



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE**

**SUPLEMENTAÇÃO DE METIONINA NA DIETA MATERNA
E A MODULAÇÃO DO METABOLISMO DA PROGENIE DE
CODORNAS DE POSTURA**

THAÍS PACHECO SANTANA

2023



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE**

THAÍS PACHECO SANTANA

**SUPLEMENTAÇÃO DE METIONINA NA DIETA MATERNA E A MODULAÇÃO
DO METABOLISMO DA PROGENIE DE CODORNAS DE POSTURA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Doutorado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Orientador
Prof. Dr. Leandro Texeira Barbosa

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL
2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

S232s Santana, Thaís Pacheco.
Suplementação de metionina na dieta materna e a modulação
do metabolismo da progênie de codornas de postura / Thaís
Pacheco Santana ; orientador Leandro Teixeira Barbosa. – São
Cristóvão, SE, 2023.
70 f.; il.

Tese (doutorado em Agricultura e Biodiversidade) –
Universidade Federal de Sergipe, 2023.

1. Agrobiodiversidade. 2. Codornas. 3. Metionina. 4. Dieta. 5.
Absorção. 6. Micronutrientes. I. Barbosa, Leandro Teixeira, orient.
II. Título.

CDU 636.084.52

THAÍS PACHECO SANTANA

**SUPLEMENTAÇÃO DE METIONINA NA DIETA MATERNA E A MODULAÇÃO
DO METABOLISMO DA PROGENIE DE CODORNAS DE POSTURA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Doutorado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de Doutora em Ciências.

APROVADA em 07 de junho de 2023.

Dra. Ana Paula Del Vesco	(UFS)
Dra. Angélica de Souza Khatlab	(UEM)
Dr. Claudson Oliveira Brito	(UFS)
Dra. Daiane de Oliveira Grieser	(UNIFESSPA)

Prof. Dr. Leandro Texeira Barbosa
UFS
(Orientador)

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL

*A Deus, o maior orientador da minha vida,
que nunca me abandonou nos momentos mais
difíceis. A Ele devo tudo que sou, sem Ele eu
não seria nada.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, o grande guia da minha vida. Aquele que me protege, que me proporciona força e coragem para chegar até aqui e ir mais além.

Aos meus pais, Selma Pacheco e Zenildo Vieira. Obrigada pelo amor, ensinamentos, compreensão e incentivo para chegar até aqui, mesmo sem entender muito bem sobre essa vida louca acadêmica. Mami, obrigada por ouvir os meus lamentos, desesperos, principalmente no primeiro ano do doutorado, e obrigada também pela companhia em dias intensos de leitura, me atrapalhando durante os estudos com as suas conversas, foi super necessário kkkkk, me distraiu demais quando a mente já estava saturada.

As minhas irmãs, Daniela Maria e Isabela Maria, por todo amor, incentivo e apoio.

Ao meu “namorado” Lucas que no início não sabia muito bem lidar com a minha vida acadêmica, mas hoje entende e é um dos meus maiores incentivadores. Obrigada por tanto amor, carinho, cumplicidade e parceria. É e sempre será por nós todo o meu esforço. Amo você!

A minha amiga Cinthia Leão que hoje está em terras catarinenses, mas que nunca deixou de me apoiar, de ouvir os meus lamentos e desesperos. Obrigada por me fazer rir nos momentos mais necessários e por sempre dizer que eu seria capaz de chegar até aqui. Angel (Angélica Khatlab), não tenho palavras até hoje para agradecer tudo que fez e faz por mim, desde lá do experimento até hoje, quase todos os dias eu pergunto alguma coisa a ela, coitada. Muito obrigada!

A minha Jujuba (Juliana dos Santos), estagiariazinha que está sempre se oferecendo e disposta a ajudar, e também topa qualquer coisa no laboratório. Obrigada, Jujubex.

A minha sogra Tânia Maria, por cuidar de tudo enquanto eu estava na frente do computador ou na universidade. A minha cunhada Luana Melo, por me incentivar. Agora você já pode dizer que sou Doutora, kkkkk.

Ao professor Leandro Barbosa que aceitou me orientar no momento de grande desespero e quase desistência. Não sei como agradecer ao senhor por essa oportunidade. Obrigada por tanto e por confiar em mim.

A uma das mais importantes, a minha super, hiper, mega, master “profe” Ana Paula Del Vesco. O que seria de mim sem você? Muito obrigada por todos os ensinamentos, por toda ajuda, por todo apoio, por sua amizade, pela confiança depositada em mim e por simplesmente TUDO. Cheguei até aqui graças a você. Admiro demais sua mente brilhante e você. Você é maravilhosa demais.

Aos amigos que fiz na UFS durante a realização do doutorado.

A Jéssika, secretária do PPGAGRI, por toda paciência e ajuda na parte burocrática dessa tese.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil.

Enfim, a todos muito obrigada!

BIOGRAFIA

THAÍS PACHECO SANTANA, filha de Selma Pacheco e Zenildo Vieira Santana, nasceu em Aracaju, estado de Sergipe, no dia 21 de dezembro de 1991.

Cursou graduação em Zootecnia pela Universidade Federal de Sergipe, no período de 2010 a 2017.

No período de 2017 a 2019, cursou mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Sergipe, na área de concentração Produção Animal-Melhoramento Genético Animal, sob orientação da professora Dra. Ana Paula Del Vesco.

Em agosto de 2021 iniciou o doutorado no Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Biodiversidade da Universidade Federal de Sergipe, na área de concentração Tecnologias Sustentáveis, Manejo e Recuperação de Ecossistemas, sob a orientação do professor Dr. Leandro Texeira Barbosa.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS	iii
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Criação de matrizes	2
2.2 Nutrição de aves	3
2.3 Suplementação de metionina	5
2.3.1 Ambiente intestinal	5
2.3.2 Produção de ovos	7
2.4 Efeito materno	8
2.4.1 Desenvolvimento de pintainhos	9
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	12
4. ARTIGO 1: NÍVEIS DE METIONINA NA DIETA DA MATRIZ SOBRE A EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS AO METABOLISMO LIPÍDICO DA PROGÊNIE DE CODORNAS JAPONESAS	21
Resumo	21
4.1 Introdução	22
4.2 Materiais e métodos	23
4.2.1 Matrizes	23
4.2.2 Progênie	25
4.2.3 Avaliações	26
4.2.4 Isolamento de RNA e síntese de cDNA	26
4.2.5 Análise estatística	28
4.3 Resultados	28
4.3.1 Matrizes	28
4.3.2 Progênie na fase inicial (1 a 15 dias) e de crescimento (15 a 35 dias)	29

4.4 Discussão	32
4.5 Conclusões	33
4.6 Referências bibliográficas	33
5. ARTIGO 2: EFEITO DA DIETA MATERNA SOBRE O AMBIENTE INTESTINAL DA PROGÊNIE DE CODORNAS JAPONESAS ALIMENTADAS COM DIFERENTES NÍVEIS DE METIONINA	36
Resumo	36
5.1 Introdução	37
5.2 Materiais e métodos	38
5.2.1 Matrizes	38
5.2.2 Progenie	34
5.2.3 Morfometria intestinal	42
5.2.4 Isolamento de RNA e síntese de cDNA	42
5.2.5 Análise estatística	43
5.3 Resultados	43
5.3.1 Matrizes	43
5.3.2 Progenie na fase inicial (1 a 14 dias) e de crescimento (15 a 35 dias)	46
5.4 Discussão	50
5.5 Conclusões	51
5.6 Referências bibliográficas	51
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	55

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

Página

Figura 1. Representação esquemática do delineamento experimental 25

Figura 2. Expressão gênica de *ACC*, *FAS*, *APOA1*, *APOB* no fígado de matrizes de codornas japonesas 29

ARTIGO 2

Página

Figura 1. Representação esquemática do delineamento experimental 40

Figura 2. Expressão de *SLC7A7*, *OCLN*, *SLC5A1*, *SLC2A2* e *SLC6A19* no duodeno de matrizes de codornas japonesas..... 45

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

	Página
Tabela 1. Composição percentual e valores nutricionais das dietas experimentais fornecidas para as matrizes de codornas japonesas em fase de postura (98 a 136 dias de idade)	24
Tabela 2. Composição percentual e valores nutricionais das dietas experimentais fornecidas para progênie de codornas japonesas em fase inicial e de crescimento	26
Tabela 3. Sequências de primers utilizados na reação de RT-qPCR	28
Tabela 4. Desempenho da progênie aos 35 dias de idade	30
Tabela 5. Expressão de genes relacionados ao metabolismo lipídico no fígado da progênie de codornas japonesas	31

ARTIGO 2

	Página
Tabela 1. Composição percentual e valores nutricionais das dietas experimentais fornecidas para as matrizes de codornas japonesas em fase de postura (98 a 136 dias de idade)	39
Tabela 2. Composição percentual e valores nutricionais das dietas experimentais fornecidas para progênie de codornas japonesas em fase inicial e de crescimento	41
Tabela 3. Sequências de primers utilizados na reação de RT-qPCR	43
Tabela 4. Efeito da dieta sobre a morfometria do duodeno de matrizes de codornas japonesas	39
Tabela 5. Parâmetros morfométricos e área de superfície absorptiva do duodeno de progênie de codornas japonesas alimentadas com diferentes níveis de metionina	46
Tabela 6. Parâmetros morfométricos e área de superfície absorptiva do jejuno de progênie de codornas japonesas alimentadas com diferentes níveis de metionina	47
Tabela 7. Parâmetros morfométricos e área de superfície absorptiva do íleo de progênie de codornas japonesas alimentadas com diferentes níveis de metionina	48
Tabela 8. Expressão de <i>SLC2A2</i> , <i>SLC5A1</i> , <i>SLC7A7</i> , <i>SLC6A19</i> e <i>OCLN</i> no duodeno da progênie de codornas japonesas	49

SIGLAS E SÍMBOLOS

β	Beta
%	Porcentagem
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
μM	Micrômetro
ACC	Acetil carboxilase CoA
APOA-I	Apolipoproteína A 1
APOB	Apolipoproteína B
ATP	Adenosina trifosfato
AU	Unidade arbitrária
B.H.A	Hidroxianisol Butilado
B ⁰ AT1	Transportador de aminoácidos neutro dependente de sódio 1
CA	Conversão alimentar
cDNA	DNA complementar
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
<i>CLDN-1</i>	Gene claudina 1
cm	Centímetros
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase	Desoxirribonucelase
EPM	Erro padrão médio
FAS	Ácido graxo sintase
FSH	Hormônio folículo estimulante
<i>FSHR</i>	Gene receptor do hormônio folículo estimulante
g	Gramas
GH	Hormônio do crescimento
GLUT2	Transportador de glicose 2
GP	Ganho de peso
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HMET	Suplementação com nível acima do recomendado de metionina
IGF-I	Hormônio semelhante à insulina tipo 1
kcal	Quilocalorias
kg	Quilogramas
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LMET	Sem suplementação de metionina
LH	Hormônio luteinizante
<i>LHR</i>	Gene receptor do hormônio luteinizante
M	Molar
MET	Suplementação com nível recomendado de metionina
mg	Miligramas
mL	Mililitros
mRNA	RNA mensageiro
<i>n</i>	Número de repetições
n°	Número
ng	Nanogramas
°C	Graus Celsius
<i>OCN</i>	Gene ocludina
<i>p</i>	Valor de P

P35	Peso aos 35 dias
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogênico
Q.S.P	Quantidade suficiente para
qRT-PCR	PCR em tempo real
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SAM	S-adenosilmetionina
SGLT1	Gene cotransportador de glicose dependente de sódio 1
<i>SLC2A2</i>	Gene transportador de glicose
<i>SLC5A1</i>	Gene cotransportador de glicose dependente de sódio
<i>SLC6A19</i>	Gene transportador de aminoácidos neutros dependente de sódio
<i>SLC7A7</i>	Gene transportador de aminoácidos Y + L 1
TLR4	Receptor do tipo Toll 4
UI	Unidade internacional
Vit. A	Vitamina A
Vit. B1	Vitamina B1
Vit. B12	Vitamina B12
Vit. B2	Vitamina B2
Vit. B6	Vitamina B6
Vit. K3	Vitamina K3
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
y ⁺ LAT-1	Transportador de aminoácidos neutros e catiônicos 1
Zn	Zinco

RESUMO

SANTANA, Thaís Pacheco. **Suplementação de metionina na dieta materna e a modulação do metabolismo da progênie de codornas de postura**. São Cristóvão: UFS, 2023. 70p. (Tese – Doutorado em Agricultura e Biodiversidade).*

Em aves, além de participar da síntese proteica, a metionina da dieta também pode influenciar o metabolismo lipídico, sendo essencial na produção de ovos, e também no desenvolvimento e funcionamento do ambiente intestinal, melhorando a absorção dos nutrientes. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar como diferentes níveis de suplementação de metionina podem influenciar o metabolismo lipídico e intestinal tanto da matriz, quanto da sua progênie. Para isso, o experimento foi desenvolvido em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 3, sendo três dietas para as matrizes: dieta sem suplementação de metionina (LMET); dieta suplementada com o nível recomendado de metionina (MET); e dieta com suplementação acima do nível recomendado de metionina (HMET), e para cada tratamento das matrizes, as mesmas três dietas para sua progênie: LMET, MET e HMET. Foi avaliada a expressão dos genes: acetil-CoA carboxilase (*ACC*), ácido graxo sintase (*FAS*), apolipoproteína A-I (*APOA1*), apolipoproteína B (*APOB*), transportador de glicose (*SLC2A2*), cotransportador de glicose dependente de sódio (*SLC5A1*), transportador de aminoácidos neutros dependentes de sódio (*SLC6A19*), transportador de aminoácido Y+L 1 (*SLC7A7*), ocludina (*OCN*) e a morfometria intestinal tanto da matriz, quanto da progênie. Observamos que a suplementação de metionina na dieta contribui para o melhor desempenho reprodutivo durante a fase de postura das matrizes, onde matrizes alimentadas com suplementação de metionina obtiveram ovos mais pesados, melhor taxa de postura e melhor taxa de eclosão, processo bastante influenciado pela síntese de lipídeos. A suplementação de metionina também diminuiu o valor de expressão dos genes *ACC* e *FAS*. Também observamos que a dieta materna teve efeito sobre a expressão de *APOA1* no fígado da progênie. As aves alimentadas com MET, filhas de matrizes também alimentadas com MET, apresentaram maior valor de expressão de *APOA1*. Em relação à morfometria intestinal, observamos que a suplementação de metionina aumentou a largura dos vilos no duodeno e a profundidade de cripta no duodeno e no jejuno das matrizes. Constatamos que o efeito da dieta materna, principalmente matrizes alimentadas com HMET, é capaz de melhorar os parâmetros morfológicos da progênie, e quando estas também recebem dieta HMET, garantem resultados ainda mais eficientes em relação à morfologia do duodeno, jejuno e íleo de codornas japonesas. O maior valor de expressão de *SLC6A19* e *SLC7A7* foi observado no duodeno de matrizes alimentadas com HMET. Foi possível observar também que osprogênies de matrizes que receberam dieta com suplementação de metionina, quando foram alimentadas com MET obtiveram maior expressão dos genes *SLC2A2*, *SLC5A1* e *OCN*. Podemos concluir que a suplementação de metionina na dieta de matrizes, tanto dieta MET quanto com dieta HMET, foi essencial para melhorar os parâmetros reprodutivos das matrizes e melhorar o processo do desenvolvimento intestinal do pintainho. Além disso, a dieta materna permitiu a melhor expressão do fenótipo na progênie.

