

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia



Tese

**Estudo epigênico e morfométrico em uma linhagem de
codornas de corte**

Raquel Pillon Della-Flora

Pelotas, 2017

RAQUEL PILLON DELLA-FLORA

**ESTUDO EPIGÊNICO E MORFOMÉTRICO EM
UMA LINHAGEM DE CODORNAS DE CORTE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Ciências, na área de concentração: Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Nelson José Laurino Dionello
Co-orientador: Prof. Dra. Ana Paula Nunes

Pelotas, 2017

Banca examinadora:

Prof. Dr. Nelson José Laurino Dionello - UFPel - DZ/FAEM.

Prof. Dra. Débora Cristina Nichelle Lopes– UFPel- DZ/FAEM.

Prof. Dr. Fernando Rutz – UFPel- DZ/FAEM.

Prof. Dr. Gilberto D'Avila Vargas - UFPel - FV.

Prof. Dr. Marcos Antonio Anciuti – Instituto Federal Sul-Riograndense.

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

D111e Della-Flora, Raquel Pillon

Estudo epigênico e morfométrico em uma linhagem de codornas de corte / Raquel Pillon Della-Flora ; Nelson José Laurino Dionello, orientador ; Ana Paula Nunes, coorientadora. — Pelotas, 2017.

62 f.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Extração de RNA. 2. Codornas de corte. 3. Histomorfometria. I. Dionello, Nelson José Laurino, orient. II. Nunes, Ana Paula, coorient. III. Título.

CDD : 636.3

“A minha família, meus pais e irmãos, pelo apoio e amor incondicional. Ao meu esposo pelo carinho e companheirismo ao longo desses anos. Ao meu anjo Daniel por me ensinar o amor verdadeiro, ao meu filho Augusto por me mostrar como se vive ele e a Deus por me conceder a dádiva de poder desfrutá-lo.

Dedico

Agradecimentos

À minha família: minha mãe Bernardete, meu exemplo de persistência, determinação e principalmente de mãe, que nunca mediu esforços para me ajudar em tudo. Sempre preocupada e presente na minha vida. Durante a elaboração desta tese, mais uma vez conseguiu liberação de seu trabalho para vir me ajudar a cuidar do nosso Augusto. A meu pai Walmor, pelo apoio em busca dos meus sonhos, sempre me incentivando e me dando força para lutar, e também acompanhando minha mãe na ajuda com nosso pequeno. Meus amados irmãos, Magno e Gustavo, que sempre acreditaram em mim. Obrigada pela amizade e amor, vocês são mais que irmãos, são meus melhores amigos. A meu esposo, Thiago, pela ajuda, compreensão, por estar do meu lado em todos os momentos, nos dias alegres e nos muitos dias cinzas que passamos. Aos meus amados filhos, Daniel (*"in memoriam"*) e Augusto, por me mostrarem o amor verdadeiro e fazerem minha vida, meu caminho, valer a pena. Amo muito vocês, meus amores. E à minha Pretinha, que "escreveu" essa tese comigo, ficando ao meu lado para me distrair nos momentos cansativos. Amo muito todos vocês! Obrigada por fazerem minha vida ter sentido.

Ao meu orientador, Prof. Nelson J.L. Dionello, pela dedicação, ensinamentos, confiança, apoio e paciência durante a realização deste trabalho, sem o qual não conseguiria chegar até aqui. E principalmente pela sua amizade e compreensão em todos os momentos difíceis que passei, tanto na vida profissional quanto pessoal. Meu muito obrigado!

À minha amiga, colega e comadre Jerusa, por toda ajuda, amizade, companheirismo, compreensão, carinho e palavras que me deram forças para seguir em todos os momentos.

Às amigas, Ariane e Suzane, pela ajuda e amizade.

Ao querido funcionário do LEEZO, José Ulisses Azambuja, pela colaboração durante a realização deste trabalho, amizade e companheirismo demonstrados.

Aos professores e funcionários do IF-Sul/ CAVG e Universidade Federal de Rio Grande pelo auxílio nas atividades desenvolvidas em seus respectivos departamentos.

A amiga e profa. Dra. Débora C.N.Lopes pela contribuição na formulação das dietas.

Aos demais professores do Departamento de Zootecnia, pelo conhecimento transmitido.

À secretária Norma pelo auxílio e amizade.

Aos amigos e colegas de mestrado e doutorado, pela ajuda e também pela amizade nos momentos de convívio.

Aos estagiários, que participaram da realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Pelotas, pela oportunidade de minha formação profissional.

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, pela oportunidade de crescimento acadêmico.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudo para o doutorado.

Aos membros da banca examinadora, os professores, Débora Cristina Nichelle Lopes, Fernando Rutz, Gilberto D'Ávila Vargas e Marcos Antônio Anciuti, pela disponibilidade na participação da minha defesa de tese e por fazerem parte da conclusão de mais um ciclo acadêmico em minha vida.

À Deus, pela vida.

E a todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a conquista dessa fase, meu eterno agradecimento.

***“Escolhe um trabalho de que gostes, e
não terás que trabalhar nem um dia na
tua vida.” Confúcio***

Resumo Geral

DELLA-FLORA, Raquel Pillon. **Estudo epigênico e morfométrico em uma linhagem de codornas de corte**. 2017. 62f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS.

O objetivo desta tese foi avaliar a expressão gênica do fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I) e do receptor do hormônio do crescimento (GHR) no fígado e músculo do peito de codornas de corte e avaliar o desenvolvimento muscular de cortes comerciais através do diâmetro das fibras musculares do peito e coxa em aves alimentadas com dietas contendo diferentes níveis de suplementação de metionina, em duas gerações sucessivas. Foram utilizadas codornas dos 22 aos 42 dias de idade, distribuídas em três e cinco tratamentos na primeira e na segunda gerações, respectivamente. Ao final, foram coletadas amostras do fígado e músculo do peito para extração de RNA total, e músculo do peito e coxa para a análise morfométrica. Os resultados mostraram que a expressão dos genes GHR e IGF-I sofreu influência da suplementação. No quinto tratamento, onde apenas a primeira geração recebeu uma suplementação acima do padrão das exigências para o período, houve uma expressão significativamente maior do GHR tanto no músculo do peito quanto no fígado e igualmente do IGF-I no músculo do peito. As aves que receberam mais metionina que as exigências da dieta na fase de postura (T3), apresentaram menor peso ao abate e menor diâmetro de fibras musculares em relação ao músculo da coxa quando comparadas aos outros tratamentos. Na fase de postura, as aves alimentadas com dieta basal (T1) e dieta conforme as exigências da espécie (T2), apresentaram maiores pesos corporais que as suplementadas com 20% a mais de metionina (T3) ($P < 0,05$), sendo que não houve diferença significativa para as aves que não receberam suplementação na segunda geração. Quanto ao diâmetro das fibras musculares do peito, as aves que receberam suplementação além das exigências de metionina nas duas gerações tiveram pior resultado comparados aos outros tratamentos, mas não diferiram significativamente das que receberam metionina em excesso apenas na primeira geração.

Palavras-chave: crescimento; extração de RNA; histomorfometria.

Abstract

DELLA-FLORA, Raquel Pillon. **Epigenic and morphometric study in a slaughter line of quail**. 2017. 62f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS.

The aim of this thesis was to evaluate the gene expression of insulin-like growth factor I (IGF-I) and growth hormone receptor (GHR) in the liver and chest muscle of slaughter quails and to evaluate the muscle development of commercial cuts through the chest and thigh muscles fibers diameter. The birds were fed with diets containing different levels of methionine supplementation in two successive generations. Quails were used from 22 to 42 days old, distributed in three and five treatments in the first and second generations, respectively. At the end, samples were collected from the liver and chest muscle for extraction of total RNA, and from chest and thigh muscles for morphometric analysis. The results showed that GHR and IGF-I gene expression was influenced by supplementation. In the fifth treatment, where only the first generation received a supplementation above the standards requirements for the period, there was a significantly greater expression of GHR in both liver and chest muscle and also IGF-I in the chest muscle. The birds that received more methionine than the diet requirements in the laying phase (T3) presented lower weight at slaughter and smaller diameter of muscle fibers in relation to the thigh muscle when compared to the other treatments. In the laying phase, birds fed with a basal diet (T1) and diet according to the specie requirements (T2) presented higher body weights than those supplemented with 20% more methionine (T3) ($P < 0.05$), where there was no significant difference from the birds that did not receive supplementation in the second generation. Regarding the chest muscle fibers diameter, the birds that received supplementation beyond methionine demands in the two generations had worse result compared to the other treatments, but did not differ significantly from those that received methionine excess only in the first generation.

Keywords: growth; RNA extraction; histomorphometry.

Lista de Tabelas

Revisão de literatura

Tabela 1. Tabela da Composição da carne de codorna.....	20
---	----

Relatório do Trabalho de Campo

Tabela 1. Composição das dietas experimentais nos três tratamentos, para codornas de corte na fase de crescimento.	36
---	----

Tabela 1. Composição das dietas experimentais nos três tratamentos, para codornas de corte na fase de postura	37
---	----

Tabela 3. Primers dos genes <i>GHR</i> e <i>IGF-I</i> e β -actina utilizados nas reações de qRT-PCR	41
---	----

Resultados e discussão

Tabela 1. Resultados da quantificação relativa de expressão do RNA mensageiro dos genes <i>GRH</i> e <i>IGF-1</i> em tecidos de músculo e fígado de codornas de cortes, as amostras foram coletadas aos 42 dias.....	46
--	----

Tabela 2. Resultados para consumo alimentar e conversão alimentar dos 21 aos 42 dias de idade e peso inicial aos 21 dias em codornas de corte na primeira geração de análise nos cinco tratamentos..	47
--	----

Tabela 3. Resultados de ganho de peso, consumo alimentar e conversão alimentar dos 21 aos 42 dias de idade em codornas de corte, na segunda geração, nos cinco tratamentos.....	48
---	----

Tabela 4. Efeito da dieta sobre o peso (g), o diâmetro das fibras musculares esqueléticas (μ m) dos músculos do peito e da coxa, consumo e conversão alimentar de codornas abatidas na fase de postura (médias e desvio padrão)	51
--	----

Tabela 5. Efeito da dieta sobre o peso (g), diâmetro das fibras musculares esqueléticas (μm) dos músculos do peito e da coxa, consumo e conversão alimentar, de codornas de corte da segunda geração abatidas aos 42 dias de idade (médias e desvio padrão).....	52
---	----

Lista de Figuras

Material e Métodos

Figura 1.	Baterias experimentais.....	32
Figura 2.	Coleta do músculo do peito e coxa.....	34
Figura 3.	Armazenamento do fígado e músculo do peito para extração do RNA.....	35
Figura 4.	Armazenamento do músculo do peito e da coxa para análise mosfométrica.....	35
Figura 5.	Integridade do RNA em luz ultravioleta.....	39
Figura 6.	IGF-1 - Fígado.....	41
Figura 7.	GHR - Fígado.....	41
Figura 8.	IGF-1 - Músculo.....	42
Figura 9.	GHR - Músculo.....	43

Resultados e Discussão

Figura 1.	Quantificação relativa (QR) da expressão diferencial do gene IGF-1, em cinco tratamentos no músculo do peito e no fígado de codornas de corte. Os valores representam as médias de três repetições, cada uma com três replicatas.	48
Figura 2.	Quantificação relativa (QR) da expressão diferencial do gene <i>GHR</i> , em cinco tratamentos no músculo do peito e no fígado de codornas de corte. Os valores representam as médias de três repetições, cada uma com três replicatas.....	49

Sumário

1 Introdução	15
2 Revisão de literatura	19
2.1 Codornas	19
2.2 Aminoácidos	21
2.3 Metionina +cistina	23
2.4 RNA.....	24
2.5 Músculo	26
3 Material e Métodos	30
3.1 Local e período experimental	30
3.2 Instalações e equipamentos	31
3.3 Seleção das aves.....	32
3.4 Delineamentos experimental e tratamentos.....	33
3.5 Abate das aves	33
3.6 Coleta do Material.....	33
3.6.1 Coleta de fígado e músculo do peito para a expressão Gênica	34
3.6.2 Coleta do músculo do peito e da coxa para análise morfométrica.....	34
3.7 Manejo Alimentar	35
3.7.1 Dietas experimentais.....	35
3.7.2 Preparo da ração e arraçoamento	37
3.8 Variáveis analisadas	38
3.8.1 Consumo de ração	38
3.8.2 Peso corporal.....	38
3.9 Expressão Gênica.....	39
3.9.1 Extração do RNA	39
3.9.2 Síntese do cDNA.....	39
3.10 Análise Morfométrica	42
3.11 Análise estatística.....	43
3.11.1 Expressão Gênica.....	43
3.11.2 Análise Morfométrica.....	43

4 Resultados e Discussão	45
4.1 Expressão Genica.....	45
4.2 Análises Morfométrica.....	49
5 Conclusões	53
6 Referências	54

1 INTRODUÇÃO

A exploração comercial das codornas de corte após a modernização da produção animal encontra-se em expansão. Antes desse novo mercado chamar a atenção dos criadores, machos e fêmeas das criações de codornas voltadas para postura (*Coturnix japonica*) eram utilizados para o abate e comercialização da carne. Os machos nascidos eram recriados para o abate e as fêmeas eram abatidas ao final do período de produção de ovos, utilizando-se animais mais velhos e com características de carcaça não padronizadas para esse fim.

