

Expressão gênica de IGF-I e GHR no fígado e no músculo do peito de codornas de corte suplementadas com diferentes níveis de metionina em duas gerações sucessivas

[*IGF-I and GHR gene expression in liver and breast muscle of meat quails supplemented with different levels of methionine in two successive generations*]

R.P.D. Flora, N.J.L. Dionello, L. Benitez, J.M. Germano, A.G. Gotuzzo, S. Freitas

Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel – Universidade Federal de Pelotas – Pelotas, RS

RESUMO

Este estudo foi desenvolvido com o objetivo de 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 no músculo do peito de codornas de corte, 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 geração, respectivamente. Ao final, as aves foram abatidas por deslocamento cervical, sendo coletados fígado e músculo do peito para extração de RNA total. O cDNA foi amplificado usando *primers* específicos para os genes analisados. Os resultados mostraram que a expressão dos genes GHR e IGF-I sofreu influência da suplementação. No quinto tratamento, em que 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 como no fígado e igualmente do IGF-I no músculo, levando a concluir que o excesso de metionina na dieta torna-se tóxica para as aves. Apesar de a expressão dos genes ter sofrido influência da adição de metionina nos níveis estudados, não foi observada diferença no consumo alimentar, na conversão alimentar e no peso das aves.

Palavras-chave: crescimento, extração de RNA, geração

ABSTRACT

This study was conducted to evaluate the gene expression of the insulin-like I growth factor (IGF-I) and growth hormone receptor (GHR), in the liver and chest muscle of slaughter quails fed with diets containing different levels of methionine supplementation, in two successive generations. Twenty-two to 42 day-old quails were used, distributed in three and five treatments in the first and second generation, respectively. At the end, the birds were killed by cervical dislocation, and their liver and chest muscle were collected for total RNA extraction. The cDNA was amplified using specific primers for the genes analyzed. The results showed that the expression of GHR gene and IGF-I were influenced by the supplementation. In the fifth treatment, where only the first generation received supplementation above the standard requirements for the period, there was a significantly higher expression of GHR both in muscle chest and in the liver, and also IGF-I on muscle, leading to the conclusion that the excess dietary methionine becomes toxic to birds. Despite the gene's expression seeming to be influenced by the addition of methionine levels in the study, there was no difference in feed intake, feed conversion and weight of the birds.

Keywords: growth, RNA extraction, generation

INTRODUÇÃO

A exploração comercial das codornas de corte após a modernização da produção animal encontra-se em expansão. A alimentação é responsável por 75% do custo total da produção (Freitas *et al.*, 2005). 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). Daquela porcentagem, cerca de 25% correspondem à proteína da dieta (Freitas *et al.*, 2005). 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 degradação de proteínas pelo metabolismo animal, também é responsável, em grande parte, pelo crescimento. Autores afirmam que esses 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 composição nutricional da dieta pode influenciar a fisiologia e a expressão de vários genes, tornando as aves mais ou menos eficientes em converter os alimentos em crescimento corporal. A metionina é o primeiro aminoácido limitante para codornas de corte, devido à composição dos alimentos utilizados em suas dietas e à grande exigência das aves por esse aminoácido para deposição de músculos e penas. Assim, essa alta exigência de metionina reforça a necessidade de suplementação desse aminoácido na dieta de codornas de corte de fontes industriais para se alcançar o desempenho adequado. Além disso, a metionina participa não apenas da síntese proteica, mas também de outras reações metabólicas importantes para manter o desempenho adequado, por exemplo, atuando como doador de enxofre (Wu e Davis, 2005), participante da síntese de glutatona (Piovacari *et al.*, 2008) e doador do grupo metil, por meio 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).

As aves podem adaptar seus metabolismos às 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 nesse processo tem se tornado tema de pesquisas recentes, e uma das ações dos aminoácidos na regulação da expressão gênica ocorre diretamente por meio da modulação do mRNA, com efeito sobre proteínas e fatores de tradução (Kimball e Jefferson, 2004).

