

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**BIODISPONIBILIDADE E EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO
DE L E DL-METIONINA NA INTEGRIDADE INTESTINAL E
ESTADO OXIDATIVO DE LEITÕES NA FASE DE CRECHE**

Raphael Perini Caetano

Zootecnista

2019

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**BIODISPONIBILIDADE E EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO
DE L E DL-METIONINA NA INTEGRIDADE INTESTINAL E
ESTADO OXIDATIVO DE LEITÕES NA FASE DE CRECHE**

Discente: Raphael Perini Caetano

Orientador: Prof. Dr. Luciano Hauschild

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Reis Furtado Campos

Coorientador: Prof. Dr. Luan Sousa dos Santos

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Mestre Zootecnia**

2019

C128b	Caetano, Raphael Perini Biodisponibilidade e efeitos da suplementação de L e DL-metionina na integridade intestinal e estado oxidativo de leitões na fase de creche / Raphael Perini Caetano. -- Jaboticabal, 2019 59 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientador: Luciano Hauschild Coorientador: Paulo Henrique Reis Furtado Campos 1. Aminoácidos na nutrição animal. 2. Nutrição animal. 3. Suinocultura. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: BIODISPONIBILIDADE E EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE L E DL-METIONINA NA INTEGRIDADE INTESTINAL E ESTADO OXIDATIVO DE LEITÕES NA FASE DE CRECHE

AUTOR: RAPHAEL PERINI CAETANO

ORIENTADOR: LUCIANO HAUSCHILD

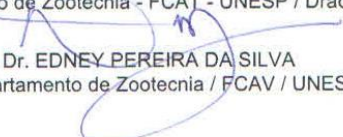
COORIENTADOR: PAULO HENRIQUE REIS FURTADO CAMPOS

COORIENTADOR: LUAN SOUSA DOS SANTOS

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em ZOOTECNIA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. LUCIANO HAUSCHILD
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. GUSTAVO DO VALLE POLYCARPO
Curso de Zootecnia - FCAT - UNESP / Dracena/SP


Prof. Dr. EDNEY PEREIRA DA SILVA
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 10 de outubro de 2019

DADOS CURRÍCULARES DO AUTOR

RAPHAEL PERINI CAETANO – nascido em Ribeirão Preto/SP, no dia 05 de agosto de 1990. Ingressou no curso de Zootecnia da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Unesp – Câmpus de Ilha Solteira, em agosto de 2011, graduando-se em agosto de 2016. Durante o período de 2013 a 2014 foi bolsista de Iniciação Científica da FAPESP sob orientação do Prof. Dr. Antonio Carlos de Laurentiz e presidente do Centro Acadêmico da Zootecnia de Ilha Solteira – CAZIS na gestão 2013/2014. No período de 2014 a 2015 foi bolsista de Intercâmbio AREX/Unesp, na Universidade de Santiago de Compostela, Lugo, Espanha, também sob orientação do Prof. Dr. Antonio Carlos de Laurentiz. Em março de 2017 iniciou os estudos no curso de mestrado do Programa de Pós-graduação em Zootecnia na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp – Câmpus de Jaboticabal, sendo bolsista da CAPES e, posteriormente, FAPESP. Realizou estágio no exterior entre 2018 e 2019, financiado pela BEPE/FAPESP, na “University of Manitoba”, Winnipeg, Canadá, sob orientação do Prof. Dr. Luciano Hauschild e supervisão do Prof. Dr. Charles Martin Nyachoti.

“É exatamente disso que a vida é feita, de momentos. Momentos que temos que passar, sendo bons ou ruins, para o nosso próprio aprendizado. Nunca esquecendo do mais importante: nada nessa vida é por acaso. Absolutamente nada. Por isso, temos que nos preocupar em fazer a nossa parte, da melhor forma possível. A vida nem sempre segue a nossa vontade, mas ela é perfeita naquilo que tem que ser.”

Chico Xavier

DEDICO

Aos meus pais Sérgio e Milna, à minha irmã Jéssica, aos meus avós José e Irene e à minha tia Wilma, que me apoiaram, me encorajaram e sempre foram estímulo e exemplo de vida fundamentais.

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre iluminar meu caminho e minhas escolhas, por me dar forças para superar minhas dificuldades e por conceder tantas oportunidades e bênçãos em minha vida.

À minha família por todo amor e dedicação, pela educação que me deram, pelos valores que me ensinaram e por todos os sacrifícios que realizaram por mim.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luciano Hauschild por ter acreditado em mim, me concedido a oportunidade de desenvolver este projeto e pela excepcional orientação e apoio.

À Prof^a Dr^a Luciane Helena Gargaglioni Batalhão pelo auxílio e orientação burocrática referente à bolsa.

Aos meus coorientadores Prof. Dr. Luan Sousa dos Santos e Prof. Dr. Paulo Henrique Reis Furtado Campos pela ajuda com a elaboração do projeto, estatística, artigo, pelos conselhos e contribuições que me deram durante o curso.

À equipe do LabSui (Laboratório de Estudos em Suinocultura), por ter me acolhido e contribuído tanto para a realização de meus trabalhos quanto para meu crescimento profissional, especialmente Alicia, Alini, Estefânia e Jaqueline, que sempre estiveram ao meu lado e me ajudaram nas correrias e nos momentos difíceis.

Ao Welex e ao Sr. José Antônio Segecic pela amizade, parceria, paciência, apoio e pelos ensinamentos que dividiram comigo em todas as etapas do experimento e fora deles.

Aos meus amigos Hanay, Heloisa e Renan pelo apoio nas disciplinas e pelos momentos de diversão.

A todos os estagiários que participaram dos experimentos que conduzi e que agregaram fortemente nas ações diárias e tarefas pesadas: Bárbara, Brandon, Eunice, Fernanda, Gabriel H., Gabriel S., Heloísa, Janine, Joseane, Larissa, Marina, Natália, Raissa e Vitor.

Ao Prof. Dr. Charles Martin Nyachoti e sua equipe, por terem me permitido realizar estágio de pesquisa na “University of Manitoba”, me acolhido de forma tão calorosa e me possibilitado participar de palestras e estudos tão enriquecedores.

À Tais Sasahara, à Prof^a Dr^a Marcia Rita Fernandes Machado e à equipe do Laboratório de Morfologia de Invertebrados, DBAA, FCAV, especialmente ao Prof. Dr. Fernando José Zara, Márcia Fiorese Mataqueiro e Maria Alice Garcia Bento pela paciência e auxílio com as análises de morfologia intestinal.

À equipe da Prof^a Dr^a Priscila L. Gratão, principalmente à Sonia Maria R. Carregari pela orientação e ajuda com a coleta e processamento das amostras para análises de estado oxidativo.

À equipe do Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Júnior, especialmente à Paula Payão Ovidio e à Tania Riul pela ajuda com as análises laboratoriais e pela grande amizade.

À Ana Paula de Oliveira Sader e ao Sr. Orlando Agostini por todo carinho, auxílio, orientação e confiança.

Às bancas de defesa de projeto, qualificação e defesa de dissertação pelas sugestões e por agregarem enormemente ao trabalho.

Aos animais que deram a vida para que este projeto se concretizasse.

A todos os professores, técnicos, funcionários e alunos que me auxiliaram durante o mestrado e durante a elaboração e execução do experimento.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. O projeto também foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - Nº Processo 2017/10354-5 e da Evonik Nutrition & Care GmbH.

SUMÁRIO

	Página
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
CAPÍTULO 1 - Considerações gerais	1
1. Introdução	1
2. Revisão de literatura.....	2
2.1. Morfofisiologia intestinal.....	2
2.2. Aminoácidos na nutrição animal	4
2.3. A isomeria dos aminoácidos.....	5
2.4. A importância da metionina para o equilíbrio oxidativo.....	7
3. Objetivos.....	9
3.1. Objetivo geral	9
3.2. Objetivos específicos.....	9
4. Referências	9
CAPÍTULO 2 - Effects of L-Methionine and DL-Methionine on bioavailability, intestinal morphology and oxidative status of weaned and growth pigs	13
Abstract	15
1. Introduction	16
2. Material and Methods.....	17
2.1. Animals, housing and experimental diets.....	17
2.2. Nitrogen (N) Balance	19
2.3. Sampling and collection (blood and tissues).....	19
2.4. Chemical analysis	20
2.4.1. Preparation of tissue homogenate.....	20
2.4.2. Determination of total proteins	20
2.4.3. Determination of carbonyl level.....	20
2.4.4. Determination of the level of Malondialdehyde (MDA).....	21
2.4.5. Determination of the Level of Reduced Glutathione (GSH), Oxidized Glutathione (GSSG), GSH : GSSG and Total Glutathione	21
2.5. Intestinal morphology	22
2.6. Statistical analysis.....	22
3. Results	23

3.1. Diets and AA levels	23
3.2. Experiment 1	23
3.2.1. N balance assay	23
3.2.2. Oxidative status	24
3.2.3. Intestinal Morphology	24
3.3. Experiment 2	25
3.3.1. N Balance assay	25
3.3.2. Oxidative status	25
3.3.3. Intestinal Morphology	26
4. Discussion.....	26
4.1. N Balance	26
4.2. Oxidative Status.....	27
4.3. Intestinal Morphology	28
5. Conclusions	29
Conflict of interest	29
Acknowledgement	30
References	30

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado **"Biodisponibilidade e efeitos da suplementação de L e DL-metionina na integridade intestinal e equilíbrio oxidativo de leitões na fase inicial"**, protocolo nº 4931/17, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Luciano Hauschild, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 06 de abril de 2017.

Vigência do Projeto	01/05/2017 a 31/08/2017
Espécie / Linhagem	<i>Sus scrofa</i> / Comercial
Nº de animais	84
Peso / Idade	10-25kg/30-60 dias
Sexo	Machos Castrados
Origem	Granja comercial

Jaboticabal, 06 de abril de 2017.


Prof.ª Dr.ª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal/ SP - Brasil
tel 16 3209 7100 www.fcav.unesp.br

BIODISPONIBILIDADE E EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE L E DL-METIONINA NA INTEGRIDADE INTESTINAL E ESTADO OXIDATIVO DE LEITÕES NA FASE DE CRECHE

RESUMO - Dois estudos foram conduzidos com objetivo de comparar a biodisponibilidade relativa de L-Met e DL-Met com base em ensaio de balanço de N e os efeitos promovidos por ambas as fontes na morfologia intestinal e no sistema antioxidante de suínos em fase inicial e final de creche. Em cada experimento foram utilizados 42 suínos machos castrados (Agrocres PIC, Rio Claro, SP, Brazil: CamboroughTM x AGPIC 337TM) com peso inicial de $10,7 \pm 1,09$ kg e $20,5 \pm 1,55$ kg, respectivamente para o experimento 1 e o experimento 2. Cada experimento foi dividido em dois períodos experimentais com 21 suínos. Cada período experimental correspondeu a um bloco. Três suínos foram distribuídos aleatoriamente em 7 dietas experimentais dentro de cada bloco, resultando em um total de 6 repetições por tratamento. As dietas basais (DB) foram formuladas com deficiência de 68% em metionina, porém adequadas para os demais aminoácidos. Três níveis graduados de DL-Met e L-Met (0,03, 0,06 e 0,09%) foram suplementados à dieta basal para criar as dietas 2-7 em ambos os estudos. No experimento 1, ambas as fontes de metionina reduziram linearmente o N excretado pela urina e aumentaram linearmente a retenção de N (% de absorvido) ($P \leq 0,03$). A biodisponibilidade relativa estimada para L-Met em comparação a DL-Met foi de 106% (intervalo de confiança – IC de 95%: 39 a 173%) para retenção de N (% de absorvido) em uma base equi-molar. No experimento 2, a suplementação com ambas as fontes de Met diminuiu linearmente a excreção de N urinário e aumentou linearmente o total de N retido, a retenção de N (% de ingerido e % de absorvido) ($P \leq 0,04$). A biodisponibilidade estimada de L-Met em comparação a DL-Met foi de 95% (IC 95%: 13 a 177%) para retenção de N (% da ingerido) e 94% (IC 95%: 20 a 167%) para retenção de N (% de N absorvido), respectivamente em uma base equi-molar. Em ambos os experimentos, houve concentrações semelhantes de proteína carbonil e MDA no plasma, duodeno e fígado de suínos alimentados com dietas contendo L-Met ou DL-Met ($P > 0,05$). Não houve diferenças estatísticas na altura das vilosidades, largura das vilosidades, profundidade da cripta e razão entre altura das vilosidades : profundidade da cripta de duodeno, jejuno e íleo para ambas as fontes de Met ($P \geq 0,07$). Os resultados indicam que DL-Met e L-Met são igualmente biodisponíveis como fontes de metionina e impactam positivamente na morfologia intestinal e no sistema antioxidante de suínos em fase inicial e final de creche.