Porém, com um mercado consumidor cada vez mais exigente para a qualidade da carne e pelo grande potencial que apresenta, teve início a produção de uma linhagem de codornas européias (*Coturnix coturnix*) voltada exclusivamente para esta finalidade, com peso ao abate maior em relação a linhagem de postura, idade ao abate entre 35-42 dias, resultando em atividade promissora e vem aumentando ano a ano, como podemos observar nos dados do IBGE, onde em 2013 o efetivo era 18.171.955 aves, passando em 2015 para 21.986.942 aves. O estado de São Paulo concentra mais da metade dessa produção, seguido pelo Espírito Santo e Minas Gerais. Esses três são responsáveis por aproximadamente 74% da produção nacional. O Rio Grande do Sul, nos últimos dois anos passou da oitava para a sétima posição, representando em torno de 2,7% da produção nacional.

As codornas europeias apresentam crescimento mais rápido que as japonesas, em todas as idades, e ambas apresentam o pico máximo de taxa de crescimento aos 27 dias, provavelmente sendo esse o período de maior deposição de proteína e água na carcaça.

Logo após esse pico de crescimento a taxa diminui e o ganho passa a ter um retorno decrescente, com aumentos da deposição de gordura em vísceras e retenção de nutrientes no ovário-oviduto. Com 35 dias de idade,

o peso das codornas de corte se aproxima de 200g, ou seja, cerca de 25 vezes o peso delas com 1 dia de idade (~8g). (SILVA, et al., 2012).

Nos últimos anos, a procura por cortes comerciais de carnes de aves e produtos pré-processados tem aumentado devido à preferência do consumidor pela praticidade. Assim, as empresas do setor avícola têm dado atenção especial à qualidade e tamanho dos cortes. No Brasil, o preço da carne de codornas de corte é elevado, tornando este produto pouco competitivo no mercado varejista em relação a outras carnes de aves, sendo mais cara do que muitos cortes sofisticados de outras espécies. Para aumentar o acesso da população à carne de codorna, será preciso investir em pesquisas que tenham o objetivo de elevar a produção nacional de codornas de corte, a fim de atingir melhorias nas linhagens atuais e em estratégias de marketing, que deixem claras todas as qualidades do produto, a fim de promovê-lo, reduzindo seu preço, aumentando sua competitividade e garantindo o seu lugar, tanto nos supermercados quanto na mesa dos brasileiros.

Em sistemas de produção da carne, o conhecimento dos fatores que determinam o crescimento e o desenvolvimento dos tecidos e do organismo são fundamentais para a adequação de programas de melhoramento, manejo nutricional, entre outros, para alterar a quantidade e a qualidade da carne produzida.

Estudos têm sido desenvolvidos buscando conhecimentos sobre o desempenho, exigências nutricionais e características da carcaça, para que os produtores possam realizar sua exploração de forma mais organizada e, com isso, tornar esta carne disponível a todos.

A alimentação das aves é responsável por 75% do custo total da produção (FREITAS et al., 2005), desempenhando um papel fundamental na criação.

Novos estudos levaram à percepção de que não só alguns nutrientes são essenciais, mas que suas quantidades específicas também são muito importantes (MUTCH et al., 2005). Portanto, é indispensável administrar rações devidamente balanceadas, capazes de satisfazer às necessidades da ave e permitir seu perfeito desenvolvimento (MURAKAMI e ARIKI, 1998). Daquela

porcentagem, cerca de 25% corresponde à proteína da dieta (FREITAS et al., 2005). Pode ocorrer danos ao desempenho das aves pelo desbalanço, antagonismo e toxidez, caso ocorra erro na dosagem de nutrientes, especialmente os aminoácidos, elevando ainda mais este percentual. (SILVA e RIBEIRO, 2001).

As exigências de proteína bruta e de energia metabolizável das codornas podem sofrer alterações pela idade, sexo, linhagem, aminoácidos na dieta entre outros (MORAES e ARIKI, 2009). Esses fatores podem influenciar de forma diferente nas várias espécies de aves, devido às características anatômicas que as mesmas apresentam, em termos de tamanho e comprimento dos órgãos do trato gastrointestinal, particularidades fisiológicas e, às vezes, hábitos alimentares (MURAKAMI e FURLAN, 2002). Também a qualidade da matéria prima, fatores anti-nutricionais, contaminações por outros grãos, fungos e bactérias certamente afetam a criação, causando prejuízos à produção animal.

As proteínas contidas na alimentação, após serem digeridas no organismo por processos conhecidos, liberam sua unidade menor que são os aminoácidos, dipeptídeos e tripeptídeos. Os aminoácidos integram a formação de músculos, enzimas, células e hormônios, mostrando que este macronutriente é de fundamental importância para o organismo.

Atualmente, a utilização de aminoácidos sintéticos permite a formulação de dietas com teores reduzidos de proteína bruta, porém sem que ocorram deficiência nem excesso de aminoácidos essenciais. Dentre os aminoácidos essenciais, a metionina se destaca, pois é o primeiro limitante para aves. Esse aminoácido sintético, ao ser incorporado em rações, pode também ser convertido em cistina (Cys) e, assim, elevar os níveis de aminoácidos sulfurados (Met + Cys) da ração (OLIVEIRA NETO et al., 2000).

Características produtivas como taxa de ganho de peso diário e composição do ganho de peso (proteína e gordura) também são influenciadas por outros mecanismos biológicos além da alimentação. Entre estes, estão os hormônios relacionados ao crescimento, como o fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I) e o receptor do hormônio do crescimento (GHR).

Ainda, a deposição proteica, obtida pelo balanço entre a síntese e a catabolismo de proteínas pelo metabolismo animal, também é responsável, em grande parte, pelo crescimento. Autores afirmam que estes dois caminhos distintos são produtos da mesma rota biológica (SACHECK et al., 2004) e que a concentração hormonal e a composição da dieta são fatores que podem determinar qual deles irá prevalecer.

A taxa de crescimento está ligada à eficiência alimentar, bem como a deposição de massa muscular. A deposição de massa é produto da síntese protéica, promovida em parte por hormônios ligados ao crescimento.

Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a expressão gênica do *IGF-I* e do *GHR* no fígado e músculo do peito, determinar o diâmetro das fibras musculares do peito e coxa de codornas de corte, avaliar qual concentração de metionina+cistina conferiu maior aumento das fibras musculares e peso corporal e se há transferência vertical dessas características para a prole, em duas gerações de seleção, alimentadas com dietas em diferentes níveis de suplementação de metionina.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Codornas

A coturnicultura tem apresentado um notório crescimento nos últimos anos, tanto para a produção de ovos quanto para a de carne. Atualmente, apresenta-se como atividade estável, rentável e com boas perspectivas de crescimento para os anos seguintes, pelas suas características de interesse como rápido crescimento da ave, precocidade de idade de postura e abate, produtividade elevada, maturidade sexual (35 a 42 dias de abate), necessidade de pequenas instalações (que acomodam um número grande de aves), longevidade em produção (14 a 18 meses), estas últimas superiores às galinhas e perus, reduzido período de incubação dos ovos (17 dias), baixo investimento inicial, pequeno consumo de ração, fácil manuseio, rápido retorno financeiro, excepcional sabor exótico da carne, responsável por iguarias finas e sofisticadas, podendo se tornar uma fonte de renda complementar dos pequenos produtores rurais.

A carne de codorna tem sido uma ótima alternativa para o consumo humano, apresentando um bom custo-benefício, em diversas partes do mundo. É escura, macia, saborosa e pode ser preparada da mesma maneira que a de frango de corte. Apresenta bons índices de proteína animal, alto valor nutritivo com vitaminas B6, niacina, B1, B2 e ácido pantotênico, é altamente palatável e apresenta baixo teor de gorduras. Também apresenta grandes concentrações de ferro, fósforo, zinco e cobre quando comparada à carne de frango. (MORAES e ARIKI, 2009).

A quantidade de colesterol da carne de codorna atinge valores intermediários (76 mg) entre a carne de peito (64 mg) e da coxa e sobrecoxa (81 mg) do frango. A maioria dos níveis dos aminoácidos encontrados na carne de codorna são superiores aos de frango. Na tabela 1 se observa a diferença da composição nutricional do peito e coxa da carne de frango e a codorna.

Tabela 1 - Composição nutricional da carne de frango (peito e coxa) e de codorna. (em 100 gramas)

Componentes	Frango		Codorna
	Peito	Coxa+sobrecoxa	Codorna
Composição do Alimento(%)			
Água (g)	69,46	65,42	69,65
Energia Meta. (Kcal/Kg)	172,0	237	192
Proteína (g)	20,85	16,69	19,63
Gordura(g)	9,25	18,34	12,05
Vitamina C (mg)	1,00	2,1	6,1
Minerais (g)	1,01	0,76	0,9
Ácido Pantotênico (mg)	0,804	0,994	0,772
Vitamina B6(mg)	0,53	0,25	0,6
vitamina B12(mg)	0,34	0,29	440
Vitamina A(ui)	83	170	73
Aminoácidos			
Triptofano(g)	0,237	0,185	0,288
Treonina (g)	0,869	0,687	0,945
Leucina(g)	1,534	1,207	1,645
Lisina(g)	1,725	1,348	1,645
Metionina(g)	0,563	0,441	0,591
Cistina(g)	0,274	0,224	0,34

Fonte: <http://yohimbe.org/nutrients>

A carne de codorna é uma boa fonte de proteína de origem animal. Na Europa as aves melhoradas atingem 260 a 280 gramas ao abate. Na França, Itália, Espanha e Grécia o consumo per capita anual de carne de codorna é de 300 gramas e especialmente na Espanha e França a produção desta carne representa, respectivamente, 0,4 e 1,4% do total de carne de aves produzida. (MORAES e ARIKI, 2000).

No Brasil, o consumo de carne de codorna é pequeno, sendo maior o consumo de ovos. Assim, grande parte da carne de codorna consumida no país origina-se de animais de descarte, como fêmeas no final de produção de ovos, o que leva o consumidor a adquirir produto de menor qualidade. Estas carcaças são de menor tamanho em comparação as carcaças de codornas tipo carne, sendo a carne endurecida, pela idade das aves, o que prejudica a imagem do produto perante os consumidores. A produção correta de codornas para o abate, ou seja, usando linhagens específicas para corte, permite ao

produtor um lucro diferenciado por se tratar de uma carne exótica e de qualidade.

Recentemente tem-se verificado um aumento na exploração da coturnicultura no Brasil, principalmente nas regiões sudeste, nordeste e sul do país. Empresas têm se incluído neste ramo de atividade atuando na produção de carne *in natura*, inclusive com perspectivas de exportação.

O desenvolvimento de material genético superior nos programas de melhoramento genético pode ser feito através de seleção e/ou cruzamento dos animais geneticamente superiores.

O Departamento de Zootecnia da UFPel, por anos e em quinze gerações sucessivas fez essa seleção, a qual era realizada pelo peso corporal aos 21 dias de idade, estimando-se parâmetros genéticos para características de interesse econômico, como peso corporal, produção, peso e massa de ovos, fertilidade e percentagem de eclosão, fazendo a seleção através de curvas de crescimento e produção de ovos, comparando metodologias como a utilização de modelos de regressão aleatória e análise unicaracterística, ambos pelo REML e uso da análise bayesiana. Igualmente, o seu desenvolvimento foi avaliado pelas características da carcaça através da alometria e análise sensorial, tecidual e bromatológica.