Mediante a medida da expressão de GHR, pode-se avaliar se esse 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, como a de síntese e liberação do IGF-I. A inclusão de metionina na dieta pode levar à deposição proteica, 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 as mudanças na suplementação de aminoácidos podem iniciar alteração na expressão de genes, como GH e IGF-I, 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. Essa técnica é considerada altamente sensível, permitindo que até mesmo pequenas diferenças na expressão de determinado gene sejam observadas, além de outras características positivas como resultado de quantificação rápida 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 em nível celular ou molecular.

Dessa forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a expressão gênica do IGF-I e do *GHR* no fígado e no músculo do peito em codornas de corte, durante duas gerações de seleção, alimentadas com dietas em diferentes níveis de suplementação de metionina.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Ensino e Experimentação Zootécnica Prof. Dr. Renato Rodrigues Peixoto, do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Pelotas, sendo aprovado pelo Comitê de Ética (CCEA 2618-2014). Para a formação da 14^a e da 15^a gerações utilizadas no experimento, os acasalamentos foram de duas fêmeas com um macho, sob controle de *pedigree*. Selecionaram-se 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 experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente ao acaso, dividido em duas etapas. A primeira (G1) contou com três tratamentos de cinco repetições cada, em que 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) foi 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, em que 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.

Em todo o período experimental, as aves tiveram livre acesso à água e ração. A dieta, composta à base de milho e farelo de soja, apresentou 20,0% de PB e 2.900 de EM durante todo o período experimental. As rações isonutritivas (Tab. 1) foram formuladas de acordo com Rostagno *et al.* (2011), com exceção dos níveis de metionina + cistina.

Para determinação do ganho de peso, todas as aves foram pesadas no início (22 dias) e no final (42 dias) do período experimental. O consumo de ração foi calculado pela quantidade de ração oferecida, subtraída da sobra no final do experimento. A conversão alimentar foi obtida pela divisão do consumo de ração pelo ganho de peso das aves. A mortalidade foi considerada para o cálculo da conversão alimentar.

Ao final do período experimental, oito animais de cada tratamento foram eutanasiados por deslocamento cervical, e os tecidos do fígado e do peito (*Pectoralis superficialis*) coletados e armazenados em RNA Holder® (BioAgency Biotecnologia, Brasil) a -20°C, até o momento da extração de RNA. Destes, quatro de cada tratamento foram utilizados para as análises de expressão gênica.

O RNA total foi extraído com o uso do reagente Trizol® (Invitrogen, Carlsbad CA, USA), na proporção de 1mL para cada 100mg 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 homogeneizador elétrico Pro-scientific (Bio-Gen Series Pro 29) até à completa dissociação. Logo após, foram adicionados 300uL de clorofórmio e homogeneizados por inversão, por um minuto.

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 bicálcico	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

¹Composição/kg do produto: ácido fólico 16mg; 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 200.000UI; vitamina B1 40mg; vitamina B12 430mg; vitamina B2 120mg; vitamina B6 55mg; vitamina D3 42.000UI; vitamina E 540UI; Vitamina K3 50 mg; zinco 1.800mg; Dig = digestível; meta= metabolizável; Met-= metionina

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

7.500rpm por cinco minutos, e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi seco por cinco minutos e, a seguir, suspenso em 35uL de água ultrapura livre de RNase.

A concentração total de RNA foi mensurada usando-se um espectrofotômetro no comprimento de onda de 260nm, e a pureza medida pela razão 260/280nm. A integridade do

RNA foi avaliada em gel de agarose 1%, corada com brometo de etídio e visualizada em luz ultravioleta.

Para síntese do cDNA, foi utilizado o *kit* SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen Corporation, Brasil), de acordo com as normas do fabricante. Em tubo estéril e livre de RNA, foram adicionados 6µL de RNA total, 1µL de oligo (dT) (50µM oligo (dT)) 20 e 1µL de tampão de anelamento. A reação foi incubada por cinco minutos a 65°C e, então, colocada no gelo por um minuto. Foram adicionados a seguir 10µL de solução 2x First-Strand Reaction Mix e 2µL de solução contendo a enzima transcriptase reversa SuperScript III e o 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 cinco minutos e imediatamente colocada 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-se 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 20µL. As condições de ciclagem foram: renaturação das amostras por dois 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 um minuto e 72°C por um minuto) e, por fim, a 72°C por cinco minutos.