Palavras-chave: Aminoácido, Isomeria, Monogástrico, Morfologia Intestinal, Nutrição Animal, Suinocultura

BIOAVAILABILITY AND EFFECTS OF L AND DL-METHIONINE SUPPLEMENTATION ON GUT INTEGRITY AND OXIDATIVE STATUS OF WEANED PIGS

ABSTRACT - Two studies were conducted to compare the relative bioavailability of L-Met and DL-Met based on N balance assay and the effects promoted by both sources on intestinal morphology and antioxidant system of weaned and growing pigs. In each experiment were used 42 barrows (Agrocères PIC, Rio Claro, SP, Brazil: CamboroughTM x AGPIC 337TM) with initial body weight of 10.7 ± 1.09 kg and 20.5 ± 1.55 kg, respectively for Experiment 1 and Experiment 2. Each experiment was divided into two batches with 21 pigs. Each batch corresponded to a block. Three pigs were randomly assigned to 7 experimental diets within each block, resulting in a total of 6 replicates per treatment. Basal diets (BD) were formulated with 68% methionine deficiency, but adequate for the other amino acids. Three graded levels of DL-Met and L-Met (0.03, 0.06 and 0.09%) were supplemented to the basal diet to create diets 2-7 in both studies. In experiment 1, both sources of methionine linearly reduced N excreted in the urine and linearly increased N retention (% absorbed) ($P \leq 0.03$). The estimated relative bioavailability for L-Met compared to DL-Met was 106% (95% CI - confidence interval: 39 to 173%) for N retention (% absorbed) on an equi-molar basis. In experiment 2, supplementation with both Met sources linearly decreased urinary N excretion and linearly increased total N retention, N retention (% ingested and % absorbed) ($P \leq 0.04$). The estimated bioavailability of L-Met compared to DL-Met was 95% (95% CI: 13 to 177%) for N retention (% of intake) and 94% (95% CI: 20 to 167%) for N retention (% absorbed N), respectively on an equi-molar basis. In both experiments, there were similar concentrations of carbonyl protein and MDA in plasma, duodenum and liver of pigs fed diets containing L-Met or DL-Met ($P > 0.05$). There were no statistical differences in villus height, villus width, crypt depth and villus height: crypt depth ratio of duodenum, jejunum and ileum for both Met sources ($P \geq 0.07$). The results indicate that DL-Met and L-Met are equally bioavailable as methionine sources and positively impact on intestinal morphology and antioxidant system of weaned and growing pigs.

Keywords: Amino Acid, Isomeria, Monogastric, Intestinal Morphology, Animal Nutrition, Pig Farming

CAPÍTULO 1 - Considerações gerais

1. Introdução

O processo de desmame figura como um dos momentos mais críticos da suinocultura. Nessa fase, os leitões são submetidos a mudanças abruptas, como: separação da mãe, mistura com animais de outras leitegadas, alojamento em novos locais e alteração na alimentação de uma fonte líquida e altamente digestível (leite) para uma sólida e menos digestível. Estes fatores geram estímulos estressores que modificam a arquitetura entérica e a atividade enzimática. Adicionalmente, em função da imaturidade imunológica destes animais, a instalação de patógenos na região entérica também é favorecida, o que leva ao desenvolvimento de lesões que prejudicam a absorção de nutrientes (Lalles et al. , 2007).

Com o intuito de minimizar os efeitos do desmame no desempenho e fisiologia dos animais, diferentes estratégias nutricionais têm sido utilizadas para amenizar o impacto do desmame em leitões. Dentre estas, destaca-se o uso de aminoácidos (AA) cristalinos em substituição ao farelo de soja, uma vez que leitões são mais propensos a reações de hipersensibilidade transitória aos antígenos da soja, podendo ocorrer lesões nos enterócitos (Resende, 2014). A redução do uso de farelo de soja nas dietas de leitões recém-desmamados tem-se mostrado benéfica para o desenvolvimento e manutenção da saúde do trato gastrointestinal (Ren et al. , 2014).

Dentre os AA cristalinos disponíveis, a metionina tem sido utilizada em ampla escala na alimentação de suínos não apenas por contribuir com a fração proteica da dieta, mas por desempenhar, também, importantes funções no organismo. O principal destino da metionina retida nos tecidos intestinais é a produção de substâncias utilizadas para manter o sistema antioxidante das células e garantir a divisão e renovação celular. Estas ações possuem especial importância neste órgão, devido à constante renovação celular ocasionada pelas descamações naturais decorrentes do atrito com o alimento e também por agressões causadas por microrganismos que podem gerar inflamações (Oliveira Neto, 2014).

Em termos de nutrição animal, as fontes de metionina usualmente utilizadas

são o ácido DL-2-amino-4 (metiltio) butanóico (DL-Met) e o ácido DL-2-hidroxi-4 (metilo) butanóico, mais conhecido como metionina hidróxi análoga (MHA-FA) (Visentini et al. , 2005). Contudo, para que o organismo consiga utilizar os aminoácidos é necessário que estes estejam na conformação de L-aminoácidos (Nelson e Cox, 2014). Portanto, quando D-aminoácidos são ingeridos, estes devem ser convertidos na forma L para sua utilização. Esse processo de conversão é mediado pela enzima D-aminoácido oxidase (Findrik e Vasić-Rački, 2007). Alguns autores têm relatado valores de biodisponibilidade similares entre DL-Metionina e L-metionina para suínos (Baker, 2006; Oliveira Neto, 2014). Em função desse aspecto, atualmente, a DL-metionina tem sido utilizada como fonte principal deste aminoácido nas dietas para todas as fases.

Uma vez que a metionina é um aminoácido que desempenha funções biológicas de grande relevância em suínos, podendo otimizar o tempo de recuperação das áreas absortivas do trato gastrointestinal posteriormente aos estímulos estressores promovidos pela desmama, torna-se essencial para o desenvolvimento de programas nutricionais mais eficientes, sustentáveis e viáveis, o conhecimento de sua forma isomérica mais biodisponível e os efeitos por ela desempenhados a nível bioquímico e fisiológico.

2. Revisão de literatura

2.1. Morfofisiologia intestinal

Nos suínos, o trato gastrointestinal, é uma estrutura tubular que compreende boca, faringe, esôfago, estômago, intestino delgado, intestino grosso, pâncreas e fígado. Histologicamente, é formado por quatro camadas ou túnicas principais: mucosa, submucosa, duas camadas musculares e uma camada serosa. Sua função principal é fornecer nutrientes, eletrólitos e água ao corpo, por meio das funções de motilidade, secreção, digestão e armazenamento (Daniel et al. , 2014; Klein, 2014).

A mucosa é a camada mais interna do trato gastrointestinal e é composta por epitélio, lâmina própria e lâmina muscular. A superfície do epitélio do intestino delgado

é formada por vilos, que são projeções que aumentam a área da mucosa e criptas. Os vilos são constituídos por células especializadas como os enterócitos (as mais abundantes), células caliciformes e endócrinas. Quanto maior o número de células, maior o tamanho de vilos, e consequentemente, maior a área de absorção de nutrientes (Berne e Levy, 2009; Maiorka, 2004).

Os enterócitos são responsáveis pela digestão final do alimento e absorção dos nutrientes. Em suínos desmamados, há renovações periódicas de enterócitos a cada dois a quatro dias. As células imaturas migram das criptas em direção à extremidade das vilosidades, onde atingem a maturidade e expressam sua ação (Zlotowski et al. , 2008). As células caliciformes secretam glicoproteínas, como a mucina, responsáveis pela formação do muco, que protege o epitélio de ações mecânicas e enzimáticas, além de atuar como barreira protetora, impedindo que os microrganismos tenham acesso direto às células epiteliais. As células enteroendócrinas produzem hormônios peptídicos, como gastrina, secretina e colecistoquinina e monoaminas biogênicas, que estão envolvidos com a regulação da digestão, absorção e utilização dos nutrientes. (Maiorka, 2004).

Durante um período de 3 dias após o desmame, é observado um baixo consumo de alimento pelos leitões. Esta anorexia temporária e o estresse relacionado ao desmame (separação das matrizes, mistura de lotes, novo ambiente e mudanças na natureza da dieta) são os principais fatores associados às alterações estruturais da mucosa intestinal observadas em leitões recém-desmamados (Marion et al. , 2005). Estas alterações podem perdurar de 7 a 14 dias após o desmame e caracterizam-se por encurtamento da área de superfície do vilo no intestino delgado, aumento na profundidade da cripta, alteração na atividade enzimática e na produção do muco; que podem acarretar em má absorção de nutrientes, desidratação, diarreia e a infecções entéricas (Junqueira et al. , 2008).

Alguns nutrientes (e.g. aminoácidos) podem exercer ação trófica sobre a mucosa intestinal. Estas ações consistem em induzir mecanismos de transcrição gênica, favorecendo a atividade mitótica em vilos e criptas. Adicionalmente, permitem uma melhor sanidade entérica, por favorecerem que a microbiota intestinal se mantenha em equilíbrio (Maiorka, 2004). Dentre os aminoácidos, a metionina tem função importante nesse contexto, por meio da síntese das poliaminas como a

espermina e a espermidina, componentes esses que são considerados agentes tróficos por atuarem na maturação e regeneração da mucosa intestinal dos leitões (Tucci et al. , 2011). A mucina produzida pelas células caliciformes também é formada a partir da metionina (Oliveira Neto, 2014).

2.2. Aminoácidos na nutrição animal

Os AA são moléculas monoméricas capazes de se unir por meio de ligações peptídicas covalentes, formando as proteínas. Cerca de 20 tipos de AA formam as proteínas e apresentam particularmente diversas propriedades químicas (Marzzoco e Torres, 2015). Para suínos, nove destes AA merecem especial atenção, pois são essenciais, devido o organismo não ser capaz de sintetizá-los de acordo com a demanda fisiológica. Dessa forma, é necessária a suplementação desses AA na dieta dos animais. Esses nove AA, são: histidina (His), isoleucina (Ile), leucina (Leu), lisina (Lis), metionina (Met), fenilalanina (Fen), treonina (Tre), triptofano (Tri) e valina (Val) (Resende, 2016).

Caso estes aminoácidos estejam presentes na dieta em quantidades inferiores às exigidas pelo animal, podem limitar a síntese de compostos proteicos. Os principais aminoácidos limitantes em dietas convencionais a base de milho e farelo de soja para suínos são, respectivamente: lisina, metionina e treonina (Zangeronimo et al. , 2007). O fornecimento de aminoácidos em excesso também não é desejável, uma vez que são desaminados e a ureia resultante é eliminada no ambiente, podendo prejudicar o balanço energético dos animais e gerar impactos ambientais (Van Milgen e Dourmad, 2015). Nesse contexto, foi proposto o conceito de proteína ideal. Esse conceito se refere ao fornecimento nutricional de níveis dos aminoácidos que atendam à quantidade exigida pelo animal, sem excessos ou carência, para garantir a sua manutenção, ótimo desempenho e saúde (Girôto Júnior et al. , 2013). Embora esse conceito tenha permitido avanços importantes na nutrição de suínos, algumas lacunas são verificadas no que se refere às respostas de leitões ao uso aminoácidos nas dietas.

