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |          |   |               |
| A0A1D5PEU7 | CN hydrolase domain-containing protein                | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |          |   |               |
| A0A1D5PEU2 | Uncharacterized protein                               | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |          |   |               |
| A0A1D5PQT5 | Sodium channel protein                                | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |          |   |               |
| P07751     | Spectrin alpha chain_ non-erythrocytic 1              | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |          |   |               |
| A0A1D5PUS9 | Uncharacterized protein                               | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |          |   |               |

|            |                                                        |                               |                |  |  |  |
|------------|--------------------------------------------------------|-------------------------------|----------------|--|--|--|
| E1BXC5     | C3H1-type domain-containing protein                    | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| B3VE14     | Inter-alpha inhibitor heavy chain 2                    | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| A0A3Q2TWR1 | Dystrophin                                             | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| A0A3Q2TT39 | [Histone H3]-lysine(4) N-methyltransferase             | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| E1C6U2     | Uncharacterized protein                                | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| A0A3Q2TWQ7 | VWFD domain-containing protein                         | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| A0A1D5PQ94 | Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 2B  | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| A0A3Q2UJC3 | Dystrophin                                             | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| F1NRH6     | Rho-associated protein kinase                          | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| E1BYS5     | Uncharacterized protein                                | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| Q9PWM9     | Tyrosine-protein kinase                                | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| F1NHT3     | Spectrin alpha chain_ non-erythrocytic 1               | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| A0A3Q2U6B8 | Uncharacterized protein                                | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| A0A3Q2TTH6 | Rho-associated protein kinase 2                        | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| D2W6W9     | Adenomatous polyposis coli 2                           | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| F1NX88     | Uncharacterized protein                                | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| A0A1D5NZX5 | Cytoplasmic dynein 2 heavy chain 1                     | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| A0A1D5PVG1 | Spectrin alpha chain_ non-erythrocytic 1               | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| A0A3Q2U0M3 | Dystrophin                                             | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| A0A1D5PBH0 | Sodium channel protein                                 | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| A0A1D5PDT4 | Sodium channel protein                                 | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| A0A1D5NTK0 | Cytoplasmic dynein 2 heavy chain 1                     | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| Q98SN6     | Rho-associated coiled-coil forming kinase 1 (Fragment) | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| Q98SN5     | Rho-associated protein kinase 2 (Fragment)             | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| A0A3Q2UIC5 | [Histone H3]-lysine(4) N-methyltransferase             | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| A0A1D5PDR9 | Cytoplasmic dynein 2 heavy chain 1                     | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| A0A3Q2UPH9 | Dystrophin                                             | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| A0A3Q2U6V9 | Cytoplasmic dynein 2 heavy chain 1                     | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |  |  |  |

|            |                                                       |                               |                |  |  |  |
|------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------|----------------|--|--|--|
| H1AC38     | A2M_recep domain-containing protein (Fragment)        | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| A0A3Q3AJ53 | Uncharacterized protein                               | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| A0A3Q2TUU4 | Dystrophin                                            | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| A0A3Q2U000 | Dystrophin                                            | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| F1NS97     | Dystrophin                                            | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| F1NL38     | Uncharacterized protein                               | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| A0A3Q2U5Z2 | Spectrin alpha chain_ non-erythrocytic 1              | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| E1BX75     | Uncharacterized protein                               | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| F1NK88     | Rho-associated protein kinase 2                       | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| A0A3Q2U342 | Spectrin alpha chain_ non-erythrocytic 1              | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| A0A1D5PLM9 | CN hydrolase domain-containing protein                | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| A0A3Q3ABK2 | Dystrophin                                            | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| P11533     | Dystrophin                                            | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| A0A3Q2UG14 | [Histone H3]-lysine(4) N-methyltransferase            | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| A0A3Q2U4E0 | Cytoplasmic dynein 2 heavy chain 1                    | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| F1P2F7     | Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 2B | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| A0A3Q2U719 | Dystrophin                                            | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| K4Q293     | Histidine-rich glycoprotein                           | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| A0A1D5PQC3 | Spectrin alpha chain_ non-erythrocytic 1              | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| Q90933     | Neuron-glia cell adhesion molecule (Ng-CAM)           | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| A0A3Q3B2L3 | Uncharacterized protein                               | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| A0A1L1RKA9 | Uncharacterized protein                               | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| A0A3Q2U4Z5 | [Histone H3]-lysine(4) N-methyltransferase            | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| REVERSE376 | Reversed Sequence 376                                 | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| A0A3Q3ARE0 | Cytoplasmic dynein 2 heavy chain 1                    | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |  |  |  |
| A0A3Q2U5S8 | Kinesin motor domain-containing protein               | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | HCM CONTROLE   |  |  |  |
| A0A1D5PC51 | Ceramide transfer protein                             | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | HCM CONTROLE   |  |  |  |
| A0A3Q2UJ10 | Nuclear receptor coactivator                          | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | HCM CONTROLE   |  |  |  |

|            |                                              |                               |              |          |      |                 |
|------------|----------------------------------------------|-------------------------------|--------------|----------|------|-----------------|
| A0A3Q2TTP6 | Histone deacetylase                          | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | HCM CONTROLE |          |      |                 |
| A0A1D5PRP5 | Spatacsin_C domain-containing protein        | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | HCM CONTROLE |          |      |                 |
| A0A3Q2TRY9 | Kinesin motor domain-containing protein      | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | HCM CONTROLE |          |      |                 |
| A0A1D5P7H9 | Kinesin motor domain-containing protein      | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | HCM CONTROLE |          |      |                 |
| E1C409     | Ceramide transfer protein                    | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | HCM CONTROLE |          |      |                 |
| A0A1D5P5T9 | Ceramide transfer protein                    | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | HCM CONTROLE |          |      |                 |
| A0A3Q3AD18 | Hist_deacetyl domain-containing protein      | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | HCM CONTROLE |          |      |                 |
| A0A3Q2UIG0 | Histone deacetylase                          | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | HCM CONTROLE |          |      |                 |
| F1P1T9     | Spatacsin_C domain-containing protein        | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | HCM CONTROLE |          |      |                 |
| P00565     | Creatine kinase M-type                       | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | HCM CONTROLE |          |      |                 |
| A0A3Q2U014 | Histone deacetylase                          | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | HCM CONTROLE |          |      |                 |
| A0A1D5PBB1 | Histone deacetylase                          | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | HCM CONTROLE |          |      |                 |
| F1NMB5     | Nuclear receptor coactivator                 | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | HCM CONTROLE |          |      |                 |
| A0A3Q2U1U6 | RRM domain-containing protein                | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | HCM CONTROLE |          |      |                 |
| Q5F432     | Histone deacetylase                          | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | HCM CONTROLE |          |      |                 |
| A0A3Q2U6M6 | Creatine kinase                              | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | HCM CONTROLE |          |      |                 |
| A2N884     | VH1 protein (Fragment)                       | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |              | 0,826959 | 0,01 | Down regulation |
| A0A3Q2UGI5 | Ig-like domain-containing protein            | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |              | 0,860708 | 0,01 | Down regulation |
| Q90864     | Beta-H globin                                | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |              | 0,644036 | 0,02 | Down regulation |
| F1NWX6     | Plasminogen                                  | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |              | 0,826959 | 0,02 | Down regulation |
| A0A3Q2UCM5 | Ig-like domain-containing protein            | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |              | 0,151072 | 0,02 | Down regulation |
| P02128     | Hemoglobin subunit epsilon                   | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |              | 0,625002 | 0,03 | Down regulation |
| A0A3Q2UAA5 | Ig-like domain-containing protein            | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |              | 0,951229 | 0,03 | Down regulation |
| A0A1D5P4A2 | Hemoglobin subunit epsilon                   | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |              | 0,637628 | 0,04 | Down regulation |
| F1P587     | Anaphylatoxin-like domain-containing protein | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |              | 0,802519 | 0,04 | Down regulation |
| P02127     | Hemoglobin subunit rho                       | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |              | 0,637628 | 0,05 | Down regulation |
| A0A3Q2UJK8 | Ig-like domain-containing protein            | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |              | 1,349859 | 1    | Up regulation   |
| A0A3Q3ARD4 | Ig-like domain-containing protein            | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |              | 1,2586   | 1    | Up regulation   |