Com isso, plantéis de reprodução foram formados a cada geração, a partir da seleção dos animais geneticamente superiores, para formar a próxima geração.

2.2 Aminoácidos

O aminoácido é uma molécula orgânica que contém um grupo amina (NH_2) e um grupo carboxila (COOH). Os aminoácidos se unem através de ligações peptídicas, formando os peptídeos e as proteínas (CHAMPE e HARVEY, 1996).

Existem mais de 20 aminoácidos que constituem as proteínas dos animais, sendo todos considerados fisiologicamente essenciais. As aves conseguem sintetizar 10 destes 20 aminoácidos. Os outros devem ser

fornecidos através da dieta, sendo considerados aminoácidos essenciais na composição desta. São eles: metionina, triptofano, treonina, arginina, isoleucina, leucina, histidina, fenilalanina e valina. A tirosina e a cistina são consideradas como “semiessenciais”, desde que possam ser sintetizadas a partir da fenilalanina e da metionina, respectivamente. (RAVIDRAN e BRYDEN, 1999).

As dietas das aves têm como base o milho e o farelo de soja. Os três primeiros aminoácidos limitantes são metionina, lisina e treonina (nesta ordem). Os aminoácidos são classificados como limitantes quando apresentam baixa concentração na composição da dieta para permitir o crescimento máximo das aves, devendo ser suplementados pelo uso de aminoácidos sintéticos.

Interações entre aminoácidos também ocorrem e podem acarretar em deficiências, desbalanços, antagonismos e toxidez.

A deficiência de alguns aminoácidos pode resultar em um aumento do consumo alimentar para atender as necessidades diárias, tendo como consequência uma deposição desproporcional de tecido adiposo em relação à deposição muscular. Uma ligeira deficiência não irá refletir inicialmente nos resultados de ganho de peso, mas no aumento da proporção de tecido adiposo dos animais, devendo ser uma das causas apontadas como fonte de obesidade em algumas espécies, como frangos de corte, perus, patos e codornas (KLASING, 1994).

A exigência aminoácídica para as aves é influenciada pela expressão genética, densidade calórica da dieta, condições ambientais, densidade populacional, estado sanitário, etc, tornando-a de difícil definição. (ARAÚJO et al., 2001). Entretanto, estudos têm mostrado que quando se tem deficiência ou desbalanço de aminoácidos ocorrem reações variadas por parte das aves, promovendo alterações no consumo alimentar, pois o excesso de aminoácidos leva à diminuição do desempenho (TORRES et al., 2005).

2.2.1 Metionina+cistina

A metionina e a cistina são consideradas aminoácidos fisiologicamente essenciais para manutenção, crescimento e para o desenvolvimento das penas das aves (PINTO et al., 2003).

A metionina é o primeiro aminoácido limitante para codornas de corte, devido à composição dos alimentos utilizados em suas dietas e em função da grande exigência das aves por este aminoácido. Assim, essa alta exigência de metionina reforça a necessidade de suplementação deste aminoácido na dieta de codornas de corte para se alcançar o desempenho adequado. Além disto, a metionina participa não apenas na síntese proteica, mas também em outras reações metabólicas importantes para manter o desempenho adequado, como por exemplo, atuando como doador de enxofre (WU e DAVIS, 2005), participando da síntese de glutathione (PIOVACARI et al., 2008) e como doador do grupo metil, através da S-adenosilmetionina (SIMON, 1999). A S-adenosilmetionina (SAM) é um composto responsável pelas metilações essenciais para a biossíntese de uma variedade de compostos celulares, como creatina, carnitina, fosfolipídeos e proteínas (STIPANUK, 2004).

No organismo, em condições normais, a metionina pode ser catabolizada e convertida em cistina, porém esta conversão não é reversível.

Muitos estudos avaliaram a influência da suplementação de metionina (CORRÊA et al., 2006; CORRÊA et al., 2010; FERREIRA et al., 2012) sobre o desempenho de codornas de corte. Entretanto, poucos estudos foram realizados mostrando a influência da metionina ou de outros nutrientes sobre a expressão gênica.

As aves podem adaptar seus metabolismos a condições fisiológicas e ambientais que estão em constantes mudanças, e requerem respostas metabólicas coordenadas pela expressão de genes específicos na presença ou ausência de nutrientes apropriados (AVEROUS et al., 2003). A ação dos aminoácidos neste processo tem se tornado tema de pesquisas recentes, sendo que uma das ações dos aminoácidos na regulação da expressão gênica ocorre diretamente através da modulação do mRNA, com efeito sobre proteínas e fatores de tradução (KIMBALL e JEFFERSON, 2004).

2.3 RNA

O melhoramento genético, nas últimas décadas, vem proporcionando grande melhora no desempenho das aves (HARVENSTEIN et al., 2003).

As restrições de nutrientes na dieta materna, causam grande impacto na metilação do DNA de genes importantes ou regiões gênicas durante o desenvolvimento fetal, resultando em um efeito a longo prazo. Essa regulação é conhecida como Epigenética, ou seja, mudanças na expressão de genes que ocorrem sem alteração na sequência de DNA. (BIDLACK e RODRIGUEZ, 2012).

Na produção animal, características de interesse como eficiência alimentar e reprodutiva, são expressas em função da genética, do ambiente e também em função da interação entre estes dois fatores. Características produtivas, como taxa de ganho de peso diário e composição do ganho de peso (proteína e gordura) são influenciadas por diversos mecanismos biológicos. Entre estes, estão os hormônios relacionados ao crescimento, tais como o fator de crescimento semelhante a insulina I (IGF-I) e o receptor do hormônio do crescimento (GHR), bem como a alimentação fornecida para as aves. O crescimento é devido em grande parte à deposição proteica. Esta, por sua vez, é dada por um balanço entre a síntese e catabolismo de proteína pelo metabolismo animal. Autores afirmam que estes dois caminhos distintos são produtos da mesma rota biológica e que a concentração hormonal e a composição da dieta são fatores que podem determinar qual destes irá prevalecer. (SACHECK et al., 2004)

Os genes são conhecidamente importantes na produção de substâncias funcionais, como o IGF-I e GH, que atuam diretamente no metabolismo e no crescimento das aves. O crescimento das aves é dado pela ação do eixo somatotrófico, com ação principal do hormônio do crescimento (GH). A atividade do GH é causada por sua ligação ao GHR, seguido pela ativação de gene nuclear específico para codificação de IGF-I. O IGF-I liberado na circulação sanguínea se liga ao receptor específico chamado de IGF tipo-1,

desempenhando papéis cruciais na proliferação, diferenciação e transformação em uma variedade de tecidos (VAN VUGHT et al., 2008).

As células somatotróficas da hipófise são responsáveis pela produção do GH e sua síntese é estimulada pela ligação entre o hormônio liberador de GH (GHRH), sintetizado pelo hipotálamo, e seu receptor (GHRHR) (MARTINELLI JÚNIOR et al., 2002). O IGF-I é uma proteína de estrutura semelhante a insulina, sendo sintetizado no fígado em maior quantidade e em menor quantidade em outros tecidos (SCHWANDER et al., 1983), podendo sofrer influência da dieta, tanto por sinais transcricionais quanto tradução.

Com relação ao GHR, é um importante regulador do crescimento e da composição corporal e seus efeitos são promovidos através da estimulação da síntese e liberação do IGF-I. O GHR, por sua vez, é uma proteína integral de membrana de 620 aminoácidos (VAN VUGHT et al., 2008).

O IGF-I possui um importante papel na taxa de crescimento corporal de aves, e quanto menor o seu nível encontrado, pior será o crescimento corporal (SCANES et al., 2009). Tem-se observado maior síntese e menor degradação protéica em aves com maior nível de IGF-I plasmático, o que resulta em maior deposição de músculo esquelético (COLON e KITA, 2002). Muitos autores tem mostrado relação entre administração de aminoácidos, como a metionina, e a secreção de GH (GROSCHL et al., 2003; COLLIER et al., 2005), e ainda, que o desempenho mediado pela ação do IGF-I também pode ser influenciado pela suplementação da metionina, já que estudos mostram que aves recebendo dieta deficiente em metionina apresentaram menor crescimento (CAREW et al., 2003).

Pode-se convir que existe a hipótese de que a expressão de IGF-I mediada pelo GH pode ser afetada pela quantidade de metionina na dieta. Através da medida da expressão de GHR pode-se avaliar se este receptor é importante no sistema de ação GH/IGF-I sobre o crescimento, devendo haver a ligação GH-GHR para estimular diversas rotas de sinalização, entre estas, a de síntese e a liberação do IGF-I. A inclusão de metionina na dieta pode levar a deposição protéica, por estimular a síntese de proteína corpórea, via indução de maiores quantidades de IGF-I e de GH.

Apesar de ainda não estar bem esclarecido como que as mudanças na suplementação de aminoácidos possam iniciar alteração na expressão de genes como GH e IGF-I, por exemplo, sugere-se que a atividade da mTOR (alvo da rapamicina de mamíferos), enzima envolvida na regulação da síntese proteica, possa mediar tal ocorrência (STUBBS et al., 2002).

A técnica de transcrição reversa seguida pela PCR em tempo real (qRT-PCR) é um dos métodos utilizados para análise da expressão gênica. Esta técnica é considerada altamente sensível, permitindo que até mesmo pequenas diferenças na expressão de determinado gene seja observada, além de outras características positivas como resultados de quantificação rápidos e alta acurácia (PFAFFL, 2001).

Muitos estudos avaliaram a influência da suplementação de metionina (CORRÊA et al., 2006; CORRÊA et al., 2010; FERREIRA et al., 2012) sobre o desempenho de codornas de corte. Entretanto, poucos foram realizados mostrando a influência da metionina ou de outros nutrientes sobre a expressão gênica. O estudo da influência de níveis de metionina na dieta de aves sobre a expressão de genes envolvidos no crescimento pode auxiliar a explicar diferenças obtidas no desempenho, em função das modificações ocorridas devido a mudanças fisiológicas a nível celular ou molecular.

2.4 Músculo

A musculatura das aves quando transformada em carne no *período post mortem* constitui importante fonte de proteína de alta qualidade para a alimentação e nutrição humana.

Quanto à composição dos músculos dos animais domésticos é correto afirmar que há variabilidade de acordo com alguns caracteres, como a espécie do animal, a plasticidade morfológica (raça) dentro da espécie, gênero (machos apresentam maior número de fibras musculares que as fêmeas, o que confere maior ganho de peso diário), maturidade, localização no corpo, atividade física e plano nutricional. Esta última é a mais significativa, ditando a deposição, quantidade e composição química do músculo. (REHFELDT et al., 2000).

O tecido muscular é constituído por células alongadas, chamadas de fibras musculares. Estas são envolvidas individualmente e em grupo por tecido conjuntivo (FELÍCIO, 2008). Os crescimento dos ossos e músculos devem estar associados, para permitir boa sustentação e desenvolvimento muscular (CRUZ, 2011).

A partir do arranjo de aminoácidos das proteínas contráteis, originam-se estriações transversais proeminentes (miofilamentos): os mais finos, de peso molecular menor, compostos principalmente por actina e os mais espessos, de peso molecular maior, compostos principalmente por miosina. A contração muscular se dá através da interação de deslizamento e sobreposição entre eles. A repetição destas duas unidades, actina e miosina, é denominada sarcômero, que é a unidade funcional e pode ter seu comprimento variável (PARDI et al., 2005).

Para o entendimento do desenvolvimento muscular, é fundamental estudar os mecanismos que regulam o número, o tipo e o tamanho das fibras musculares, relacionados a vários fatores que interferem no desenvolvimento muscular nos períodos pré e pós-natal (DAUNCEY e GILMOUR, 1996), como os fatores intrínsecos (genética, fatores reguladores de crescimento, ativadores de transcrição, status endócrino, proteinases musculares e inervação) e os ambientais (dieta e temperatura ambiente), a atividade motora, os agentes repartidores de nutrientes, a idade, o sexo, as doenças, o tipo de músculo e a localização das fibras no músculo (GONZALES e SARTORI, 2002). O processo de maturação das fibras musculares pós-eclosão em frangos de corte é bastante rápido e alterações na ingestão de alimento reduzem a atividade das células satélites e podem influenciar de forma irreversível a maturação das fibras musculares (HALEVY et al., 2000).