Devido a carências de informação sobre a fisiologia de leitões e pelas abordagens disponíveis na literatura não considerarem diferenças no potencial de

crescimento, status sanitário, sexo, temperatura ambiente e densidade animal, podem haver equívocos nos requerimentos de aminoácidos estimados para leitões com peso inferior a 20 kg (Marcolla e Ribeiro, 2015). Entretanto, alguns meios de avaliação podem ser empregados, com o intuito de se conhecer melhor as necessidades nutricionais individuais de leitões em diversas condições fisiológicas e ambientais.

Dentre os métodos de avaliação de exigências nutricionais disponíveis, o dose-resposta estima a exigência de determinado nutriente por meio da resposta dos indivíduos submetidos a níveis crescentes de sua inclusão na dieta. Para isto, é necessário que alguma variável para avaliação seja pré-estabelecida (e.g. ganho de peso, conversão alimentar). Quando o animal expressa a resposta máxima a esta variável, a exigência é encontrada (Rostagno et al. , 2007). A quantificação da concentração basal no organismo ou eliminação de determinados metabólitos também figura como método efetivo de determinação do status nutricional dos animais (Dantas, 2014). O balanço de nitrogênio é um método que reflete a eficiência de utilização da proteína dietética, pois permite, descontando-se a fração de nitrogênio excretada da ingerida, o conhecimento da quantidade retida pelo animal (Sakomura e Rostagno, 2016). A quantidade de ureia presente no sangue e na urina também pode refletir o excesso ou a carência de proteína e AA na dieta. Os aminoácidos oferecidos em excesso são desaminados e utilizados pelos hepatócitos do fígado para a síntese de ureia, tornando a ureia sanguínea indicador da qualidade proteica da dieta. Rações com baixo teor de proteína, e suplementação adequada de aminoácidos essenciais, acarretam em menor quantidade de ureia no sangue (Oliveira, 2004).

Outro fator necessário para que a efetividade de utilização de um aminoácido seja assegurada é o fornecimento da forma isomérica melhor aproveitada pelo animal.

2.3. A isomeria dos aminoácidos

Os aminoácidos são formados por um grupo amino (com exceção à Prolina, que apresenta um grupo imino) e um grupo carboxila ligados ao carbono α juntamente com átomo de hidrogênio e um grupo variável, usualmente chamado de cadeia lateral ou grupo R. Por estar ligado a quatro grupos diferentes (com exceção à glicina), o

carbono α é assimétrico, fenômeno conhecido como quiralidade (Marzzoco e Torres, 2015). Um mesmo composto quiral pode apresentar-se de diferentes formas, conforme a disposição de seus grupos ligantes. Sendo assim, dois compostos quirais de mesma composição atômica, porém com seus grupos ligantes dispostos de formas diferentes são conhecidos como isômeros (Lima, 1997). A estrutura dos aminoácidos dá origem a dois isômeros opticamente ativos. Esses isômeros são imagens especulares que não podem ser sobrepostas. Um isômero L é denominado de enantiômero da conformação D correspondente e vice-versa (Barreiro et al. ,1997; Gusmão, 2014).

Em organismos vivos, as biomoléculas encontram-se apenas em uma única forma quiral, devido as enzimas que as sintetizam se encontrarem na mesma forma. Entretanto, um composto quiral quimicamente produzido pode estar nas formas D e L (mistura racêmica) (Nelson e Cox, 2014). Industrialmente, a síntese química de aminoácidos muitas vezes é economicamente mais viável do que a síntese microbiana, além de permitir uma produção em larga escala. A desvantagem da síntese química, porém, é possuir como produto final uma mistura racêmica, constituída por 50% de D-aminoácidos e 50% de L-aminoácidos (Bucco, 2013; Domingues et al. , 2015).

Os aminoácidos são metabolizados pelo organismo animal na conformação L. (Nelson e Cox, 2014). O organismo dos suínos tem a capacidade de transformar eficientemente a forma D (dextrógino) de alguns aminoácidos para a forma L (Moura et al. , 2010). Os D-aminoácidos fornecidos aos suínos são absorvidos pelo intestino e transportados através da corrente sanguínea para o tecido esplâncnico, onde são oxidados pela D-aminoácido oxidase e convertidos em L-aminoácidos.

A metionina é um aminoácido essencial, sintetizada quimicamente e encontrada comercialmente das seguintes formas: ácido DL-2- amino-4 (metiltio) butanóico (DL-Met) e ácido DL-2- hidróxi-4 (metilo) butanóico, mais conhecido como metionina hidróxi análoga (MHA-FA). Sendo assim, é necessário que ocorra a conversão destas fontes em L-metionina para que sejam utilizadas pelo organismo na síntese proteica e deposição muscular (Visentini et al. , 2005; Resende, 2016).

Avanços tecnológicos têm permitido a produção de L-Metionina que, por ser uma fonte prontamente disponível ao organismo animal, têm apresentado bons

resultados na nutrição de leitões (Shen et al. , 2014). Contudo, estudos ainda são necessários no que diz respeito aos benefícios fisiológicos que esta fonte promove nas áreas absortivas de leitões em toda a fase de creche, período em que a saúde intestinal tem uma grande importância, pois concomitantemente ao estresse da desmama, ocorre o desenvolvimento do trato intestinal e sua maturação adequada refletirá em melhor absorção dos nutrientes da dieta durante todo o ciclo produtivo.

2.4. A importância da metionina para o equilíbrio oxidativo

Após a fração proteica da dieta sofrer a ação das enzimas digestivas, os di e tripeptídeos resultantes são absorvidos pela membrana apical dos enterócitos. Os aminoácidos são então transportados para o fígado por meio da veia porta e, posteriormente distribuídos para as demais células do organismo (Oliveira Neto, 2014).

Existem 3 etapas metabólicas para a metionina: metilação, remetilação e transulfuração. Para o processo de metilação, a metionina recebe uma adenosina proveniente de uma molécula de ATP com catalisação da enzima metionina-adenosiltransferase convertendo-se em S-adenosil-metionina (SAM). Após a doação do grupo metil a um receptor, por intermédio da metil-transferase, a SAM transforma-se em S-adenosil-homocisteína, que é convertida em homocisteína após reação da adenosina com uma molécula de água. A próxima etapa possível é a remetilação, que ocorre quando a homocisteína gerada reincorpora um grupo metil e retorna à forma de metionina. Esta etapa acontece com a associação entre metionina-sintase, vitamina B12, B6 e ácido fólico. A última etapa possível é a transulfuração, que ocorre quando o grupo S (enxofre) da metionina é transferido para uma L-serina dando origem a uma molécula de cisteína. Duas moléculas de cisteína ainda podem unir-se pelos grupos S e dar origem a uma cistina (Oliveira Neto, 2014; Remus, 2015; Resende, 2016).

Durante os processos inflamatórios há uma elevada taxa de oxidação dos aminoácidos, porém o catabolismo de cisteína, obtida a partir do metabolismo de metionina, tende a reduzir nestes períodos para ser utilizada na síntese de componentes protetores contra o estresse oxidativo, principalmente de glutathiona

(Pinheiro et al. , 2015).

O estresse oxidativo ocorre quando há alta concentração de radicais livres (superóxido – $O_2^{\bullet}$ - e hidroxila - $OH^{\bullet}$) ou presença insuficiente de enzimas antioxidantes no organismo. Esses radicais livres são naturalmente produzidos a partir do metabolismo de O_2 nas mitocôndrias, membranas plasmáticas e no citoplasma e e, quando em altas concentrações, podem ocasionar alterações na permeabilidade e fluidez de membranas, danos a proteínas transmembrana, enzimas, receptores e canais iônicos (Stefanello, 2008; Barbosa et al. , 2010).

Para o controle da concentração destes radicais, o organismo conta com um sistema enzimático de defesa, que inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). As enzimas CAT e GPx, impedem o acúmulo do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), não-radical responsável pela geração de $OH^{\bullet}$, o qual não há sistema enzimático de defesa (Barbosa et al. , 2010). Nesse contexto, a glutathione (GSH) é um tripeptídeo encontrado em altos níveis em animais, plantas e algumas bactérias; é considerada um tampão redox indispensável para as reações catalizadas pela GPx, como na redução do H_2O_2 em H_2O (Nelson e Cox, 2014; Marzocco e Torres, 2015). A GPx catalisa a oxidação de GSH pelo peróxido de hidrogênio, formando a glutathione oxidada (GSSG). Após este processo, a enzima glutathione redutase (GR) catalisa a redução de GSSG a GSH utilizando NADPH como agente redutor (Valente, 2012).

O principal destino da metionina retida nos tecidos intestinais é a produção de GPx e GSH. Tendo em vista as alterações causadas pelo estresse pós-desmame na arquitetura entérica, é de grande valia o fornecimento da forma mais biodisponível deste aminoácido, com intuito de garantir um sistema oxidativo íntegro e efetivo, que amenize os efeitos deletérios deste período, assegurando o bom desenvolvimento e saúde do trato gastrointestinal dos leitões.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Estudar a similaridade de duas fontes isoméricas de metionina e seus efeitos no desenvolvimento intestinal e estado oxidativo de plasma e tecidos de leitões em fase inicial e final de creche.

3.2. Objetivos específicos

- Estimar a biodisponibilidade dos isômeros L e DL-metionina para leitões nas fases inicial e final de creche por meio da realização de balanço de nitrogênio;
- Avaliar possíveis efeitos das fontes isoméricas oferecidas na manutenção da integridade intestinal dos leitões, por meio de morfometria intestinal.
- Avaliar por meio de análise de marcadores oxidativos em tecidos envolvidos com a metabolização da metionina, se a forma isomérica interfere no equilíbrio oxidativo dos leitões.

4. Referências

Baker DH (2006) Comparative species utilization and toxicity of sulfur amino acids. **The Journal of Nutrition** 136:1670S-1675S.

Barbosa KBF, Costa NMB, Alfenas RDCG, Paula SO, Minim VPR, Bressan J (2010) Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição** 23:629-643.

Barreiro EJ, Ferreira VF, Costa PRR (1997) Substâncias enantiomericamente puras (sep): a questão dos fármacos quirais. **Química Nova**, 20: 647-656.

Berne RB, Levy MN (2009) Tratado De Fisiologia Humana. 6. Ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 864p.

Bucco RD (2013) **A produção de L-aminoácidos e a sua aplicação na fertilização foliar**. 39 f. Monografia (Engenharia Bioquímica) - Universidade de São Paulo, Lorena.

Daniel E, Ruiz US, Thomaz MC, Furlan RL (2014). Anatomia e fisiologia do sistema digestório de suínos. In.: Sakomura, NK, Silva JHV, Costa FGP, Fernandes JBK, Hauschild L (Eds.) **Nutrição de não ruminantes**. Jaboticabal: Funep, p.18-32

Dantas WMF (2014) **Perfil bioquímico sanguíneo e ganho de peso corporal de suínos em crescimento alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de fosfato bicálcico mantidos em estresse por calor**. 74 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

Domingues DL, Marques LGA, Freitas ALP (2015) Produção de aminoácidos e seus derivados: Prospecção tecnológica. **GEINTEC-Gestão, Inovação e Tecnologias** 5:2597-2603.

Findrik Z, Vasić-Rački Đ (2007) Biotransformation of D-methionine into L-methionine in the cascade of four enzymes. **Biotechnology and bioengineering** 98:956-967.

Girôto Júnior C, Brustolini P, Silva F, Donzele J, Ferreira A, Nalon P, Campos P, Moutinho J (2013) Suplementação de aminoácidos para redução da proteína bruta em dietas para leitões desmamados aos 21 dias de idade. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 65:1131-1138.

Gusmão GODM (2014) **Estudo das propriedades vibracionais do aminoácido DL-metionina por Espectroscopia Raman**. 70 f. Tese (Doutorado em Física), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

Junqueira OM, Silz LZT, Araújo LF, Pereira AA, Laurentiz AC, Filardi RS (2008) Avaliação de níveis e fontes de proteína na alimentação de leitões na fase inicial de crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia** 37:1622-1627.