|            |                                   |                               |  |          |   |               |
|------------|-----------------------------------|-------------------------------|--|----------|---|---------------|
| A0A3Q2UHW8 | Ig-like domain-containing protein | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |  | 1,32313  | 1 | Up regulation |
| A0A3Q2U8X8 | Ig-like domain-containing protein | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |  | 1,349859 | 1 | Up regulation |
| E1BQC2     | Ovotransferrin                    | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |  | 1,419068 | 1 | Up regulation |
| A0A3Q2UGD4 | Ig-like domain-containing protein | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |  | 1,363425 | 1 | Up regulation |
| A0A3Q2TXQ0 | Ig-like domain-containing protein | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |  | 1,309964 | 1 | Up regulation |
| A0A3Q2TXP7 | Ig-like domain-containing protein | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |  | 1,377128 | 1 | Up regulation |
| A0A3Q2TYH6 | Ig-like domain-containing protein | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |  | 1,2586   | 1 | Up regulation |
| A0A3Q2UFG5 | Ig-like domain-containing protein | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |  | 1,349859 | 1 | Up regulation |
| A0A3Q2TTN1 | Ig-like domain-containing protein | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |  | 1,246077 | 1 | Up regulation |
| A0A3Q2TZA1 | Ig-like domain-containing protein | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |  | 1,349859 | 1 | Up regulation |
| A0A3Q2U7A2 | Ig-like domain-containing protein | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |  | 1,246077 | 1 | Up regulation |
| A0A3Q2TT43 | Ig-like domain-containing protein | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |  | 1,246077 | 1 | Up regulation |
| Q4ADJ7     | Ovotransferrin                    | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |  | 1,377128 | 1 | Up regulation |
| Q4ADJ6     | Ovotransferrin                    | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |  | 1,32313  | 1 | Up regulation |
| Q8JIG5     | Alpha-1-acid glycoprotein         | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |  | 1,447735 | 1 | Up regulation |
| A7UEB0     | Alpha-1-acid glycoprotein         | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |  | 1,447735 | 1 | Up regulation |
| P02789     | Ovotransferrin                    | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |  | 1,433329 | 1 | Up regulation |
| A0A3Q2TUE3 | Ig-like domain-containing protein | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |  | 1,309964 | 1 | Up regulation |
| A0A3Q2UD70 | Ig-like domain-containing protein | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |  | 1,161834 | 1 | Up regulation |
| A0A1L1S0P1 | Uncharacterized protein           | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |  | 1,32313  | 1 | Up regulation |
| A0A3Q2UCU3 | Ig-like domain-containing protein | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |  | 1,363425 | 1 | Up regulation |
| A0A3Q2U474 | Ig-like domain-containing protein | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |  | 1,363425 | 1 | Up regulation |
| Q4ADG4     | Ovotransferrin                    | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |  | 1,29693  | 1 | Up regulation |
| A0A1D5PAQ0 | Ig-like domain-containing protein | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |  | 1,363425 | 1 | Up regulation |
| A0A3Q3AIA0 | Ig-like domain-containing protein | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |  | 1,462285 | 1 | Up regulation |
| A0A3Q2U0N4 | Ig-like domain-containing protein | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |  | 1,309964 | 1 | Up regulation |
| A0A3Q2ULL1 | Ig-like domain-containing protein | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |  | 1,2586   | 1 | Up regulation |
| A0A3Q3AMX7 | Ig-like domain-containing protein | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |  | 1,476981 | 1 | Up regulation |

|            |                                        |                               |           |          |   |               |
|------------|----------------------------------------|-------------------------------|-----------|----------|---|---------------|
| A0A3Q2TTY3 | Ig-like domain-containing protein      | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |           | 1,363425 | 1 | Up regulation |
| A0A3Q2UFX5 | Ig-like domain-containing protein      | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |           | 1,462285 | 1 | Up regulation |
| A0A3Q2U9E1 | Ig-like domain-containing protein      | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |           | 1,2586   | 1 | Up regulation |
| A0A3Q2UH03 | Ig-like domain-containing protein      | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |           | 1,363425 | 1 | Up regulation |
| A0A3Q2TW03 | Ig-like domain-containing protein      | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |           | 1,462285 | 1 | Up regulation |
| Q98TD1     | PIT 54                                 | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |           | 1,433329 | 1 | Up regulation |
| A0A1D5PGT8 | Nup188 domain-containing protein       | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |           | 2,484323 | 1 | Up regulation |
| A0A3Q2U343 | Ig-like domain-containing protein      | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |           | 1,246077 | 1 | Up regulation |
| A0A3Q3AN21 | Ig-like domain-containing protein      | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |           | 1,363425 | 1 | Up regulation |
| A0A3Q2U8F2 | Ig-like domain-containing protein      | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |           | 1,246077 | 1 | Up regulation |
| A0A3Q2U3K4 | Ig-like domain-containing protein      | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |           | 1,246077 | 1 | Up regulation |
| A0A3Q2U287 | Ig-like domain-containing protein      | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |           | 1,246077 | 1 | Up regulation |
| A0A3Q2TTU9 | Ig-like domain-containing protein      | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |           | 1,246077 | 1 | Up regulation |
| P01875     | Ig mu chain C region                   | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |           | 1,521962 | 1 | Up regulation |
| A0A3Q3AKX3 | Ig-like domain-containing protein      | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |           | 1,246077 | 1 | Up regulation |
| Q4AEJ1     | Complement regulatory soluble protein  | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE     | BAIXO HCM |          |   |               |
| A0A1D5PNS4 | Gelsolin                               | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE     | BAIXO HCM |          |   |               |
| Q5ZHM4     | CN hydrolase domain-containing protein | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE     | BAIXO HCM |          |   |               |
| F1DQG4     | Complement component 7                 | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE     | BAIXO HCM |          |   |               |
| E1BUA6     | CN hydrolase domain-containing protein | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE     | BAIXO HCM |          |   |               |
| A0A3Q2U6J1 | A2M_recep domain-containing protein    | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE     | BAIXO HCM |          |   |               |
| F2YI34     | Toll-like receptor 3                   | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE     | BAIXO HCM |          |   |               |
| A0A1D5P331 | RING-type E3 ubiquitin transferase     | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE     | BAIXO HCM |          |   |               |
| A0A1D5NU50 | Fibronectin                            | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE     | BAIXO HCM |          |   |               |
| A0A1D5PUU6 | PH domain-containing protein           | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE     | BAIXO HCM |          |   |               |
| P26652     | Metalloproteinase inhibitor 3          | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE     | BAIXO HCM |          |   |               |
| F1NKF3     | Gelsolin                               | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE     | BAIXO HCM |          |   |               |
| F1P4I7     | CN hydrolase domain-containing protein | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE     | BAIXO HCM |          |   |               |

|            |                                                  |                           |           |  |  |  |
|------------|--------------------------------------------------|---------------------------|-----------|--|--|--|
| A0A411H9Q7 | Tgf                                              | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | BAIXO HCM |  |  |  |
| A0A3Q2TZA4 | A2M_recep domain-containing protein              | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | BAIXO HCM |  |  |  |
| A0A1D5PEU7 | CN hydrolase domain-containing protein           | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | BAIXO HCM |  |  |  |
| P41263     | Retinol-binding protein 4                        | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | BAIXO HCM |  |  |  |
| A0A8C4HWG7 | Protogenin homolog b (Gallus gallus)             | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | BAIXO HCM |  |  |  |
| B3VE14     | Inter-alpha inhibitor heavy chain 2              | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | BAIXO HCM |  |  |  |
| Q90XG4     | Slit-3 (Fragment)                                | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | BAIXO HCM |  |  |  |
| P11722     | Fibronectin                                      | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | BAIXO HCM |  |  |  |
| Q90750     | Beta-H globin gene 5'flanking region (Fragment)  | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | BAIXO HCM |  |  |  |
| A0A3Q2TS72 | VASSt domain-containing protein                  | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | BAIXO HCM |  |  |  |
| F1NA58     | Calponin-homology (CH) domain-containing protein | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | BAIXO HCM |  |  |  |
| P02001     | Hemoglobin subunit alpha-D                       | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | BAIXO HCM |  |  |  |
| Q90735     | Beta-globin protein (Fragment)                   | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | BAIXO HCM |  |  |  |
| F1NUK7     | Leucine-rich repeat transmembrane protein FLRT3  | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | BAIXO HCM |  |  |  |
| A0A8C4HUM9 | Protogenin homolog b (Gallus gallus)             | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | BAIXO HCM |  |  |  |
| E1BZI9     | RING-type E3 ubiquitin transferase               | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | BAIXO HCM |  |  |  |
| E1BZI6     | DEUBAD domain-containing protein                 | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | BAIXO HCM |  |  |  |
| B8ZX71     | Sixth complement component                       | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | BAIXO HCM |  |  |  |
| P51890     | Lumican                                          | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | BAIXO HCM |  |  |  |
| A0A1D5PA50 | VASSt domain-containing protein                  | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | BAIXO HCM |  |  |  |
| A0A1L1RYW9 | Gelsolin                                         | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | BAIXO HCM |  |  |  |
| Q03696     | Neuronal-glia cell adhesion molecule             | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | BAIXO HCM |  |  |  |
| A0A1D5PHS1 | Phospholipid-transporting ATPase                 | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | BAIXO HCM |  |  |  |
| A0A3Q2UKP2 | MG2 domain-containing protein                    | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | BAIXO HCM |  |  |  |
| P01994     | Hemoglobin subunit alpha-A                       | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | BAIXO HCM |  |  |  |
| A0A3Q2U4J3 | Sema domain-containing protein                   | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | BAIXO HCM |  |  |  |
| H1AC38     | A2M_recep domain-containing protein (Fragment)   | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | BAIXO HCM |  |  |  |
| T1W1C3     | Polyprotein (Fragment)                           | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | BAIXO HCM |  |  |  |