Palavras-chave: absorção de nutrientes, ambiente intestinal, lipídeos, expressão de genes, transporte de aminoácidos.

* Comitê Orientador: Dr. Leandro Texeira Barbosa – UFS (Orientador), Dra. Ana Paula Del Vesco – UFS (Coorientadora).

ABSTRACT

SANTANA, Thaís Pacheco. **Methionine in maternal diet and metabolic modulation in quail chicks**. São Cristóvão: UFS, 2023. 70p. (Thesis - Doctor of Science in Agriculture and Biodiversity).*

Methionine in poultry diet does not only contribute to protein synthesis but can also influence the lipid metabolism, essential for egg production. In addition, it can improve the development and functioning of the intestinal environment, and thus nutrient uptake. This study evaluated how different levels of methionine supplementation can affect the lipid and intestinal metabolism of both the quail hen and her chicks. To this end, an experiment with a completely randomized 3 x 3 factorial design tested three diets for quail hens: diet without methionine supplementation (LMET); diet supplemented with the recommended level of methionine (MET); and diet with supplementation above the recommended level of methionine (HMET), and for each treatment of the mother hens, their chick were fed the same three diets: LMET; MET; and HMET. The expression of the following genes was evaluated: acetyl-CoAcarboxylase (*ACC*), fatty acid synthase (*FAS*), apolipoprotein A 1 (*APOA1*), apolipoprotein B (*APOB*), glucose transporter (*SLC2A2*), sodium-dependent glucose cotransporter (*SLC5A1*), sodium-dependent neutral amino acid transporter (*SLC6A19*), Y+L 1 amino acid transporter (*SLC7A7*), occludin (*OCN*) and intestinal morphometry of both hen and chick. The methionine-supplemented diet contributed to a better reproductive performance during the laying period of the hens, since hens fed with such a diet laid heavier eggs, at higher rates of egg laying and hatching. The processes of laying and consequently, yolk and egg formation, are greatly influenced by lipid synthesis. Methionine supplementation also decreased the expression of the *ACC* and *FAS* genes. In addition, the maternal diet influenced the expression of *APOA1* in the chick liver. In quails fed with MET, which were offspring of hens also fed with MET, the *APOA1* gene was expressed at higher levels. Regarding intestinal morphometry, methionine supplementation increased the duodenum villi width and duodenum and jejunum crypt depth of the hens. The effect of the maternal diet, mainly of HMET, improved the morphological parameters of the chicks. When the chicks were also fed HMET, the results in relation to the morphology of the duodenum, jejunum and ileus of the Japanese quails were even better. The expression of *SLC6A19* and *SLC7A7* was highest in the duodenum of hens fed with HMET. When chicks from hens that received a methionine-supplemented diet were fed with MET, the expression of *SLC2A2*, *SLC5A1* and *OCN* genes increased. It was concluded that a methionine-supplemented diet (MET or HME), was essential to improve the reproductive parameters of the mother hen and the intestinal development process of the chick. In addition, a methionine-supplemented maternal diet optimized the phenotype expression of the offspring.

Keywords: amino acid transport, gene expression, intestinal environment, lipids, nutrient uptake.

* Advisory Committee: Dr. Leandro Texeira Barbosa (Advisor), Dr^a. Ana Paula Del Vesco (Co-advisor).

1. INTRODUÇÃO GERAL

A coturnicultura vem ganhando espaço tanto na produção de carne quanto na produção de ovos. Isso ocorre devido às vantagens de facilidade de manejo, rápido crescimento, precocidade na produção de ovos, alta produtividade (300 ovos/ano), longevidade em alta produção, criação de baixo investimento e rápida lucratividade. As codornas japonesas (*Coturnix japonica*) são as aves mais utilizadas para a produção de ovos por apresentarem maior taxa de postura quando comparadas com as demais espécies (Pastore *et al.*, 2012). Para garantir eficiência na produção desses animais, cada vez mais vem sendo empregadas tecnologias que permitem a expressão de seu potencial genético (Zuidhof *et al.*, 2014).

A nutrição é um dos principais fatores estudados e tem o objetivo de fornecer dietas adequadas para beneficiar a taxa de crescimento, a produção e reprodução, além de minimizar os efeitos do ambiente sobre a ave. Nos últimos anos trabalhos também têm sido realizados para melhor entender como a dieta materna pode atuar sobre o desempenho da progênie (Santana *et al.*, 2021; Santana *et al.*, 2023). A dieta, principal fator na produção de matrizes, é fundamental para obtenção do maior número de ovos de qualidade, assim como maior e melhor produção de pintainhos ao nascimento. Além disso, o desenvolvimento do embrião e do pintainho após o nascimento depende dos nutrientes provenientes da dieta da matriz que são depositados ainda no ovo (Emamverdi *et al.*, 2019). A incompatibilidade do ambiente materno-descendente pode causar efeitos positivos ou negativos sobre o desenvolvimento e desempenho do indivíduo da geração seguinte, modificando o funcionamento fisiológico das aves, causando alterações nos sistemas digestivo, reprodutivo, oxidativo e imune (Li *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2021). De acordo com Waaij *et al.* (2011), matrizes criadas com restrição alimentar têm descendentes programados para se desenvolverem de acordo com a baixa disponibilidade de alimento, e quando estes são alimentados *ad libitum* alcançam o peso adulto de maneira precoce, devido ao ganho compensatório, onde, ao invés de haver deposição de massa muscular, os nutrientes são desviados para a deposição de gordura nas aves.

Um dos pontos-chave na nutrição de aves é a utilização de aminoácidos baseado no conceito de proteína ideal (Emmert & Baker, 1997). A metionina é o primeiro aminoácido limitante para as aves, sendo fundamental para a síntese proteica, é doador de enxofre e está envolvido na síntese de poliamina. Dentre os principais intermediários das vias metabólicas, a metionina é precursora de carnitina e cistina, ela também é grupo doador de metila para a formação da coenzima S-adenosilmetionina e garante o funcionamento normal do metabolismo celular (Bunchasak, 2005). A metionina também possui papel importante nas funções fisiológicas, com ação antioxidante, a qual previne a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), e está ligada à função imunológica, por participar do crescimento de órgãos imunológicos e também na produção das células de defesa (Pan *et al.*, 2016; Kalvandi *et al.*, 2019; Machado *et al.*, 2020; Santana *et al.*, 2021).

Nos trabalhos já realizados, podemos observar que a suplementação de metionina pode estar relacionada também com a modulação do ambiente da progênie. Os resultados sugerem que a suplementação de metionina na dieta das matrizes pode contribuir para a redução dos danos causados pelo estresse térmico durante a fase de crescimento da progênie atuando sobre a capacidade antioxidante e o sistema imune das aves (Santana *et al.*, 2021; Santana *et al.*, 2023). Apesar da importância desses resultados, ainda é preciso maior compreensão sobre o efeito da metionina sobre as diversas rotas metabólicas que atuam para expressar o fenótipo da progênie. Como o desenvolvimento intestinal está diretamente relacionado ao desempenho das aves, e falhas fisiológicas no intestino podem comprometer o desenvolvimento geral dos animais (Yousaf *et al.*, 2016), o entendimento sobre como a suplementação de metionina na dieta da matriz pode contribuir para o ambiente intestinal de sua progênie poderá trazer mais respostas sobre esse tema.

Desta forma, as principais questões levantadas nesse estudo são: (1) qual o efeito da suplementação de metionina sobre o ambiente intestinal das matrizes? (2) qual o efeito da

suplementação de metionina sobre o metabolismo lipídico e produção de ovos das matrizes? (3) como a dieta materna pode influenciar no ambiente da progênie?

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Criação de matrizes

As codornas são aves menores que pertencem à ordem dos Galináceos, do gênero *Coturnix*. As espécies mais conhecidas e difundidas são as linhagens *Coturnix japônica* e *Coturnix coturnix* (Nascimento *et al.*, 2021). A *Coturnix japônica* é a mais recomendada para a produção de ovos, apresentando maior taxa de postura, melhor conversão alimentar por quilo de ovos produzidos e qualidade dos ovos superior. A postura é um processo biológico complexo, sendo influenciada pela idade, dieta, peso, ambiente e programa de iluminação.

As matrizes jovens estão frequentemente associadas à produção de ovos com baixo potencial de eclosão e pintos de baixa qualidade, e isto pode ser atribuído a menor capacidade das aves jovens de mobilizar gordura para a formação da gema, comprometendo a viabilidade embrionária e, conseqüentemente, reduzindo a eclosão. As diferenças relacionadas à idade da matriz podem explicar por que pintainhas provenientes de matrizes jovens têm mortalidade aumentada e desempenho reduzido (Vieira, 2001). Codornas fêmeas começam a manifestar seu desenvolvimento sexual em torno de seis a sete semanas de idade, sendo caracterizado pela postura dos primeiros ovos (SHI *et al.*, 2020). A produção eleva-se linearmente e atinge o pico de postura por volta da 12^a a 14^a semana de vida (Albino & Barreto, 2003). O peso médio dos ovos aumenta à medida que as matrizes atingem o pico de postura e isso acontece devido ao maior peso da gema (NASRI *et al.*, 2019). O aumento no peso da gema tem sido relacionado à taxa de síntese e transporte de lipoproteínas. Em codornas mais jovens, a quantidade de lipídios disponíveis para a deposição de gema é limitada, resultando em ovos com peso de gema menor em comparação com ovos de aves mais velhas (Nasri *et al.*, 2019). À medida que as aves envelhecem, a taxa de postura diminui, assim como a porcentagem de ovos férteis, a qualidade dos ovos e a eclodibilidade (Amevor *et al.*, 2021).

No sistema de criação de codornas, o consumo de alimento é regulado pela densidade energética da ração e pela exigência nutricional, portanto, é imprescindível o conhecimento acurado de suas relações. Quando ocorre aumento no nível energético da ração, o consumo de ração diminui, reduzindo a produção de ovos (Moura *et al.*, 2008). Portanto, as exigências nutricionais das aves devem ser expressas em relação à demanda energética, principalmente as exigências proteicas, considerando todo o perfil aminoacídico (Moura *et al.*, 2008). A suplementação de nutrientes em níveis ideais na dieta das matrizes influencia no desempenho reprodutivo destas. A adição de metionina na dieta aumenta e melhora a produção de ovos, isso porque a metionina aumenta a deposição de proteína, que junto com outros fatores aumenta a produção de ovos (Del Vesco *et al.*, 2013; Xiao *et al.*, 2017; Santana *et al.*, 2021).

Em relação ao peso, o desempenho e o valor econômico das aves estão diretamente relacionados ao seu peso corporal. Conforme apontado por Ojo *et al.* (2023), a variação no peso corporal de um lote de aves pode ser influenciada tanto por fatores genéticos quanto ambientais. Aves mais pesadas atingem o pico de produção mais rápido, tendem a produzir ovos com maior massa e produzem ovos mais pesados tanto no início quanto no final da produção (Ricklefs, 1983; Summers, 1994). De acordo com Reis *et al.* (2007), aves mais pesadas consomem mais ração e produzem mais ovos. Lima *et al.* (2011) observaram que pequenas variações no peso corporal podem resultar em inadequada conformação corporal para a maturação do aparelho reprodutor e início da postura. As codornas que entram precocemente e de forma rápida em produção, utilizam alta quantidade de nutrientes ingeridos para alcançar o peso corporal da ave adulta, e também, maior quantidade de suas reservas orgânicas para atender às necessidades de produção de massa de ovos (Leandro *et al.*, 2019).

O estresse ambiental pode reduzir a eficiência produtiva das codornas, devido à necessidade dos animais em regular os mecanismos de controle de temperatura para manter a homeostase. Além

disso, fatores estressantes podem interferir na qualidade do ovo, cor da gema, espessura da casca, valor nutritivo e vida útil dos ovos (Lara & Rostagno, 2013). Em condições de estresse por altas temperaturas, por exemplo, a ave aciona seus mecanismos termorregulatórios para auxiliar a dissipação do calor corporal para o ambiente, fazendo com que o consumo de ração diminua (Vandana *et al.*, 2020) e a conversão alimentar piore (Oliveira *et al.*, 2020), afetando a ingestão de nutrientes, que irá ocasionar menor produção de ovos e a má formação dos mesmos (Vandana *et al.*, 2020; Oliveira *et al.*, 2020). Alguns estudos (Hu *et al.*, 2020; Santana *et al.*, 2021) sugerem que a eficiência produtiva descrita acima também está relacionada ao comprometimento dos sistemas de defesa das aves, onde aves submetidas às altas temperaturas são mais suscetíveis à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), inibindo a ativação do sistema antioxidante.