Klein BG (2014) Cunningham tratado de fisiologia veterinária. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 624p.

Lalles JP, Bosi P, Smidt H, Stokes CR (2007) Nutritional management of gut health in pigs around weaning. **Proceedings of the Nutrition Society** 66:260-268.

Lima VLE (1997) Os fármacos e a quiralidade: uma breve abordagem. **Química Nova** 20:657-663.

Maiorka A (2004) Impacto da saúde intestinal na produtividade avícola. In: V SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA. **Anais**. Chapecó: SBSA, p. 26-41.

Marcolla CS, Ribeiro AML (2015) Efeitos do fornecimento de dietas pré-desmame para leitões: uma revisão. **Boletim de Indústria Animal** 72:77-90.

Marion J, Petersen YM, Romé V, Thomas F, Sangild PT, Dividich JL, Huërou-Luron I (2005) Early weaning stimulates intestinal brush border enzyme activities in piglets, mainly at the posttranscriptional level. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition** 41:401-410.

Marzzoco A, Torres, BB (2015) Bioquímica básica. 4. ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 392p.

Moura AMA, Melo TV, Miranda DJA (2010) Utilização da DL-metionina e metionina hidróxi-análoga na alimentação de aves. **Boletim de Indústria Animal** 67:97-107.

Nelson DL, Cox MM (2014) *Princípios de Bioquímica: Lehninger*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 1328p.

Oliveira VD (2004) **Efeito de níveis de proteína da ração no balanço de nitrogênio e composição corporal de suínos em crescimento**. 98 f. Tese (Doutorado em Zootecnia), Universidade Federal de Lavras, Lavras.

Oliveira Neto AR (2014). Metabolismo e Exigência de Metionina. In.: Sakomura, NK, Silva JHV, Costa FGP, Fernandes JBK, Hauschild L (Eds.) **Nutrição de não ruminantes**. Jaboticabal: Funep, p.186-217

Pinheiro RW, Fontes DDO, Silva F, Souza LPO, Vidal TZB (2015) Níveis de metionina+ cistina para leitões dos 6 aos 16 kg submetidos a diferentes graus de ativação do sistema imune. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal** 16:827-838.

Remus A (2015) **Modelos para estimar exigências nutricionais de aminoácidos e resposta à ingestão de metionina: sistema tradicional por fases x nutrição de precisão**. 98 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal.

Ren M, Liu C, Zeng X, Yue L, Mao X, Qiao S, Wang J (2014) Amino acids modulates the intestinal proteome associated with immune and stress response in weaning pig. **Molecular Biology Reports** 41:3611-3620.

Resende MQ (2014) **Concentrado proteico de soja em dietas pré-iniciais de leitões**. 50 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Universidade Federal De Goiás, Goiânia, 2014.

Resende M (2016) **Desempenho e saúde intestinal de leitões suplementados com DL ou L-metionina na fase de creche**. 43 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

Rostagno HS, Bünzen S, Sakomura NK, Albino LFT (2007) Avanços metodológicos na avaliação de alimentos e de exigências nutricionais para aves e suínos. **Revista Brasileira de Zootecnia** 36:295-304.

Sakomura NK, Rostagno HS (2016) *Métodos de Pesquisa em Nutrição de Monogástricos*. Jaboticabal: Funep, 262p.

Shen YB, Weaver AC, Kim SW (2014) Effect of feed grade L-methionine on growth performance and gut health in nursery pigs compared with conventional DL-methionine. **Journal of Animal Science** 92:5530–5539.

Stefanello FM (2008) **Metionina altera parâmetros bioquímicos e comportamentais em ratos: estudos *in vitro* e *in vivo***. 125 f. Tese (Doutorado em Bioquímica), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

Tucci F, Thomaz MC, Nakaghi L, Hannas MI, Scandolera A, Budiño F (2011). Efeito da adição de agentes tróficos na dieta de leitões desmamados sobre a estrutura e ultraestrutura do intestino delgado e sobre o desempenho. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 63:931-940.

Valente C (2012) **Efeito do estresse pelo frio sobre células embriogênicas de *Araucaria angustifolia* em cultura: disfunção mitocondrial e estresse oxidativo.** 132 f. Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

Van Milgen J, Dourmad, JY (2015) Concept and application of ideal protein for pigs. **Journal of Animal Science and Biotechnology** 6:15.

Visentini P, Lopes J, Toledo GS, Costa PT (2005) Níveis de substituição da DL-metionina pela metionina hidróxi análoga em base equimolar, em dietas para frangos de corte. **Ciência Rural** 35:1400-1405.

Zangeronimo MG, Fialho ET, Murgas LDS, Fonseca R, Rodriguez P (2007) Desempenho e excreção de nitrogênio de leitões dos 9 aos 25 kg alimentados com dietas com diferentes níveis de lisina digestível e proteína bruta. **Revista Brasileira de Zootecnia** 36:1382-1387.

Zlotowski P, Driemeier D, Barcellos D (2008) Patogenia das diarreias dos suínos: modelos e exemplos. **Acta Scientiae Veterinariae** 36:81-86.

CAPÍTULO 2 - Effects of L-Methionine and DL-Methionine on bioavailability, intestinal morphology and oxidative status of weaned and growth pigs

Este capítulo é apresentando de acordo com a normas de **Animal Feed Science and Technology**

Effects of L-Methionine and DL-Methionine on bioavailability, intestinal morphology and oxidative status of weaned and growth pigs

R. P. Caetano^a, L. S. Santos^a, J. K. Htoo^b, A. M. Veira^a, W. C. Silva^a, A. Z. Fraga^a, P. H. R. F. Campos^c, N. A. A. Barbosa^d, C. M. Nyachoti^e, L. Hauschild^{a*}

^a *Department of Animal Science, São Paulo State University, Jaboticabal, São Paulo, 14883-125, Brazil.*

^b *Evonik Nutrition & Care GmbH, 63457 Hanau-Wolfgang, Germany.*

^c *Department of Animal Science, Federal University of Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 36570-900, Brazil.*

^d *Evonik Degussa Brasil Ltda, 07.222-000 São Paulo, Brazil.*

^e *Department of Animal Science, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, R3T 2N2, Canada.*

*Corresponding author. Tel +55 16 32097443; e-mail: luciano.hauschild@unesp.br

Abstract

Two studies were conducted to compare the relative bioavailability (RBV) of L-Met and DL-Met as Met sources based on N balance assay and the effects promoted by both sources in the intestinal morphology and antioxidative system of weaned pigs (experiment 1) and growing pigs (experiment 2). In each experiment, 42 barrows (PIC; initial BW in Exp. 1: 10.7 ± 1.09 kg and Exp. 2: 20.5 ± 1.55 kg) were used in two batches of 21 pigs each. Each batch of pigs was considered as a block. Three pigs were randomly allotted to each of 7 experimental diets within each block resulting in a total of 6 replicate pigs per dietary treatment. The basal diets (BD) were formulated to be adequate for all amino acids, except Met which was 68% of the requirement (Experiment 1: 2.4 g/kg SID Met; 5.3 g/kg SID Met + Cys; 13.0 g/kg SID Lys; Experiment 2: 2.3 g/kg SID Met; 4.7 g/kg SID Met + Cys; 11.5 g/kg SID Lys). Three graded levels of DL-Met and L-Met (0.3, 0.6 and 0.9 g/kg) were supplemented to the BD to create diets 2-7 in both studies. In experiment 1, supplementation with L or DL-Met decreased Urine N and increased N retention (% of absorbed) ($P \leq 0.03$; linear). The slope-ratio regression estimated the RBV of 106% [95% confidence interval (CI): 39 to 173%] for N retention (% of absorbed) on an equi-molar basis. In experiment 2, supplementation with both Met sources linearly decreased Urine N excretion and linearly increased Total N retained, N retention (% of intake, and % of absorbed) ($P \leq 0.04$, linear). Based on the slope-ratio regression the RBV for L-Met compared to DL-Met was estimated 95% (95% CI: 13 to 177%) for N retention (% of N intake) and 94% (95% CI: 20 to 167%) for N retention (% of N absorbed), respectively on an equi-molar basis. In both experiments there were similar concentrations of protein carbonyl and MDA in the plasma, duodenum and liver for L-Met and DL-Met supplementation ($P \geq 0.05$). There were no statistical differences in villus height, villus width, crypt depth and villus height:crypt depth ratio of duodenum, jejunum and ileum for both Met sources ($P \geq 0.07$). In conclusion, the results of both experiments indicate that DL-Met and L-Met are equally

bioavailable as Met sources to optimize intestinal morphology and antioxidant status of weaned and growing pigs.

Keywords: amino acid, animal nutrition, isomer, nonruminant, sulfur amino acid

Abbreviations: AA, amino acids; BW, body weight; CI, confidence interval; Cys, cysteine; DL-Met, DL-Methionine; Exp, experiment; L-Met, L-Methionine; Lys, lysine; Met, Methionine; N, nitrogen; RBV, relative bioavailability; SID, standardized ileal digestible

1. Introduction

Methionine is an essential amino acid, usually the second or third limiting in diets for pigs (Remus et al., 2015, Tian et al., 2016) and acts as a precursor for protein, energy and substances synthesis directly involved with development and antioxidant system of the cells. (Zhang et al., 2015, Martínez et al., 2017). A methionine deficient diet may compromise the integrity and intestinal development of swine (Su et al., 2018). The cysteine obtained from the metabolism of methionine is catabolized mainly in the intestine and contributes to the formation of glutathione (GSH), tripeptide and redox buffer essential for antioxidant reactions catalyzed by glutathione peroxidase (GPx), forming one of the most important systems used to prevent oxidative stress (Nelson; Cox, 2014; Oliveira Neto, 2014). The oxidative stress occurs when high concentrations of free radicals cause an increase in the oxidation of carbohydrates, lipids and proteins (Pajk et al., 2006). Moreover, an imbalance of antioxidants concentration in relation to free radicals, can result in metabolic and structural damage to organs and tissues, especially small intestine, which receives important support of glutathione to ensure cell division and renewal (Hopps et al., 2010).

In animal nutrition, the commonly used sources of methionine are DL-Methionine (DL-Met; a 50:50 mixture of D and L-isomers) and methionine hydroxy analog free acid (MHA-FA) (Feng et al., 2006). Animals can only use the L-isomers of amino acids for metabolic

functions (Nelson; Cox, 2014), any ingested D-amino acid must first be converted into its L-isomer through a process mediated by the enzyme D-amino acid oxidase before it can be utilized (Findrik; Vasić-Rački, 2007). The conversion of DL-Met to L-Met is not a limiting factor for swine, since the liver, kidney and intestine have a high ability to convert D-methionine to L-methionine (Fang et al., 2010), but unlike for MHA-FA, information about the relative bioavailability (RBV) of L-Met compared with DL-Met for weaned and growing pigs is limited.

Therefore, more studies about actual RBV of Met sources are the utmost importance for optimal diet formulation. Additionally, few studies have been conducted to evaluate the effect of Met levels and sources in the intestinal morphology and oxidative status of weaned and growth pigs. Therefore, the primarily objective was determine the RBV of L-Met compared with DL-Met for weaned and growth pigs based on N balance response of supplemental Met intake. The second objective was to investigate the effects of different dietary concentrations of either DL- or L-Met on oxidative stress-related parameters in intestinal as well as in plasma and liver tissue and in the small intestine structures of weaned and growing pigs.

2. Material and Methods

2.1. Animals, housing and experimental diets

Two studies were conducted at the Swine Studies Laboratory (FCAV / UNESP-Jaboticabal). All procedures were approved by the Institutional Ethics Committee for Animal Use (CEUA; Protocol 4931/17). In each experiment, forty-two barrows (Agroceres PIC, Rio Claro, SP, Brazil: CamboroughTM x AGPIC 337TM) with an average initial body weight (BW) of 10.7 ± 1.09 kg and 20.5 ± 1.55 kg (Exp. 1 and Exp. 2, respectively) were used in two batches of 21 pigs each. Each batch of pigs served as a block. Three pigs were randomly allotted to each of 7 experimental diets within each block resulting in a total of 6 replicate pigs per dietary treatment.