|            |                                                 |                           |              |  |  |  |
|------------|-------------------------------------------------|---------------------------|--------------|--|--|--|
| A0A3Q2TW07 | Fibronectin                                     | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | BAIXO HCM    |  |  |  |
| A0A1D5NYA7 | Sema domain-containing protein                  | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | BAIXO HCM    |  |  |  |
| A0A1D5PM04 | VASst domain-containing protein                 | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | BAIXO HCM    |  |  |  |
| F1NW72     | Kinesin motor domain-containing protein         | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | BAIXO HCM    |  |  |  |
| A0A1D5PLM9 | CN hydrolase domain-containing protein          | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | BAIXO HCM    |  |  |  |
| O93510     | Gelsolin                                        | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | BAIXO HCM    |  |  |  |
| A0A3Q2TSE8 | A2M_recep domain-containing protein             | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | BAIXO HCM    |  |  |  |
| A0A1D5PH32 | Gelsolin                                        | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | BAIXO HCM    |  |  |  |
| F1NJT4     | Fibronectin                                     | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | BAIXO HCM    |  |  |  |
| A0A3Q2U1V1 | Reverse transcriptase domain-containing protein | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | BAIXO HCM    |  |  |  |
| A0A1D5PFV8 | VASst domain-containing protein                 | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | BAIXO HCM    |  |  |  |
| A0A8C4NUA9 | Protogenin homolog b (Gallus gallus)            | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | BAIXO HCM    |  |  |  |
| A0A3Q2UJ10 | Nuclear receptor coactivator                    | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | HCM CONTROLE |  |  |  |
| A0A3Q2TTP6 | Histone deacetylase                             | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | HCM CONTROLE |  |  |  |
| A0A1D5PRP5 | Spatacsin_C domain-containing protein           | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | HCM CONTROLE |  |  |  |
| A0A1D5P0F4 | Collagen alpha-1(XIV) chain                     | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | HCM CONTROLE |  |  |  |
| P32018     | Collagen alpha-1(XIV) chain                     | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | HCM CONTROLE |  |  |  |
| E1C409     | Ceramide transfer protein                       | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | HCM CONTROLE |  |  |  |
| A0A1D5P5T9 | Ceramide transfer protein                       | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | HCM CONTROLE |  |  |  |
| A0A3Q3AD18 | Hist_deacetyl domain-containing protein         | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | HCM CONTROLE |  |  |  |
| A0A3Q2UL60 | Microtubule-associated protein                  | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | HCM CONTROLE |  |  |  |
| A0A3Q2ULM6 | Microtubule-associated protein                  | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | HCM CONTROLE |  |  |  |
| A0A3Q2UIG0 | Histone deacetylase                             | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | HCM CONTROLE |  |  |  |
| A0A3Q2UFA0 | Microtubule-associated protein                  | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | HCM CONTROLE |  |  |  |
| F1P1T9     | Spatacsin_C domain-containing protein           | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | HCM CONTROLE |  |  |  |
| A0A3Q2U014 | Histone deacetylase                             | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | HCM CONTROLE |  |  |  |
| A0A1D5PBB1 | Histone deacetylase                             | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | HCM CONTROLE |  |  |  |
| F1NMB5     | Nuclear receptor coactivator                    | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | HCM CONTROLE |  |  |  |

|            |                                        |                           |              |          |      |                 |
|------------|----------------------------------------|---------------------------|--------------|----------|------|-----------------|
| A0A3Q2U1U6 | RRM domain-containing protein          | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | HCM CONTROLE |          |      |                 |
| Q5F432     | Histone deacetylase                    | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | HCM CONTROLE |          |      |                 |
| A0A1D5P4A2 | Hemoglobin subunit epsilon             | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE |              | 0,025476 | 0,01 | Down regulation |
| A0A3Q2UF48 | Peptidase S1 domain-containing protein | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE |              | 0,559898 | 0,01 | Down regulation |
| A0A3Q2UJK8 | Ig-like domain-containing protein      | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE |              | 1,552707 | 1    | Up regulation   |
| A0A3Q2U8X8 | Ig-like domain-containing protein      | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE |              | 1,552707 | 1    | Up regulation   |
| E1BQC2     | Ovotransferrin                         | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE |              | 1,221403 | 1    | Up regulation   |
| A0A3Q2UGD4 | Ig-like domain-containing protein      | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE |              | 1,552707 | 1    | Up regulation   |
| A0A3Q2TZD6 | Ig-like domain-containing protein      | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE |              | 4,71147  | 1    | Up regulation   |
| A0A3Q2TXP7 | Ig-like domain-containing protein      | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE |              | 1,552707 | 1    | Up regulation   |
| Q9W6F5     | Vitamin D-binding protein              | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE |              | 1,2586   | 1    | Up regulation   |
| P19121     | Albumin                                | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE |              | 1,419068 | 1    | Up regulation   |
| A2N890     | VH1 protein (Fragment)                 | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE |              | 1,584074 | 1    | Up regulation   |
| A0A3Q2UFG5 | Ig-like domain-containing protein      | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE |              | 1,552707 | 1    | Up regulation   |
| A2N889     | VH1 protein (Fragment)                 | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE |              | 5,05309  | 1    | Up regulation   |
| A2N886     | VH1 protein (Fragment)                 | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE |              | 5,259311 | 1    | Up regulation   |
| A2N885     | VH1 protein (Fragment)                 | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE |              | 2,117    | 1    | Up regulation   |
| A2N884     | VH1 protein (Fragment)                 | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE |              | 1,682028 | 1    | Up regulation   |
| A2N883     | VH1 protein (Fragment)                 | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE |              | 1,822119 | 1    | Up regulation   |
| A2N881     | VH1 protein (Fragment)                 | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE |              | 1,584074 | 1    | Up regulation   |
| A0A3Q2TZA1 | Ig-like domain-containing protein      | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE |              | 1,552707 | 1    | Up regulation   |
| Q4ADJ6     | Ovotransferrin                         | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE |              | 1,20925  | 1    | Up regulation   |
| A0A3Q2UCU3 | Ig-like domain-containing protein      | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE |              | 1,552707 | 1    | Up regulation   |
| A0A3Q2U474 | Ig-like domain-containing protein      | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE |              | 1,568312 | 1    | Up regulation   |
| Q4ADG4     | Ovotransferrin                         | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE |              | 1,20925  | 1    | Up regulation   |
| A0A1D5PAQ0 | Ig-like domain-containing protein      | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE |              | 1,568312 | 1    | Up regulation   |
| F1NVF3     | Vitamin D-binding protein              | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE |              | 1,2586   | 1    | Up regulation   |
| A0A1D5PCD2 | A2M_recep domain-containing protein    | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE |              | 1,390968 | 1    | Up regulation   |

|            |                                   |                           |  |          |   |               |
|------------|-----------------------------------|---------------------------|--|----------|---|---------------|
| A0A3Q3AF81 | Ig-like domain-containing protein | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE |  | 1,552707 | 1 | Up regulation |
| A0A1D5NW68 | Albumin                           | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE |  | 1,419068 | 1 | Up regulation |
| A0A3Q2UH03 | Ig-like domain-containing protein | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE |  | 1,568312 | 1 | Up regulation |
| A0A3Q2UPH3 | Ig-like domain-containing protein | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE |  | 5,103875 | 1 | Up regulation |
| A0A3Q2TW03 | Ig-like domain-containing protein | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE |  | 1,568312 | 1 | Up regulation |
| P08250     | Apolipoprotein A-I                | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE |  | 1,599994 | 1 | Up regulation |
| A0A1D5PU00 | Protein AMBP                      | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE |  | 1,750673 | 1 | Up regulation |
| Q98TD1     | PIT 54                            | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE |  | 1,822119 | 1 | Up regulation |
| A0A3Q2UAA5 | Ig-like domain-containing protein | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE |  | 1,349859 | 1 | Up regulation |
| A0A3Q3AN21 | Ig-like domain-containing protein | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE |  | 1,537258 | 1 | Up regulation |
| A0A3Q2UAW0 | Ig-like domain-containing protein | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE |  | 4,806648 | 1 | Up regulation |
| A0A3Q2UGI5 | Ig-like domain-containing protein | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE |  | 1,433329 | 1 | Up regulation |
| A0A3Q2UMU2 | Ig-like domain-containing protein | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE |  | 1,803988 | 1 | Up regulation |
| A0A3Q2U2P6 | Ig-like domain-containing protein | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE |  | 5,002811 | 1 | Up regulation |
| A0A3Q2UDA5 | Ig-like domain-containing protein | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE |  | 3,974902 | 1 | Up regulation |

**CAPÍTULO IV**

**PERFIL METALOPROTÊOMICO DE FÍGADO DE FRANGOS DE**  
**CORTE SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES FONTES E NÍVEIS DE**  
**COBRE, MANGANÊS E ZINCO**

**Resumo:** Cobre, Zinco e Manganês são microminerais suplementados em dietas de aves que participam de vários processos fisiológicos específicos. Há diversas fontes comerciais e dentre elas os hidroxicloreto minerais representam a terceira geração por apresentarem características específicas em relação às fontes convencionais. Tais características podem influenciar as respostas fisiológicas em nível molecular e o estudo proteômico é uma das ferramentas que auxiliam na descrição dessas respostas. Desse modo, o objetivo dessa pesquisa foi avaliar diferentes fontes e níveis de Cu, Zn e Mn sobre o perfil diferencial das proteínas associadas com estes minerais no tecido hepático de frangos de corte. Para isso, 1080 frangos de corte foram divididos em 3 grupos experimentais (Sulf. Controle, Baixo HCM e HCM Controle) e foi coletado fragmento de fígado de 9 aves/tratamento e a partir das amostras feito 3 *pools*. Os *pools* foram submetidos aos procedimentos de extração proteica para obtenção do proteoma e posteriormente caracterização, identificação dos níveis funcionais, via metabólicas e interações das proteínas associadas com os minerais estudados. A análise proteômica demonstrou indução de proteínas associadas os processos biológicos e componente celular, com funções de transporte de nutrientes e produção de energia como a ALDOB (fructose-biphosphate aldolase B) e ATP Sintetase Subunidade  $\beta$  (ATP5b), respectivamente, sugerindo envolvimento dessas proteínas com os minerais estudados e como potenciais biomarcadores responsivos a concentrações e/ou biodisponibilidade dos minerais frente às estratégias nutricionais.

**Palavras Chaves:** ATP Sintetase Subunidade  $\beta$ , fructose-biphosphate aldolase B, hidroxicloreto minerais, metaloproteínas, *Shotgun*.