O desenvolvimento do músculo esquelético é definido como miogênese e acontece em períodos distintos. O que ocorre ainda na fase embrionária é denominado hiperplasia, que é a multiplicação das fibras musculares. Neste período há o estabelecimento do número de fibras musculares (MOSS, 1968).

Depois do nascimento o número de fibras permanece inalterado e se tem início o segundo período de crescimento, chamado de hipertrofia, que é o

aumento do tamanho das fibras musculares, principalmente por acréscimo de proteína e núcleos originados da proliferação e fusão de células satélites. (CHRIST e BRAND DABERI, 2002). Dessa forma, o incremento da massa muscular ocorre pela hipertrofia das fibras musculares (BERRI et al. 2007).

A Hipertrofia ocorre primeiramente no sentido logitudinal da fibra muscular, com o aumento do número de sarcômeros. Após, começa o aumento do diâmetro da célula pela deposição de proteínas miofibrilares.

O desenvolvimento muscular ocorre de maneira disto-proximal, se iniciando nas extremidades e seguindo a ordem: tronco, pescoço, abdome e espinhais. Os músculos da perna possuem uma velocidade de crescimento muscular maior que o resto da musculatura. Existe uma isometria entre os músculos do pescoço e tórax em relação ao resto da musculatura. Os músculos das extremidades apresentam desenvolvimento precoce, já os espinhais possuem desenvolvimento tardio.

Nas aves, assim como em mamíferos, as fibras musculares podem ser identificadas com base nas suas características metabólicas e contráteis, em três tipos: tipo I – de contração lenta e oxidativa (SO); tipo IIA – de contração rápida e oxidativa-glicolítica (FOG); e tipo IIB – de contração rápida e glicolítica (FG) (BANKS, 1992). O músculo *Pectoralis* dos galináceos é composto quase exclusivamente destas últimas (ONO et al., 1993). O aumento do tamanho do peito deve-se principalmente ao aumento na espessura do músculo esquelético, especialmente o *Pectoralis major* (LUBRITZ, 1997).

Aproximadamente 30 a 40% do peso vivo animal consiste de músculos esqueléticos (PEARSON e YOUNG, 1989). Entre esses músculos, destacam-se o vermelho, constituído predominantemente por fibras oxidativas, e o branco, formado predominantemente por fibras glicolíticas (BANKS, 1992).

Fatores genéticos e nutricionais limitam o tamanho da fibra muscular e irão determinar a capacidade do músculo sintetizar proteínas musculares. (BRIDI et al, 2009).

O melhoramento genético feito através da seleção fenotípica em várias gerações em animais produtores de carne origina linhagens altamente musculares, tendo como característica de interesse a seleção das aves pelo

rápido crescimento e rendimento do peito, gerando consideráveis incrementos no ganho dessas duas variáveis, além da melhora na conversão alimentar. Quanto maior for a eficiência de “turnover” protéico, maior a deposição muscular. (TESSERAUD, et al., 2000). A seleção genética visa aumentar a velocidade de ganho de peso e da massa muscular, proporcionando aumento tanto no número como no tamanho das fibras musculares, influenciando o processo de proliferação dos mioblastos e na taxa de proliferação das células satélites musculares. (SCHEUERMANN, 2004).

A deposição proteica depende da suplementação de aminoácidos e da quantidade e qualidade da proteína dietética (CARVALHO et al., 2009). Fatores que podem influenciar o crescimento muscular são o nível dietético de aminoácidos e o nível energético da ração. (ENYG et al., 2013).

Quando se tem um balanço adequado dos aminoácidos na dieta, pode-se otimizar a maturação das fibras musculares. Com isso ocorre uma melhora na produção de carne (TESSERAUD et al., 2008).

A ênfase do estudo no músculo esquelético dar-se-á pela sua importância na alimentação humana, quando transformado em carne (SCHEUERMANN et al., 2003).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local e período experimental

O estudo de campo foi conduzido no Laboratório de Ensino e Experimentação Zootécnica Prof. Dr. Renato Rodrigues Peixoto/ Departamento de Zootecnia/ Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, pertencente a Embrapa-ETB, no município de Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil, no paralelo 31°45'48"Sul e no meridiano 52°29'02" Oeste de Greenwich, sendo aprovado pelo comitê de ética (CCEA 2618-2014).

Para a formação da décima quarta e décima quinta gerações utilizadas no experimento, os acasalamentos foram de duas fêmeas com um macho, sob controle de pedigree. Foram selecionados 60 machos e 120 fêmeas para a formação das gerações seguintes. Os períodos de acasalamento e coleta de ovos foram de 15 dias, incubados em seguida no aviário do Instituto Federal Sul-Riograndense (IF-Sul). Foram utilizadas duas gerações (G1 e G2) de matrizes fêmeas de codornas dos 22 aos 42 dias de idade. Para cada geração foram selecionadas 300 codornas, criadas em pinteiro até 21 dias de idade. Aos 22 dias foram alojadas em baterias experimentais e criadas sob iguais condições até completarem 42 dias de idade.

O estudo da extração do RNA foi realizado no Laboratório de Fisiologia da Universidade Federal de Pelotas e o estudo da morfometria realizado no Laboratório de Histologia da Universidade Federal de Rio Grande.

O estudo iniciou em março de 2013 com a incubação e seleção das aves para a primeira geração, estendendo-se até julho de 2015, totalizando 17 meses de período experimental.

3.2 Instalações e equipamentos

O sistema de criação utilizado foi em piso do 1º ao 21º dia. A cama foi de maravalha, a qual apresentou textura não muito grosseira, mas também não muito fina que pudesse apresentar formação de pó ou poeira, com capacidade de absorver e desprender com facilidade a umidade das excreções das aves, livre de resíduos tóxicos, material estranho ou contaminações microbiológicas.

Sobre a cama foi colocado um tecido que permitiu às codornas caminharem tranquilamente. A falta desta forração causa desconforto e as aves não conseguem bom desenvolvimento se criadas diretamente sobre a cama. Alguns criadores já tiveram maus resultados em lotes que não foram criados nessas condições recomendadas, inclusive com elevada mortalidade. O cuidado com esta forração é de que a mesma não deva permanecer por muito tempo, no máximo uma semana, pois certamente irá causar problemas de contaminação. O forro de tecido apresenta ainda a desvantagem de molhar-se com a água dos bebedouros. O manejo da cama é importante para as semanas subsequentes e estará diretamente relacionado ao desempenho produtivo das aves.

Os bebedouros utilizados foram os do tipo copos de pressão na proporção de 1 bebedouro para 200 codornas de corte nos 15 dias iniciais. Após este período foram trocados por bebedouros tipo pendular, na mesma proporção. Este manejo foi realizado nas duas gerações.

Ao abrigar a segunda geração das codornas, as instalações e equipamentos foram submetidos à limpeza e desinfecção. Foi retirada toda a cama que foi utilizada pelo lote anterior. A seguir fez-se a varredura de todo piso. Depois, já com a instalação toda limpa, fez-se a lavagem com água sob pressão do piso, telhado, paredes e telas. A importância desta limpeza está na retirada total de resíduos de matéria orgânica, já que os produtos químicos usados na desinfecção não atuam sobre a mesma.

Após o vazio sanitário de 12 dias, nova cama foi distribuída e uniformizada sobre o piso, 2 dias antes da chegada do lote, com altura mínima entre 5 e 6 cm.

A temperatura foi monitorada nos primeiros 21 dias de idade com auxílio de um termômetro, visando o bem-estar das aves. Para o aquecimento utilizou-se campânula a gás, devido ao fato de que fontes de aquecimento elétricas, em regiões rurais, não são recomendados pela ocorrência casual de falta de energia elétrica.

Com 22 dias de idade as aves foram transferidas e alojadas em baterias experimentais (2x1 m). Foram utilizados 40 boxes em ambas as gerações. Os comedouros eram tipo calha e os bebedouros tipo *nipple*. Durante a realização da pesquisa foi adotado um foto-período de 16 horas de luz diária, com a utilização de um relógio *timer*. A quantidade de iluminação artificial utilizada deve ser cuidada, pois o seu uso indevido dos 21 aos 35 dias estimula a produção de hormônios responsáveis pelo amadurecimento sexual, fazendo com que as fêmeas venham a iniciar a produção de ovos mais cedo, o que não seria desejado, pois poderiam ocorrer problemas de prolapso de oviduto, causando mortalidade nestas aves.



Figura 1: Baterias experimentais

3.3 Seleção das aves

As aves foram selecionadas aleatoriamente aos 22 dias de idade. Antes de ser iniciado o experimento, as aves foram pesadas individualmente e distribuídas ao acaso nas gaiolas experimentais. Esta pesagem teve como objetivo o acompanhamento do peso corporal das codornas por tratamento a cada ciclo experimental.

3.4 Delineamento experimental e tratamentos

O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado, dividido em duas etapas. A primeira (G1), com três tratamentos de cinco repetições cada, onde o primeiro tratamento (G1T1) refere-se à dieta basal (controle), sem adição de metionina industrial, fornecendo um teor de metionina+cistina digestível de 0,67% aos animais. O segundo (G1T2) teve a inclusão de DL-metionina, atendendo às exigências da espécie nesta fase, cuja suplementação forneceu 0,84% de metionina-cistina digestível; e o terceiro (G1T3), instituído com 20% a mais de suplementação de metionina, com um total de 1,04% de metionina+cistina.

A segunda etapa (G2) contou com cinco tratamentos de cinco repetições cada, onde o primeiro tratamento (G2T1) foi composto por filhas da G1T1 recebendo a dieta basal; o segundo (G2T2) consistiu de filhas da G1T2 com suplementação de metionina atendendo as exigências da espécie; o terceiro (G2T3) de filhas da G1T3 recebendo 20% a mais de suplementação de metionina; o quarto (G2T4) composto por filhas da G1T2 recebendo a dieta basal e o quinto (G2T5) de filhas da G1T3, recebendo também a dieta basal.

3.5 Abate das aves

O abate aconteceu no abatedouro do campus Visconde da Graça/IFSUL.

As aves foram submetidas a um jejum de 6 horas. Após foram penduradas através do metatarso em suporte próprio para a espécie, submetidas a insensibilização, que foi realizada através de eletronarcose, sendo usado corrente elétrica entre 30 e 45 V com frequência de 60 Hz, por 10 segundos.

A sangria mecânica com lâmina cortante foi realizada no máximo 2 segundos após insensibilização. Foi respeitado o tempo de três minutos para

que ocorresse a completa sangria. Após este tempo as aves foram submetidas à coleta de material.

3.6 Coleta do material

3.6.1 Coleta de fígado e músculo do peito para expressão gênica

Amostras do músculo peitoral (*Pectoralis superficialis*) e amostras do fígado das aves foram coletadas e acondicionadas adequadamente em RNAlater® (Qiagen, USA) à -20°C até o momento da extração de RNA. Destes oito animais, apenas quatro de cada tratamento serão utilizados para as análises de expressão gênica.

3.6.2 Coleta do músculo do peito e da coxa para análise morfométrica

Amostras do músculo da coxa e peito de 10 aves em cada tratamento foram coletadas e acondicionadas no formol 10% por 12 horas.



Figura 2 : Coleta do músculo do peito e coxa

Após foram lavadas com álcool 70% por 3 vezes consecutivas, para posterior armazenamento em álcool do mesmo tipo. Finalizados esses procedimentos, as amostras foram encaminhadas para o Laboratório de

Técnicas Histológicas da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) para posterior análise.



Figura 3. Armazenamento do fígado e músculo do peito para extração do RNA



Figura 4. Armazenamento do músculo do peito e da coxa para análise morfométricas

3.7 Manejo alimentar

3.7.1 Dietas experimentais

As dietas experimentais foram formuladas segundo as necessidades nutricionais de manutenção e de produção da linhagem em estudo e em cada fase do desenvolvimento. As rações isonutritivas foram formuladas de acordo com Rostagno et al. (2011), com exceção dos níveis de metionina + cistina.

Todas as dietas foram à base de milho e farelo de soja, com 20% de proteína bruta, 2.900 kcal de EM/kg de ração e variando-se apenas os níveis de metionina, atendendo às exigências das aves.

Tabela 1. Composição das dietas experimentais nos três tratamentos, para codornas de corte na fase de crescimento.