The pigs were individually housed in adjustable stainless-steel crates (0.60 x 1.60 m) equipped with a low-pressure drinking nipple, stainless steel feeder, stool collection tray and bucket with fine mesh on the surface for collection of urine in a temperature controlled room (25°C) with 12h of light program.

Supplemental Met sources was obtained from commercial companies: L- Met; (99%; CJ CheilJedang Co) and DL-Met (99%; MetAMINO®; Evonik Nutrition & Care GmbH). Dietary treatments consisted of basal diet (BD); BD + 0.3 g/kg DL-Met; BD + 0.6 g/kg DL-Met; BD + 0.9 g/kg DL-Met; BD + 0.3 g/kg L-Met; BD + 0.6 g/kg L-Met; and BD + 0.9 g/kg L-Met.

The basal diets (Table 1) were formulated based on corn and soybean meal, except for the first experiment, where whey powder and spray-dried plasma were also added. The methionine + cysteine (Met + Cys) levels were set to be 68% lower than recommended for pigs weighing 10 to 20 kg and 20 to 25 kg (AMINOPig, 2012), respectively, for experiment 1 and 2 (Experiment 1: 2.4 g/kg standardized ileal digestible [SID] Met; 5.3 g/kg SID Met + Cys; 13.0 g/kg SID Lys; Experiment 2: 2.3 g/kg SID Met; 4.7 g/kg SID Met + Cys; 11.5 g/kg SID Lys). The diets were formulated based on analyzed AA contents of ingredients and the SID coefficients of AA (AMINODat 5.0).

The pigs were allowed a 7-day adaptation period followed by a 5-day period for total but separate collection of feces and urine. During the experimental period, pigs had free access to water and were provided their daily feed at an amount equivalent to 4% of the average body weight of the group, which corresponded to approximately 3 times their daily energy requirement for maintenance (i.e. 0.44 MJ ME / kg of BW^{0.75} / day; NRC, 1998). The animals were fed with equal portions twice a day, at 0800 and 1600 h.

BW was measured in the start and end of adaptation and end of collections.

2.2. Nitrogen (N) Balance

The fecal collection period was determined through the inclusion of 3g of ferric oxide in the feed offered at 0800 h on the 8th day and started when the marker appeared in the feces. Likewise, the same fraction of the marker was included in the diet offered at 0800 h on the 13th day and the fecal collection was terminated when the marker appeared in the feces.

Feces were collected twice a day, packed in labeled plastic bags, weighed and frozen at -20°C. After the collection period, the samples were thawed, homogenized and dried at 55°C for 48h, then ground and stored in labeled containers.

Concomitant to the collection of feces, urine was collected daily into plastic buckets containing 10 mL of 6N HCl solution. A thin mesh was laid out in the collectors to prevent contamination of urine with solid material. A sample of 10% of the total urine collected per day was stored at -20°C in labeled plastic bottles. At the end of the collection period, the urine samples were thawed, homogenized and stored in properly labeled flasks.

To determine N content of the feed and feces, the samples were homogenized and analyzed for dry matter (procedure 4.1.06, AOAC, 2000) and then approximately 0.100g of the samples were weighed, wrapped in thin sheets and analyzed by Leco FP-528 (LECO Corporation, USA), using the Dumas Method. To obtain the urine N values, approximately 0.100 g of urine were pipetted, packed in tin capsules and subjected to the same analysis.

2.3. Sampling and collection (blood and tissues)

On the 14th day of the experiment at 0800 h with all pigs fasting since last feeding the previous day, blood was collected into heparinized tubes, centrifuged, and the plasma stored at -80 °C. The animals corresponding to treatments BD, BD + 0.9 g/kg DL-Met and BD + 0.9 g/kg L-Met were euthanized. Following euthanasia, the gastrointestinal tract was quickly removed, and the small intestine was dissected. The middle sections of the duodenum, jejunum

and ileum were isolated and flushed with saline solution. The sections were fixed in 10% formaldehyde phosphate buffer and kept for microscopic assessment of mucosal morphometry. Some sections of the duodenum were collected and opened for scraping of the mucosa layer into a micro assay tube, which was frozen in liquid nitrogen. A part of the liver (20 g; right upper lobe) was also collected into an aluminum foil and frozen in liquid nitrogen. Mucosa and liver samples were then stored in -80°C until analyzed for concentrations of glutathione (GSH), glutathione disulfide (GSSG), protein carbonyls, and malondialdehyde (MDA) as markers for oxidative status.

2.4. Chemical analysis

2.4.1. Preparation of tissue homogenate

Samples of 0.15 to 0.20 g were weighed and placed in microassay tubes, where 700 μl of 50 mM phosphate buffer (H_2PO_4) pH=7 was added. The blends were homogenized using a vortex stirrer. Additional buffer solution was added until a ratio of 1:9 (g of tissue:ml solution), considering the amount previously added (700 μl). The blends were centrifuged at 4°C and 12000 rpm for 12 minutes and the supernatant was pipetted and stored in new microassay tube.

2.4.2. Determination of total proteins

Total protein concentrations in the plasma and homogenate samples were obtained using the commercial kit guidelines (Labtest Diagnóstica S.A.), which follow the Biureto method.

2.4.3. Determination of carbonyl level

To the determination of the carbonyl level of the samples, adaptations of the methods described by Levine et al. (1990) and Odetti et al. (1996) were performed.

The samples were precipitated by adding 100 μl of plasma or homogenate to 100 μl of 20% trichloroacetic acid (TCA) and centrifuging for 10 minutes at 3500 rpm. The supernatant was

discarded, and the proteins were derivatized from 500 μ L of 2,4 Dinitrophenylhydrazine (DNPH) + 2M HCl solution. After receiving this solution, the samples were kept for 0100h in absence of light, being shaken every 15 minutes. The precipitate was then washed three times with 1 mL of ethanol (1: 1) to remove free DNPH. The pellets were then dissolved with 2 mL of NaOH (1M) and the absorbance measured at wavelength 370 nm. Carbonyl levels were expressed in μ mol / g protein.

2.4.4. Determination of the level of Malondialdehyde (MDA)

The analysis was performed by some adaptations of the method described by Gérard-Monnier et al. (1998).

A total of 300 μ L of (10 mM) 1-methylphenylindole solution + acetonitrile and methanol (2: 1, v / v) and 75 μ L pure HCl (37%) were added in 100 μ L of the homogenate or plasma. The content of the microassay tubes were homogenized with the aid of a vortex stirrer and incubated for 40 minutes in a water bath at 45°C. After withdrawing from the water bath, the samples were cooled on ice and centrifuged at 4000 rpm for 10 minutes. The supernatant was pipetted, and the absorbance was measured at 586 nm wavelength. The concentration of MDA was calculated by comparison with a hydrolyzed 1,1,3,3-tetramethoxypropane (TMP) curve. The results were expressed as μ mol / g protein.

2.4.5. Determination of the Level of Reduced Glutathione (GSH), Oxidized Glutathione (GSSG),

GSH : GSSG and Total Glutathione

The concentrations of GSH and GSSG in plasma and tissues were determined by GSH and GSSG assays method described by Rahman et al. (2006). The determination of the total concentration of glutathione occurred with the sum of the GSH and GSSG values obtained in each sample. The values were expressed as μ mol / g protein. Data concerning the redox potential of glutathione were obtained by means of the GSH : GSSG ratio.

2.5. *Intestinal morphology*

The samples of duodenum, jejunum and ileum were quickly sent after collection to Department of Morphology and Animal Physiology FCAV-UNESP for preparation of the slides. Tissues were stained with H.E. (hematoxylin and eosin). Each blade was finished having three to four cuts of a certain intestinal segment.

Images of at least 25 intact villi and their associated crypt were captured under a DFC290 camera attached to a Leica DM200 microscope (Leica Microsystems Ltd.). Data of crypt depth, length and width of villi and relation length of villi: depth of crypt were obtained with Leica IM50 system (Leica Microsystems Ltd.), calibrated at 100 μm , in 40 $\times$ magnification, according Shen et al. (2014) methodology.

2.6. *Statistical analysis*

In both experiments (1 and 2), data were analyzed as a randomized complete block design using the software SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA). The fixed effect of diet and the random effect of block (batch) and pigs were included in the model. The individual pigs were used as the experimental unit. Orthogonal-polynomial contrasts were used to determine the linear and quadratic effects of increasing DL-Met and L-Met levels on response criteria, and to evaluate the effects of Met sources of N Balance, oxidative status and intestinal morphometry data.

In order to compare the relative bioavailability (RBV) of Met sources, N retention data were subjected to multiple linear regression analyzes to verify the fundamental validity assumptions of the slope-ratio assay (Littell et al., 1997), which included linearity tests of responses, equality of the intercept and equality of the intercept common to the mean of the basal diet. The statistical validity tests described by Littell et al. (1997) determined whether the mean of the two slopes was nonzero and whether the inclinations of the individual lines were

different from each other. The multiple linear regression analysis was performed from the follow equation: $Y = a + bx \text{ DL-Met} + cx \text{ L-Met}$, Y = the response variable (N retained, g/d; N retention, % of intake; N retention, % of absorbed), a = the intercept, b = slope of the line in response to the DL-Met in the diet, DL-Met = percentage of supplemental DL-Met in the diet, c = slope of the line for the percentage L-Met the diet, L-Met = percentage of L-Met supplemental in the diet. The bioavailability of L-Met compared to DL-Met was calculated as the ratio of its linear slopes (i.e., $b_2/b_1 \times 100$) as described by Littell et al. (1997). Statistical differences were considered significant when $P \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Diets and AA levels

The analyzed crude protein and AA contents of experimental diets were close to the formulated levels in both experiments, resulting in graded levels of L- and DL-Met (Table 1).

3.2. Experiment 1

3.2.1. N balance assay

To ensure that the development of intestinal structure and the other variables studied were interfered only with methionine sources, the animals did not receive antibiotics. However, three animals had diarrhea and were not considered in the analysis, having at least five pig replicates per treatment. Dietary leftovers were individually weighed, recorded and discounted from the amount offered to the animal.

Met supplementation decreased Urine N and increased N retention (% of absorbed) irrespective of the Met source ($P \leq 0.03$; linear). Pigs fed supplemented DL-Met diets had increased Fecal N ($P = 0.02$; linear). There were no linear or quadratic responses ($P > 0.05$) to increasing Met intake for all other response criteria measured irrespective of Met source (Table

2). Based on the slope-ratio regression the RBV for L-Met compared to DL-Met was estimated 106% [95% confidence interval (CI): 39 to 173%] for N retention (% of absorbed) on an equimolar basis (Figure 1).

3.2.2. *Oxidative status*

Markers of oxidative stress in the plasma and tissues of pigs fed diets supplemented with L- and DL-Met are presented in Table 3. Protein carbonyl concentrations in the plasma, duodenum and liver were not affected by both Met sources ($P > 0.05$), but L-Met supplementation affected MDA, GSH concentrations and GSH:GSSG ratio in the duodenum compared to the basal diet ($P = 0.05$). The GSH concentrations in the liver of pigs fed diets supplemented with both Met sources were increased ($P \leq 0.03$) compared with pigs fed the basal diet. Pigs fed L-Met supplemented diets presented higher ($P = 0.01$) concentrations of GSH than pigs receiving the DL-Met supplemented diets. Similarly, the concentrations of GSSG in the plasma ($P = 0.04$) and liver ($P = 0.01$) were lower in pigs fed diets supplemented with L-Met compared with pigs fed the basal diet. The Total Glutathione and GSH:GSSG ratio in the liver were increased ($P \leq 0.01$) by L-Met supplementation.

3.2.3. *Intestinal Morphology*

The contrast of DL-Met versus L-Met was not significant ($P \geq 0.10$) to villus height, villus width, crypt depth and villus height:crypt depth ratio of duodenum, jejunum and ileum (Table 4). Pigs fed L-Met supplemented diets had greater villus height and villus height:crypt depth ratio ($P \leq 0.04$) in the duodenum and jejunum, but lower values of crypt depth in the jejunum compared with pigs fed a basal diet. No significant results were found in the measurements of the ileum ($P = 0.53$).