## INTRODUÇÃO

Os elementos minerais são estruturas que não podem ser decompostos ou sintetizados pelos organismos vivos em reações químicas metabólicas e desempenham diversas funções (estruturais, fisiológica, catalisadora, etc.) no organismo animal (MACARI et al., 2002; SUTLE, 2010).

Nutricionalmente, os minerais requeridos em grandes quantidades são chamados de macrominerais e aqueles requeridos em pequenas quantidades são chamados de microminerais. No grupo dos microminerais estão presentes o Cobre (Cu), Zinco (Zn) e Manganês (Mn), todos com funções muito específicas no metabolismo animal e, essenciais para as funções de manutenção e produção de frangos de corte (MACARI et al., 2002).

Cobre, Zn e Mn suplementados em dietas de aves são indispensáveis para o crescimento, além de terem interfície com muitos processos fisiológicos e biológicos, especialmente como catalizador enzimático intracelular, envolvidos no metabolismo de proteínas, secreção de hormônios, sistema imunológico, antioxidante e outros (VIEIRA et al., 2020).

Há diversas fontes comerciais de minerais no mercado atualmente e sua efetividade bem como seu valor comercial é medida pela biodisponibilidade, determinada pela quantidade do mineral ingerida e absorvida no trato gastrointestinal para ser utilizada em funções metabólicas normais dos organismos.

Entre as fontes disponíveis comercialmente, os hidroxidocloreto também são classificados como minerais inorgânicos, no entanto apresentam particularidades que os diferenciam das fontes sulfatos, óxidos ou carbonatos (JASEK et al., 2019). Os hidroxidocloreto minerais apresentam ligações covalentes em sua estrutura química que os tornam menos reativos e menos solúveis em água, reduzindo as interações negativas com

os demais componentes da dieta (LUO et al., 2005; LU et al., 2010). E embora hajam estudos que comprovem sua efetividade como fonte de maior biodisponibilidade não há estudos que explorem a funcionalidade de Cu, Zn e Mn a nível molecular, com o objetivo de correlacionar uma característica fenotípica estimulada por uma estratégia nutricional.

A análise proteômica pode auxiliar na avaliação das interações de diferentes estratégias nutricionais sobre as alterações no proteoma de células, tecidos ou fluídos corporais, elucidando como estas mudanças podem influenciar a saúde, produção, reprodução e qualidade dos produtos gerados (ALMEIDA & BENDIXEN, 2012).

Ferramentas proteômicas permitem compreender as propriedades das proteínas, seus níveis de expressão e modificações pós traducionais, caracterizando quali e quantitativamente o perfil proteico, permitindo a compreensão de mecanismos moleculares que alteram os fenótipos (NAABY-HANSEN et al., 2001; PRASAD et al., 2017).

Nesse sentido, o objetivo desse experimento foi avaliar o perfil diferencial das proteínas associadas com Cu, Zn e Mn no tecido hepático de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis desses minerais utilizando como ferramenta as estratégias metaloproteômicas.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Todos os procedimentos executados nesse estudo foram submetidos aprovados pelo Comitê de Ética de Uso de Animais – CEUA/FMVZ, processo nº 0033/2020.

### ***Aves, Dietas e Tratamentos Experimentais***

Para o estudo proteômico foram utilizadas amostras do tecido hepático de 27 frangos de corte macho da linhagem (Cobb® 500) suplementados com duas fontes

(sulfato e hidroxiclreto) e um nível de Cobre (15 ppm), dois níveis de manganês (40 e 80 ppm) e dois níveis de zinco (40 e 80 ppm), totalizando três tratamentos:

- Sulf. Controle – 15 ppm de Cobre + 80 ppm de Manganês + 80 ppm de Zinco (fonte sulfato);
- Baixo HCM – 15 ppm de Cobre + 40 ppm de Manganês + 40 ppm de Zinco (fonte hidroxiclreto);
- HCM Controle – 15 ppm de Cobre + 80 ppm de Manganês + 80 ppm de Zinco (fonte hidroxiclreto);

As dietas foram isoproteicas e isoenergéticas formuladas a base de milho e farelo de soja, seguindo as recomendações de Rostagno et al. (2017), diferindo apenas nos níveis dos minerais avaliados e divididas em quatro fases: pré inicial (1 a 7 dias); inicial (8 a 21 dias); crescimento (22 a 35 dias) e final (36 a 42 dias).

As aves foram criadas desde um dia de idade em galpão com piso de concreto cobertos com maravalha com área 2,0m<sup>2</sup>/box (15 frangos/m<sup>2</sup>) durante o de 42 dias. Cada box foi equipado com um comedor tubular e bebedouros tipo *nipple* (5 bebedouros/box). O fornecimento da ração e água foi à vontade durante todo o período experimental.

### ***Coleta de Amostras***

Aos 42 dias os frangos de corte foram abatidos por deslocamento crânio cervical e posteriormente foi realizada a coleta de um fragmento do lobo direito do fígado de cada ave utilizando lâmina de aço inoxidável. Cada fragmento de fígado foi seccionado em fatias, transferidos para criotubos e então armazenado em *freezer* -80°C até a sua utilização nos ensaios proteômicos. A partir das amostras coletadas foram feitos *pools* por meio da homogeneização e maceração das amostras de fígado do mesmo grupo,

correspondendo aos três tratamentos estudados. Foram consideradas amostras de 9 aves por tratamento.

### ***Extração e Quantificação de Proteínas***

Para a extração das proteínas foram homogeneizados aproximadamente 100 mg de cada pool de tecido hepático em 300  $\mu\text{L}$  em tampão de lise (uréia 7  $\text{mol L}^{-1}$ , tiouréia 2  $\text{mol L}^{-1}$ , ditioneitol 40  $\text{mmol L}^{-1}$  e bicarbonato de amônio 50  $\text{mmol L}^{-1}$ ). A mistura foi submetida a extração em disruptor de células por três ciclos de 20 segundos e descanso em gelo de um minuto entre os ciclos. Em seguida os extratos foram centrifugados durante 20 minutos, a 14 000  $\times g$  e 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e transferido para um novo microtubo. Posteriormente as proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando albumina de soro bovino (BSA) como proteína padrão.

### ***Digestão de Proteínas em Solução***

A partir dos extratos proteicos, 50  $\mu\text{g}$  de proteína de cada amostra foi diluída em 60  $\mu\text{L}$  de bicarbonato de amônio (50  $\text{mmol L}^{-1}$ ). Em seguida foram adicionados 25  $\mu\text{L}$  de Rapigest (0,2% (v/v)) em cada amostra e transferidas para bloco aquecido a 37°C durante 60 minutos. Posteriormente, as proteínas presentes nas amostras foram reduzidas com a adição de 2,5  $\mu\text{L}$  de ditioneitol (100  $\text{mmol L}^{-1}$ ) sendo incubadas (37°C) por 40 minutos, e posteriormente alquiladas por meio da adição de 2,5  $\mu\text{L}$  de iodoacetamida (300  $\text{mmol L}^{-1}$ ). Logo após as etapas de redução e alquilação, os extratos proteicos foram incubados em temperatura ambiente, na ausência de luz, por 30 minutos. Na sequência foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de solução de tripsina na concentração de 0,1  $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$  (1:50 [enzima:substrato]) procedendo-se imediatamente a digestão a 37°C por 16 horas. A

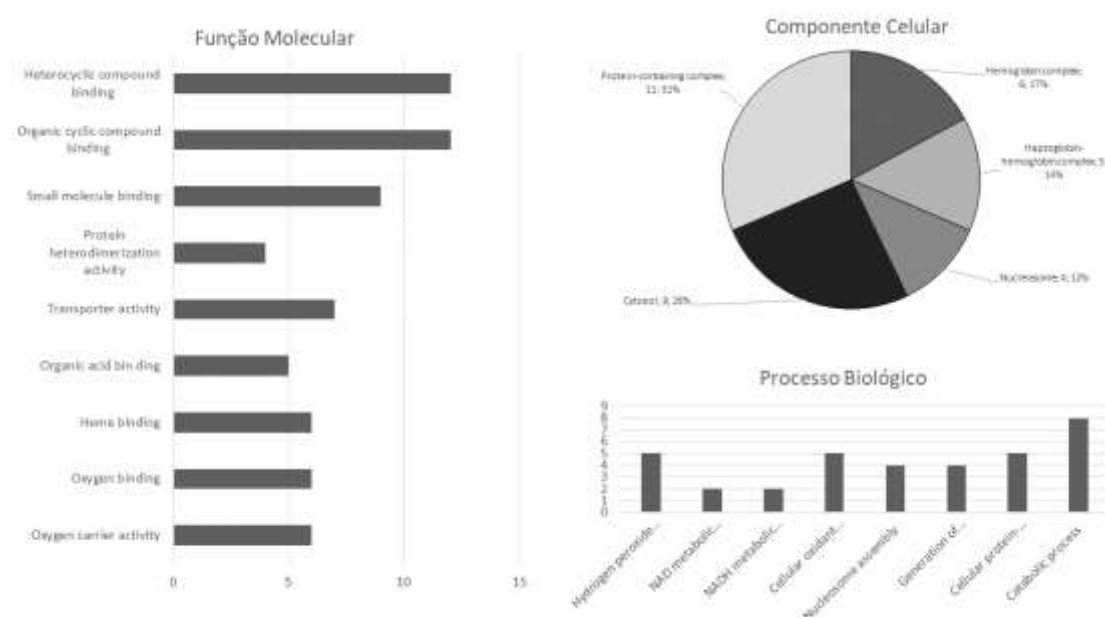
digestão foi interrompida com 10 µL de ácido trifluoroacético 5% (v/v) e as amostras foram incubadas novamente durante 90 minutos a 37°C. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 14 000 rpm por 30 minutos em temperatura ambiente. Logo após a centrifugação os sobrenadantes foram separados e transferidos para um novo microtubo. As amostras foram dessalinizadas por meio de colunas *Sep-Pak Vac C18* (Waters, Milford, EUA) conforme as recomendações do fabricante. As soluções contendo os peptídeos foram reduzidas por meio de centrifugação a vácuo e armazenadas a -20°C até a análise por espectrometria de massas em sequência acoplada com cromatografia líquida (LC-MS/MS).