Níveis de Metionina(%)	T1	T2	T3
Composição do Alimento(%)			
DL-Metionina.	00,00	00,17	00,37
Milho	53,00	53,00	53,00
Farelo de Soja	37,82	37,60	37,36
Núcleo MIG PLUS ¹	05,00	05,00	05,00
Óleo de Soja	02,43	02,43	02,43
Inerte	00,35	00,40	00,52
Fosfato Bicalcico	01,10	01,10	01,10
Sal Comum	00,00	00,00	00,00
L-Treonina	00,10	00,10	00,10
L-Lisina	00,08	00,08	00,08
Calcário	00,00	00,00	00,00
Total	100	100	100
Composição Nutricional			
Proteína Bruta (%)	22,00	22,00	22,00
Energia Meta. (Kcal/Kg)	2900	2900	2900
Isoleucina Dig. (%)	0,86	0,86	0,86
Leucina Dig. (%)	1,72	1,72	1,72
Met+Cistina Dig. (%)	0,59	0,59	0,59
Metionina Dig. (%)	0,30	0,47	0,67
Treonina Dig. (%)	0,82	0,82	0,82
Triptofano Dig. (%)	0,25	0,25	0,25
Valina Dig. (%)	1,01	1,01	1,01
Sódio (%)	0,19	0,19	0,19
Potássio (%)	1,15	1,15	1,15
Cálcio (%)	0,85	0,85	0,85
Fósforo Disponível(%)	0,31	0,31	0,31

¹ Composição/kg do produto: Ácido Fólico 16, mg; Ácido pantotênico 200mg; bacitracina de zinco 600mg; Biotina 1,4mg; Cálcio 150-200g; Cobalto 3mg; Cobre 240mg; Colina 30g; Ferro 1000mg; Fósforo 45g; Iodo 28mg; Manganês 1400mg; Metionina 10g; Niacina 840mg; Selênio 3mg; Sódio 30g; Vitamina A 200.000 UI; Vitamina B1 40mg; Vitamina B12 430mg; Vitamina B2 120mg; Vitamina B6 55mg; Vitamina D3 42.000UI; Vitamina E 540 UI; Vitamina K3 50 mg; Zinco 1.800 mg; Dig= Digestível; Meta= metabolizável; Met-=Metionina

Como o experimento contou com duas fases (duas gerações), na fase de postura da primeira geração foi dada continuidade aos tratamentos, porém atendendo às exigências nessa fase, onde machos e fêmeas receberam o mesmo tratamento e foram cruzados para a obtenção da segunda geração.

Tabela 2. Composição das dietas experimentais nos três tratamentos, para codornas de corte na fase de postura

Níveis de Metionina(%)	T1	T2	T3
Composição do Alimento(%)			
DL-Metionina.	00,00	00,27	00,47
Milho	50,00	50,00	50,00
Farelo de Soja	39,00	38,55	38,40
Núcleo MIG PLUS ¹	05,00	05,00	05,00
Óleo de Soja	02,30	02,30	02,20
Inerte	00,18	00,36	00,41
Fosfato Bicalcico	01,06	01,06	01,06
Sal Comum	00,00	00,00	00,00
L-Treonina	00,00	00,00	00,00
L-Lisina	00,00	00,00	00,00
Calcário	02,45	00,00	00,00
Total	100	100	100
Composição Nutricional			
Proteína Bruta (%)	22,00	22,00	22,00
Energia Meta. (Kcal/Kg)	2800	2803	2800
Isoleucina Dig. (%)	0,87	0,86	0,86
Leucina Dig. (%)	1,74	1,72	1,72
Met+Cistina Dig. (%)	0,60	0,85	1,05
Metionina Dig. (%)	0,31	0,57	0,77
Treonina Dig. (%)	0,75	0,74	0,74
Triptofano Dig. (%)	0,25	0,25	0,25
Valina Dig. (%)	0,91	0,90	0,90
Sódio (%)	0,19	0,19	0,19
Lisina Dig(%)	1,08	1,07	1,07
Cálcio (%)	2,09	2,09	2,09
Fósforo Disponível(%)	0,31	0,31	0,31

¹ Composição/kg do produto: Ácido Fólico 16, mg; Ácido pantotênico 200mg; bacitracina de zinco 600mg; Biotina 1,4mg; Cálcio 150-200g; Cobalto 3mg; Cobre 240mg; Colina 30g; Ferro 1000mg; Fósforo 45g; Iodo 28mg; Manganês 1400mg; Metionina 10g; Niacina 840mg; Selênio 3mg; Sódio 30g; Vitamina A 200.000 UI; Vitamina B1 40mg; Vitamina B12 430mg; Vitamina B2 120mg; Vitamina B6 55mg; Vitamina D3 42.000UI; Vitamina E 540 UI; Vitamina K3 50 mg; Zinco 1.800 mg; Dig= Digestível; Meta= metabolizável; Met-=Metionina

3.7.2 Preparo da ração e arraçoamento

Os ingredientes de cada uma das dietas experimentais foram pesados em balança digital com sensibilidade de 2g e capacidade máxima de 20kg. Após, foram misturados em um misturador tipo Y, durante 12 minutos.

As rações foram acondicionadas em baldes plásticos, identificadas com os tratamentos e estocadas no interior do aviário.

A ração foi fornecida diariamente, à vontade, às oito horas da manhã e às cinco horas da tarde, com o auxílio de um recipiente que continha a medida de 50g, sendo que o fornecimento de ração variava de acordo com o consumo do dia anterior, caso houvesse sobra no comedouro. A quantidade de ração distribuída em cada bateria foi registrada, diariamente, em fichas de controle de arraçoamento do ciclo. Já as sobras de ração foram registradas ao final de cada ciclo experimental.

3.8 Variáveis analisadas

3.8.1 Consumo de ração

O consumo de ração foi calculado a partir da quantidade de ração fornecida diariamente por bateria e pelas sobras de ração coletadas ao final de cada etapa, as quais foram pesadas e o montante foi subtraído da quantidade total de ração fornecida a cada bateria, através da fórmula:

$CTR = TRF - S$, onde:

CTR: consumo total de ração (g)

TRF: total de ração fornecido, durante o ciclo experimental;

S: sobras de ração (g) recolhidas de cada bateria, no final do ciclo experimental.

3.8.2 Peso corporal

As aves foram pesadas individualmente no início do período e no final da fase experimental nas duas gerações. Para a pesagem das aves foi utilizada uma balança digital com sensibilidade de 0,5g e capacidade máxima de 2 kg.

3.9 Expressão Gênica

3.9.1 Extração do RNA

O RNA total foi extraído com uso do reagente Trizol® (Invitrogen, Carlsbad CA, USA), na proporção de 1 mL para cada 100 mg de tecido. Todos os materiais utilizados foram previamente tratados com inibidor de RNase - RNase AWAY® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

O tecido foi triturado (tecido+trizol) com homogenizador elétrico Pro-scientific (Bio-Gen Series Pro 29) até a completa dissociação. Logo após, foram adicionados 300 uL de clorofórmio e homogeneizados por inversão, por 1 minuto.

As amostras foram, então, centrifugadas por 15 minutos à 12.000 rpm /4°C. A fase líquida foi coletada e transferida para um tubo limpo, com adição de 500 uL de isopropanol em cada tubo. As amostras foram homogeneizadas por inversão e centrifugadas por 15 minutos à 12.000 rpm/4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado em 100 uL de etanol a 75%. O material foi centrifugado novamente a 7.500 rpm por 5 minutos e o sobrenadante descartado. O pelet foi seco por 5 minutos e a seguir suspenso em 35 uL de água ultrapura livre de RNase.

A concentração total de RNA foi mensurada usando um espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm e a pureza medida pela razão 260/280 nm. A integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio e visualizado em luz ultravioleta.

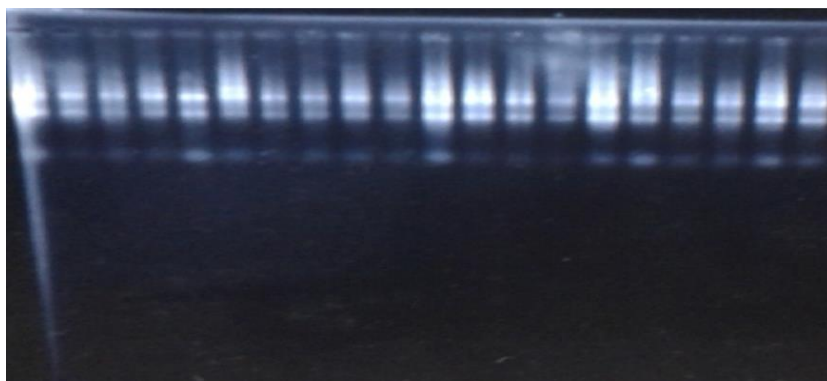


Figura 5. Integridade do RNA em luz ultravioleta

3.9.2 Síntese do cDNA

Para síntese do cDNA, foi utilizado o kit SuperScript™ III First-Strand Syntesis Super Mix (Invitrogen Corporation, Brasil) de acordo com as normas do fabricante. Em tubo estéril e livre de RNA, foram adicionados 6 uL de RNA total, 1uL de oligo (dT) (50uM oligo(dT)20 e 1uL de tampão de anelamento. A reação foi incubada por 5 minutos a 65°C e então colocada no gelo por 1 minuto. Foram adicionados a seguir 10 uL de solução 2x First-Strand Reaction Mix e 2 uL de solução contendo a enzima transcriptase reversa SuperScript III e inibidor de RNase.

A solução foi incubada inicialmente a 50°C por 50 minutos, para que ocorresse a síntese do DNA complementar, em seguida a 85°C por 5 minutos e imediatamente colocados sob o gelo. As amostras foram armazenadas a -20°C.

As análises de PCR em tempo real foram realizadas em equipamento Bio-Rad CFX Real-Time Thermocycler (Hercules, CA, USA) utilizando o fluoróforo SYBR® Green (Invitrogen).

Os *primers* utilizados nas reações foram desenhados pelo programa Perl primer v1.1.21 de acordo com as sequências dos genes *GHR* e *IGF-I* depositados no site www.ncbi.nlm.nih.gov. Para controle endógeno foi usado o gene β -actina.

As reações de PCR foram realizadas em triplicata, a partir da mesma amostra, contendo, cada uma delas, um volume total de 20 μ L. As condições de ciclagem foram: renaturação das amostras por 2 minutos a 50°C e ativação da enzima Taq Polymerase por 10 minutos a 95°C. Após, foram feitos 40 ciclos contendo três etapas (95°C por 30s, 60°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto) e, por fim, a 72°C por 5 minutos.

Os *primers* (Tab.3) para os genes do fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I) e para o receptor do hormônio do crescimento (GHR) mostraram-se específicos e eficientes para as análises de PCR em tempo real realizadas neste trabalho. A β -actina, utilizada como controle basal neste

estudo, não mostrou diferença estatística entre os tratamentos estudados, comprovando a eficiência de seu uso na reação.