3.3. Experiment 2

3.3.1. N Balance assay

To ensure that the development of intestinal structure and the other variables studied were interfered only with methionine sources, the animals did not receive antibiotics. However, seven animals had diarrhea and were not considered in the analysis, having at least four pig replicates per treatment. Dietary leftovers were individually weighed, recorded and discounted from the amount offered to the animal.

N retention and excretion data were tested for linear and quadratic effects (Table 5). Met supplementations had no effect on BW, N fecal and N absorbed ($P \geq 0.08$). Pigs receiving L-Met or DL-Met supplemented diets linearly decreased ($P \leq 0.04$) Urine N excretion and linearly increased ($P \leq 0.02$) Total N retained, N retention (% of intake, and % of absorbed). Pigs fed DL-Met supplemented diets showed a quadratic effect on N Intake ($P = 0.04$). The slope-ratio estimated the RBV of 95% (95% CI: 13 to 177%) for N retention (% of intake) and 94% (95% CI: 20 to 167%) for N retention (% of absorbed) on an equi-molar basis (Figures 2 and 3, respectively).

3.3.2. Oxidative status

Protein carbonyl concentration obtained in the plasma was lower ($P < 0.01$) for pigs fed diets supplemented with L-Met than pigs fed the basal diet (Table 6). The supplementation of both Met sources decreased ($P \leq 0.02$) MDA concentration in the plasma compared with Met deficient diet. However, both Met sources increased ($P < 0.01$) the plasmatic GSH concentration compared with pigs fed basal diet. GSH concentrations in the duodenum and liver were greater ($P = 0.02$) for pigs fed diets supplemented with L-Met than pigs fed basal diets. Pigs fed diets supplemented with L-Met or DL-Met had lower concentrations of GSSG in liver than pigs fed a basal diet ($P < 0.01$), but L-Met decreased the GSSG concentration compared with DL-Met

($P = 0.03$). Both sources of Met increased the GSH:GSSG ratio and total glutathione in the plasma compared with basal diet ($P \leq 0.03$), but in the liver, pigs fed diet supplemented with L-Met increased GSH:GSSG ratio ($P = 0.03$) compared with pigs fed basal diet.

3.3.3. *Intestinal Morphology*

The contrast of DL-Met versus L-Met were not significantly different ($P \geq 0.07$) for the measurements obtained in the villus height, villus width, crypt depth and villus height:crypt depth ratio of duodenum, jejunum and ileum (Table 7). Pigs fed L-Met supplemented diets had greater villus width ($P \leq 0.01$) in the duodenum and jejunum than pigs fed a basal diet. No significant results were found in the measurements of the ileum ($P \geq 0.50$).

4. Discussion

4.1. *N Balance*

The primary objective of this analysis was to compare the N retention response of weaned and growing pigs fed with Met-deficient diets or supplemented with increasing levels of L-Met or DL-Met, according to the relative bioavailability (RBV) methodology described by Littell et al. (1997). Increased protein intake by mammals leads to elevated feed costs and increased nitrogen release into the environment, thus, Nitrogen is an indicator of protein status and has been used to determine protein requirements and lean tissue growth rates in pigs. (Liu et al., 2015). The analyzed content of the diets indicated that the amounts of CP, AA total and methionine supplementation were close to the calculated and the levels of the sources increased in graded form, as reported by Opapeju et al. (2012) for a proper determination of RBV between AA sources. Overall, the supplementation of both Met sources linearly decreased urinary excretion of N and linearly increased the percentage of N retention based on the absorbed amount, compared to the basal diet, while the more satisfactory responses were achieved with the highest supplemental level of both Met sources in these two studies, which demonstrates

improved AA balance and more efficient utilization of dietary N. The results confirm that the deficiency of the sulfur amino acids of the basal diet was limiting, increasing the amount of catabolized AA and excreted as urinary urea (Opapeju et al., 2012; Santos et al., 2018). Thus, the responses were tested at a sensitive level as reported in previous studies. The RBV of L-Met compared to DL-Met based on a slope-ratio procedure was estimated as 106% for N retention (% of absorbed) for weaned pigs (Experiment 1) and 95 and 94% for N retention (% of intake) and N retention (% of absorbed), respectively, for growing pigs (Experiment 2). According to Littell et al. (1997), relative bioavailability is the ratio of the required amounts of a test substance to a standard substance to produce the same response. Htoo and Morales (2016) and Tian et al. (2016) found an equal bioavailability for L-Met compared to DL-Met and reported that a relatively wide CI indicates that the data were consistent with a wide range of possible RBV values. However, the 95% CI found in our study for the L-Met reaches 100% demonstrating that Met in DL-Met and L-Met are equally bioavailable to the weaned and growing pigs, although L-Met RBV was approximately 6% greater or lower than DL-Met to the responses presented. In addition, nitrogen retention and excretion parameters between the sources did not show significant differences when compared by orthogonal contrasts.

4.2. *Oxidative Status*

Damage caused by oxidative stress can be identified by the concentration of MDA and carbonyl protein. MDA is a biomarker of oxidative lipid deterioration and protein carbonyl indicates oxidative protein damage (Shen et al., 2014; Zhang et al., 2016). The oxidative stress occurs when GSH levels are not enough to neutralize the actions of reactive oxygen species (ROS), which increases GSSG concentrations and reduces the value of the GSH:GSSG ratio (Rahman et al., 2006). Lower concentrations of oxidative biomarkers indicate lower tissue deterioration by ROS and more effective antioxidant action. Although GSH, GSSG, total glutathione production and redox potential were higher in pigs fed diets with L-Met source

compared with pigs fed diets with DL-Met source, the oxidative markers values did not show significant differences between the sources, demonstrating that glutathione production was sufficient to prevent damage caused by reactive oxygen species such as free radicals and peroxides in the studied tissues. Similarly, Zeitz et al. (2018) concluded that the effects of L-Met and DL-Met supplementation are comparable considering antioxidant status and plasma L-Met concentration. Overall, the conversion of D-Met portion of DL-Met to Keto-Met is not a limiting factor due to the existence of substantial D-AAOX activity in different tissues, of poultry and pigs (Brachet; Puigserver, 1992; Fang et al., 2010). Furthermore, the conversion of Keto-Met to L-Met is highly efficient as it merely requires transamination of an amino group from a donor AA, which can be catalyzed by several aminotransferases (Dilger et al., 2007). Thus, DL-Met can be fully utilized by the pigs (Baker, 2006).

It should be noted the tendency ($P>0.09$) observed for a higher protein carbonyl in the duodenum (Table 3) and higher MDA in the plasma (Experiment 2) for pigs fed basal diet compared to Met sources (DL-Met and L-Met) show Met deficient diets may compromise the oxidative status. Indeed, the GSH concentration in the liver was 48% lower for weaned pigs fed basal diet compared to Met sources. Growth pigs fed basal diet also presented antioxidant status impaired (lower GSH, GSH:GSSG and glutathione in the plasma) compared to pigs fed diets with Met sources. According to Conde-Aguilera et al. (2016), lower glutathione concentration can be explained if Cys is the rate-limiting factor for glutathione synthesis. This fact reinforces that the Met of the basal diets was limiting and the effects of dietary supplementation with both sources was positive for the antioxidant system, since Cys synthesis is related to methionine metabolism.

4.3. Intestinal Morphology

The intestinal epithelium of mammals undergoes rapid renewal, so intestinal integrity is essential for nutrient absorption and animal health (Wang et al., 2015). Methionine has

important functions in this context, through the synthesis of polyamines such as spermine and spermidine, which are considered trophic agents because they act in the maturation and regeneration of the intestinal mucosa of swine (Tucci et al., 2011). In addition, methionine is related to the production of bioactive compounds such as glutathione, an important antioxidant in splanchnic tissues, especially in the gut, where most sulfur amino acid metabolism occurs (Shen et al., 2014). It should be noted greater dimensions and their ratios were observed in duodenum and jejunum structures of pigs fed diets containing L-Met than those fed basal diets in this study; however, the methionine sources were not statistically different in the effects promoted on the digestive and absorptive areas of the small intestine as also observed by Zeitz et al. (2018) in villi height, crypt depth, the villi height: crypt depth ratio in duodenum and jejunum of weaned pigs fed diets with L or DL-Met. Conde-Aguilera et al. (2016) reported 16 % decrease in the absorptive surface area in the jejunum of piglets fed with insufficient supplementation of sulfur amino acids. These data confirm that there was no limitation on the availability of sufficient substrates for the production of glutathione and other substances necessary for the development of the intestinal portions analyzed, as no differences in intestinal structure measurements were observed in animals fed with both methionine sources. In addition, the pigs used in this analysis presented similar performance and were not observed physical or behavioral changes that could indicate any damage related to nutrient absorption deficiency.

5. Conclusions

In conclusion, the results of both experiments indicate that DL-Met and L-Met are equally bioavailable as Met sources to optimize intestinal morphology and antioxidant status of weaned and growing pigs.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgement

This research was supported by Evonik Nutrition & Care GmbH, Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and The São Paulo Research Foundation – FAPESP (Grant numbers: 2017/10354-5 and 2018/20486-9). The authors gratefully acknowledge Laboratory of Invertebrate Morphology, DBAA, FCAV for the excellent aid with sampling and laboratory analyses of intestinal morphometry.

References

- AMINODat® 4.0. Platinum version, 2010. Evonik Degussa GmbH, Hanau-Wolfgang, Germany.
- AMINOPig® 1.0 (2012): Evonik Industries, Hanau-Wolfgang, Germany.
- AOAC, 2000. Official methods of analysis. Assoc. Anal. Chem., 17th ed. Arlington, VA.
- Baker, D. H., 2006. Comparative species utilization and toxicity of sulfur amino acids. The Journal of Nutrition. 136, 1670S–1675S.
- Brachet, P., Puigserver, A., 1992. Regional differences for the D-amino acid oxidase-catalysed oxidation of D-methionine in chicken small intestine. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry. 101, 509–511.
- Conde-Aguilera, J. A., Le Floc’h, N., Le Huërou-Luron, I., Mercier, Y., Tesseraud S., Lefaucheur, L., van Milgen, J., 2016. Splanchnic tissues respond differently when piglets are offered a diet 30 % deficient in total sulfur amino acid for 10 days. European Journal of Nutrition. 55, 2209-2219.
- Dilger, R. N., Kobler, C., Weckbecker, C., Hoehler, D., Baker, D. H., 2007. 2-Keto-4-(Methylthio)Butyric Acid (Keto Analog of Methionine) is a safe and efficacious precursor of L-Methionine in chicks. The Journal of Nutrition. 137, 1868–1873.

- Fang, Z., Luo, H., Wei, H., Huang, F., Qi, Z., Jiang, S., Peng, J., 2010. Methionine metabolism in piglets fed DL-methionine or its hydroxy analogue was affected by distribution of enzymes oxidizing these sources to keto-methionine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58, 2008–2014.
- Feng, Z., Qiao, S., Ma, Y., Wang, X., Li, X., Thacker, P. A., 2006. Efficacy of methionine hydroxy analog and DL-methionine as methionine sources for growing pigs. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 5, 135-142.
- Findrik, Z., Vasić-Rački, Đ., 2007. Biotransformation of D-methionine into L-methionine in the cascade of four enzymes. *Biotechnology and Bioengineering*. 98, 956-967.
- Gérard-Monnier, D., Erdelmeier, I., Régnard, K., Moze-Henry, N., Yadan, J. C., Chaudière, J., 1998. Reactions of 1-Methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-Hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chemical Research in Toxicology*. 11, 1176-1183.
- Hopps, E., Noto, D., Caimi, G., Averna, M. R., 2010. A novel component of the metabolic syndrome: The oxidative stress. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*. 20, 72-77.
- Htoo, J. K., Morales, J., 2016. Bioavailability of L-Methionine relative to DL-Methionine as a methionine source for weaned pigs. *Journal of Animal Science*. 94, 249-252.
- Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A., Ahn, B., Shaltiel, S., Stadtman, E. R., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*. 186, 464-478.
- Littell, R., Henry, P., Lewis, A., Ammerman, C., 1997. Estimation of relative bioavailability of nutrients using SAS procedures. *Journal of Animal Science*. 75, 2672–2683.