### ***Identificação e Análise de Bioinformática e Expressão de Proteínas***

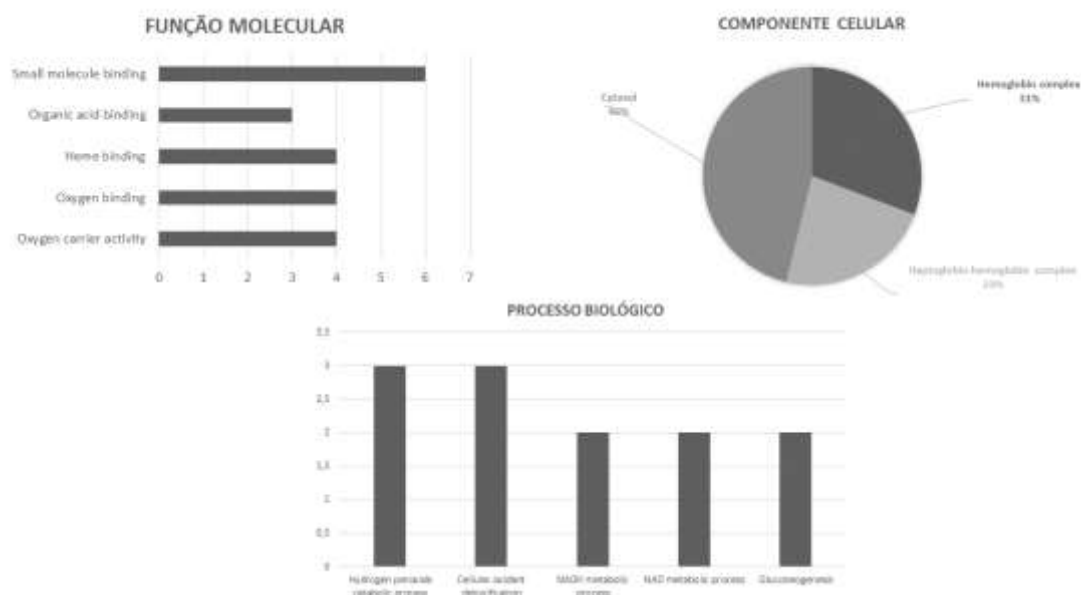
A análise funcional das proteínas *upregulated* e *downregulated* foi realizada utilizando o *software* Blast2GO v.6.0.3 a partir das sequências FASTA das proteínas obtidas no banco de dados *Uniprot*. Por meio dos termos GO (*Gene Ontology*) as proteínas foram classificadas em três níveis: processo biológico, função molecular e componente celular. A ferramenta online *String* (*string-db.org* v.11.5) foi utilizada para construir a rede de interação proteína-proteína utilizando o nível de confiança mais alto (0,900). A rede foi agrupada em 3 *clusters* utilizando o agrupamento *kmeans*. Os nós desconectados na rede foram ocultados. A análise de enriquecimento da via KEGG (Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto) foi realizada utilizando o *software* *Cytoscape* (v.3.9.1) com o plugin *String* para avaliar as vias metabólicas alteradas (FDR<0,05) pelas proteínas diferencialmente expressas.

## RESULTADOS

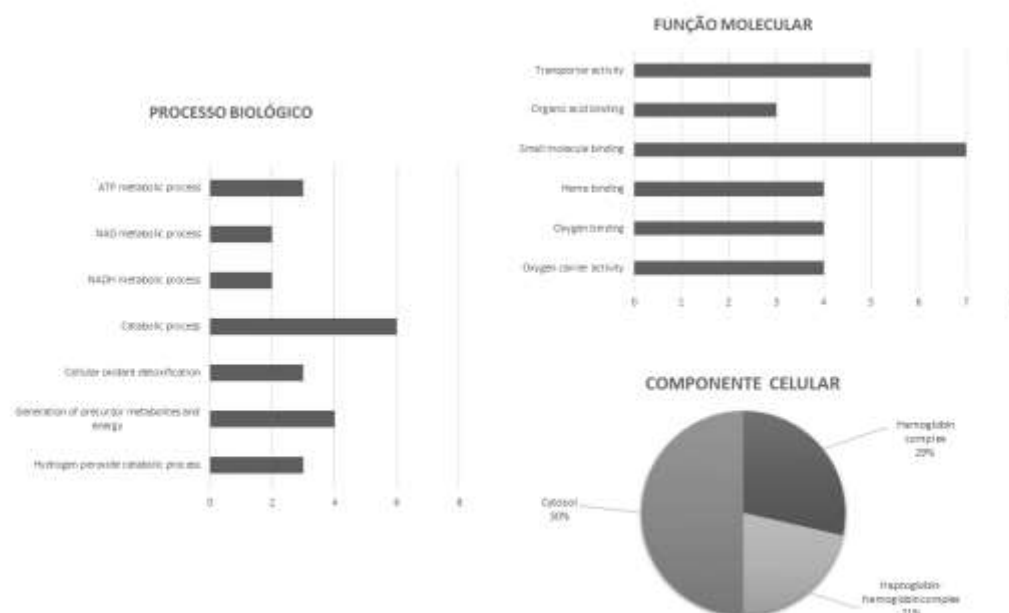
Os tratamentos avaliados foram confrontados para melhor visualização do perfil de proteínas identificadas, conforme a descrição a seguir: Sulf. Controle vs Baixo HCM; Sulf. Controle vs Controle HCM e Baixo HCM vs Controle HCM. Os resultados da anotação funcional (processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares) das proteínas encontradas no confronto dos tratamentos experimentais Sulf. Controle vs Baixo HCM; Sulf. Controle vs Controle HCM e Baixo HCM vs Controle HCM podem ser visualizados nas Figuras 1, 2 e 3, respectivamente.



**Figura 1.** Anotação funcional das proteínas identificadas na comparação entre Sulf. Controle vs Baixo HCM do tecido hepático de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de Cobre, Zinco e Manganês.



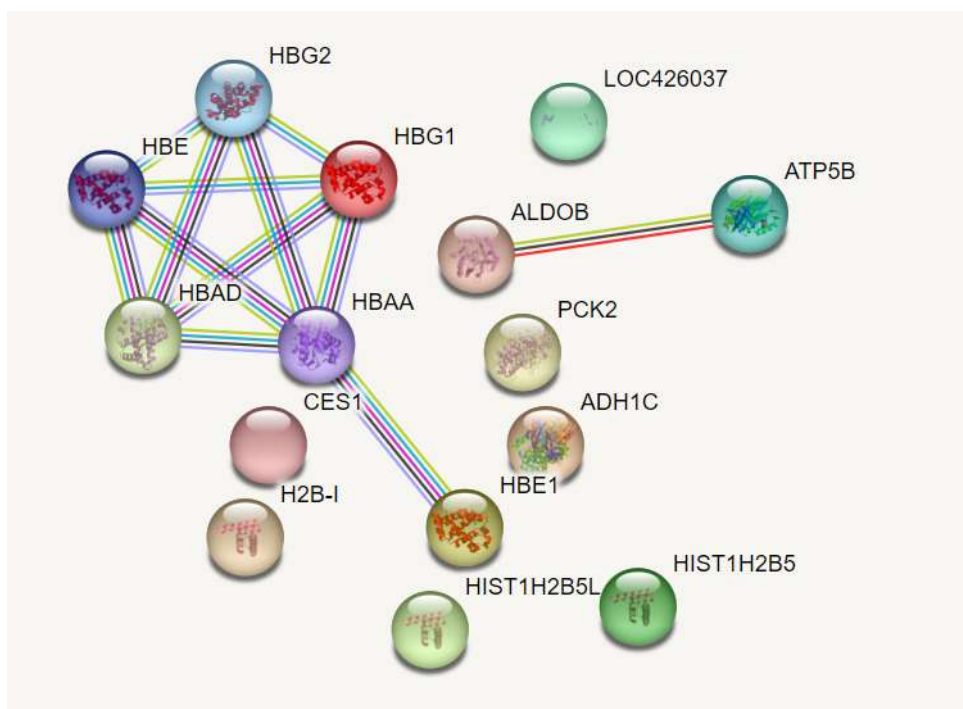
**Figura 2.** Anotação funcional das proteínas identificadas na comparação entre Sulf. Controle vs HCM Controle do tecido hepático de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de Cobre, Zinco e Manganês.



**Figura 3.** Anotação funcional das proteínas identificadas na comparação entre Baixo HCM vs. HCM Controle do tecido hepático de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de Cobre, Zinco e Manganês.