Tabela 3 -Primers dos genes *GHR* e *IGF-I* e β -actina utilizados nas reações de qRT-PCR

Gene	Amplicom(pb)	Temperatura de anelamento(C°)	Sequencia dos <i>primers</i> (5'-3')
<i>ACTINA</i>	73	60	F:GCCCTCTTCCAGCCATCTTT
			R:TCATTGTGCTAGGTGCCAGG
<i>GHR</i>	76	60	F:CAAGATTACATCGCCGTGG
			R:CAACACTGTTATTGTCATCTTCTC
<i>IGF-1</i>	67	60	F:CCACCTAAATCTGCACGCT
			R:TGTTTCCTGTGTTCCCTCTACT

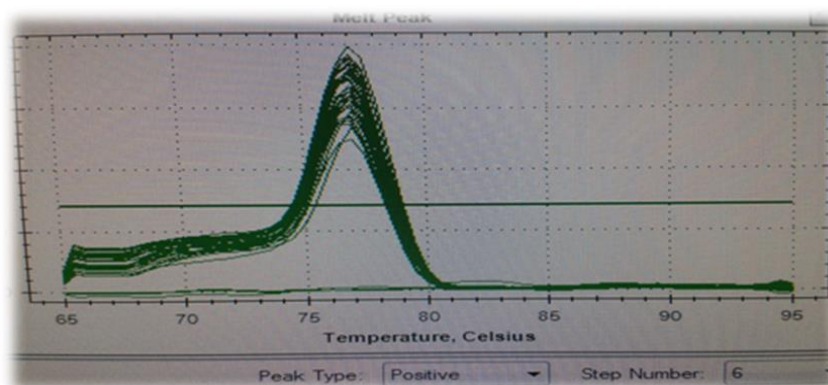


Figura 6. IGF-1-Fígado

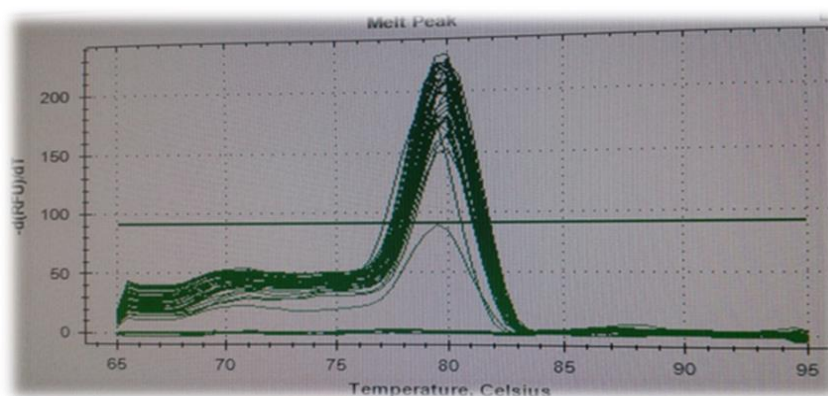


Figura 7. GHR- Fígado

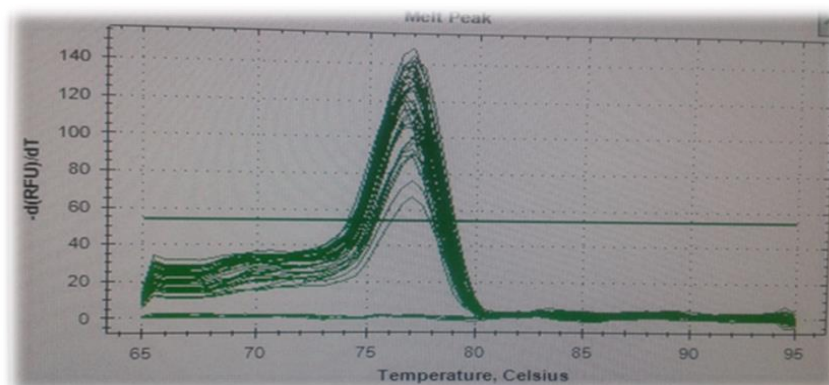


Figura 8. IGF-I- Músculo

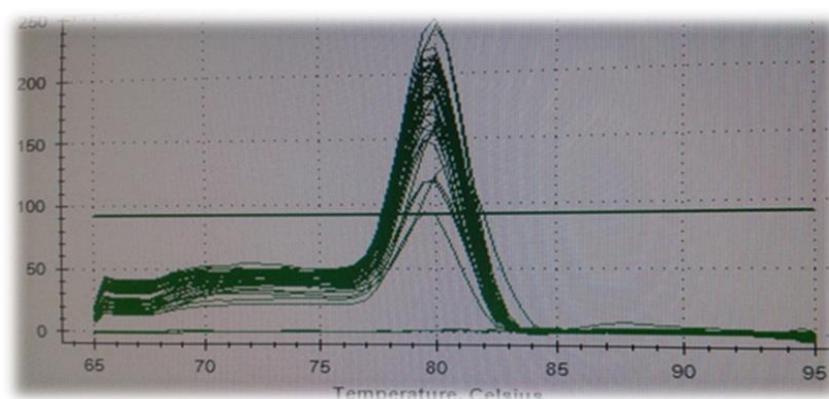


Figura 9. GHR – Músculo

3.10 Análise Morfométrica

As amostras de aproximadamente 1cm² foram transportadas até o Laboratório de Técnicas Histológicas da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), onde os músculos de peito e coxa foram retirados do álcool e submetidos a cortes, com bisturi cirúrgico, na região central do corte desses tecidos, da face mais externa para a mais interna, formando pequenos blocos de aproximadamente 2mm de espessura.

Iniciou-se, com o equipamento Leica® ASP 2005, a inclusão desses blocos em uma série ascendente de álcoois a 70, 80 e 90% de concentração de álcool e álcool absoluto por um período de 24 horas. Após, os blocos foram mergulhados durante 20 minutos em xilol, e banhados três vezes em paraplast® para fazer a inclusão e corte no micrótomo Leica® RM2255 a

posteriori. Os cortes foram feitos transversalmente à fibra muscular, com espessura de 6µm.

Passado este processo, foram realizados procedimentos de coloração com hematoxilina Reagen® e eosina Vetec® (H&E), que consistiu, *a anteriori*, da hidratação gradual das peças para desparafinação até serem coradas com H&E de fato. Para a análise histomorfométrica utilizou-se: um microscópio Olympus BX51; câmera de captura DP72 Olympus pró-series, com o qual se obteve imagens das lâminas no aumento de 400x; programa ImageJ (licença livre) como analisador de imagens para medida do tamanho da área absoluta das fibras musculares.

O diâmetro da fibra muscular é feito traçando uma linha reta que passa pelo centro da fibra e tendo o menor valor possível. Ou seja, se uma fibra estiver com orientação oval no corte, se traça a menor linha possível que corte a fibra ao meio passando pelo centro.

3.11 Análise estatística

3.11.1 Expressão Gênica

Para análise da expressão gênica a quantificação relativa da expressão diferencial (QR) foi calculada utilizando o método de comparação de CT (comparative threshold cycle method) (Livack e Schmittgen, 2001), utilizando-se a equação $QR = 2^{-\Delta\Delta Ct}$.

O método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ foi utilizado para as análises onde as diferenças entre os grupos foram testadas usando o teste t-Student para dados não pareados (SAS, 2000). Todos os dados foram expressos na forma de média±DP, considerando-se diferenças significativas para valores de $P < 0,05$.

3.11.2 Análise Morfométrica

A análise de variância dos dados foi realizada através do procedimento GLM (“general linear models”), utilizando o programa Statistic Analysis Sistem

(SAS, 2000). As médias foram contrastadas pelo teste DMS Fischer, ao nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Expressão Genica

Neste estudo observou-se que no terceiro tratamento, onde as duas gerações receberam metionina além da exigência nutricional para esta fase, a expressão gênica não diferiu dos outros tratamentos. Porém, no quinto tratamento, onde apenas a primeira geração recebeu maior suplementação houve uma expressão significativamente maior do *GHR* tanto no músculo como no fígado e também do *IGF-1* no músculo (Tab.1).

O *IGF-1* no fígado no tratamento quatro, onde as aves receberam conforme as exigências somente na primeira geração, também apresentou maior expressão gênica comparado com o tratamento dois que era o seu controle, onde as aves receberam a suplementação da metionina conforme as exigências nas duas gerações. Este resultado complementa a afirmação de Ferreira *et al.* (2012), que observaram redução do consumo alimentar a partir do nível 0,96% de suplementação de metionina, devido ao fato de que a metionina em excesso torna-se tóxica para as aves. A metionina tem sido relatada como o aminoácido mais tóxico para aves quando ingerido em excesso (GRIMINGER e FISHER, 1968). Grande concentração de metionina causa a diminuição do crescimento e da ingestão da dieta a níveis de três a quatro vezes abaixo do exigido. Seu excesso sofre oxidação que resulta na produção do sulfato, levando a uma acidose metabólica. A acidose interfere negativamente na ativação da vitamina D3, o que pode contribuir para uma variedade de problemas nas aves, como baixa mineralização óssea e diminuição da espessura da casca (KLASING, 1998).

O *IGF-I* é sintetizado no fígado, podendo sofrer influência da dieta (SCHWANDER et al., 1983). Uma hipótese em discussão é de que a expressão de *IGF-I* mediada pelo GH pode ser afetada pela quantidade de metionina na dieta. Há uma redução do nível do mRNA do *IGF-1* em aves sob jejum ou alimentadas com baixos níveis de energia ou proteína na dieta (LAUTERIO e SCANES, 1987). No presente estudo observou-se uma redução

da expressão de *IGF-1* no fígado, nos tratamentos onde os níveis de metionina utilizados foram menores (Tab.1).

Tabela 1. Resultados da quantificação relativa de expressão do RNA mensageiro dos genes *GRH* e *IGF-1* em tecidos de músculo e fígado de codornas de cortes, as amostras foram coletadas aos 42 dias

	T1*	T2	T3	T4	T5	Prob
GRH-M ¹	1±0b	0,35±0,32b	1,51±0,37b	0,90±0,60b	3,21±1,92a	0,0058
GRH-F ²	1±0b	0,35±0,19b	0,15±0,06b	0,89±0,54b	3,29±2,61a	0,0146
IGF1-M ¹	1±0b	0,16±0,08b	1,34±1,07b	0,89±0,53b	4,14±3,21a	0,0208
IGF1-F ²	1±0b	0,48±0,12b	2,97±0,47 ^a	2,84±1,06a	3,97±1,26a	<0,0001

**Médias na mesma linha seguidas por letras diferentes diferem pelo teste de t ao nível de 0,05

*Na quantificação relativa do RNAmensageiro o Tratamento 1 tem média 1 e desvio padrão 0 ¹ Músculo ² Fígado

Ao início do experimento, houve uma boa padronização do peso corporal das aves selecionadas para cada tratamento o que pode ser verificado pela ausência de diferença estatística para o peso corporal aos 21 dias (Tab.2).

Tabela 2. Resultados para consumo alimentar e conversão alimentar dos 21 aos 42 dias de idade e peso inicial aos 21 dias em codornas de corte na primeira geração de análise nos cinco tratamentos

	T1	T2	T3	Prob
PC21(g)	147,77±18,26a	150,59±17,45a	150,03±18,19a	0,4805
Consumo(g)	30,59±1,40a	30,78±3,92a	29,72±2,36a	0,6633
CA(g/g)	4,07±0,65a	3,53±0,72a	3,66±0,64a	0,1928

*Médias na mesma linha seguidas por letras diferentes diferem pelo teste de t ao nível de 0,05;

PC(21) : Peso aos 21 dias . CA: conversão alimentar.

Alguns estudos mostram que aves recebendo dieta deficiente em metionina apresentaram menor crescimento (CAREW et al., 2003). Muitos autores têm mostrado relação entre administração de aminoácidos como a metionina e a secreção de GH (GROSCHL et al., 2003; COLLIER et al., 2005), e ainda, que o desempenho mediado pela ação do IGF-I também pode ser influenciado pela suplementação da metionina. Neste estudo, como pode-se observar na Tab.3 apesar dos tratamentos que receberam uma maior suplementação de metionina terem uma maior expressão do IGF-1, isto não interferiu significativamente no crescimento das aves. Porém, observa-se que as aves que nunca receberam metionina na dieta, tiveram um pior ganho de peso. Os resultados estão de acordo com Belo (1987) e Pinto et al. (2003) que também não observaram efeito dos aminoácidos sulfurosos sobre o peso final em codornas de postura.

A suplementação de metionina é um dos fatores modificadores do desempenho animal, como ganho de peso e eficiência alimentar (VIANA et al., 2009). Porém, conforme destacado nas Tab. 2 e 3, nos níveis estudados não foi observada diferença nas variáveis consumo alimentar e conversão alimentar. Estes resultados são corroborados com os encontrados por Corrêa et al., 2006; Corrêa et al., 2010 e por Ferreira et al., 2012, que também não encontraram influência dos níveis de metionina+cistina total em codornas de corte sobre a conversão alimentar.

Tabela 3. Resultados de ganho de peso, consumo alimentar e conversão alimentar dos 21 aos 42 dias de idade em codornas de corte, na segunda geração, nos cinco tratamentos

	T1	T2	T3	T4	T5	Prob
GP(g)	159,07±41,31a	170,34±32,99a	173,23±33,44a	177,07±40,43a	169,50±31,57a	0,0539
Consumo(g)	26,02±4,40a	27,31±4,06a	28,46±2,06a	28,28±5,68a	28,71±3,47a	0,6784
CA(g/g)	3,86±0,54a	3,34±0,60a	3,86±0,59a	3,67±0,48a	3,85±0,29a	0,2111

*Médias na mesma linha seguidas por letras diferentes diferem pelo teste de t ao nível de 0,05;

GP(g) : ganho de peso nos dias de experimento. CA: conversão alimentar

A expressão de genes envolvidos na degradação proteica pode ser reduzida não apenas por fatores de crescimento, mas também pela disponibilidade de metionina na dieta (TESSERAU et al., 2007), conforme observado nas Fig.1 e 2.