A manipulação da iluminação é comum na criação de aves de postura, ela pode acelerar a maturação sexual em aves, ativando o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (Shi *et al.*, 2020). A fotoestimulação precoce resulta em maturação sexual precoce, mas ovos menores em maior quantidade (Robinson *et al.*, 2007; Zuidhof *et al.*, 2007). A formação dos ovos segue um ritmo biológico chamado ritmo circadiano, que ocorre endogenamente, mas se ajusta ao ambiente externo (Kennaway, 2004). Esse sistema permite ao organismo antecipar e se preparar para mudanças físicas no ambiente que estão associadas com a noite e o dia. A luz é recebida pelos fotorreceptores hipotalâmicos, que convertem o sinal eletromagnético em hormonal, estimulam a produção do hormônio liberador de gonadotrofinas, como hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH), hormônios responsáveis pelo crescimento e maturação dos ovócitos que serão liberados na fase de postura para então o ovo ser formado (Oliveira *et al.*, 2020). Os programas intermitentes de iluminação são mais eficientes, beneficiando a produção de ovos e a redução do consumo de ração (Melo *et al.*, 2006; Yuri, 2013). De acordo com Araújo *et al.* (2011), programas de iluminação adequados à linhagem utilizada, podem proporcionar melhor qualidade da casca do ovo, menor número de ovos de duas gemas e deformados, e menor mortalidade de matrizes por prolapso.

2.2 Nutrição de aves

Na produção animal, os custos com ração são bastantes significativos para o pecuarista. Diante deste cenário, a colina e a betaína são utilizadas como alternativas para diminuir o uso de metionina na dieta das aves. A colina é essencial para os impulsos nervosos e em seu metabolismo pode gerar betaína através da enzima colina oxidase, e em reações de metilação através da betaína aldeído desidrogenase. A betaína é um doador metil e tem característica osmótica que favorece a saúde dos animais (Figueroa-Soto & Valenzuela-Soto, 2018; Wu *et al.*, 2020).

A metionina responsável pelo fornecimento de enxofre para a síntese de cisteína, participa da síntese de glutatona peroxidase, servindo como um antioxidante para os animais, e atua na formação de proteína corporal, pele, penas e pelos (Lai *et al.*, 2018; Sahebi-Ala *et al.*, 2019). Esse aminoácido também tem função de doar grupo metil participando da síntese da S-adenosilmetionina (SAM) que é responsável para a metilação essencial na biossíntese de carnitina, creatina, fosfolipídeos e proteínas. Participa do metabolismo da homocisteína que é dividido em três partes: metilação, transsulfuração e remetilação (Silva, 2019).

A metilação ocorre quando a metionina é ativada, o radical metil é transferido para a reação de metilação para a SAM através da S-adenosil-metil-transferase (SAMT). A transsulfuração acontece por duas vias diferentes: uma ocorre a partir da conversão de metionina em SAM, o grupo metil da SAM é transferido e produz a S-adenosil-homocisteína (SAH) que será desmetilada, hidrolisada e de maneira irreversível é transformado em cisteína livre após a liberação da homocisteína. Na outra via, através da oxidação da colina a betaína, a homocisteína recebe o grupo metil. No processo de remetilação a homocisteína volta para a metionina através das enzimas betaine-homocisteína-metiltransferase (BHMT) e tetra-hidrofolato-metiltransferase (THFMT) que

incorporam o carbono do grupo metil à homocisteína que volta para a metionina (SILVA, 2019) (Figura 1).

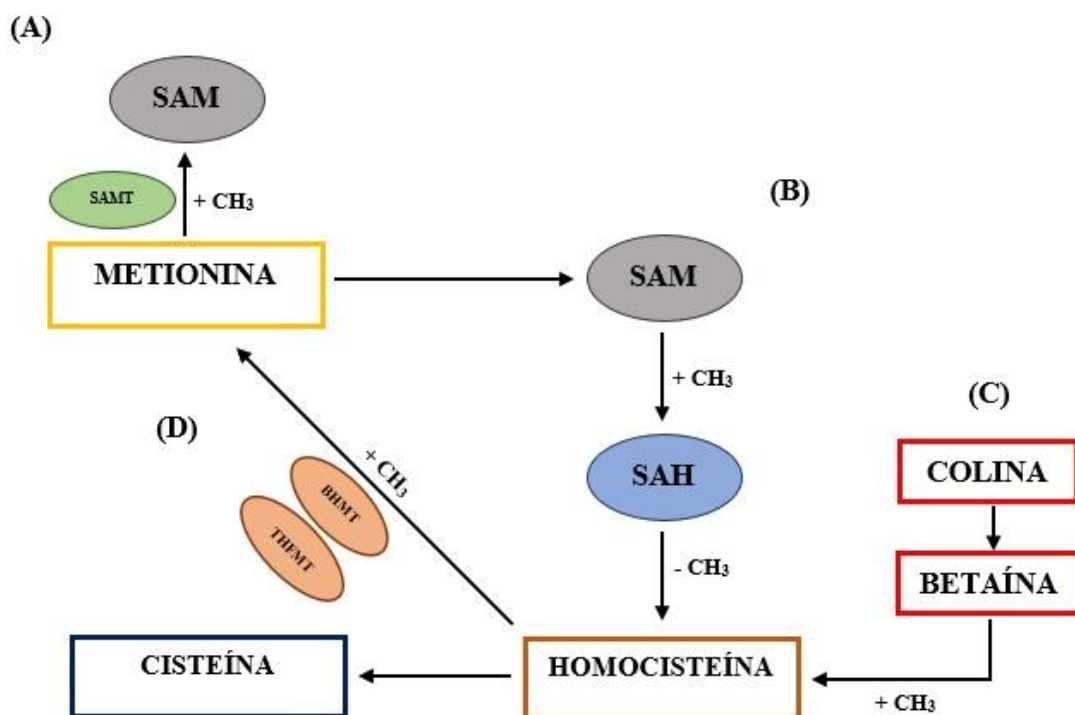


FIGURA 1. (A) representação esquemática da metilação; (B) representação esquemática da transsulfuração 1; (C) representação esquemática da transsulfuração 2; (D) representação esquemática da remetilação.

Por não ser sintetizada pelo organismo, a metionina é considerada um aminoácido limitante para as aves, no entanto deve ser fornecida de maneira sintética na dieta, e a mais utilizada é a DL-metionina. Ela é transportada pelo sistema Y+L, mais especificamente a proteína transportadora de aminoácidos neutros e catiônicos (Y+LAT1), e pela proteína transportadora de aminoácidos neutros (B^0AT) (To *et al.*, 2019). Ao chegar no intestino a metionina é absorvida nas membranas da borda em escova ou na membrana basolateral e, ao ser absorvida, os isômeros L-metionina e D-metionina são transportados para o fígado, onde a L-metionina é utilizada para a síntese proteica (Fagundes *et al.*, 2020). A síntese de proteínas envolve processos como a expressão de genes relacionados ao crescimento, hormônio do fator de crescimento relacionado à insulina tipo 1 (IGF-I), por exemplo, onde a metionina se liga ao mRNA na cadeia de polipeptídeos, formando o N-formilmetionil mensageiro (Del Vesco *et al.*, 2013; Ji *et al.*, 2022).

A suplementação de metionina na dieta de aves promove o crescimento regulando o desenvolvimento do músculo, apresentando maior diâmetro de fibras musculares (Sahebi-Ala *et al.*, 2021). A suplementação de metionina na dieta de aves aumenta o peso corporal, a metionina que compõe a dieta faz com que os níveis séricos do hormônio do crescimento (GH) e do IGF-I sejam aumentados (Lim *et al.*, 2022). Além disso, os níveis de expressão de genes relacionados ao crescimento, como GH e IGF-I, por exemplo, são bastante expressos quando a dieta das aves é suplementada com metionina (Wang *et al.*, 2021).

O crescimento das aves está relacionado à eficiência alimentar, ou seja, a conversão da ração em músculo. Essa conversão demanda gasto de energia, a qual é produzida na mitocôndria e quanto menor a produção de ATP, menor a eficiência alimentar desses animais (Del Vesco *et al.*, 2013). No entanto, a partir da glicose, a produção de ATP depende da β oxidação de ácidos graxos, que são transportados para dentro da mitocôndria através da carnitina (Fritz, 1959; Ringseis *et al.*, 2018).

A síntese de carnitina ocorre no fígado, rim e cérebro, regulada pela dieta. A deficiência de lisina, metionina, niacina, vitamina C e vitamina B6 prejudica a síntese de carnitina (Wu, 2013). A partir da lisina e metionina, a SAM degrada as proteínas para formar a ϵ -N-L-trimetilisina, as proteases vão liberar a ϵ -N-L-trimetilisina para formar a β -hidroxitrimetilisina, γ -butirotetáina aldeído e por fim a γ -butirotetáina que irá formar a carnitina, e nesse processo estão envolvidas as vitaminas C, B6 e niacina (Wu, 2013).

A eficiência alimentar, além de estar relacionada à função mitocondrial alterando a atividade das enzimas mitocondriais que irá refletir na capacidade oxidativa para a produção de ATP, também está relacionada à expressão de genes da cadeia transportadora de elétrons e fosforilação oxidativa (Brito *et al.*, 2017; Sahebi-Ala *et al.*, 2021). A ineficiência da cadeia transportadora de elétrons pode afetar a taxa de conversão e o desempenho de crescimento, e a suplementação de metionina, por exemplo, na dieta das aves, pode melhorar a eficiência e aumentar a síntese de ATP (Marayat *et al.*, 2019).

A ineficiência na função mitocondrial duodenal pode reduzir a eficiência de conversão de alimentos em massa muscular (Sahebi-Ala *et al.*, 2021). Avaliando o efeito da suplementação de metionina sobre a expressão de genes relacionados à produção de energia nas mitocôndrias, Marayat *et al.* (2019) observaram que a suplementação de metionina pode aumentar a expressão do translocador de nucleotídeos de adenina (ANT), aumentando a quantidade de ADP para a transformação em ATP, indicando maior produção de ATP que será direcionado ao crescimento da ave.

Avaliando a suplementação de lisina sobre a expressão de genes da cadeia transportadora de elétrons no músculo peitoral de frangos de corte, Brito *et al.* (2017) observaram que níveis de lisina abaixo do recomendado na dieta reduzem a expressão de genes como subunidade I da NADH desidrogenase (*ND1*), citocromo b (*CTYB*), subunidade I do citocromo C oxidase (*COXI*), subunidade II do citocromo C oxidase (*COXII*) e subunidade III do citocromo C oxidase (*COXIII*) refletindo na disponibilidade de ATP, diminuindo a energia mitocondrial, reduzindo o ganho de peso, a eficiência alimentar e deposição de proteína corporal das aves.

Baixos níveis de metionina na dieta das aves podem aumentar a expressão da proteína desacopladora (*UCP*), reduzindo a síntese de ATP, diminuindo a eficiência alimentar, como o aumento da conversão alimentar. Além disso, a suplementação de metionina pode aumentar os níveis de expressão de *COXIII*, o que está relacionado à eficiência da fosforilação oxidativa, bombeando prótons e elétrons e melhorando a eficiência alimentar das aves (Del Vesco *et al.*, 2013; Gasparino *et al.*, 2014).

2.3 Suplementação de metionina

2.3.1 Ambiente intestinal

O intestino delgado é dividido em três regiões: duodeno, jejuno e íleo (Figura 1). O duodeno está localizado logo após o proventrículo, é de maior diâmetro e é onde ocorre a liberação dos sais biliares produzidos pelo fígado para dentro do intestino. O jejuno é mais longo com várias alças em espiral e, durante o desenvolvimento do embrião, está ligado ao saco vitelínico, que possui nutrientes para o desenvolvimento da mucosa intestinal. O íleo vai da porção anterior do ceco até a junção ileocecal (Figura 2) (Boleli *et al.*, 2008).

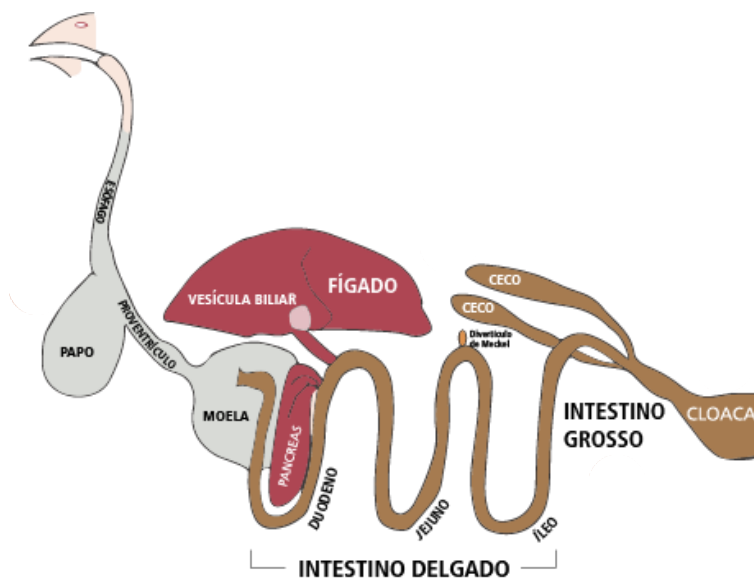


FIGURA 2. Representação da localização dos três segmentos que compõem o intestino delgado das aves. Fonte: Adaptado de Alltech®.

O desenvolvimento do intestino delgado começa ainda durante a fase de embrião e após a eclosão o peso do intestino aumenta rapidamente até os sete dias de idade, atingindo desenvolvimento máximo até 14 dias de idade (Ravindran & Abdollahi, 2021). A seleção genética tem papel relevante no desenvolvimento do intestino. Linhagens de aves de corte de rápido crescimento apresentam maior comprimento, peso e área de superfície que as aves de postura de crescimento lento.

É no intestino delgado onde ocorre a digestão e absorção dos nutrientes. Na mucosa intestinal, com a ajuda das vilosidades intestinais, os nutrientes são absorvidos do lúmen para a corrente sanguínea (Chen *et al.*, 2015). No epitélio intestinal encontramos três principais células, os enterócitos, as células caliciformes e as células enteroendócrinas. Os enterócitos são células colunares altas com borda em escova, são responsáveis pelo transporte dos nutrientes e digestão do alimento através de enzimas encontradas nas microvilosidades da borda em escova, responsáveis pelo processo de digestão. Já as células caliciformes são encontradas na superfície dos vilos e criptas que estão entre os enterócitos, são responsáveis pela liberação de mucina na luz intestinal que protege o epitélio. As células enteroendócrinas são encontradas no epitélio dos vilos, criptas e glândulas intestinais, são produtos de hormônios peptídicos e são responsáveis pela proliferação de células epiteliais, integridade da barreira intestinal e também participam da regulação da digestão, absorção e utilização dos nutrientes (Gurtler *et al.*, 1987; Smirnov *et al.*, 2005).