- Liu, Y., Kong, X., Jiang, G., Tan, B., Deng, J., Yang, X., Li, F., Xiong, X., Yin, Y., 2015. Effects of dietary protein/energy ratio on growth performance, carcass trait, meat quality, and plasma metabolites in pigs of different genotypes. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 6, 1-10.
- Martínez Y., Li, X., Liu, G., Bin, P., Yan, W., Más, D., Valdiviá, M., Hu C. A., Ren, W., Yin, Y., 2017. The role of methionine on metabolism, oxidative stress, and diseases. *Amino Acids*. 49, 2091-2098.
- Nelson, D. L., Cox, M. M., 2014. *Principios de Bioquímica: Lehninger*, sixth ed. Artmed, Porto Alegre.
- NRC, 1998. *Nutrient Requirements of Swine*, 10th ed. National Academy Press, Washington, DC, USA.
- Odetti, P., Garibaldi, S., Gurreri, G., Aragno, I., Dapino, D., Pronzato, M. A., Marinari, U. M., 1996. Protein oxidation in hemodialysis and kidney transplantation. *Metabolism*. 45, 1319-1322.
- Oliveira Neto, A. R., 2014. Metabolismo e Exigência de Metionina, in: Sakomura, N. K., Silva, J. H. V., Costa, F. G. P., Fernandes, J. B. K., Hauschild, L. (Eds.), *Nutrição de não ruminantes*. Funep, Jaboticabal, pp. 186-217.
- Opapeju, F. O., Htoo, J. K., Dapoza, C., Nyachoti, C. M., 2012. Bioavailability of methionine hydroxy analog-calcium salt relative to DL-methionine to support nitrogen retention and growth in starter pigs. *Animal*. 6, 1750-1756.
- Pajk, T., Rezar, V., Levart, A., Salobir, J., 2006. Efficiency of apples, strawberries, and tomatoes for reduction of oxidative stress in pigs as a model for humans. *Nutrition*. 22, 376-384.

- Rahman, I., Kode A., Biswas S. K., 2006. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nature Protocols*. 1, 3159-3165.
- Remus, A., Peres, F. M., Hauschild, L., Andretta, I., Kipper, M., Gobi, J. P., Pomar, C., 2015. Exploratory study on the utilization of different dietary methionine sources and methionine to lysine ratio for growing–finishing pigs. *Livestock Science*. 181, 96-102.
- Santos, L. S., Htoo, J.K., Fracaroli, C., Silva, W. C., Gobi, J.P., Veira, A.M., Barbosa, N.A.A., Hauschild L., 2018. Bioavailability of di-peptide DL-methionyl-DL-methionine in comparison to DL-methionine in weaned and growing pigs. *Animal Feed Science and Technology*. 241, 94-101.
- Shen, Y. B., Weaver, A. C., Kim, S. W., 2014. Effect of feed grade L-methionine on growth performance and gut health in nursery pigs compared with conventional DL-methionine. *Journal of Animal Science*. 92, 5530-5539.
- Su, W., Zhang, H., Ying, Z., Li, Y., Zhou, L., Wang, F., Zhang, L., Wang, T., 2018. Effects of dietary L-methionine supplementation on intestinal integrity and oxidative status in intrauterine growth-retarded weanling piglets. *European Journal of Nutrition*. 57, 2735–2745.
- Tian, Q. Y., Zeng, Z. K., Zhang, Y. X., Long, S. F., Piao, X. S., 2016. Effect of L- or DL-methionine supplementation on nitrogen retention, serum amino acid concentrations and blood metabolites profile in starter pigs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 29, 689-694.
- Tucci, F. M., Thomaz, M. C., Nakaghi, L. S. O., Hannas, M. I., Scandolera, A. J., Budiño, F.E.L., 2011. The effect of the addition of trofic agents in weaned piglet diets over the structure and ultra-structure of small intestine and over performance. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 63, 931-940.

- Wang, B., Wu, G., Zhou, Z., Dai, Z., Sun, Y., Ji, Y., Li, W., Wang, W., Liu, C., Han, F., Wu, Z., 2015. Glutamine and intestinal barrier function. *Amino Acids*. 47, 2143-2154.
- Zeitz, J. O., Kaltenböck, S., Most, E., Eder, K., 2018. Effects of L-methionine on performance, gut morphology and antioxidant status in gut and liver of piglets in relation to DL-methionine. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 1-9.
- Zhang, S., Wong, E. A., Gilbert, E. R., 2015. Bioavailability of different dietary supplemental methionine sources in animals. *Frontiers in Bioscience*. 7, 478-490.
- Zhang, X., Lu, P., Xue, W., Wu, D., Wen, C., Ding, L., Zhou Y., 2016. Effect of ginkgo biloba leaf powder on growth performance, meat quality and antioxidant activity of muscle in growing-finishing pigs. *Pakistan Journal of Zoology*. 48, 1555-1561.

Table 1
Composition and calculated nutrient and energy content of the basal diets, as-is basis

Ingredients	Exp. 1, g/kg ^a	Exp. 2, g/kg ^a
Corn	614.0	717.5
Soybean meal	260.0	243.1
Dried whey	70.0	-
Soybean oil	7.6	-
Spray-dried plasma	12.7	-
Limestone	3.2	4.8
Dicalcium phosphate	15.1	15.0
L-Lysine, 54.6%	6.9	7.4
L-Threonine	1.8	2.0
L-Valine	0.8	0.9
L-Tryptophan	0.9	1.0
Salt	4.0	5.3
Choline chloride (60%)	0.5	0.5
Mineral and vitamin premix ^b	2.5	2.5
Calculated composition, g/kg ^c		
ME, MJ/kg	14.0	13.7
NE, MJ/kg	10.4	10.3
CP	200.2 (204.3)	182.4 (186.6)
Lys, total	14.3 (14.8)	12.7 (13.1)
Met+Cys, total	6.4	5.8
^d SID Lys	13	11.5
SID Met	2.6 (2.9)	2.4 (2.6)
SID Met+Cys	5.5 (6.4)	4.9 (5.6)
SID Thr	8.4 (9.8)	7.5 (8.4)
SID Trp	2.9 (3.2)	2.6 (2.8)
SID Ile	7.3 (8.6)	6.5 (7.5)
SID Val	9.1 (10.8)	8.1 (9.3)
SID His	4.5	4.1
SID Phe	8	7.2
Ca, total	7	7

^aGraded levels (0.3, 0.6 and 0.9 g/kg) of DL-Met (Treatments 2, 3 and 4) or L-Met (Treatments 5, 6 and 7) were added to a single common batch of the basal diet to obtain diets 2, 3, 4, 5, 6, and 7, respectively (Exp. 1 and Exp. 2). The analyzed supplemental Met content was 0.34, 0.63, 0.95, 0.39, 0.51 and 0.81 g/kg in diets 2, 3, 4, 5, 6, and 7 in Exp.1, respectively and was 0.35, 0.65, 0.82, 0.32, 0.65 and 0.99 g/kg in diets 2, 3, 4, 5, 6, and 7 in Exp.2, respectively.

^bSupplied the following per kg of diet: 10 000 IU of vitamin A, 2000 IU of vitamin D3, 15mg of vitamin E, 1.3 mg of vitamin B1, 3.5 mg of vitamin B2, 0.025 mg of vitamin B12, 1.5 mg of vitamin B6, 10mg of calcium pantothenate, 15mg of nicotinic acid, 0.1 mg of biotin, 0.6 mg of folic acid, 2mg of vitamin K3, 80mg of Fe, 6mg of Cu, 0.75 mg of Co, 150 mg of Zn, 60 mg of Mn; 0.75 mg of I, 0.10 mg of Se and 150 mg of ethoxyquin.

^cValues in parenthesis are expressed as analyzed total CP and AA contents.

^dSID = standardized ileal digestible.

Table 2

Nitrogen balance of pigs fed diets supplemented with DL-Met or L-Met, Exp. 1

Items	Supplementation level (g/kg of diet; as-fed)							SEM ^c	Contrasts ^{a,b}	
	Basal	DL-Met			L-Met				C1	C2
	0	0.3	0.6	0.9	0.3	0.6	0.9			
BW, kg										
Beginning of adaptation	10.72	10.49	10.73	10.73	10.77	10.78	10.86	0.474	0.84	0.75
End of adaptation	11.73	11.91	12.40	12.05	11.87	11.72	12.19	0.508	0.21	0.28
End of collection	13.58	13.71	14.06	13.99	13.57	13.43	13.90	0.531	0.23	0.52
N intake, g/d	13.14	13.08	13.10	13.09	12.76	12.63	12.94	0.527	0.90	0.46
Fecal N, g/d	3.80	3.19	3.04	2.75	3.50	2.55	2.83	0.383	0.03	0.01
Urine N, g/d	1.69	1.80	1.97	2.22	1.64	2.02	1.98	0.269	0.02	0.08
N absorbed, g/d	11.46	11.28	11.13	10.87	11.12	10.61	10.95	0.470	0.12	0.10
N retained, g/d	7.65	8.09	8.09	8.12	7.62	8.06	8.12	0.464	0.38	0.25
N retention, % of intake	58.67	61.66	61.70	62.58	60.07	63.77	63.28	3.385	0.29	0.11
N retention, % of absorbed	67.20	71.64	72.45	74.86	68.84	73.45	74.41	2.902	0.03	0.02

^aC1: Linear effect of DL-Met; C2: Linear effect of L-Met.^bThe contrast of DL-Met vs. L-Met was not significant ($P > 0.05$).^cSEM: Standard Error of the Mean.

Table 3
Oxidative status of pigs fed diets supplemented with DL-Met or L-Met, Exp. 1

Item	Treatment			SEM	Contrasts ^a		
	Basal	DL-Met	L-Met		C1	C2	C3
Protein carbonyl, μmol/g protein							
Plasma	0.09	0.08	0.07	0.006	0.31	0.14	0.56
Duodenum	0.37	0.30	0.30	0.022	0.09	0.09	0.89
Liver	0.31	0.29	0.28	0.017	0.62	0.33	0.63
MDA, μmol/g protein							
Plasma	0.15	0.11	0.08	0.030	0.36	0.17	0.59
Duodenum	0.52	0.51	0.46	0.018	0.61	0.05	0.15
Liver	0.44	0.38	0.35	0.059	0.50	0.31	0.73
GSH, μmol/g protein							
Plasma	0.14	0.17	0.18	0.015	0.21	0.11	0.71
Duodenum	0.13	0.23	0.35	0.072	0.32	0.05	0.25
Liver	0.16	0.26	0.40	0.030	0.03	<0.01	0.01
GSSG, μmol/g protein							
Plasma	0.09	0.07	0.06	0.010	0.08	0.04	0.58
Duodenum	0.20	0.22	0.22	0.038	0.70	0.74	0.96
Liver	0.22	0.18	0.16	0.011	0.06	0.01	0.25
GSH : GSSG							
Plasma	2.09	2.85	3.38	0.674	0.48	0.24	0.63
Duodenum	0.61	0.99	1.80	0.392	0.48	0.05	0.17
Liver	0.76	1.39	2.67	0.206	0.06	<0.01	<0.01
Glutathione, μmol/g protein							
Plasma	0.23	0.23	0.23	0.009	0.58	0.55	0.97
Duodenum	0.34	0.45	0.56	0.091	0.41	0.12	0.42
Liver	0.38	0.45	0.58	0.035	0.11	<0.01	0.01

^aC1: Contrast Basal vs. DL-Met; C2: Contrast Basal vs. L-Met; C3: Contrast DL-Met vs. L-Met.

^bSEM: Standard Error of the Mean.