Já a rede de interação de proteínas identificadas no tecido hepático entre a comparação do tratamento Sulf. Controle vs Baixo HCM; Sulf. Controle vs Controle

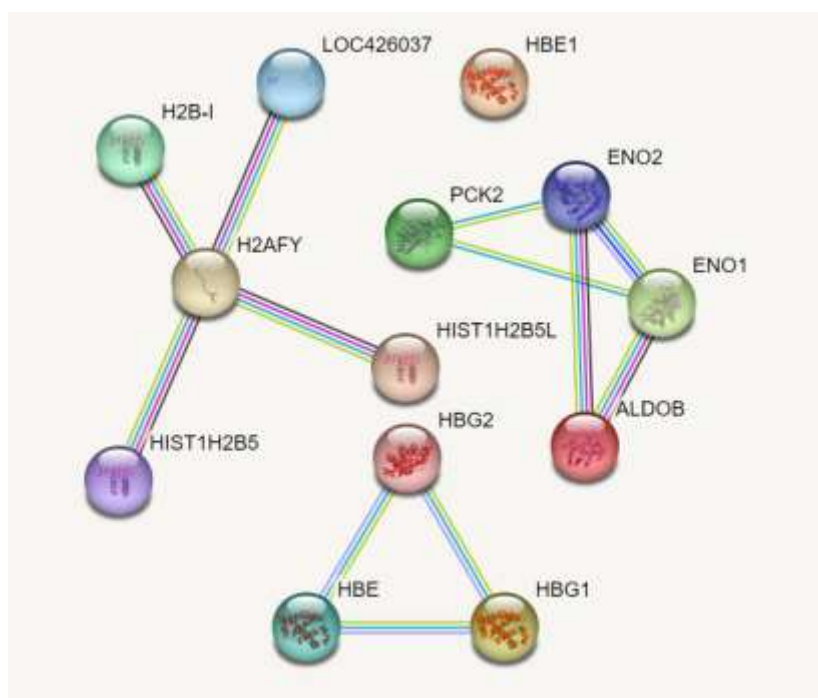
HCM e Baixo HCM vs Sulf HCM podem ser visualizados nas Figuras 4, 5 e 6, respectivamente.



**Figura 4.** Rede de interação entre proteínas identificadas na comparação entre o grupo Sulf. Controle vs Baixo HCM e diferencialmente expressas no tecido hepático de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de cobre, zinco e manganês. Cada nó (esfera colorida) representa uma proteína com o nome do respectivo gene. As linhas que conectam cada nó indicam evidência de interação (quanto mais espessa maior o nível de confiança).

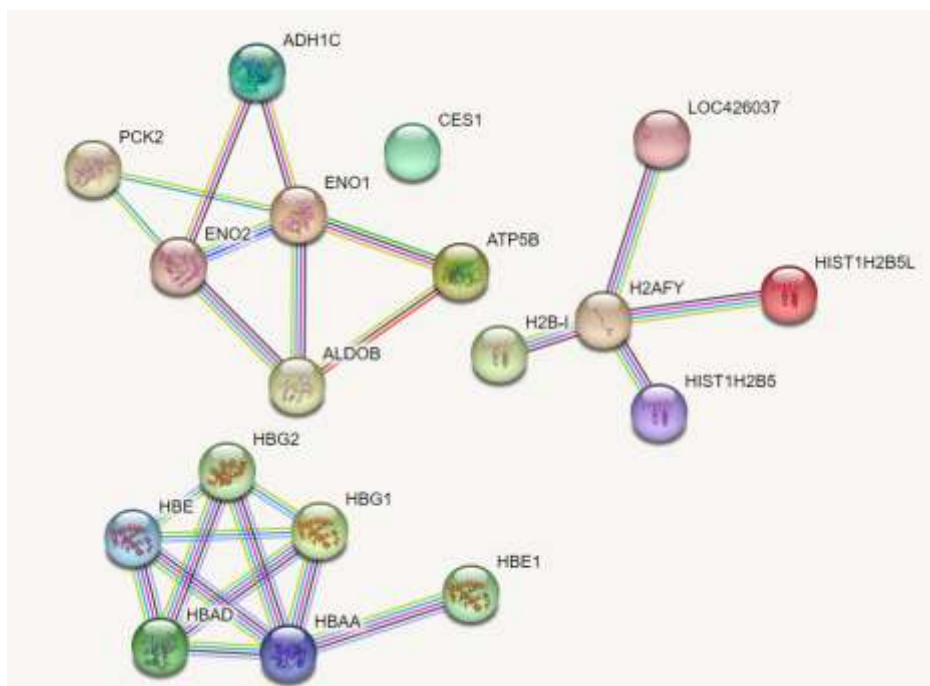
De acordo com a Figura 4, 15 proteínas foram evidenciadas entre os tratamentos Sulf. Contre vs Baixo HCM, participando de processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares, como mostra a Figura 1.





**Figura 5.** Rede de interação entre proteínas identificadas na comparação entre o grupo Sulf. Controle vs HCM Controle e diferencialmente expressas no tecido hepático de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de cobre, zinco e manganês. Cada nó (esfera colorida) representa uma proteína com o nome do respectivo gene. As linhas que conectam cada nó indicam evidência de interação (quanto mais espessa maior o nível de confiança).

A figura 5 indica a rede de interação entre os tratamentos Sulf. Contre vs HCM Controle, evidenciando 15 proteínas que participam de processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares, como mostra a Figura 2.



**Figura 6.** Rede de interação entre proteínas identificadas na comparação entre o grupo Sulf. Controle vs HCM Controle e diferencialmente expressas no tecido hepático de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de cobre, zinco e manganês. Cada nó (esfera colorida) representa uma proteína com o nome do respectivo gene. As linhas que conectam cada nó indicam evidência de interação (quanto mais espessa maior o nível de confiança).

De acordo com a Figura 6, 18 proteínas foram evidenciadas entre os tratamentos Baixo HCM. vs HCM Controle, participando de processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares, como mostra a Figura 3.

## DISCUSSÃO

A suplementação de diferentes fontes e níveis de Cu, Zn e Mn alterou o perfil de proteínas hepáticas associadas com os processos biológicos e componente celular, com funções de transporte de nutrientes e produção de energia em frangos de corte aos 42 dias de idade. A partir da análise de ontologia genética foi possível identificar nesse estudo proteínas que tiveram sua expressão alterada a partir dos tratamentos experimentais, como: *ALDOB* (*fructose-biphosphate aldolase B*) e *ATP Sintetase Subunidade  $\beta$*  (*ATP5b*).

A proteína ALDOB encontrada nesse estudo faz parte de processos biológicos e moleculares e foi expressa exclusivamente no tecido hepático de frangos de corte suplementados com níveis mais baixos de hidroxicloreto mineral (grupo Baixo HCM) quando comparado as aves suplementadas com níveis mais altos da mesma fonte mineral (HCM Controle).

A ALDOB é uma enzima glicolítica, predominantemente expressa pelo fígado e rim, responsável por clivar a frutose 1,6 bifosfato em gliceraldeído 3 fosfato. A isoforma B desta proteína é expressa exclusivamente pelo fígado e sua expressão é controlada pela ingestão de alimentos. A ALDOB é uma metaloproteína e depende de um íon de Zn em sua estrutura para exercer sua função biológica (COPPER et al., 1999; FONVIELLE et al., 2008). Carboidratos simples, como a frutose por exemplo, aumentam a expressão de mRNA para síntese da ALDOB (MUNNICH et al., 1985). Estudos proteômicos correlacionando esta proteína com frangos de corte são escassos. No entanto, Maharjan et al (2021), observaram que à medida que algumas proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos são *up reguladas* (PYGB e MGAM) inicia-se um estado fisiológico de deficiência de nutrientes e as fibras musculares são afetadas, ao passo que essa situação fisiológica é contornada com o aumento da expressão da ALDOB, permitindo melhor utilização de energia dos carboidratos da dieta para correto crescimento celular.

Neste estudo, a fonte hidroxicloreto de Cu, Zn e Mn em níveis reduzidos (grupo Baixo HCM) podem ter favorecido a expressão da proteína ALDOB, seja pela maior disponibilidade da fonte mineral ou ainda pela menor saturação dos íons metálicos circulantes no organismo da ave competindo por sítios de ligação e/ou transportadores. Alguns autores também constataram que a suplementação de hidroxicloreto mineral resultaram em melhor performance em comparação às fontes sulfatos, inclusive obtendo os mesmos resultados quando suplementados em níveis abaixo do recomendado pelos

guias nutricionais (OLUKOSI et al., 2018; NAGUYEN et al., 2020, FRANKLIN et al., 2022; GROFF-URAYAMA et al., 2023). Nesse sentido, por mais que esses estudos não sejam proteômicos, pode-se sugerir que molecularmente a fructose-biphosphate aldolase B também tenha sido positivamente expressa, favorecendo o metabolismo de nutrientes e, dessa maneira, proporcionando resultados satisfatórios de desempenho mesmo quando a suplementação mineral foi abaixo do recomendado.

Outra proteína que teve sua expressão alterada nesse estudo é a *ATP Sintetase Subunidade  $\beta$*  (ATP5b). Esta proteína foi expressa exclusivamente no tratamento Baixo HCM quando comparado com o tratamento Sulf. Controle. A proteína ATP5b é uma subunidade da enzima ATP sintetase mitocondrial responsável por produzir ATP a partir de ADP durante o processo da cadeia respiratória na mitocôndria e com importante função no metabolismo celular (GANETZKY et al., 2022). Segundo Liu et al. (2012), maior expressão de ATP5b significa maior capacidade oxidativa (capacidade produzir energia a partir de glicose, ácidos orgânicos) e estudos anteriores com suínos correlacionam tal ação com maior crescimento muscular e metabolismo de tecido adiposo (Xu et al., 2009).