Os nutrientes que compõem a dieta das aves são absorvidos no intestino, e para proporcionar desenvolvimento e desempenho eficientes, são utilizados para manter a integridade da flora intestinal e a saúde das aves. Ainda no ovo, a digestão e absorção intestinal são limitadas devido a baixas concentrações de mRNA de genes relacionados às enzimas e transportadores de nutrientes intestinais na mucosa do intestino delgado (Nazem *et al.*, 2017). À medida que a eclosão se aproxima, a capacidade de absorção aumenta e para manter a integridade intestinal, os aminoácidos contidos na dieta são essenciais (Vaezi *et al.*, 2011). De acordo com Nazem *et al.* (2017), a metionina pode aumentar a superfície dos vilos no intestino dos embriões, produzindo pintainhos com maior área de absorção intestinal, maior peso corporal, e também é capaz de aumentar o número de células caliciformes, melhorando o sistema imunológico das aves. Portanto, a nutrição *in ovo* com metionina pode melhorar a estrutura das vilosidades intestinais, garantindo melhor absorção de nutrientes no dia da eclosão. A metionina também pode elevar os níveis de expressão de genes transportadores de nutrientes na borda em escova (Zeitz *et al.*, 2019). Segundo Wen *et al.* (2017), a suplementação de

metionina aumenta o nível de expressão do transportador de glicose (*SLC2A2*), o que indica maior aumento de absorção de glicose e síntese de ATP. De acordo com Wang *et al.* (2019), a DL-metionina na dieta de aves pode aumentar a expressão de genes relacionados ao transporte de aminoácidos, como o transportador de aminoácidos neutros (*SLC6A19*) no duodeno.

Assim como a dieta, desafios relacionados à temperatura do ambiente, por exemplo, podem causar prejuízos à integridade intestinal. Aves submetidas às altas temperaturas aumentam a produção de calor corporal reduzindo a produtividade. Quando submetidas a altas temperaturas, a morfometria do intestino delgado é modificada, comprometendo a integridade intestinal (Lin *et al.*, 2006). A altura das vilosidades é reduzida, tornando-se curtas e achatadas, logo as criptas ficam mais profundas (Wu *et al.*, 2018). Sabe-se que quando submetidas a altas temperaturas, as aves diminuem o consumo de ração, e a baixa ingestão de alimento prejudica a estimulação da mucosa, diminuindo a produção de enzimas digestivas e a quantidade de células caliciformes (Mehaisen *et al.*, 2017). No entanto, a suplementação de metionina na dieta das aves pode reduzir os efeitos deletérios causados pelas altas temperaturas (Moraes *et al.*, 2021).

2.3.2 Produção de ovos

A produção de ovos nas aves é iniciada a partir da maturação dos folículos, que aumenta o conteúdo da gema para que haja a liberação do ovócito. Em codornas, a hierarquia folicular é classificada em folículos grandes amarelos F1, F2, F3, folículos brancos grandes e folículos brancos pequenos (Figura 2) (Sreesujatha *et al.*, 2016). Essa hierarquia é estimulada pelos hormônios FSH e LH, que induzem a ovulação do ovócito que são capturados pelo infundíbulo, vai para o magno, onde é adicionado o albúmen, passa para o istmo, onde começa a ser produzida a membrana da casca, e por fim vai para a glândula da casca onde é adicionada a parte fluida do albúmen e procede a formação completa da casca (Figura 3) (Evêncio-Neto *et al.*, 1994). Suplementos dietéticos na ração das aves podem contribuir com o aumento dos níveis séricos das gonadotrofinas FSH e LH, regulando a expressão gênica dos receptores desses hormônios, promovendo o desenvolvimento e a maturação dos folículos em aves (Yang *et al.*, 2022). Com isso, a utilização de aminoácidos na dieta de codornas japonesas, como a metionina, tem influência no desempenho reprodutivo. A quantidade adequada de metionina proporciona melhor eficiência alimentar, melhorando o desempenho reprodutivo, qualidade e produção de ovos das aves devido ao aumento da deposição de proteína (Reda *et al.*, 2020). Em relação à qualidade do ovo, a resistência, peso e espessura da casca são melhorados com a suplementação deste aminoácido, devido ao fato de que a metionina aumenta o desempenho antioxidante dentro do corpo, comprovando a função antioxidante deste aminoácido (Reda *et al.*, 2020). As propriedades antioxidantes da metionina estão correlacionadas com o metabolismo lipídico. Durante a fase de postura, os lipídeos produzidos e coletados são utilizados para sintetizar os precursores da gema como a vitelogenina e lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL). Sendo assim, a suplementação de metionina na dieta das aves aumenta os níveis plasmáticos de lipoproteína de alta densidade (HDL), diminui os níveis de lipoproteína de baixa densidade, colesterol total e triglicerídeos (Reda *et al.*, 2020).



FIGURA 3. Hierarquia folicular em codornas japonesas (arquivo pessoal).

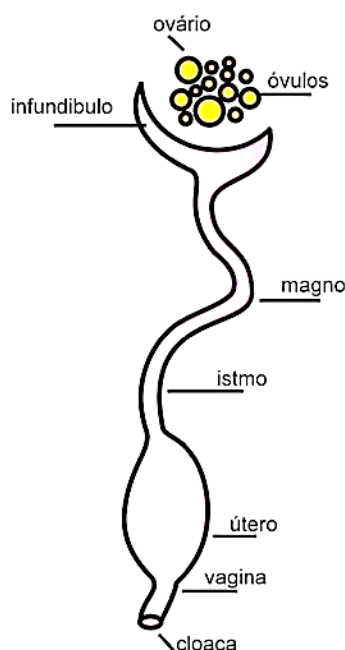


FIGURA 4. Caminho percorrido pelos ovócitos para a formação do ovo. Fonte: OVO: o alimento perfeito, 2010.

2.4 Efeito materno

O efeito materno é como o ambiente ou fenótipo da mãe age sobre o fenótipo da progênie (Danchin *et al.*, 2011; Day & Bonduriansky, 2011). Esse efeito faz com que a progênie tenha informações sobre o ambiente em que será submetida futuramente, desta forma, a progênie será então capaz de enfrentar e desenvolver uma resposta fenotípica adequada para tal situação (Burgess & Marshall, 2014; Mcghee & Bell, 2014; Storm & Lima, 2010). O estresse materno pode causar efeitos positivos ou não sobre a fisiologia, o comportamento e o processo de aprendizagem da progênie (Dixon *et al.*, 2016; Peixoto *et al.*, 2021).

A dieta materna tem influência na vida inicial e final da progênie, tendo efeito sobre os ovos, que consequentemente terá efeito sobre peso ao nascimento, que por sua vez tem efeito sobre o peso final, modulando o metabolismo da progênie (Li *et al.*, 2021; Tompkins *et al.*, 2022; Zukiwsky *et al.*, 2021). Fatores como a obesidade, por exemplo, podem ter efeito negativo sobre a progênie, podendo

causar doenças cardíacas, diabetes, asma, distúrbios do neurodesenvolvimento, entre outros durante a infância e vida adulta (Godfrey *et al.*, 2017).

Van der Waaij *et al.* (2011) mostram que matrizes criadas com restrição de alimento têm filhos programados para se desenvolverem de acordo com a baixa disponibilidade de alimento, e quando estes são alimentados *ad libitum* alcançam o peso adulto de maneira precoce, devido ao ganho compensatório, onde, ao invés de haver deposição de massa muscular, os nutrientes são desviados para a deposição de gordura nas aves.

Ao avaliar o efeito da suplementação de betaína na dieta de matrizes sobre o desenvolvimento da progênie de codornas japonesas, Boulton *et al.* (2021) observaram que as matrizes que tiveram dieta suplementada com betaína obtiveram ovos mais pesados, porém filhos nascidos mais leves. No entanto, em relação à reprodução, a progênie obteve maior peso de ovário e maior número de folículos, o que pode determinar melhor desempenho reprodutivo dessas aves futuramente. Também foi possível observar que as matrizes com dieta suplementada com betaína influenciou no comportamento da progênie, onde níveis mais altos de ansiedade foram detectados através da concentração de hormônios do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) circulantes no plasma sanguíneo.

Avaliando o efeito da suplementação de arginina na dieta de codornas japonesas submetidas a temperaturas elevadas, Kalvandi *et al.* (2022) observaram que a suplementação de arginina na dieta das matrizes é capaz de reverter os efeitos causados pelo fator estressante, melhorando o desempenho, reprodução, status antioxidante e imunidade das aves. Os autores observaram também que os níveis de anticorpos na gema do ovo e no soro da progênie foram maiores quando as matrizes submetidas à alta temperatura com dieta suplementada com arginina, indicando que a dieta materna influenciou na transmissão dos anticorpos, transmitindo capacidade imunitária para a progênie quando desafiada futuramente. Videla *et al.* (2020), ao avaliarem se a suplementação com timol na dieta de matrizes de codornas japonesas tem efeito sobre a progênie, observaram que a suplementação com timol pode modular a resposta imune da progênie.

Em um estudo sobre como a dieta materna suplementada com vitamina A tem efeito sobre o desempenho de frangos de corte, Wang *et al.* (2020) puderam observar que as matrizes que tiveram dieta suplementada com vitamina A tiveram filhos com maior peso inicial, mas não teve efeito sobre o crescimento das aves, esse ganho inicial pode ter ocorrido devido ao armazenamento da vitamina A no tecido hepático, atendendo a necessidade das aves nessa fase. Os autores também observaram que a suplementação de vitamina A na dieta materna influenciou na expressão de citocinas durante a fase inicial, onde a suplementação de vitamina A na dieta materna é transmitida para o embrião promovendo funções imunológicas para os frangos.

Tompkins *et al.* (2022) testaram como a suplementação dietética de matrizes de frangos de corte com óleo de peixe tem efeito sobre o desempenho da progênie e observaram que a suplementação com óleo de peixe na dieta das matrizes tem efeito positivo para a progênie durante a fase de crescimento, aumentando o consumo de ração e o ganho de peso da progênie aos 42 dias de idade, melhorando o desempenho do crescimento, através do aumento de massa muscular e redução da quantidade de lipídeos, tendo benefícios sobre a expressão de mRNAs lipogênicos e adipogênicos.

2.4.1 Desenvolvimento de pintainhos

O início do desenvolvimento embrionário das aves ocorre algumas horas após a fecundação, quando a energia produzida pela gema faz com que o embrião se desenvolva a partir de várias reações bioquímicas (Barbosa, 2011). Nos cinco primeiros dias de incubação inicia-se o processo de formação do trato gastrointestinal, sistema nervoso, cabeça, olhos, narinas, pescoço, âmnio, córion, alantoide, boca, proventrículo e moela. A partir do sexto dia começa a formação do bico, ossos, asas, pernas e penas. Aos 14 dias de incubação o embrião já está completamente desenvolvido, e nos últimos dias de incubação o albúmen é absorvido por completo e o embrião passa a ocupar todo o espaço do ovo para então eclodir (Cobb, 2008).

Fatores como nutrição *in ovo* e temperatura podem afetar o desenvolvimento do embrião. Elwan *et al.* (2019) e Elwan *et al.* (2021) observaram que a suplementação de metionina *in ovo* promove proteção do embrião, melhorando o desenvolvimento do pintainho ainda na fase que antecede a eclosão, reduzindo a taxa de mortalidade embrionária. E ao nascerem, o efeito da injeção de metionina *in ovo*, promove a redução do nível sérico da proteína do choque térmico 70 (HSP70), eleva a atividade de enzimas antioxidantes, aumentando a capacidade antioxidante, aumenta a atividade da glutatona, aumenta a expressão do gene *IGF-I* e do receptor do tipo Toll 4 (*TLR4*), promovendo aumento do peso do pintainho e a manutenção da homeostase quando submetida a condições de estresse.

Ovos suplementados com metionina promovem resultados positivos em relação aos dados de desempenho dos embriões, no entanto, essa suplementação deve acontecer em níveis que não sejam prejudiciais para o pintainho. Farias *et al.* (2023) observaram que níveis crescentes de metionina injetados nos ovos podem diminuir a eclodibilidade, aumentar a mortalidade embrionária e interferir no peso relativo de órgãos vitais no processo de metabolização dos nutrientes, devido à baixa capacidade do embrião metabolizar altos níveis de metionina. Além disso, o desenvolvimento do embrião e o peso ao nascer do pintainho está associado à morfologia do trato gastrointestinal (Farias *et al.*, 2023). A injeção *in ovo* também promove melhorias nos parâmetros morfométricos do intestino delgado. Nazem *et al.* (2017) observaram que ao serem injetados altos níveis de metionina (40 mg/ovo) *in ovo*, a altura, largura e área de profundidade dos vilos em todos os segmentos que compõem o intestino delgado das aves são aumentados, corroborando com o desenvolvimento das aves pós-eclosão. A suplementação de metionina *in ovo* promove maior peso do intestino delgado, aumenta a altura dos vilos e profundidade das criptas devido ao aumento da massa e número de enterócitos que proporcionam a proliferação e diferenciação das células intestinais, as quais garantem a integridade estrutural das vilosidades.

Além do efeito da suplementação *in ovo*, o efeito materno também pode agir sobre o desenvolvimento do embrião e do pintainho. A partir da dieta materna, efeitos intergeracionais e transgeracionais podem ser acionados para então serem transmitidos via ovo para a prole (Yehuda *et al.*, 2018). Alguns nutrientes que compõem a dieta da matriz podem, além de aumentar a produção de ovos e melhorar o desempenho de crescimento (Xiao *et al.*, 2017), modular o metabolismo da progênie (Li *et al.*, 2021). A metionina, por exemplo, tem como uma das suas funções doar o grupo metil para a metilação do DNA, modificação química que não altera a sequência do DNA, mas regula a expressão de genes, podendo ser herdada pela progênie (Triantaphyllopoulos *et al.*, 2016). No entanto, o efeito da suplementação de metionina na dieta da matriz sobre a sua progênie é pouco conhecido.