Table 4
Morphometry of small intestine of pigs fed diets containing DL-Met or L-Met in Exp 1

Item	Treatment			SEM ^b	Contrasts ^a		
	Basal	DL-Met	L-Met		C1	C2	C3
Duodenum							
Villus height (µm)	659.62	710.49	794.09	32.257	0.29	0.01	0.10
Villus width (µm)	192.99	191.19	193.30	7.699	0.87	0.98	0.85
Crypt depth (µm)	350.29	288.80	276.06	26.663	0.13	0.08	0.74
Villus height:crypt depth	2.14	2.70	3.08	0.278	0.18	0.04	0.36
Jejunum							
Villus height (µm)	496.21	532.40	622.29	36.729	0.50	0.04	0.11
Villus width (µm)	175.23	184.79	180.14	4.304	0.15	0.44	0.46
Crypt depth (µm)	311.74	236.98	225.50	25.718	0.07	0.04	0.76
Villus height:crypt depth	1.86	2.31	2.97	0.302	0.32	0.03	0.15
Ileum							
Villus height (µm)	543.84	552.54	558.19	32.903	0.86	0.76	0.91
Villus width (µm)	179.63	179.22	189.99	7.460	0.97	0.35	0.33
Crypt depth (µm)	265.58	261.51	239.04	20.529	0.89	0.38	0.46
Villus height:crypt depth	2.26	2.25	2.37	0.136	0.94	0.59	0.54

^aC1: Contrast Basal vs. DL-Met; C2: Contrast Basal vs. L-Met; C3: Contrast DL-Met vs. L-Met.

^bSEM: Standard Error of the Mean.

Table 5
Nitrogen balance of pigs fed diets supplemented with DL-Met or L-Met, Exp. 2

Items	Supplementation level (g/kg of diet; as-fed)							SEM ^d	Contrasts ^{a,b}	
	Basal	DL-Met			L-Met				C1	C2
	0	0.3	0.6	0.9	0.3	0.6	0.9			
BW, kg										
Beginning of adaptation	20.40	20.60	20.40	20.40	20.70	20.50	20.50	0.710	0.94	0.95
End of adaptation	22.00	22.90	22.80	22.60	22.60	21.90	22.60	0.820	0.48	0.59
End of collection	24.90	26.20	26.50	25.90	26.00	25.20	25.80	0.840	0.15	0.40
N intake, g/d ^c	25.06	26.10	25.86	25.66	25.68	25.66	25.78	0.704	0.23	0.09
Fecal N, g/d	7.54	6.62	7.09	5.46	6.61	6.52	5.93	0.634	0.02	0.04
Urine N, g/d	2.87	3.08	3.10	3.07	3.17	3.30	2.83	0.341	0.66	1.00
N absorbed, g/d	22.19	23.05	22.79	22.60	22.54	22.35	22.95	0.714	0.56	0.18
N retained, g/d	14.63	16.52	15.77	17.11	16.01	15.83	17.02	0.754	0.01	0.01
N retention, % of intake	58.22	62.89	61.08	66.60	62.16	61.85	65.88	2.328	0.02	0.01
N retention, % of absorbed	65.72	70.79	69.34	75.73	70.69	71.08	73.97	2.515	0.01	0.01

^aC1: Linear effect of DL-Met; C2: Linear effect of L-Met.

^bThe contrast of DL-Met vs. L-Met was not significant ($P > 0.05$).

^cQuadratic effect of DL-Met ($P = 0.04$).

^dSEM: Standard Error of the Mean.

Table 6
Oxidative status of pigs fed diets supplemented with DL-Met or L-Met, Exp. 2

Item	Treatment			SEM ^b	Contrasts ^a		
	Basal	DL-Met	L-Met		C1	C2	C3
Protein carbonyl, μmol/g protein							
Plasma	0.08	0.07	0.06	0.003	0.13	<0.01	0.08
Duodenum	0.38	0.38	0.40	0.075	0.96	0.85	0.89
Liver	0.30	0.30	0.28	0.033	0.97	0.70	0.73
MDA, μmol/g protein							
Plasma	0.10	0.07	0.07	0.007	0.02	<0.01	0.46
Duodenum	0.68	0.65	0.68	0.129	0.89	0.96	0.84
Liver	0.68	0.63	0.50	0.105	0.72	0.22	0.38
GSH, μmol/g protein							
Plasma	0.03	0.16	0.19	0.027	<0.01	<0.01	0.35
Duodenum	0.20	0.43	0.51	0.110	0.08	0.02	0.51
Liver	0.07	0.23	0.46	0.109	0.31	0.03	0.12
GSSG, μmol/g protein							
Plasma	0.14	0.15	0.16	0.023	0.64	0.58	0.94
Duodenum	0.30	0.46	0.38	0.112	0.28	0.54	0.58
Liver	0.34	0.20	0.14	0.025	<0.01	<0.01	0.03
GSH : GSSG							
Plasma	0.30	1.15	1.35	0.206	0.01	<0.01	0.50
Duodenum	0.72	1.00	1.56	0.363	0.52	0.06	0.20
Liver	0.20	1.49	3.62	1.013	0.37	0.03	0.13
Glutathione, μmol/g protein							
Plasma	0.17	0.32	0.34	0.038	0.01	<0.01	0.56
Duodenum	0.50	0.91	0.88	0.187	0.08	0.07	0.90
Liver	0.40	0.43	0.60	0.096	0.83	0.16	0.20

^aC1: Contrast Basal vs. DL-Met; C2: Contrast Basal vs. L-Met; C3: Contrast DL-Met vs. L-Met.

^bSEM: Standard Error of the Mean.

Table 7
Morphometry of small intestine of pigs fed diets containing DL-Met or L-Met in Exp. 2.

Item	Treatment			SEM ^b	Contrasts ^a		
	Basal	DL-Met	L-Met		C1	C2	C3
Duodenum							
Villus height (µm)	707.38	750.74	727.97	30.531	0.34	0.64	0.61
Villus width (µm)	176.94	185.20	202.15	5.805	0.34	0.01	0.07
Crypt depth (µm)	275.47	271.85	258.09	11.708	0.83	0.32	0.43
Villus height:crypt depth	2.72	2.96	2.97	0.164	0.31	0.30	0.98
Jejunum							
Villus height (µm)	535.28	579.70	600.65	35.365	0.40	0.22	0.68
Villus width (µm)	173.75	184.51	197.27	4.564	0.13	< 0.01	0.08
Crypt depth (µm)	240.44	232.87	214.21	17.657	0.77	0.32	0.47
Villus height:crypt depth	2.44	2.82	3.07	0.321	0.42	0.20	0.60
Ileum							
Villus height (µm)	633.69	642.66	647.60	38.899	0.87	0.81	0.93
Villus width (µm)	187.63	194.18	190.73	3.818	0.25	0.58	0.54
Crypt depth (µm)	289.97	273.87	277.09	21.787	0.61	0.68	0.92
Villus height:crypt depth	2.39	2.60	2.55	0.316	0.65	0.72	0.92

^aC1: Contrast Basal vs. DL-Met; C2: Contrast Basal vs. L-Met; C3: Contrast DL-Met vs. L-Met.

^bSEM: Standard Error of the Mean.

Fig 1. Slope-ratio comparison of means dietary DL-methionine or L-methionine based on N retention expressed as % of absorbed in Exp. 1. The 95% confidence interval for the true RBV is between 39 to 173%.

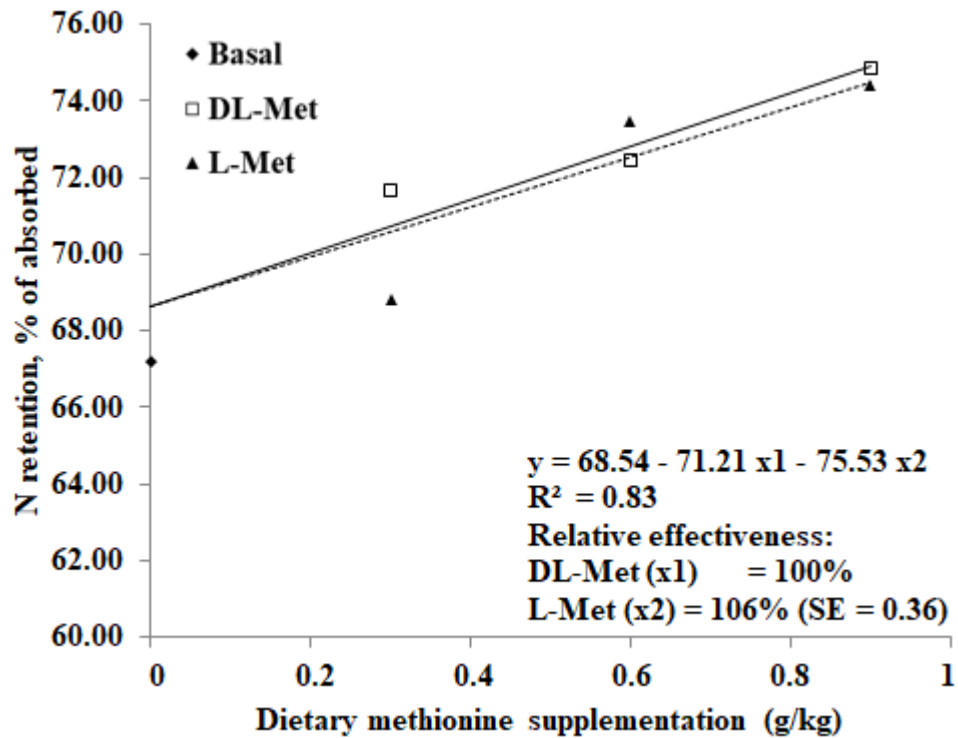


Fig 2. Slope-ratio comparison of means dietary DL-methionine or L-methionine based on N retention expressed as % of intake in Exp. 2. The 95% confidence interval for the true RBV is between 13 to 177%.

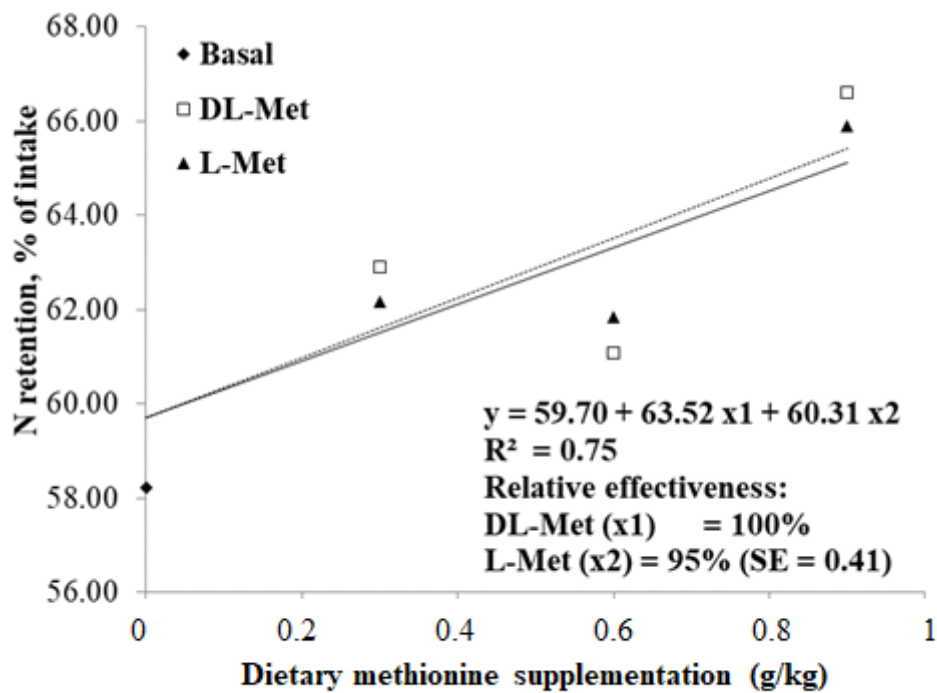


Fig 3. Slope-ratio comparison of means dietary DL-methionine or L-methionine based on N retention expressed as % of absorbed in Exp. 2. The 95% confidence interval for the true RBV is between 20 to 167%.