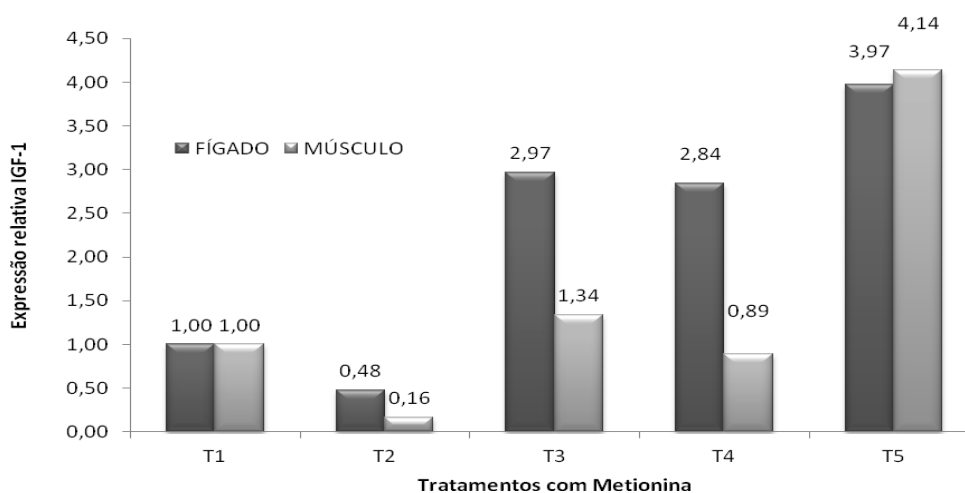


Figura 1. Quantificação relativa (QR) da expressão diferencial do gene IGF-1, em cinco tratamentos no músculo do peito e no fígado de codornas de corte. Os valores representam as médias de três repetições, cada uma com três replicatas.

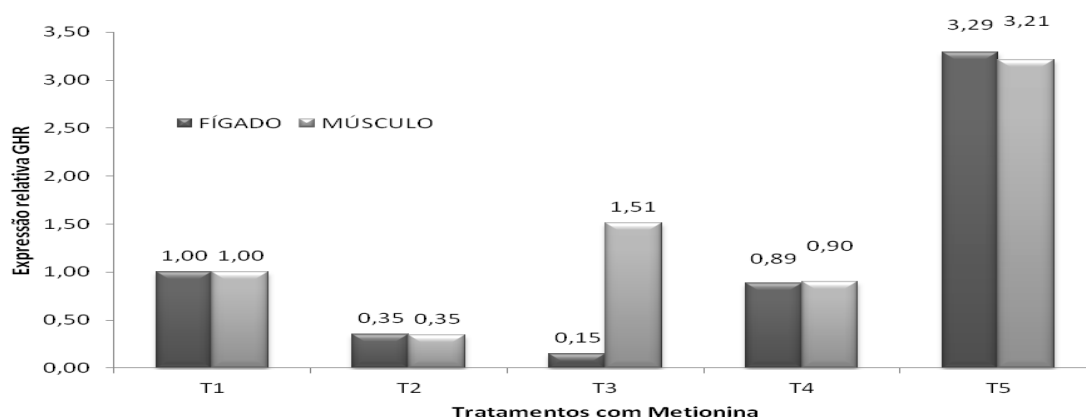


Figura 2. Quantificação relativa (QR) da expressão diferencial do gene *GHR*, em cinco tratamentos no músculo do peito e no fígado de codornas de corte. Os valores representam as médias de três repetições, cada uma com três replicatas.

4.2 Análise Morfométrica

A Tabela 4 mostra que as codornas alimentadas com uma dieta controle (0,67% de metionina+cistina), sem adição de metionina industrial e as codornas que receberam dieta com inclusão de DL-metionina mais cistina que atenderam as exigências da espécie nesta fase (0,87% metionina+cistina), mostraram um peso corporal ao abate significativamente maior do que as aves que receberam 20% a mais de suplementação de metionina na dieta (respectivamente 320,8; 331 e 301,7 gramas).

As aves, que receberam metionina a mais que as exigências na dieta na fase de postura, apresentaram menores diâmetros de fibras musculares com relação ao músculo da coxa quando comparadas aos dos outros tratamentos. Mostrando que essas aves, além de apresentarem menor peso ao abate, o que se refletiu em um menor desenvolvimento dos músculos da coxa. Portanto isso é indicativo que aves que recebem este aminoácido além das exigências da espécie podem apresentar menores pesos dos ovos e consequentemente sua prole apresentará menor peso ao nascimento, devido à correlação positiva entre tamanho da matriz, peso dos ovos para a incubação e posteriormente

peso da prole ao nascimento. Não houve diferenças significativas quanto ao diâmetro das fibras musculares do músculo do peito.

A Tabela 5 mostra que as codornas da segunda geração G2T1 e G2T2, respectivamente alimentadas com dieta basal, e dieta conforme as exigências da espécie apresentaram maiores pesos corporais que as suplementadas com 20% a mais de metionina ($P < 0,05$), sendo que não houve diferença significativa para as que não receberam suplementação na segunda geração. Isso indica que a metionina pode não ser acrescentada na dieta das aves da segunda geração quando for administrada de uma forma adequada nas poedeiras.

Quanto ao diâmetro das fibras musculares do peito, as aves que receberam suplementação além das exigências de metionina nas duas gerações tiveram pior resultado comparados aos outros tratamentos, mas não diferiram significativamente do T5, sugerindo que este adicional pode ser prejudicial no desenvolvimento das aves nas gerações seguintes.

Não houve diferenças significativas para o diâmetro das fibras musculares da coxa, porém as aves que receberam 20% a mais de metionina na dieta apresentaram menores índices também. Mais uma vez comprovando o que relataram Griminger e Fisher (1968), onde a metionina seria o aminoácido mais tóxica para aves quando ingerido em excesso e que a grande concentração de metionina causa a diminuição do crescimento e da ingestão da dieta a níveis de três a quatro vezes abaixo do exigido.

Em relação ao consumo alimentar e conversão alimentar nas duas fases de estudo, não houve diferença como se pode observar nas Tabelas 3 e 4. Ferreira et al. (2012) observaram redução do consumo alimentar a partir do nível 0,96% de suplementação de metionina, onde os autores sugerem que a metionina em excesso tornou-se tóxica para as aves.

Ferreira et al. (2010), avaliaram o desempenho de codornas de corte criadas do nascimento ao 35º dia de idade, também observaram resultado significativo para os níveis de metionina + cistina testados sobre peso final, ganho de peso e consumo alimentar, em que o máximo ganho de peso foi obtido com o nível 0,95%.

Entretanto, Pinto et al. (2003), trabalhando com níveis de 0,55 a 0,86% de metionina + cistina digestível na dieta, verificaram efeito linear positivo dos níveis testados sobre o peso no 42º dia e ganho de peso do sétimo ao 42º dia de idade, para codornas japonesas em crescimento.

Tabela 4. Efeito da dieta sobre o peso (g), o diâmetro das fibras musculares esqueléticas (µm) dos músculos do peito e da coxa, consumo e conversão alimentar de codornas abatidas na fase de postura (médias e desvio padrão)

	G2T1	G2T2	G2T3	P
PESO DA AVE(g)	320,8 ± 36,71 a	331 ± 41,7 3 a	301,7 ± 32,43 b	0,0354
DIÂMETRO PEITO	21,186 ± 2,64a	21,572 ± 3,09a	20,078 ± 2,86a	0,9634
DIÂMETRO COXA	20,717 ± 1,34 a	20,303 ± 1,90 a	18,637 ± 1,54 b	0,0213
CONSUMO(g)	30,59±1,40a	30,78±3,92 ^a	29,72±2,36a	0,6633
CA(g/g)	4,07±0,65a	3,53±0,72 ^a	3,66±0,64a	0,1928

Letras distintas na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste t (P<0,05)

Corrêa et al. (2006), trabalhando com níveis próximos aos testados no presente estudo (0,73; 0,79; 0,85; 0,91; 0,97 e 1,03% de metionina + cistina), observaram efeito linear positivo dos níveis testados sobre o ganho de peso e o consumo alimentar de codornas de corte criadas do sétimo ao 42º dia de idade o que difere do presente estudo onde o nível mais elevado indicou um pior ganho de peso.

Tabela 5. Efeito da dieta sobre o peso (g), diâmetro das fibras musculares esqueléticas (μm) dos músculos do peito e da coxa, consumo e conversão alimentar, de codornas de corte da segunda geração abatidas aos 42 dias de idade (médias e desvio padrão)

	G2T1	G2T2	G2T3	G2T4	G2T5	P
PESO DA AVE	314,2 $\pm$ 30,45 a	311,7 $\pm$ 41,45 a	283,5 $\pm$ 41,9 b	306 $\pm$ 24,47 ab	302 $\pm$ 35,87 ab	0,0445
DIÂMETRO PEITO	20,877 $\pm$ 2,89 a	21,063 $\pm$ 1,99 a	19,659 $\pm$ 1,68 b	20,745 $\pm$ 1,69 a	20,001 $\pm$ 3,09 ab	0,0367
DIÂMETRO COXA	19,939 $\pm$ 2,04 a	20,019 $\pm$ 2,84 a	18,487 $\pm$ 2,09a	19,565 $\pm$ 2,09 a	18,970 $\pm$ 2,23a	0,1254
CONSUMO(g)	26,02 $\pm$ 4,40 a	27,31 $\pm$ 4,06a	28,46 $\pm$ 2,06a	28,28 $\pm$ 5,68a	28,71 $\pm$ 3,47a	0,6784
CA(g/g)	3,86 $\pm$ 0,54a	3,34 $\pm$ 0,60a	3,86 $\pm$ 0,59a	3,67 $\pm$ 0,48a	3,85 $\pm$ 0,29a	0,2111

Letras distintas na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste t ($P < 0,05$) .

5 CONCLUSÕES

A metionina interfere positivamente na expressão gênica, principalmente quando uma maior suplementação for utilizada apenas nas matrizes. Apesar da expressão dos genes ter sofrido essa influência, não foi observado diferença no consumo alimentar, conversão alimentar e peso das aves.

Neste estudo, observou-se que o efeito da metionina pode ser transmitida para a geração seguinte quando administrada adequadamente na dieta. Não se deve utilizar metionina além do nível já estabelecido como exigido pelo metabolismo da ave em cada fase de desenvolvimento, visto que seu aumento excessivo pode acarretar problemas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, L.F.; JUNQUEIRA, O.M.; ARAÚJO, C.S.S.N. et al. Proteína bruta e proteína ideal para frangos de corte no período de 1 a 21 dias de idade. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**. Campinas. v.3, n.2, p. 1-10, 2001.

AVEROUS, J.; BRUHAT, A.; MORDIER, S. et al. Recent Advances in the Understanding of Amino Acid Regulation of Gene Expression. **Journal of Nutrition**, v.133, p.2040S-2045S, 2003.

BANKS, W.J. Tecido muscular. In: **Histologia veterinária aplicada** . 2.ed. São Paulo: Manole,p.215- 236, 1992.

BELO, M.S. *Níveis de energia metabolizável e de metionina em rações de codornas japonesas (Coturnix cotunix japônica) na fase inicial de postura*. 80f. Dissertação (Mestrado em Nutrição de Monogástrico)- Universidade Federal de Lavras, Lavras.1997.

BERRI, C.; LE BIHAN-DUVAL,E.; DEBUT,M. et al. Consequence of muscle hypertrophy on characteristics of Pectoralis major muscle and breast meat quality of broiler chickens. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.85,p.2005-2011,2007.

BIDLACK, W.R.; RODRIGUEZ, R.L. **Nutritional Genomics**. New York: CRC Press. 399P,2012.

BRIDI,A.M.; SILVA,C.A.; HIOSHI,E.H.Manipulação do número e tipo de fibra muscular e a produção de carne suína. 2009. Disponível em: <http://www.uel.br/pessoal/ambridi/Carnesecarcacasarquivos/Desenvolvimentodasfibrasmusculares.pdf>. acessado em março de 20017

CAREW, L.B.; MCMURTY, J.P.; ALSTER, F.A. Effects of methionine deficiency on plasma levels of thyroid hormones, insulin-like growth factor-I and -II, liver and body weights, and feed intake in growing chickens. **Poult. Scie.**, v.82, p.1932-1938, 2003.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; FERRAZ, A.; et al. Uma visão sobre a estrutura, composição e biog=degradação da madeira. **Química nova**, v.32,n.8, p.2191-2195, 2009.

CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A. **Bioquímica Ilustrada**. 2ª ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul (ARTMED), 1996.

CHRIST,B.; BRAND-SABERI,B. Limb muscle development. **International Journal of Developmental Biology**, v.46, p.905-914, 2002.

COLLIER, S.R.; CASEY, D.P.; KANALEY, J.A. Growth hormone responses to varying doses of oral arginine. **Growth Hormone & IGF Research**, v.15, p.136-139, 2005.

COLON, M.A.; KITA, K. Muscle protein synthesis rate is altered in response to a single injection of insulin-like growth factor-I in seven-day-old leghorn chicks. **Poult. Scie.**, v.81, p.1543-1547, 2002.

CORRÊA, G.S.S.; SILVA, M.A.; CORRÊA, A.B. et al. Exigência de metionina + cistina total para codornas de corte em crescimento. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.58, p.414-420. 2006.

CORRÊA, G.S.S.; SILVA, M.A.; CORRÊA, A.B. et al. Níveis de metionina + cistina para características de desempenho e carcaça em codornas de corte EV2. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v.62, p.940-947, 2010.

CRUZ,C.E.B.; **Níveis de fibra na ração de recria (7 a 17 semanas de idade) e seus efeitos no crescimento e quailidade óssea de usa linhagens de**

poedeiras. 53 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)- Universidade Federal do Ceará, 2011.

DAUNCEY, M.J.; GILMOUR, R.S. Regulatory factors in the control of muscle development. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.55, p.543-559, 1996.

ENYNG,C.;NUNES,R.V.;MURAKAMI,A.E. et al. Deposição de proteína e gordura nos cortes nobres de frangos alimentados com farinha de resíduos da indústria de filetagem de tilápia. **Semina: Ciências Agrárias**, v.34, n.2, p.887-882, 2013.

FELÍCIO, A. M. Estudo Genético-quantitativo do número e diâmetro de fibras musculares em linhagens de frangos de corte. . VII **Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal**, São Carlos, São Paulo, Brasil, 2008.

FERREIRA, F.; CORRÊA, G.S.S.; SILVA, M.A. Exigência de metionina + cistina total para codornas de corte EV2 do nascimento ao 35º dia de idade. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 20, **Anais...** Palmas, TO. ZBZ. 2010.

FERREIRA, F.; CORRÊA, G.S.S.; CORRÊA, A.B. et al. Teor de metionina + cistina total para codornas de corte do grupo genético EV2 durante o período de crescimento. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v.64, n.3, p.665-674, 2012.

FREITAS, A.C.; FUENTES, M.F.F.; FREITAS, E.R. et al. Efeito de níveis de proteína bruta e de energia metabolizável na dieta sobre o desempenho de codornas de postura. **Rev. Bras. Zootec.**, v.34, p.838-846, 2005.

GONZALES, E.; SARTORI, J.R. Crescimento e metabolismo muscular. In: MACARI, M.; FURLAN, R. L; GONZALES, E. (Eds.). **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, p.279-297. 2002.

GRIMINGER, P.; FISHER, H. Methionine excess and chick growth. **Poult. Sci.**, v.47,pag.1271, 1968.

GROSCHL, M.; KNERR, I.; TOPF, H.G. et al. Endocrine responses to the oral ingestion of a physiological dose of essential amino acids in humans. **Jour. of Endoc.**, v.179, p.237-244, 2003.

KIMBALL, S.R.; JEFFERSON, L.S. Amino acids as regulators of gene expression. **Nutr. & Metab.**, v.1:3, 2004.

KLASING, K.C. **Comparative avian nutrition**. New York: Cab International, 350p, 1998.

KLASING, K. C. **Comparative avian nutrition**. CAB International, p. 350, 1994.

HALEVY, O.; GEYRA, A.; BARAK, M. et al. Early posthatch starvation decreases satellite cell proliferation and skeletal muscle growth in chicks. **Journal of Nutrition**, v.130, p.858-864, 2000. Disponível em: <<http://jn.nutrition.org/content/130/4/858.long>>. Acesso em: 04 junho, 2016.

HARVENSTEIN, G.B.; FERKET, P.R.; QURESHI, M.A. Growth, livability, and feed conversion of 1957 versus 2001 broilers when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. **Poultry Science**, v.82, p.1500-1508, 2003.

LAUTERIO, T.J.; SCANES, C.G. Time course of changes in plasma concentrations of the growth related hormones during protein restriction in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). **Proceeding Society Experiment Biology Medical**, v. 185, p. 420-26, 1987.

LIVACK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT **Method. Methods**, v.25, p.402-408, 2001.

LUBRITZ, S.L. A statistical model for white meat yield in broiler. **Journal of Applied Poultry Research**, v.6, p.253- 259, 1997. Disponível em: <<http://japr.fass.org/content/6/3/253.short>>. Acesso em: 04 maio, 2016.

MARTINELLI JÚNIOR, C.E.; OLIVEIRA, C.R.P.; BRITO, A.V.O. et al. Diagnóstico Deficiência de Hormônio de Crescimento, a Rigor de IGF-1. **Arquivos de Endocrinologia & Metabolismo**, v.46, n.1, p.27-33, 2002.

MORAES, V. M. B.; Ariki, J. 2009. **Importância da nutrição na criação de codornas de qualidades nutricionais do ovo e carne de codorna**. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal-SP, p.97-103. Available at: <http://www.biologico.sp.gov.br/rifib/IIIRifib/97-103.pdf> Acessado em: abril, 2016.

MOSS, F.P. The relationship between the dimensions of the fibers and the number of nuclei during normal growth of skeletal muscle in the domestuc fowl. **American Journal of Anatomy**, v.122, p.555-564, 1968.

MURAKAMI, A.E.; ARIKI, J. **Produção de codornas japonesas**. Jaboticabal: FUNEP, 79p.1998.

MURAKAMI, A.E.; FURLAN, A.C. Pesquisas na nutrição e alimentação de codornas em postura no Brasil. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL COTURNICULTURA, 1. Lavras. **Anais...**, Lavras:Universidade Federal de Lavras/NECTA, [2002]. CD-ROM. Palestra, p.1-5, 2002.

MUTCH, D. M.; WAHLI, W.; WILLIAMSON, G. Nutrigenomics and nutrigenetics: the emerging faces of nutrition. **The FASEB Journal**. Vol (19) 1602-1616, 2005.

OLIVEIRA NETO, A.R.; OLIVEIRA, R.F.; DONZELE, J.L. Níveis de metionina + cistina para pintos de corte mantidos em ambiente termoneutro. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 37., Viçosa, MG, **Anais...**, p.216-218, 2000.

ONO, Y.; IWAMOTO,H.; TAKAHARA, H. The relationship between muscle growth and the growth of different fiber types in the chicken. **Poultry Science**, v.72, p.568-576,1993.

PARDI,M.C. et al. **Ciência , higiene e tecnologia de carne**. 2. ed. Goiânia: ed. Da UFG, 2005.

PFAFFL, M.W.A. New mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v.29, n.9, p.2002-2007, 2001.

PEARSON, A.M.; YOUNG, R.B. **Muscle and meat biochemistry**. San Diego: Academic Press,457p. 1989.

PIOVACARI, S.M.; SHIMA, M.; CARDOSO, R. et al. Imunonutrição. *einstein: Educação Continuada em Saúde*, v.6, n.1 Pt 2, p.41-43, 2008.

PINTO, R.; DONZELE, J.L.; FERREIRA, A.S.AUDOUIN, E. et al. Exigência de metionina mais cistina para codornas japonesas em postura. **Rev. Bras. Zootec.**, v.32, n.5, p. 1166–1173, 2003.

PINTO, R.; FERREIRA, A.S.; DONZELE, J.L. et al. Exigência de metionina mais cistina para codornas Japonesas em crescimento. **Rev. Bras. Zootec.**, v.32, p.1174-1181, 2003.

RAVINDRAN, V.; BRYDEN, W.L. Amino acid availability in poultry – in vitro and in vivo measurements. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 50, p. 889 – 908, 1999.

REHFELDT,C., et al. Miogenesis and postnatal skeletal muscle cell growth as influenced by selection. **Livestock Production Science**, v.66,p.177-188,2000.

ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L. et al. ***Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais***. 3. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 252p, 2011.

SACHECK, J.M.; OHTSUKA, A.; MCLARY, S.C. et al. IGF-I stimulates muscle growth by suppressing protein breakdown and expression of atrophy-related ubiquitin ligases, atrogin-1 and MuRF1. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v.287, p.E591-E601, 2004.

SCANES, C.G. Perspectives o the endocrinology of poultry growth and metabolism. **Gen. and Comp. Endocr.**, v.163, p.24-32, 2009.

SCHWANDER, J.C.; HAURI, C.; ZAPF, J. et al. Synthesis and secretion of insulin-like growth factor and its binding protein by the perfused rat liver: dependence on growth hormone status. **Endocrinology**, v.113, p.297-305, 1983.

SCHEUERMANN, G. N.; BILGILI, S.F.; MULVANEY, D.R. Effect of in ovo injection of IGF-I on Pectoralis myofiber and post-hatch performace of broiler chickens. **Poultry Science**, v.82(Suppl.1): p.17, 2003.

SCHEUERMANN, G. N. Alteração na quantidade e qualidade da carne de aves através da manipulação das fibras musculares. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2004, Santos. **Anais : FACTA**, v.2, p.165-178, 2004.

SILVA, J.H.V.; JORDÃO, F.J.; COSTA, F.G.P. et al. Exigências nutricionais de codorna. **Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.**, Salvador, v.13, n.3, p.775-790 jul./set., 2012 <http://www.rbspa.ufba.br>

SILVA, J.H.V.; RIBEIRO, M.L.G. **Tabela nacional de exigência nutricional de codornas (Coturnix coturnix japonica)**. Bananeiras, PB:DAP/UFPB/Campus IV, 19p. 2001.

SIMON, J. Choline, betaine and methionine interactions in chickens, pigs and fish (including crustaceans). *Wor. Poul. Scien. Jour.*, v.55, p.353-374, 1999.

STIPANUK, M.H. Sulfur amino acid metabolism: Pathways for Production and Removal of Homocysteine and Cysteine. **Annual Review of Nutrition**, v.24, p.539-77, 2004.

STUBBS, A.K.; WHEELHOUSE, N.M.; LOMAX, M.A. et al. Nutrient-hormone interaction in ovine liver: methionine supply selectively modulates growth hormone-induced IGF-1 gene expression. **Jour. of Endoc.**, v.174, p.335-341, 2002.

TESSERAUD, S.; BOUVAREL, I.; COLLIN, A. et al. Daily variations in dietary lysine content alter the expression of genes related to proteolysis in chicken *Pectoralis major* muscle. **Journal of Nutrition**, v.139, p.38- 43, 2008. Disponível em: <<http://jn.nutrition.org/content/139/1/38.short>>. Acesso em: 20 de janeiro, 2016. doi: 10.3945/jn.108.095752.

TESSERAUD, S.; CHAGNEAU, A.M.; GRIZARD, J. Muscle protein turnover early development in chickens divergently selected for growth rate. **Poultry Science**, v.79, p.1465-1471, 2000.

TESSERAUD, S.; COUSTARD-MÉTAYER, S.; BOUSSAID, S. et al. Insulin and amino acid availability regulate atrogin-1 in avian QT6 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.357, p. 181-186, 2007.

TORRES, R.A.; CORRÊA, G.S.S.; SILVA, M.A. et al. Desempenho de codornas EV2 para corte alimentadas com dietas com diferentes níveis de metionina+cistina durante a fase inicial. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 42., Goiânia. **Anais...** Goiânia: Sociedade

Brasileira de Zootecnia/Gmosis, [2005]. CD-ROM. Nutrição de Não ruminantes. NNR-1160, 2005.

VAN VUGHT, A.J.A.H.; NIEUWENHUIZEN, A.G.; BRUMMER, R.J.M. et al. Effects of oral ingestion of amino acids and proteins on the somatotropic axis. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.93, n.2, p.584-590, 2008.

VIANA, M.T.S.; ALBINO, L.F.T.; ROSTAGNO, H.S. et al. Methionine sources and levels in broilers chick diets. **Rev. Bras. de Zootec.**, v.38, p.1751-1756, 2009.

WU, G.; DAVIS, D.A. Interrelationship among methionine, choline and betaine in channel catfish – *Ictalurus punctatus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.36, n.3, p.337-345, 2005.