De acordo com Zhu *et al.* (2017), a suplementação com zinco (Zn) na dieta materna serve como proteção para o embrião, onde as matrizes alimentadas com Zn podem, através de mecanismos epigenéticos, favorecer a hipometilação de promotores que protegem as células dos efeitos deletérios causados pela exposição de metais não essenciais, aumentando o valor de expressão deste gene no fígado da progênie, sugerindo assim, que a adição de Zn na dieta da matriz é capaz de proteger o desenvolvimento embrionário. Também avaliando a suplementação de Zn na dieta materna sobre a imunidade intestinal da progênie, Li *et al.* (2015) observaram que o Zn na dieta materna é capaz de aumentar a função da barreira da mucosa intestinal, contribuindo com alterações epigenéticas ao promover a transcrição de genes relacionados à proteção da barreira intestinal e imunidade da progênie, impedindo a ativação da expressão genes ligados a processos biológicos que mantém a homeostase, através da hipermetilação de promotores destes mesmos genes.

De acordo com Araújo *et al.* (2015), o peso do ovo incubável é fundamental para o peso inicial da codorna, pois ovos mais pesados geram aves com maior peso ao nascimento, podendo refletir no desempenho inicial destas. Segundo Liu *et al.* (2021), a suplementação de metionina na dieta de matrizes contribui para o aumento da taxa de postura, do peso dos ovos e do albúmen, principalmente quando suplementadas com altos níveis de metionina. Santana *et al.* (2023) também

observaram efeito da suplementação de metionina na dieta de matrizes sobre a progênie, na qual a matriz alimentada com dieta suplementada com metionina apresentou maior produção de ovos e melhor eclosão de ovos férteis. Esses mesmos autores puderam observar que, durante a fase inicial (1 a 15 dias), a progênie de matrizes alimentadas com suplementação de metionina foi mais pesada durante a fase final de produção, a progênie apresentou maior peso (Liu *et al.*, 2021) e ganho de peso (Santana *et al.*, 2023).

Na grande maioria dos casos, o peso ao nascimento está correlacionado com o crescimento do pintainho, onde entre tantos fatores, a dieta fornecida, a qual deve atender às exigências nutricionais adequadas, contribui para tal efeito. De acordo com Chen *et al.* (2013), a suplementação de metionina na dieta de aves em fase inicial pode aumentar o desempenho de crescimento, mas não o peso corporal, porém animais mais leves requerem maiores concentrações de metionina, utilizando-a de maneira mais eficiente do que animais mais pesados. Avaliando a utilização de DL-metionina e L-metionina na dieta de frangos de corte, Rehman *et al.* (2019) observaram que o ganho de peso corporal na fase inicial das aves aumentou ao combinar as duas fontes de metionina, e observaram também que o melhor ganho de peso foi para aves que consumiram dieta contendo L-metionina, devido à L-metionina ser absorvida pelo corpo de maneira mais eficiente quando comparada com a DL-metionina.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBINO, L.F.T.; BARRETO, S.L.T. Criação de codornas para produção de ovos e carne. Viçosa: **Aprenda Fácil**, 2003.

AMEVOR, F.; CUI, Z.; NING, Z.; DU, X.; JIN, N.; SHU, G.; DENG, X.; ZHU, Q.; TIAN, Y.; LI, D.; WANG, T.; ZHANG, Z.; ZHAO, X. Synergistic effects of quercetin and vitamin E on egg production, egg quality, and immunity in aging breeder hens. **Poultry Science**, v. 100, p. 101481, 2021.

ARAÚJO, I. C. S.; MESQUITA, M. A.; ANDRADE, M. A. *et al.* Efeito do período e temperatura de armazenamento de ovos férteis sobre o rendimento de incubação e características de qualidade de codornas neonatas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, p. 1693-1702, 2015.

ARAÚJO, W. A. G.; ALBINO, L. F. T.; TAVERNARI, F. de C.; GODOY, M. J. de S. Programa de luz na avicultura de postura. **Rev. CFMV**, v. 52, p. 58-65, 2011.

BARBOSA, V. M. Fisiologia da incubação e desenvolvimento embrionário. Belo Horizonte: **FEPMVZ**, 2011.

BOLELI, I. C.; MAIORKA, A.; MACARI, M. Estrutura Funcional do Trato Digestório. In: MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. (Org.). Fisiologia Aviária – Aplicada a Frangos de Corte. 2. ed. Jaboticabal: **Funep**, 2008. p. 75-98.

BOULTON, K.; WILSON, P. W.; BISHOP, V. R.; PEREZ, J. H.; WILKSON, T.; HOGAN, K.; HOMER, N. Z. M.; ROBERT, C.; SMITH, J.; MEDDLE, S. L.; DUN, I. C.; WATSON, K. Parental methyl-enhanced diet and in ovo corticosterone affect first generation Japanese quail (*Coturnix japonica*) development, behaviour and stress response. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 2021.

BRITO, C. O.; DUTRA, J. L. L.; DIAS, T. N.; BARBOSA, L. T.; NASCIMENTO, C. S.; PINTO, A. P. G.; ALBINO, L. F. T.; FERNANDES, R. P. M.; MACÁRIO, M. S.; MELO, J. S. Effect of dietary lysine on performance & expression of electron transport chain genes in the pectoralis major muscle of broilers. **Animal**, v. 11, n. 5, p. 778–783, 2017.

BUNCHASAK, C.; SILAPASORN, T. Efeitos da adição de metionina em dietas de baixa proteína no desempenho produtivo, órgãos reprodutivos e composição química do fígado de galinhas poedeiras sob condições tropicais. **International Journal Poultry Ciência**, v. 4, p. 301-308, 2005.

BURGESS, S. C.; MARSHALL, D. J. Adaptive parental effects: The importance of estimating environmental predictability and offspring fitness appropriately. **Oikos**, v. 123, n. 7, p. 769–776, 2014.

CHEN, Y. P.; CHEN, X.; ZHANG, H.; ZHOU, Y. M. Effects of dietary concentrations of methionine on growth performance and oxidative status of broiler chickens with different hatching weight. **British Poultry Science**, v. 54, p. 531-537, 2013.

CHEN, Z.; XIE, J.; Y. HU, M.; TANG, J.; SHAO, Z.F.; LI, M.H. Protective effects of γ - aminobutyric acid (GABA) on the small intestinal mucosa in heat-stressed wenchang chicken. **Journal of Animal & Plant Sciences**, v. 25, p. 78-87, 2015.

COBB. COBB – VANTRESS. Guia de Manejo de Incubação. 2008. Disponível em: https://wp.ufpel.edu.br/avicultura/files/2012/04/Guia_incuba%C3%A7%C3%A3o_Cobb.pdf. Acesso em: 04/03/2023.

DANCHIN, E.; CHARMANTIER, A.; CHAMPAGNE, F. A.; MESOUDI, A.; PUJOL, B.; BLANCHET, S. Beyond DNA: integrating inclusive inheritance into an extended theory of Evolution. **Genetics**, v. 12, p. 475-486, 2011.

DAY, T.; BONDURIANSKY, R. A unified approach to the evolutionary consequences of genetic and nongenetic inheritance. **American Naturalist**, v. 178, n. 2, 2011.

DEL VESCO, A. P.; GASPARINO, E.; OLIVEIRA NETO, A. R.; ROSSI, R. M.; SOARES, M. A. M.; SILVA, S. C. C. Effect of methionine supplementation on mitochondrial genes expression in the breast muscle and liver of broilers. **Livestock Science**, v. 151, p. 284-291, 2013.

DIXON, L. M.; SPARKS, N. H. C.; RUTHRFORD, K. M. D. Early experiences matter: A review of the effects of prenatal environment on offspring characteristics in poultry. **Poultry Science**, v. 95, n. 3, p. 489–499, 2016.

ELWAN, H. A. M.; ELNESR, S. S.; XU, Q.; XIE, C.; DONG, X.; ZOU, X. Effects of In Ovo Methionine-Cysteine Injection on Embryonic Development, Antioxidant Status, IGF-I and TLR4 Gene Expression, and Jejunum Histomorphometry in Newly Hatched Broiler Chicks Exposed to Heat Stress during Incubation. **Animals**, v. 9, p. 1-13, 2019.

ELWAN, H.; XIE, C.; MIAO, L. P.; DONG, X.; ZOU, X. T.; MOHANY, M.; AHMED, M. M.; AL-REJAIE, S. S.; ELNESR, S. S. Methionine alleviates aflatoxin B1-induced broiler chicks embryotoxicity through inhibition of caspase-dependent apoptosis and enhancement of cellular antioxidant status. **Poultry Science**, v. 100, p. 1-16, 2021.

EMAMVERDI, M.; ZARE-SHAHNEH, A.; ZHANDI, M.; ZAGHARI, M.; MINAI-TEHRANI, D.; KHODAEI-MOTLAGH, M. An improvement in productive and reproductive performance of aged broiler breeder hens by dietary supplementation of organic selenium. **Theriogenology**, v. 126, p. 279-285, 2019.

EMMERT, J. L.; BAKER, D. H. Use of the Ideal Protein Concept for Precision Formulation of Amino Acid Levels in Broiler Diets. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 6, p. 462-470, 1997.

EVENCIO-NETO, J.; SIMÕES, M. J.; PARDI, P. C.; BINVIGNAT, G. Aspectos histoquímico y ultraestructurales de los mucocitos presentes em el epitelio del oviducto de la gallina del campo (*Gallus Gallus*) durante la ovoposicion. **Revista Chilena de Anatomia**, v. 12, p. 177-182, 1994.

FAGUNDES, N. S.; MILFORT, M. C.; WILLIAMS, S. M.; DA COSTA, M. J.; FULLER, A. L.; MENTEN, J. F.; REKAYA, R.; AGGREY, S. E. Dietary methionine level alters growth, digestibility, and gene expression of amino acid transporters in meat-type chickens. **Poultry Science**, v. 99, n. 1, p. 67–75, 2020.

FARIAS, T.M.; CRUZ, F.G.G.; RUFINO, J.P.F.; OLIVEIRA FILHO, P.A.; SANTOS, A.N.A.; BEZERRA, N.S.; CHAVES, F.A.L.; MODA, R.F. Effect of in ovo injection of DL-methionine on

hatchability, embryo mortality, hatching weight, blood biochemical parameters and gastrointestinal tract development of breeder chicks. **Animal Biotechnology**, 2023. doi: 10.1080/10495398.2023.2199501.

FIGUEROA-SOTO, C. G.; VALENZUELA-SOTO, E. M. Glycine betaine rather than acting only as an osmolyte also plays a role as regulator in cellular metabolism. **Biochimie**, v. 147, p. 89-97, 2018.

FRITZ, I. B. Action of carnitine on long chain fatty acid oxidation by liver. **Animal Journal Physiology**, v. 197, p. 297-304, 1959.

GASPARINO, E.; DEL VESCO, A.P.; VOLTOLINI, D. M.; NASCIMENTO, C. S.; BATISTA, E.; KHATLAB, A. S.; GRIESER, D. O.; ZANCANELA, V.; GUIMARÃES, S. E. F. The effect heat stress on *GHR*, *IGF-I*, *ANT*, *UCP* and *COXIII* mRNA expression in the liver and muscle of high and low feed efficiency female quail. **Molecular, Cellular & Developmental Biology**, p. 466,473, 2014.

GODFREY, K. M.; REYNOLDS, R. M.; PRESCOTT, S. L.; NYEIRENDA, M.; JADDOE, V. W. V.; ERICKSSON, J. G.; BROEKMAN, B. F. P. Influence of maternal obesity on the long-term health of offspring. **The Lancet Diabetes and Endocrinology**, v. 5, n.1, p. 53-64, 2017.

GURTLER, H.; KETZ, H. A.; KOLB, E.; SCHRODER, L.; SEIDEL, H. **Fisiologia Veterinária**, 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1987.

HU, H.; DAI, S.; LI, J.; WE, A.; BAI, X. Glutamine improves heat stress-induced oxidative damage in the broiler thigh muscle by activating the nuclear factor erythroid 2-related 2/Kelch-like ECH-associated protein 1 signaling pathway. **Poultry Science**, v. 99, p. 1454-1461, 2020.

JI, K.; LIANG, H.; GE, X.; REN, M.; PAN, L.; HUANG, D. Optimal methionine supplementation improved the growth, hepatic protein synthesis and lipolysis of grass carp fry (*Ctenopharyngodon idella*). **Aquaculture**, v. 554, p. 1-11, 2022.

KALVANDI, O.; SADEGHI, A.; KARIMI, A. Methionine supplementation improves reproductive performance, antioxidant status, immunity and maternal antibody transmission in breeder Japanese quail under heat stress conditions. **Arch. Animal. Breed.**, v. 62, p. 275-286, 2019.

KALVANDI, O.; SADEGHI, A.; KARIMI, A. Arginine supplementation improves reproductive performance, antioxidant status, immunity and maternal antibody transmission in breeder Japanese quail under heat stress conditions. **Italian Journal of Animal Science**, v. 21, n. 1, p. 8-17, 2022.

KENNAWAY, D. J. The role of circadian rhythmicity in reproduction. **Human Reproduction Update**, v. 11, p. 91-101, 2004.

LAI, A.; DONG, G.; SONG, D.; YANG, T.; ZHANG, X. Responses to dietary levels of methionine in broilers medicated or vaccinated against coccidia under *Eimeria tenella*-challenged condition. **BMC Veterinary Research**, v. 14, p. 1-11, 2018.

LARA, L. J.; ROSTAGNO, M. H. Impact of Heat Stress on Poultry Production. **Animals**, v. 3, p. 356-369, 2013.