Proteínas envolvidas na atividade mitocondrial, assim como a ATP5b podem ser usadas como biomarcadores de saúde de frangos de corte (DUCATELLE et al., 2018). Nesse sentido, pode-se extrapolar que também possam ser biomarcadores para desempenho, uma vez que a funcionalidade dessas proteínas garante correta produção de energia para ser convertida às exigências de manutenção e de produção. Segundo Musigwa et al. (2021), o aumento da expressão de genes da ATP sintetase está relacionado com um melhor desempenho uma vez que o correto funcionamento do metabolismo de mitocôndrias em produzir energia favorece o metabolismo celular e a utilização da energia em processos biológicos.

Tanto a proteína ALDOB quanto ATP5b são importantes para os processos biológicos e moleculares no organismo de frangos de corte. Apesar das informações a cerca desse assunto serem escassas e não haver estudos que investigam estas fontes com o proteoma de frangos de corte, pelos resultados obtidos, pode-se inferir que a suplementação das dietas com Cu, Zn e Mn na forma hidroxicloreto favoreceram sua expressão em comparação à fonte sulfato. Somado a isso, tais proteínas podem ser consideradas possíveis biomarcadores para avaliar a influência de estratégias nutricionais a nível molecular. No entanto, para isso, requer-se mais estudos detalhando as vias metabólicas envolvidas.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, A. M., and E. BENDIXEN. 2012. “Pig proteomics: A review of a species in the crossroad between biomedical and food sciences”. *Journal of Proteomics* 75 (14): 4296 – 4314. doi: 10.1016/j.jprot.2012.04.010.
- COPPER, J. S., G. A. LEONARD, S. M. McSWEENEY, A. W. THOMPSON, J. H. NAISMITH, S. QAMAR, A. PLATER, A. BERRY, and W. N HUNTER. 1999. “The crystal structure of a class II fructose-1,6-biphosphate aldolase shows a novel binuclear metal-binding active site embedded in a familiar fold”. *Structure* 4 (11): 1303 – 13015. Doi: 10.1016/s0969-2126(96)00138-4.
- DUCATELLE, R. E. GOOSSENS, F. D. MEYER, V. E. EECKHAUT, G. ANTONISSEN, F. HAESBROUCK, and F. V. IMMERSEEL. 2018. “Biomarkers for monitoring intestinal health in poultry: present status and future perspectives”. *Veterinary Research* 49 (43): 1 – 9. Doi: 10.1186/s13567-018-0538-6.
- FONVIELLE, M., M. COIÇON, R. DAHER, N. DESBENOIT, K. KOSIERADZKA, N. BARILONE, B. GICQUEL, J. SYGUSH, M. JACKSON, and M. THERISOD. 2008. “Synthesis and Biochemical Evaluation of Selective Inhibitors of Class II Fructose

Bisphosphate Aldolases: Towards New Synthetic Antibiotics”. *Chemistry* 14 (28): 8521 – 8529. doi: 10.1002/chem.200800857.

FRANKLIN, S. B., M. B. YOUNG, and M. CIACCIARIELLO. 2022. “The Impact of Different Sources of Zinc, Manganese, and Copper on Broiler Performance and Excreta Output”. *Animals* 12 (9): 1067. Doi: 10.3390/ani12091067.

GANETZKY, R. D., A. L. MARKHARD, I. YEE, S. CLEVER, A. CAHILL, H. SHAH, Z. GRABAREK, T. TO, and V. K. MOOTHA. 2022. “Congenital hypermetabolism and uncoupled oxidative phosphorylation”. *The New England Journal of Medicine: Research & Review* 387 (15): 1395 – 1403. doi: 10.1056/NEJMoa2202949

GROFF-URAYAMA, P. M., J. M. CRUVINEL, C. Y. OURA, T. S. SANTOS, F. K. LIMA-KRENCHINSKI, J. S. BATISTIOLI, P. A. D. RODRIGUES, K. V. Z. AUGUSTO, Y. HAN, and J. R. SARTORI. 2023. “Sources and levels of copper and manganese supplementation influence performance, carcass traits, meat quality, tissue mineral content, and ileal absorption of broiler chicken”. *Poultry Science* 102 (2): 102330. doi: 10.1016/j.psj.2022.102330

JASEK, A., C. D. COUFAL, T. M. PARR, and J. T. LEE. 2019. “Evaluation of increasing manganese hydroxychloride level on male broiler growth performance and tibia strength”. *Journal of Applied Poultry Research* 28 (4): 1039 – 1047. doi: 10.3382/japr/pfz065.

LU, L., R. L. WANG, Z. J. ZHANG, F. A. STEWARD, X. LUO, and B. LIU. 2010. “Effect of dietary supplementation with copper sulfate or tribasic copper chloride on the growth performance, liver copper concentrations of broilers fed in floor pens, and stabilities of vitamin E and phytase in feeds”. *Biological Trace Element Research* 138 (1-3): 181 -189. doi: 10.1007/s12011-010-8623-3.

LIU, J., M. N. LILLY, J. I. SHAPIRO. 2018. “Targeting Na/K-ATPase Signaling: A New Approach to Control Oxidative Stress”. *Current Pharmaceutical Design* 24 (3): 359 – 364. Doi: 10.2174/1381612824666180110101052

LUO, X. G., F. JI, Y. X. LIN, F. A. STEWARD, L. LU, B. LIU, and S. X. YU. 2005. “Effects of dietary supplementation with copper sulfate or tribasic copper chloride on broiler performance, relative copper bioavailability, and oxidation stability of vitamin E in feed”. *Poultry Science* 84 (6): 888 -893. doi: 10.1093/ps/84.6.888.

MACARI, M., R. L. FURLAN, and E. GONZALES. 2002. “Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte”. 2 ed. *Jaboticabal: FUNEP/UNESP*.

MAHARJAN, P., A. BEITIA, J. WEIL, N. SUESUTTAJIT, K. HILTON, J. CALDAS, C. UMBERSON, D. MARTINEZ, B. KONG, C. M. OWENS, and C. COON. 2021. “Woody breast myopathy broiler show age-dependent adaptive differential gene expression in *Pectoralis major* and altered *in-vivo* triglyceride kinetics in adipogenic tissues”. *Poultry Science* 100 (7): 101092. doi: 10.1016/j.psj.2021.101092.

MUNNICH, A., C. BESMOND, S. DARQUY, G. REACH, S. VAULONT, J. C. DREYFUS, and A. KAHN. 1985. “Dietary and hormonal regulation of aldolase B gene expression”. *The Journal of Clinical Investigation* 75 (3): 1045 – 1052. doi: 10.1172/JCI111766.

MUSIGWA, S., N. MORGAN, R. A. SWICK, P. COZANNET, S. K. KHERAVII, and S-B. WU. 2021. “Multi-carbohydrase enzymes improve feed energy in broiler diets containing standard or low crude protein”. *Animal Nutrition* 7 (2): 496 – 505. Doi: 10.1016/j.aninu.2020.08.008.

NAABY-HANSEN, S., M. D. WATERFIELD, and R. CRAMER. 2001. “Proteomics – post-genomic cartography to understand gene function”. *Trends in Pharmacological Sciences* 22 (7): 376 – 384. doi: 10.1016/s0165-6147(00)01663-1.

NGUYEN, H. T. T., N. MORGAN, J. R. ROBERTS, R. A. SWICK, and M. TOGHYANI. 2020. “Copper hydroxychloride is more efficacious than copper sulfate in improving broiler chicken's growth performance, both at nutritional and growth-promoting levels”. *Poultry Science* 99 (12): 6964 – 6973. doi: 0.1016/j.psj.2020.09.053.

OLUKOSI, A. O., S. V. KIJIK, and Y. HAN. 2018. “Copper and Zinc sources and levels of zinc inclusion influence growth performance, tissue trace mineral content, and carcass yield of broiler chickens”. *Poultry Science* 97 (11): 3891 – 3898. Doi: 10.3382/ps/pey247.

PRASAD, T. S. K., A. K. MOHANTY, M. KUMAR, S. K. SREENIVASAMURTHY, G. DEY, R. S. NIRUJOGI, S. M. PINTO, A. K. MADUGUNDU, A. H. PATIL, J. ADVANI, S. S. MANDA, M. K. GUPTA, S. B. DWIVEDI, D. S. KELKAR, B. HALL, X. JIANG, A. PERRY, P. RAJAGOPALAN, S. D. YELAMANCHI, H. S. SOLANKI, R. RAJA, G. J. SATHE, S. CHAVAN, R. VERMA, K. M. PATEL, A. P. JAIN, N. SYED, K. DATTA, A. A. KHAN, M. DAMMALI, S. JAYARAM, A. RADHAKRISHNAN, C. J. MITCHELL, C. H. NA, N. KUMAR, P. SINNIS, I. V. SHARAKHOV, C. WANG, H. GOWDA, Z. TU, A. KUMAR, and A. PANDEY. 2017. “Integrating transcriptomic and proteomic data for accurate assembly and annotation of genomes”. *Genome Research* 27 (1): 133 – 144. doi: 10.1101/gr.201368.115.

SUTTLE, N. F. 2010. “The mineral nutrition of livestock”. 4 ed. Editora: *CABI Publishing, Oxfordshire*.

VIEIRA, R.; P. FERKET; R. MALHEIROS; M. HANNAS; M. CRIVELARRI; V. MORAES; S. A. ELLIOTT. A alimentação com baixos níveis alimentares de minerais orgânicos melhora o desempenho de frangos de corte e reduz a excreção de minerais na serapilheira. **British Poultry Science**, v. 61, n. 5, p. 574 – 580, 2020.