A quantificação relativa da expressão diferencial (QR) foi calculada por meio do 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 em que as diferenças entre os grupos foram testadas usando-se o teste t-de Student para dados não pareados (SAS, 2000). Todos os dados foram expressos na forma de média±DP, considerando-se diferenças significativas para valores de $P < 0,05$.

Tabela 2. *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')
ACTINA	73	60	F:GCCCTCTCCAGCCATCTTT R:TCATTGTGCTAGGTGCCAGG
GHR	76	60	F:CAAGATTACATCGCCGTGG R:CAACACTGTTATTGTCATCTTCTC
IGF-1	67	60	F:CCACCTAAATCTGCACGCT R:TGTTTCCTGTGTTCCCTCTACT

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os *primers* (Tab. 2) 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.

O genes IGF-I e GH são conhecidamente relevantes na produção de substâncias funcionais, atuando diretamente no metabolismo e no crescimento das aves. O GHR é um importante regulador do crescimento e da composição corporal e seus efeitos são promovidos mediante a estimulação da síntese e a liberação do IGF-I (Van Vugth *et al.*, 2008). Já foi verificada maior síntese e menor degradação proteica em aves com maior nível de IGF-I plasmático, o que resulta em maior deposição de músculo esquelético (Colon e Kita, 2002). O IGF-I possui um importante papel na taxa de

crescimento corporal de aves. Scanes *et al.* (2009) afirmam que quanto menor o seu nível encontrado, pior será o crescimento corporal.

Restrições de nutrientes na dieta materna causam grande impacto na metilação do DNA de genes importantes ou de regiões gênicas durante o desenvolvimento fetal, resultando em um efeito aparente posterior (Bidlack e Rodriguez, 2012). Neste estudo, observou-se que, no terceiro tratamento, em que as duas gerações receberam metionina além da exigência nutricional para essa fase, a expressão gênica não diferiu dos outros tratamentos. Porém, no quinto tratamento, em que 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. 3). O IGF-1 no fígado no tratamento quatro, em que 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, em que as aves receberam a suplementação da metionina conforme as exigências nas duas gerações. Esse 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 também causa a diminuição do crescimento e da ingestão da dieta em níveis de três a quatro vezes abaixo do exigido. Seu excesso sofre oxidação que resulta na produção do sulfato, levando a uma acidose metabólica. Esta, por sua vez, pode contribuir para uma variedade de problemas nas aves, como baixa mineralização óssea e diminuição da espessura da casca (Klasing, 1998).

O IGF-1 é sintetizado no fígado, podendo sofrer influência da dieta (Schwander *et al.*, 1983). Uma hipótese em discussão é de que a expressão de IGF-1 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 em que os níveis de metionina utilizados foram menores (Tab. 3).

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. 4).

Tabela 3. 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±0,47a	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 RNA mensageiro, o tratamento 1 tem média 1 e desvio padrão 0. ¹ Músculo. ² Fígado.

Tabela 4. 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.

Expressão gênica de IGF-I...

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 se pode observar na Tab. 5, apesar de os tratamentos que receberam uma maior suplementação de metionina terem uma maior expressão do IGF-1, isso 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 (1997) 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. 4 e 5, nos níveis estudados não foi observada diferença nas variáveis consumo alimentar e conversão alimentar. Esses resultados são corroborados com os encontrados por Corrêa *et al.* (2006), Corrêa *et al.* (2010) e Ferreira *et al.* (2012), que também não encontraram influência dos níveis de metionina+cistina total em codornas de corte sobre a conversão alimentar.

Tabela 5. 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.