- LEANDRO, N. S. M.; CAFÉ, M. B.; STRINGHINI, J. H.; GOMES, N. A.; MENDONÇA, R.A.N.; ARAÚJO, I. C. S. Aspectos reprodutivos e desempenho de diferentes linhagens de matrizes de codornas japonesas. **Ciência Animal Brasileira**, v. 20, 2019.
- LI, C.; GUO, S.; GAO, J.; DU, E.; LV, Z.; ZHANG, B. Maternal high-zinc diet attenuates intestinal inflammation by reducing DNA methylation and elevating H3K9 acetylation in the A20 promoter of offspring chicks. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 26, p. 173-183.
- LI, F.; NING, H.; DUAN, X.; CHEN, Z.; XU, L. Effect of dietary L-arginine of broiler breeder hens on embryonic development, apparent metabolism, and immunity of Offspring. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 74, p. 1-12, 2021.
- LI, S.; LI, J.; LIU, Y.; LI, C.; ZHANG, R.; BAO, J. Effects of Intermittent Mild Cold Stimulation on mRNA Expression of Immunoglobulins, Cytokines, and Toll-Like Receptors in the Small Intestine of Broilers. **Animals**, v. 10, p. 1-17, 2020.
- LI, S.; ZHI, LIU, Y.; SHEN, J.; LIU, L.; YAO, J.; YANG, X. Effect of in ovo feeding of folic acid on the folate metabolism, immune function and epigenetic modification of immune effector molecules of broiler. **British Journal of Nutrition**, v. 115, p. 411-421, 2019.
- LIM, C. I.; PARK, J. H.; RYU, K. S. Dietary excess supplementation of limiting amino acids promotes growth performance in broiler chickens through GH and IGF-I. **Animal Nutrition and Feed Technology**, v. 22, p. 383-398, 2022.
- LIMA, H.; BARRETO, S.; SANTOS, D.; RIBAS, D. S. Diferentes pesos corporais ao final da fase de recria sobre o desempenho produtivo de codornas japonesas. 2011.
- LIN, H.; JIAO, H. C.; BUYSE, J.; DECUYPERE, E. Strategies for preventing heat stress in Poultry. **Worlds Poultry Science Journal**, Ithaca, v. 62, p. 71–86, 2006.
- LIU, W. C.; ZHU, Y. R.; ZHAO, Z. H.; JIANG, P.; YIN, F. Q. Effects of Dietary Supplementation of Algae-Derived Polysaccharides on Morphology, Tight Junctions, Antioxidant Capacity and Immune Response of Duodenum in Broilers under Heat Stress. **Animals**, v. 11, p. 1-13, 2021.
- MACHADO, M.; AZEREDO, R.; FONTINHA, F.; FERNÁNDEZ-BOO, S.; CONCEIÇÃO, L. E. C.; DIAS, J.; COSTAS, B. Dietary Methionine Improves the European Seabass (*Dicentrarchus labrax*) Immune Status, Inflammatory Response, and Disease Resistance. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1-17, 2020.
- MARAYAT, J.; LERTPIMONPAN, S.; RAKANGTHONG, C.; SOPANNARATH, P.; BUNCHASAK, C.; LOOGYAI, W. Effect of low-protein diets supplemented with methionine on growth performance, carcass characteristics, and expression of ANT and UCP genes in the breast muscle of Betong chickens (KU Line). **Songklanakarin Journal Science Technology**, v. 41, n. 6, p. 1211-1218, 2019.
- MCGHEE, K. E.; BELL, A. M. Paternal care in a fish: Epigenetics and fitness enhancing effects on offspring anxiety. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 281, n. 1794, doi: <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2014.114>, 2014.

- MEHAISEN, G. M.; IBRAHIM, R. M.; DESOKY, A. A.; SAFAA, H. M.; EL-SAYED, O. A.; ABASS, A. O. The importance of propolis in alleviating the negative physiological effects of heat stress in quail chicks. **PLOS ONE**, v. 12, p. e10186907, 2017.
- MELO, L. M.; MURGAS, L. D. S.; OLIVEIRA, B. L.; ZANGERÔNIMO, M. G. Utilização de programas de iluminação contínuo e intermitente em codornas (*Coturnix coturnix*). In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 43, 2006, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: SBZ, 2006.
- MORAES, L. R.; DELICATO, M. E. A.; DA SILVA CRUZ, A.; DA SILVA, H. T. F. N. P.; ALVES, C. V. B. V.; CAMPOS, D. B.; SARAIVA, E. P.; DA COSTA, F. P.; GUERRA, R. R. Methionine supplementing effects on intestine, liver and uterus morphology, and on positivity and expression of Calbindin-D28k and TRPV6 epithelial calcium carriers in laying quail in thermoneutral conditions and under thermal stress. **PLOS ONE**, v. 16, p. e0245615, 2021.
- MOURA, G.; BARRETO, S.; DONZELE, J.L.; HOSODA, L.R.; PENA, G.M.; ANGELINI, M.S. Dietas de diferentes densidades energéticas mantendo constante a relação energia metabolizável: nutrientes para codornas japonesas em postura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, n. 9, p. 1628–1633, 2008.
- NASCIMENTO, J.; ZICA, A.; PRADO, A.; PASSO, P. **Criação de codornas para corte**. Brasília: Emater-DF, 2021.
- NASRI, H.; VAN DEN BRAND, H.; NAJJAR, T.; BOUZOUAIA, M. Egg storage and breeder age impact on egg quality and embryo development. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 104, p. 257–268, 2019.
- NAZEM, M. N.; SAJJADIAN, S. M.; KHEIRANDISH, R.; MOHAMMADREZAEI, H. Histomorphometric analysis of the small intestine of broiler chick embryos injected in ovo with methionine. **Animal Production Science**, v. 17, p. 1-9, 2017.
- OJO, V.; AYORINDE, K. L.; FATOKI, H. O. Relationship between body weight and some egg production trait in the Japanese quail (*Coturnix japonica*). **NISEB Journal**, v. 11, 2023.
- OLIVEIRA, H. F.; CARVALHO, D. P.; ISMAR, M. G.; REZENDE, P.; SOUTO, C.; OLIVEIRA, S. Fatores intrínsecos a poedeiras comerciais que afetam a qualidade físico-química dos ovos. **Pubvet**, v. 14, p. 1-11, 2020.
- PAN, F. Y.; FENG, L.; JIANG, W. D.; JIANG, J.; WU, P.; KUANG, S. Y.; TANG, L.; TANG, W. N.; ZHANG, Y. A.; ZHOU, X. Q. Methionine hydroxy analogue enhanced fish immunity via modulation of NF- κ B, TOR, MLCK, MAPKs and Nrf2 signaling in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 56, p. 208-228, 2016.
- PASTORE, S. M.; OLIVEIRA, W. P.; MUNIZ, J. C. L. Panorama da Coturnicultura no Brasil. **Nutritime**, v. 9, p. 2041-2049, 2012.
- PEIXOTO, M. R. L. V.; COOLEY, L.; WIDWSKI, T. M. Maternal age and maternal environment affect stress reactivity and measures of social behaviour in laying hens. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1-10, 2021.

RAVINDRAN, V.; ABDOLLAHI. Nutrition and Digestive Physiology of the Broiler Chick: State of the Art and Outlook. **Animals**, v. 11, p. 1-23, 2021.

REDA, F.M.; SWELUM, A.A.; HUSSEIN, E.O.S.; ELNESR, S.S.; ALHIMAIDI, A.R.; ALAGAWANY, M. Effects of Varying Dietary DL-Methionine Levels on Productive and Reproductive Performance, Egg Quality, and Blood **Biochemical Parameters of Quail Breeders**. **Animals**, v. 10, p. 1839, 2020.

REHMAN, A. U.; ARIF, M.; HUSNAIN, M. M.; ALAGAWANY, M.; EL-HACK, M. E. A.; TAHA, A. E.; ELNESR, S. S.; ABDEL-LATIF, M. A.; OTHMAN, S. I.; ALLAM, A. A. Growth Performance of Broilers as Influenced by Different Levels and Sources of Methionine Plus Cysteine. **Animals**, v. 9, p. 1-12, 2019.

REIS, R. S.; LIMA, H. J. D.; MESQUITA, R. M. Avaliação do peso corporal de codornas japonesas na maturidade sexual sobre o desempenho produtivo. *In: III Simpósio Internacional de Coturnicultura II Congresso Brasileiro de Coturnicultura*. **Anais...** Lavras, Minas Gerais: Núcleo de Estudos em Ciência e Tecnologia Avícolas. p. 195, 2007.

RICKLEFS, R. E. Egg Characteristics of lines of Poultry Production. New Delhi – Ludhiana: Kalayain Publication, 1983. p. 239-241.

RINGSEIS, R.; KELLER, J.; EDER, K. Basic mechanisms of the regulation of L-carnitine status in monogastrics and efficacy of L-carnitine as a feed additive in pigs and poultry. **Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 102, p. 1686-1719, 2018.

ROBINSON, F. E.; ZUIDHOF, M. J.; RENEMA, R. A. Reproductive efficiency and metabolism of female broiler breeders as affected by genotype, feed allocation, and age at photostimulation. 1. Pullet growth and development. **Poultry Science**, v. 86, p. 2256-2266, 2007.

SAHEBI-ALA, F.; HASSANABADI, A.; GOLIAN, A. Effects of dietary supplemental methionine source and betaine replacement on the growth performance and activity of mitochondrial respiratory chain enzymes in normal and heat-stressed broiler chickens. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 103, p. 87-99, 2019.

SAHEBI-ALA, F.; HASSANABADI, A.; GOLIAN, A. Effect of replacement different methionine levels and sources with betaine on blood metabolites, breast muscle morphology and immune response in heat-stressed broiler chickens. **Italian Journal of Animal Science**, v. 20, p. 33-45, 2021.

SANTANA, M. H. M.; COSTA, F. G. P.; GUERRA, R. R.; GIVISIEZ, P. E. N.; FIGUEIREDO JUNIOR, J. P.; LIMA, M. R. Methionine plus Cystine Levels for Light Laying Hens on Production Phase. **Research, Society and Development**, v. 10, p. e57910212817, 2021.

SANTANA, T. P.; GASPARINO, E.; KHATLAB, A. S.; BRITO, C. O.; BARBOSA, L. T.; LAMONT, S. J.; DEL VESCO, A. P. Effect of prenatal ambient temperature on the performance physiological parameters, and oxidative metabolism of Japanese quail (*Coturnix japonica*) layers exposed to heat stress during growth. **Sci. Rep.**, v. 11, p. 1-11, 2021.

SANTANA, T.P.; GASPARINO, E.; KHATLAB, A.S.; PEREIRA, A.M.F.E.; BARBOSA, L.T.; FERNANDES, R.P.M.; LAMONT, S.J.; DEL VESCO, A.P. Effects of maternal methionine

supplementation on the response of Japanese quail (*Coturnix japonica*) chicks to heat stress. **Journal of Animal Science**, 2023, doi: 10.1093/jas/skad042.

SHI, L.; SUN, Y.; XU, H.; YIFAN, L.; YUNLEI, L.; ZIYAN, H.; AIXIN, N.; CHAO, C.; DONGLI, L.; PANLIN, W.; JING, F.; HUI, M.; JILAN, C. Effect of age at photostimulation on sexual maturation and egg-laying performance of layer breeders. **Poultry Science**, v. 99, p. 812–819, 2020.

SILVA, A. F. **Suplementação de metionina, colina e betaína para galinhas poedeiras e codornas japonesas**. 2019. Tese (Doutorado em Zootecnia) – 92 páginas - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife – PE, 2019.

SMIRNOV, A.; PEREZ, R.; AMIT-ROMACH, E.; SKLAN, D.; UNI, Z. Mucin Dynamics and Microbial Populations in Chicken Small Intestine Are Changed by Dietary Probiotic and Antibiotic Growth Promoter Supplementation. **Nutrient-Gene Interaction**, v. 135, p. 187-192, 2005.

SREESUJATHA, R. M.; JEYAKUMAR, S.; KUNDU, A.; BALASUNDARAM, C. Use of transcutaneous ultrasonography to characterize ovarian status, size distribution, and hierarchical status of follicles in Japanese quail (*Coturnix japonica*). **Theriogenology**, v. 86, p. 1231-1239, 2016.

STORM, J. J.; LIMA, S. L. Mothers forewarn offspring about predators: A transgenerational maternal effect on behavior. **American Naturalist**, v. 175, n. 3, p. 382-390, 2010.

SUMMERS, J. D. A importância do peso corporal e da idade de maturidade sexual - Influência dos programas adequados de manejo e alimentação para obtenção de uma poedeira lucrativa. *In*: Simpósio Técnico de Produção de Ovos, 1994, São Paulo. **Anais...** São Paulo: APA, 1994. p. 127-149.

TRIANANTAPHYLLOPOULOS, K. A.; IKONOMOPOULOS, I.; BANNISTER, A. J. Epigenetics and inheritance of phenotype variation in livestock. **Epigenetics & Chromatin**, v. 9, p. 1-18, 2016. <https://doi.org/10.1186/s13072-016-0081-5>.

TO, V. P. T. H.; MASAGOUNDER, K.; LOEWEN, M. E. SLC transporters ASCT2, B0AT1-like, y+LAT1, and LAT4-like associate with methionine electrogenic and radio-isotope flux kinetics in rainbow trout intestine. **Physiological Reports**, v. 7, n. 21, p. 1-17, 2019.

TOMPKINS, Y. H.; CHEN, C.; SWEENEY, K. M.; KIM, M.; VOY, B. H.; WILSON, J. L.; KIM, W. K. The effects of maternal fish oil supplementation rich in n-3 PUFA on offspring-broiler growth performance, body composition and bone microstructure. **PLoS ONE**, v. 17, n. 8, p. 1-20, 2022.

VAEZI, G. H.; TESHFAM, M.; BAHADORAN, Sh.; FARAZYAN, H.; HOSSEINI, S. Effects of different levels of lysine on small intestinal villous morphology in starter diet of broiler chickens. **Journal of Global Veterinary**, v. 7, p. 523-526, 2011.

VANDANA, G. D.; SEJIAN, V.; LEES, A. M.; PRAGNA, P.; SILPA, M V.; MALONEY, S. K. Heat stress and poultry production: impact and amelioration. **International Journal of Biometeorology**, v. 65, p. 163-179, 2020.

VAN DER WAAIJ, E. H.; VAN DEN BRAND, H.; VAN ARENDONK, J. A. M.; KEMP, B. Effect of match or mismatch of maternal-offspring nutritional environment on the development of offspring in broiler chickens. **Animal**, v. 5, n. 5, p. 741–748, 2011.