## MATERIAL SUPLEMENTAR

**Tabela S1.** Expressão de proteínas de tecido hepático de frangos de corte frente à análise dos termos de ontologia genética e status de expressão frente às comparações com os tratamentos experimentais (diferentes níveis e fontes de Cu, Zn e Mn).

| ACCESSION  | PROTEIN                                                | COMPARATION                | UNIQUE    | RATIO    | P VALUE | REGULATION    |
|------------|--------------------------------------------------------|----------------------------|-----------|----------|---------|---------------|
| P01994     | Hemoglobin subunit alpha-A                             | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM |          |         |               |
| Q90750     | Beta-H globin gene 5'flanking region (Fragment)        | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM |          |         |               |
| P02001     | Hemoglobin subunit alpha-D                             | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM |          |         |               |
| A0A1L1RY04 | ATP synthase subunit beta                              | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM |          |         |               |
| Q5ZLC5     | ATP synthase subunit beta_ mitochondrial               | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM |          |         |               |
| A0A3Q2U983 | Lipoyl-binding domain-containing protein               | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM |          |         |               |
| A0A1D5PMD9 | Carboxylic ester hydrolase                             | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM |          |         |               |
| A0A1D5PN19 | PKS_ER domain-containing protein                       | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM |          |         |               |
| Q8JHF6     | Pyruvate carboxylase                                   | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM |          |         |               |
| V9LU50     | Carboxylic ester hydrolase (Fragment)                  | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM |          |         |               |
| P23991     | Alcohol dehydrogenase 1                                | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM | BAIXO HCM |          |         |               |
| A0A3Q2U9K8 | Phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP)                | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM |           | 1,648721 | 1       | Up regulation |
| A0A1D5P4A2 | Hemoglobin subunit epsilon                             | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM |           | 2,225541 | 1       | Up regulation |
| Q9PSW9     | Histone H2B 8                                          | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM |           | 2,054433 | 1       | Up regulation |
| P21642     | Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP]_ mitochondrial | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM |           | 1,632316 | 1       | Up regulation |
| P07341     | Fructose-bisphosphate aldolase B                       | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM |           | 1,552707 | 1       | Up regulation |
| Q90864     | Beta-H globin                                          | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM |           | 2,225541 | 1       | Up regulation |
| P02112     | Hemoglobin subunit beta                                | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM |           | 2,225541 | 1       | Up regulation |
| A0A3Q2UDI2 | Histone H2B                                            | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM |           | 2,075081 | 1       | Up regulation |
| P02128     | Hemoglobin subunit epsilon                             | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM |           | 2,247908 | 1       | Up regulation |
| P02127     | Hemoglobin subunit rho =                               | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM |           | 2,225541 | 1       | Up regulation |
| B4Z858     | Fructose-bisphosphate aldolase (Fragment)              | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM |           | 1,462285 | 1       | Up regulation |

|            |                                                        |                               |                |          |      |                 |
|------------|--------------------------------------------------------|-------------------------------|----------------|----------|------|-----------------|
| P0C1H5     | Histone H2B 7                                          | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM    |                | 2,203396 | 1    | Up regulation   |
| P0C1H4     | Histone H2B 5                                          | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM    |                | 2,054433 | 1    | Up regulation   |
| P0C1H3     | Histone H2B 1/2/3/4/6                                  | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM    |                | 2,033991 | 1    | Up regulation   |
| A0A1D5PY49 | Histone H2B                                            | SULF.CONTROLE vs BAIXO HCM    |                | 2,247908 | 1    | Up regulation   |
| A0A3Q2U9K8 | Phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP)                | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |          |      |                 |
| P21642     | Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP]_ mitochondrial | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |          |      |                 |
| P07341     | Fructose-bisphosphate aldolase B                       | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |          |      |                 |
| B4Z858     | Fructose-bisphosphate aldolase (Fragment)              | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |          |      |                 |
| A0A3Q2U983 | Lipoyl-binding domain-containing protein               | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |          |      |                 |
| Q8JHF6     | Pyruvate carboxylase                                   | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE | SULF. CONTROLE |          |      |                 |
| A0A1D5P4A2 | Hemoglobin subunit epsilon                             | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |                | 1,698932 | 1    | Up regulation   |
| Q90864     | Beta-H globin                                          | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |                | 1,733253 | 1    | Up regulation   |
| P02112     | Hemoglobin subunit beta                                | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |                | 1,309964 | 1    | Up regulation   |
| P02128     | Hemoglobin subunit epsilon                             | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |                | 1,616074 | 1    | Up regulation   |
| P02127     | Hemoglobin subunit rho                                 | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |                | 1,682028 | 1    | Up regulation   |
| P0C1H5     | Histone H2B 7                                          | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |                | 0,826959 | 0,03 | Down regulation |
| A0A1D5PY49 | Histone H2B                                            | SULF.CONTROLE vs HCM CONTROLE |                | 0,810584 | 0,03 | Down regulation |
| A0A3Q2U9K8 | Phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP)                | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE     | BAIXO HCM      |          |      |                 |
| P21642     | Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP]_ mitochondrial | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE     | BAIXO HCM      |          |      |                 |
| P07341     | Fructose-bisphosphate aldolase B                       | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE     | BAIXO HCM      |          |      |                 |
| P01994     | Hemoglobin subunit alpha-A                             | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE     | BAIXO HCM      |          |      |                 |
| Q90750     | Beta-H globin gene 5'flanking region (Fragment)        | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE     | BAIXO HCM      |          |      |                 |
| P02001     | Hemoglobin subunit alpha-D                             | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE     | BAIXO HCM      |          |      |                 |
| A0A1L1RY04 | ATP synthase subunit beta                              | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE     | BAIXO HCM      |          |      |                 |
| Q5ZLC5     | ATP synthase subunit beta_ mitochondrial               | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE     | BAIXO HCM      |          |      |                 |
| B4Z858     | Fructose-bisphosphate aldolase (Fragment)              | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE     | BAIXO HCM      |          |      |                 |
| A0A1D5PMD9 | Carboxylic ester hydrolase                             | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE     | BAIXO HCM      |          |      |                 |
| A0A1D5PN19 | PKS_ER domain-containing protein                       | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE     | BAIXO HCM      |          |      |                 |

|            |                                          |                           |           |          |      |                 |
|------------|------------------------------------------|---------------------------|-----------|----------|------|-----------------|
| V9LU50     | Carboxylic ester hydrolase (Fragment)    | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | BAIXO HCM |          |      |                 |
| P23991     | Alcohol dehydrogenase 1                  | BAIXO HCM vs HCM CONTROLE | BAIXO HCM |          |      |                 |
| A0A3Q2U983 | Lipoyl-binding domain-containing protein |                           |           | 0,733447 | 0,01 | Down regulation |
| P02128     | Hemoglobin subunit epsilon               |                           |           | 0,683861 | 0,04 | Down regulation |
| A0A1D5P4A2 | Hemoglobin subunit epsilon               |                           |           | 0,697676 | 0,05 | Down regulation |

## IMPLICAÇÕES

O presente experimento investigou o efeito de duas fontes minerais (sulfato e hidroxicloreto) e diferentes níveis de Cobre, Zinco e Manganês sobre os parâmetros de desempenho e rendimento de partes de frangos de corte. Além do estudo de desempenho zootécnico, também foi investigado através da metodologia *Shotgun* metaloproteínas associadas com os minerais estudados, e seu perfil de expressão com base na funcionalidade e metabolismo dessas proteínas, sugerindo que sejam possíveis biomarcadores de exposição a esses minerais, por meio das estratégias nutricionais testadas.

Apesar da nutrição mineral para frangos de corte ser amplamente estudada, estudos com hidroxicloretos minerais são de certa forma recentes. Trouxemos nessa pesquisa alguns esclarecimentos, mas certamente há uma série de lacunas que precisam ser preenchidas para melhor entendimento sobre os parâmetros de desempenho. Bem como avaliar molecularmente a interação de tais fontes minerais com proteínas e outros processos fisiológicos desempenhados pelo organismo das aves.

Nesse estudo constatou-se que Cobre, Zinco e Manganês na forma hidroxicloreto suplementados em níveis abaixo do recomendado por guias nutricionais proporcionam desempenho satisfatório, inclusive quando comparado ao desempenho de frangos de corte recebendo dietas com adição de aditivo melhorador de desempenho e fontes convencionais.

Desse modo, apesar de não se ter conduzido estudos de avaliação de concentração mineral em tecidos e/ou órgãos, ou ensaios de digestibilidade dos minerais estudados, pode-se inferir de acordo com a literatura e os resultados desse estudo que a fonte hidroxicloreto é mais biodisponível, favorecendo o desempenho de frangos de corte. No entanto, sugere-se para estudos futuros com a mesma linha de investigação a realização de ensaios de digestibilidade para auxiliar na validação e justificativa dos resultados encontrados na pesquisa.

Já para o estudo proteômico, a técnica usada foi a *Shotgun* que se baseia na análise quantitativa e fornece resultados de expressão diferencial de proteínas de forma robusta. Através desta metodologia algumas metaloproteínas foram identificadas e correlacionadas como passíveis de mudança em sua expressão frente aos níveis e fontes dos minerais testados, sugerindo a possibilidade de serem biomarcadores.

No entanto, apesar da Shotgun ser uma metodologia mais aceita entre os pesquisadores da área proteômica, por ser mais recente, acreditamos que seria complementar aos resultados a utilização conjunta de outra metodologia em estudos futuros que pretendam seguir essa linha de pesquisa: a 2D-PAGE.

A análise das proteínas por 2D-PAGE permite separar o proteoma, mapear os minerais nos *spots* proteicos e caracterizar as proteínas a partir desses spots e, complementar a isso, a *Shotgun* nos permite averiguar a diferença de expressão de proteínas entre os grupos experimentais permitindo melhor compreensão das proteínas encontradas.