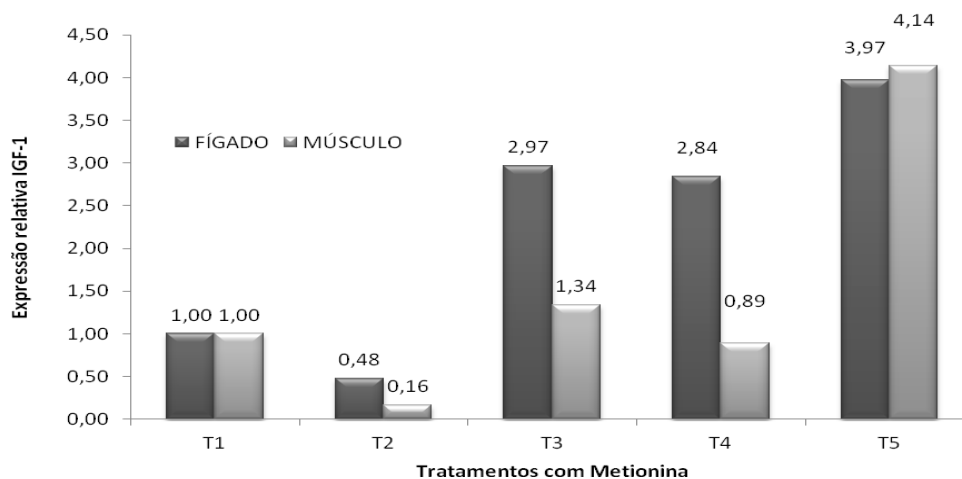


Figura 1. Quantificação relativa (QR) da expressão diferencial do gene IGF-1, em cinco tratamentos, no músculo do peito e no fígado de codornas de corte. Os valores representam as médias de três repetições, cada uma com três replicatas.

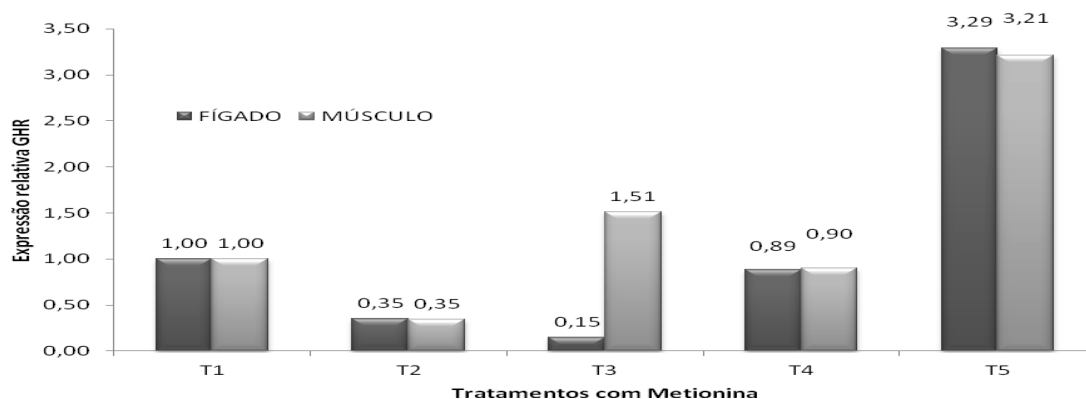


Figura 2. Quantificação relativa (QR) da expressão diferencial do gene GHR, em cinco tratamentos, no músculo do peito e no fígado de codornas de corte. Os valores representam as médias de três repetições, cada uma com três replicatas.

CONCLUSÃO

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

REFERÊNCIAS

- 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.
- BELO, M.S. *Níveis de energia metabolizável e de metionina em rações de codornas japonesas (Coturnix coturnix japonica) na fase inicial de postura*. 1997. 80f. Dissertação (Mestrado em Nutrição de Monogástrico) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- BIDLACK, W.R.; RODRIGUEZ, R.L. *Nutritional Genomics*. New York: CRC Press, 2012, 399p.
- 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.
- 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. Zoot.*, v.58, n.3, 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.
- FERREIRA, F.; CORRÊA, G.S.S.; CORRÊA, A.B. 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.
- GRIMINGER, P., E FISHER, H. Methionine excess and chick growth. *Poult. Scie.*, 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, 1998. 350p
- 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.
- MUTCH, D. M.; WAHLI, W.; WILLIAMSON, G. Nutrigenomics and nutrigenetics: the emerging faces of nutrition. *The FASEB Journal*. Vol (19) 1602-1616, 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.
- 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.; 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.
- 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, 2011. 252p.
- 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, atrogen-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.
- 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.; COUSTARD-MÉTAYER, S.; BOUSSAID, S. *et al.* Insulin and amino acid availability regulate atrogen-1 in avian QT6 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.357, p. 181-186, 2007.
- 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 somatotrophic 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.