VIDELA, E. A.; GIAYETTO, O.; FERNÁNDEZ, M. E.; CHACANA, P. A.; MARÍN, R. H.; NAZAR, F. N. Immediate and transgenerational effects of thymol supplementation, inactivated *Salmonella* and chronic heat stress on representative immune variables of Japanese quail. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2020.

VIEIRA, S.L. Idade da matriz, tamanho do ovo e desempenho do pintinho. In: Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícola, Campinas, SP. **Anais...** Campinas: Facta, p.117-123, 2001.

WAAIJ, E. H. V.; BRAND, H. V.; ARENDONK, J. A. V.; KEMP, B. Effect of match or mismatch of maternal–offspring nutritional environment on the development of offspring in broiler chickens. **Animals**, v. 5, p. 741-748, 2011.

WANG, Y.; YIN, X.; YIN, D.; LEI, Z.; MAHMOOD, T.; YUAN, J. Antioxidant response and bioavailability of methionine hydroxy analog relative to DL-methionine in broiler chickens. **Animal Nutrition**, v. 5, p. 241-247, 2019.

WANG, Y.; LI, L.; GOU, Z.; CHEN, F.; FAN, Q.; LIN, X.; YE, J.; ZHANG, C.; JIANG, S. Effects of maternal and dietary vitamin A on growth performance, meat quality, antioxidant status, and immune function of offspring broilers. **Poultry Science**, v. 99, n. 8, p. 3930–3940, 2020.

WANG, W.; YANG, P.; HE, C.; CHI, S.; LI, S.; MAI, K. Effects of dietary methionine on growth performance and metabolism through modulating nutrient-related pathways in largemouth bass (*Micropterus salmoides*). **Aquaculture Reports**, v. 20, p. 1-10, 2021.

WEN, C.; JIANG, X. Y.; DING, L. R.; WANG, T.; ZHOU, Y. M. Effects of dietary methionine on growth performance, meat quality and oxidative status of breast muscle in fast-and slow-growing broilers. **Poultry Science**, v. 96, n. 6, p. 1707-1714, 2017.

WU, G. **Aminoacids Biochemistry and Nutrition**. 1ª ED, 2013.

WU, Q. J.; LIU, N.; WU, X. H.; WANG, G. Y.; LIN, L. Glutamine alleviates heat stress-induced impairment of intestinal morphology, intestinal inflammatory response, and barrier integrity in broilers. **Poult Science**, v. 97, n. 8, p. 2675–2683, 2018.

WU, J.; HE, C.; BU, J.; LUO, Y.; YANG, S.; YE, C.; YU, S.; HE, B.; YIN, Y.; YANG, X. Betaine attenuates LPS-induced downregulation of Occludin and Claudin-1 and restores intestinal barrier function. **BMC Veterinary Research**, v. 16, n. 1, p. 1–8, 2020.

XIAO, X.; WANG, Y.; LIU, W.; JU, T.; ZHAN, X. Effects of different methionine sources on production and reproduction performance, egg quality and serum biochemical indices of broiler breeders. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, v. 30, p. 828-833, 2017.

YANG, B.; GONG, J.; JING, J.; HAO, Y.; LI, S.; LIU, G.; FENG, Z.; ZHAO, G. Effects of Zinc Methionine Hydroxy Analog Chelate on Laying Performance, Serum Hormone Levels, and Expression of Reproductive Axis Related Genes in Aged Broiler Breeders. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 9, p. 1-10, 2022.

YEHUDA, R.; LEHRNER, A.; BIERER, L. M. The public reception of putative epigenetic mechanisms in the transgenerational effects of trauma. **Environmental Epigenetics**, v. 4, p. 1-7, 2018.

YOUSAF, M. S.; AHMAD, I.; ASHRAF, K.; RASHID, M. A. Comparative effects of different dietary concentrations of β -galacto-oligosaccharides on growth performance, feed conversion efficiency and organs development in broilers. **Journal of Animal and Plant Science**, v. 26, p. 1603-1608, 2016.

YURI, F. M. **Programas de iluminação para poedeiras semipesadas**. 2013. 59p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages-SC, 2013.

ZEITZ, J. O.; MOHRMANN, S.; KÄDING, S. C. *et al.* Effects of methionine on muscle protein synthesis and degradation pathways in broilers. **Journal Animal Physiology Animal Nutrition**, v. 103, p. 191-203, 2019.

ZHU, Y.; LIAO, X.; LU, L.; LI, W.; ZHANG, L.; JI, C.; LIN, X.; LIU, H. C.; ODLE, J.; LUO, X. Maternal dietary zinc supplementation enhances the epigenetic-activated antioxidant ability of chick embryos from maternal normal and high temperatures. **Oncotarget**, v. 8, p. 19814-19824, 2017.

ZUIDHOF, M. J.; SCHNEIDER, B. L.; CARNEY, V. L.; KORVER, D. R.; ROBINSON, F. E. Growth, efficiency, and yield of commercial broilers from 1957, 1978, and 2005. **Poultry Science**, v. 93, p. 2970-2982, 2014.

ZUIDHOF, M. J.; RENEMA, R. A.; ROBINSON, F. E. Reproductive Efficiency and Metabolism of Female Broiler Breeders as Affected by Genotype, Feed Allocation, and Age at Photostimulation. Reproductive Efficiency. **Poultry Science**, v. 86, p. 2278-2286, 2007.

ZUKIWSKY, N. M. *et al.* Broiler growth and efficiency in response to relaxed maternal feed restriction. **Poultry Science**, v. 100, n. 4, p. 1-9, 2021.

4. ARTIGO 1

NÍVEIS DE METIONINA NA DIETA DA MATRIZ SOBRE A EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS AO METABOLISMO LIPÍDICO DA PROGÊNIE DE CODORNAS JAPONESAS

Artigo formatado de acordo com as normas do periódico Animals

RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da dieta materna sobre a expressão dos genes relacionados ao metabolismo lipídico no fígado de matrizes e da progênie de codornas japonesas. O experimento foi conduzido em esquema fatorial 3 x 3, sendo três dietas referentes à suplementação de metionina para as matrizes e para cada tratamento das matrizes, três dietas referentes à suplementação de metionina para sua progênie. Matrizes que receberam dietas com suplementação do nível recomendado de metionina (0,86% de metionina - MET) e dieta com suplementação acima do nível recomendado de metionina (1,17% de metionina - HMET) apresentaram melhores parâmetros reprodutivos e maior expressão das apolipoproteínas ($p < 0,05$). Matrizes alimentadas com dieta sem suplementação de metionina (LMET) tiveram descendentes mais leves aos 15 dias de idade e com menor ganho de peso. Aos 35 dias de idade, as dietas MET e HMET proporcionaram maior peso e maior ganho de peso da progênie. Dentro dos tratamentos das matrizes, o valor de expressão de apolipoproteínas foi maior para as progênies alimentadas com MET. Também houve efeito da dieta da progênie sobre a expressão de acetil carboxilase (ACC), ácido graxo sintase (FAS) e apolipoproteína A 1 (APOA1) ($p < 0,05$). Conclui-se que a suplementação de metionina na dieta de matrizes foi essencial para melhorar os parâmetros reprodutivos das aves. Além disso, a suplementação de metionina na dieta das matrizes influenciou na expressão de genes que estão relacionados ao processo de formação da gema e do desenvolvimento do embrião, garantindo melhor desenvolvimento e desempenho da progênie pós-eclosão.

Palavras-chave: ácidos graxos; apolipoproteínas e síntese lipídica

4.1 Introdução

Manter a dieta das matrizes com ingredientes e quantidade de ingredientes ideal é fundamental para que estas potencializem a produção de ovos férteis. Em aves, a secreção de hormônios relacionados à reprodução está relacionada ao metabolismo lipídico e pode ser afetada por nutrientes que compõem a dieta. Dessa forma, diversos trabalhos têm mostrado como diferentes compostos podem interferir em diferentes pontos do metabolismo lipídico [1, 2]. Um resultado comumente apresentado nestes trabalhos é que a falta de equilíbrio no metabolismo dos lipídeos que são absorvidos, sintetizados e oxidados resulta no acúmulo de gordura corporal, principalmente na cavidade abdominal, o que afeta negativamente a produção de ovos.

Tanto a deficiência quanto a suplementação de metionina afetam o catabolismo e o acúmulo de lipídeos [3]. Uma das funções desse aminoácido é doar grupo metil para participar da síntese da S-adenosilmetionina (SAM) que é responsável pela metilação, processo esse essencial na biossíntese de carnitina [4]. A carnitina tem como função facilitar o transporte de ácidos graxos de cadeia longa e pode aumentar a oxidação destes diminuindo os níveis de gordura corporal [5, 6]. Estudos mostram que a metionina da dieta pode potencializar o desempenho de postura por promover o desenvolvimento e maturação folicular e a ovulação, elevando os níveis séricos das gonadotrofinas e também promovendo o aumento dos níveis de expressão de genes como receptor do hormônio folículo estimulante (*FSHR*) e receptor do hormônio luteinizante (*LHR*) [7, 8]. Entretanto, a deficiência de metionina na dieta pode interferir no desenvolvimento dos órgãos reprodutivos, afetando o peso relativo dos ovários, número e tamanho de folículos [8, 9].

Além de afetar os parâmetros de desempenho da matriz, a dieta oferecida para a fêmea pode também influenciar as rotas metabólicas e o fenótipo de sua progênie [10]. A suplementação de metionina, por exemplo, tem sido mostrada como capaz de alterar o metabolismo e desempenho da progênie [11], alterar o transcriptoma no fígado das aves [10], bem como alterar o metabolismo energético hepático [12]. Durante a fase reprodutiva ocorre um processo intenso do metabolismo lipídico que permite a síntese dos precursores que irão formar a gema, e que são imprescindíveis para o desenvolvimento adequado do embrião [13]. Cerca de 6% de lipídeos estão presentes na gema. Durante a fase de crescimento do embrião esses lipídeos são utilizados como dieta inicial, servindo como precursores estruturais essenciais da membrana do saco vitelínico e como fonte de energia durante o desenvolvimento [14].

A síntese dos lipídios é realizada pelas enzimas acetil carboxilase-CoA (ACC) e ácido graxo sintase (FAS) [15, 16]. Já o transporte dos lipídeos se dá através da corrente sanguínea com auxílio das apolipoproteínas. Através da ligação entre os lipídeos e as apolipoproteínas são formadas as lipoproteínas. Dentre as apolipoproteínas, a apolipoproteína A 1 (APOA-I) é o principal componente da lipoproteína de alta densidade (HDL) que participa do transporte do colesterol do tecido extra-hepático para o fígado [17, 18]. Já a apolipoproteína B (APOB) é o principal componente proteico da lipoproteína de baixa densidade (LDL), que faz o transporte reverso, ou seja, transporta os lipídeos do fígado para as células do corpo [19]. Trabalhos mostram que a expressão desses genes pode ser regulada por diversos fatores para controlar o acúmulo de gordura abdominal nas aves [18, 20].

Apesar dos estudos na área, ainda não está completamente elucidado o mecanismo de ação da metionina sobre os diferentes pontos do metabolismo lipídico nas matrizes de codornas de postura, e como o efeito da dieta materna pode interferir no metabolismo de sua progênie. Para aprofundar os conhecimentos disponíveis, este experimento foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito de diferentes níveis de suplementação de metionina na dieta das matrizes sobre a expressão dos genes *ACC*, *FAS*, *APOA1* e *APOB* no fígado das matrizes e da progênie de codornas japonesas.

4.2 Materiais e Métodos

Este trabalho foi realizado na fazenda experimental da Universidade Estadual de Maringá – PR, Brasil, de acordo com as especificações do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA – nº 2402310719).

4.2.1 Matrizes

Duzentas codornas japonesas (*Coturnix japonica*) fêmeas de um dia de idade foram criadas em gaiolas coletivas até 98 dias de idade. Durante esse período, foram observados diariamente o desenvolvimento e a taxa de postura das aves. Aos 98 dias de idade, 30 codornas com peso médio de 154,6 g e taxa de postura de 85% foram realojadas em gaiolas individuais e distribuídas em três tratamentos referentes à suplementação de metionina: dieta sem suplementação de metionina (LMET); dieta com suplementação do nível recomendado de metionina, de acordo com Rostagno et al. (2017) [21] (0,86% de metionina - MET); e dieta com suplementação acima do nível recomendado de metionina (1,17% de metionina - HMET) (Tabela 1). As matrizes permaneceram em experimentação dos 98 aos 136 dias de idade, totalizando 38 dias: sendo 28 dias antes de começar a coleta de ovos para incubação, para garantir que todos os ovos fossem fertilizados durante o período experimental, e 10 dias para a coleta de ovos. Durante o período experimental as aves tiveram livre acesso à ração e água.

Na terceira semana de experimentação, 30 machos padronizados pelo peso médio (161,2 g) tiveram contato diário de uma hora com as matrizes. O efeito parental dos machos foi minimizado através de realização de rodízio. Os machos foram utilizados apenas para o acasalamento e tiveram livre acesso à água e ração formulada para atender às exigências desses animais.

Diariamente os ovos foram coletados, identificados, pesados e armazenados individualmente em sacos confeccionados de rede plástica à temperatura ambiente, e no final desse período foram transferidos para incubadora (Chocomaster Luna 240) previamente programada para atingir temperatura de 37 °C e umidade relativa de 60%. Ao final dos 19 dias de incubação, os ovos não eclodidos foram abertos e classificados como ovos não fecundados ou embriões mortos.

Tabela 1. Composição percentual e valores nutricionais das dietas experimentais fornecidas para matrizes de codornas japonesas em fase de postura (98 a 136 dias de idade)

Ingredientes (kg)	Dietas Experimentais		
	LMET [†]	MET	HMET
Milho moído	56,63	56,30	56,08
Farelo de soja	32,20	32,30	32,30
Sal	0,37	0,37	0,37
Óleo vegetal	1,70	1,60	1,50
Calcário calcítico	7,52	7,52	7,52
Fosfato bicálcico	0,99	0,99	0,99
L-Lisina HCL	0,13	0,13	0,13
DL-Metionina	-	0,335	0,650
L-Treonina	0,04	0,04	0,04
Mistura vitamínica e mineral ¹	0,40	0,40	0,40
Total	100	100	100
Composição Energética e Nutricional			
E metabolizável (kcal/kg)	2796	2795	2795
Proteína bruta (%)	19	19	19
Cálcio (%)	3,1	3,1	3,1
Fósforo digestível (%)	0,33	0,33	0,33
Sódio (%)	0,17	0,17	0,17
Aminoácidos (%)			
Metionina+Cistina digestível	0,53	0,86	1,17
Lisina digestível	1,04	1,05	1,05
Treonina digestível	0,71	0,71	0,71
Triptofano digestível	0,21	0,21	0,21

¹Mistura vitamínica e mineral de postura (por kg de ração): Vit. A = 2.250.000 UI/kg; Vit. D3 = 500.00 UI/kg; Vit. E = 7.000 UI/kg; Vit. B1 = 450 mg/kg; Vit. B2 = 1.000 mg/kg; Vit. B6 = 450 mg/kg; Vit. B12 = 3.500 mg/kg; Vit. K3 = 420 mg/kg; Pantetonato cálcio = 2.500 mg/kg; Niacina = 7.000 mg/kg; Ácido Fólico = 180 mg/kg; Biotina = 15 mg/kg; Colina = 55 g/kg; Zinco = 12 g/kg; Ferro = 12 g/kg; Manganês = 15 g/kg; Cobre = 3.000 mg/kg; Iodo = 250 mg/kg; Cobalto = 50 mg/kg; Selênio = 72 mg/kg; Etoxiqum = 40 mg/kg; B.H.A = 40 mg/kg; Veículo Q.S.P = 1.000 g/kg. [†]LMET, dieta

sem suplementação de metionina; MET, dieta com suplementação do nível recomendado de metionina; HMET, dieta com suplementação acima do nível recomendado de metionina.

4.2.2 Progenie

Para avaliar o efeito do ambiente materno sobre o metabolismo lipídico da prole, o experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 3, sendo três dietas para as matrizes, e para cada tratamento das matrizes, três dietas para sua prole.

Após o nascimento, um total de 234 pintainhos foram anilhados, pesados e alojados em círculo de proteção previamente aquecido, com lâmpada de aquecimento, contendo ração para a fase inicial (Tabela 2) e água à vontade. Os pintainhos foram alojados de acordo com a dieta experimental das matrizes e criados de maneira convencional sob as mesmas condições experimentais até os 15 dias de idade (Figura 1).

Aos 15 dias de idade, as proles macho e fêmea de cada matriz foram pesadas e distribuídas em três tratamentos referentes à suplementação de metionina: dieta sem suplementação de metionina (LMET); dieta com suplementação do nível recomendado de metionina, de acordo com Rostagno et al. (2017) [21] (0,70% de metionina - MET); e dieta com suplementação acima do nível recomendado de metionina (0,90% de metionina - HMET) (Tabela 2). As aves que pertenciam ao mesmo tratamento foram alocadas em gaiolas coletivas ($n = 13$), sendo duas aves por gaiola e tiveram livre acesso à ração e água.

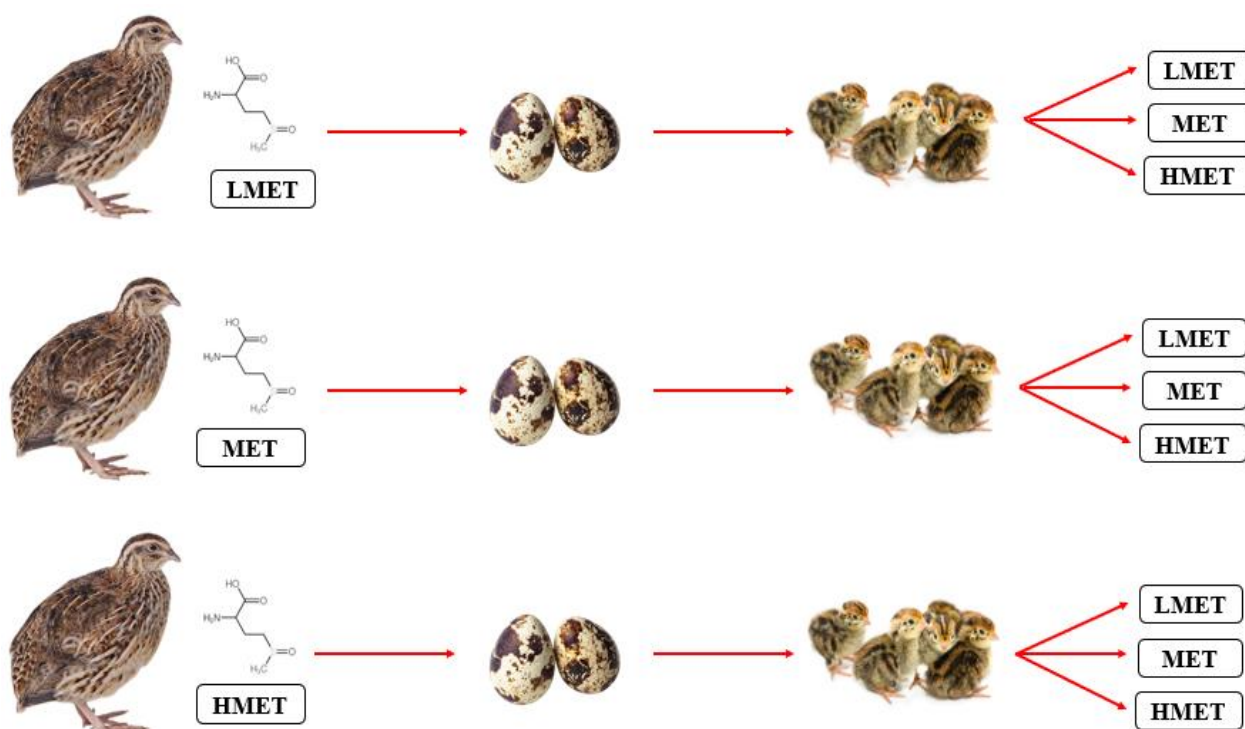


Figura 1. Representação esquemática do delineamento experimental. Ovos de cada matriz foram coletados por 10 dias e incubados sob as mesmas condições. Ao nascerem, os pintainhos foram alojados de acordo com a dieta experimental da matriz e criados de maneira convencional sob as mesmas condições experimentais até os 15 dias de idade. Aos 15 dias de idade, as aves filhas de cada matriz foram distribuídas em três tratamentos referentes à suplementação de metionina: aves que receberam dieta sem suplementação de metionina (LMET); dieta com suplementação do nível recomendado de metionina (MET); e dieta com suplementação acima do nível recomendado de metionina (HMET).

Tabela 2. Composição percentual e valores nutricionais das dietas experimentais fornecidas para progênie de codornas japonesas em fase inicial e de crescimento

Ingredientes (kg)	Composição Percentual			
	1 a 14 dias	15 a 35 dias		
		LMET [†]	MET	HMET
Milho moído	61,87	65,53	65,27	65,06
Farelo de soja	34,00	30,50	30,60	30,60
Sal	0,44	0,60	0,60	0,60
Óleo vegetal	0,30	1,70	1,60	1,50
Calcário calcítico	1,12	1,40	1,40	1,40
Fosfato bicálcico	1,53	1,40	1,40	1,40
L-Lisina HCL	0,12	0,13	0,13	0,13
DL-Metionina	0,18	-	0,16	0,37
L-Treonina	0,01	0,01	0,01	0,01
Mistura vitamínica e mineral ¹	0,40	0,40	0,40	0,40
Total	100	100	100	100
Composição Energética e Nutricional				
Energia metabolizável (kcal/kg)	2898	2908	2910	2013
Proteína bruta (%)	20	19	19	19
Cálcio (%)	0,88	0,92	0,92	0,92
Fósforo digestível (%)	0,45	0,42	0,42	0,42
Sódio (%)	0,19	0,21	0,21	0,21
Aminoácidos (%)				
Metionina+Cistina digestível	0,75	0,53	0,70	0,90
Lisina digestível	1,10	1,02	1,03	1,02
Treonina digestível	0,72	0,68	0,68	0,68
Triptofano digestível	0,22	0,21	0,21	0,21

¹Mistura vitamínica e mineral de postura (por kg de ração): Vit. A = 2.250.000 UI/kg; Vit. D3 = 500.00 UI/kg; Vit. E = 7.000 UI/kg; Vit. B1 = 450 mg/kg; Vit. B2 = 1.000 mg/kg; Vit. B6 = 450 mg/kg; Vit. B12 = 3.500 mg/kg; Vit. K3 = 420 mg/kg; Pantetonato cálcio = 2.500 mg/kg; Niacina = 7.000 mg/kg; Ácido Fólico = 180 mg/kg; Biotina = 15 mg/kg; Colina = 55 g/kg; Zinco = 12 g/kg; Ferro = 12 g/kg; Manganês = 15 g/kg; Cobre = 3.000 mg/kg; Iodo = 250 mg/kg; Cobalto = 50 mg/kg; Selênio = 72 mg/kg; Etoxiquim = 40 mg/kg; B.H.A = 40 mg/kg; Veículo Q.S.P = 1.000 g/kg. [†]LMET, dieta sem suplementação de metionina; MET, dieta com suplementação do nível recomendado de metionina; HMET, dieta com suplementação acima do nível recomendado de metionina.

4.2.3 Avaliações

Durante os 38 dias de período experimental das matrizes foram avaliados a taxa de postura (%) e peso de ovo (g) conforme Bastos et al. [22] e a taxa de eclosão (%) foi calculada de acordo com Koppenol et al. [23].

O desempenho da progênie foi avaliado no período de 15-35 dias de idade. Ao final do período de coleta dos ovos das matrizes e do período experimental da progênie, as aves foram abatidas por deslocamento cervical e ensanguinhadas. Das matrizes, os óvulos em fase F1 (fase na qual o óvulo está pronto para ser liberado) foram extraídos do ovário para obtenção do peso (g) destes.

4.2.4 Isolamento de RNA e síntese de cDNA

Para a análise de expressão gênica, amostras do fígado foram coletadas em RNAlater™ (Life Technologies do Brasil, Brasil) e armazenadas a -20 °C até o momento da extração de RNA.

O RNA total foi extraído com o uso do reagente Trizol® (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) de acordo com as normas do fabricante, na proporção de 1 mL para cada 80 mg de tecido. A integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio (10 mg/mL) e visualizado sob luz ultravioleta.

Todas as amostras foram tratadas com DNase I (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) seguindo as instruções do fabricante, para que fosse eliminada uma possível contaminação com DNA. Para a síntese do DNA complementar (cDNA) foi utilizado o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA), utilizando 10 µL de RNA tratado com DNA, seguindo as instruções do fabricante.

Para as reações de PCR em tempo real foi utilizado o fluoróforo SYBR GREEN (SYBR® GREEN PCR Master Mix, Applied Biosystems, EUA). A reação de amplificação continha 5 µL de cDNA diluído a 40 ng, 0,5 µL de cada primer a 10 µM (a concentração final da reação foi de 200 nM), 12,5 µL de SYBR® GREEN PCR Master Mix e 6,5 µL de água ultra pura, com volume final de 25 µL. Para medir a eficiência de cada primer, uma série de reações de 25 µL foi realizada semelhante à anterior utilizando 5 µL de pool de cDNA a partir de uma diluição em série (80 ng/µL, 40 ng/µL, 20 ng/µL e 10 ng/µL). A programação do termociclador para todos os genes foi: 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. As curvas de melting foram realizadas para garantir a especificidade das análises.

Os primers utilizados nas reações para a amplificação dos genes apolipoproteína A 1 (*APOA1*), apolipoproteína B (*APOB*), acetil-CoA carboxilase (*ACC*) e ácido graxo sintase (*FAS*), foram obtidos a partir das informações contidas em Lei e Lixian [24] e Jiang et al. [25], com base nas sequências de genes depositados em www.ncbi.nlm.nih.gov (número de acesso NM_205525, NM_001044633.2, NM_205505 e J03860, respectivamente). O gene da β -actina (número de acesso L08165) foi utilizado como controle endógeno (Tabela 3). Todas as análises foram realizadas em um volume de 25 µL e em duplicatas.

As eficiências de amplificação foram semelhantes para os genes de interesse, entre 90 e 110% de eficiência.

Tabela 3. Sequência de primers utilizados na reação de RT-qPCR

Gene	Sequência dos primers (5'-3')	pb ¹	Nº de acesso
<i>APOA1</i> *	F: GTGACCCTCGCTGTGCTCTT R: CACTCAGCGTGTCCAGGTTGT	217	NM_205525
<i>APOB</i>	F: GACTTGTTACACGCCTCA R: TAACTTGCCTGTTATGCTC	196	NM_00104463 3.2
<i>ACC</i>	F: AATGGCAGCTTTGGAGGTGT R: TCTGTTTGGGTGGGAGGTG	136	NM_205505
<i>FAS</i>	F: CTATCGACACAGCCTGCTCCT R: CAGAATGTTGACCCCTCCTACC	107	J03860
<i>B-actina</i>	F: ACCCCAAAGCCAACAGA R: CCAGAGTCCATCACAATACC	136	L08165

¹pb, pares de base. **APOA1*, apolipoproteína A 1; *APOB*, apolipoproteína B; *ACC*, acetil-CoA-carboxilase; *FAS*, ácido graxo sintase.

4.2.5. Análise estatística

O método $2^{-\Delta CT}$ foi utilizado para as análises de quantificação relativa. Para todos os dados, o efeito dos tratamentos foi avaliado através da ANOVA One-way. Para avaliar como o efeito do ambiente materno influencia nas respostas da progênie ao seu próprio ambiente, o efeito da dieta da progênie foi avaliado dentro da dieta das matrizes. Quando observado efeito significativo dos tratamentos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$; SAS Inst. Inc., NC, USA). Todos os resultados são apresentados como médias e erro padrão agrupado.

4.3 Resultados

4.3.1 Matrizes

O peso do ovo, a taxa de eclosão e a taxa de postura sofreram efeito da dieta experimental. As matrizes que receberam dietas suplementadas com metionina (MET e HMET) apresentaram maior peso de ovo (10,99 g e 11,12 g, respectivamente) e maior taxa de postura (96,66% e 96,66%, respectivamente) quando comparados com aquelas que receberam dieta LMET (87,22%), e as matrizes que receberam dieta MET obtiveram maior taxa de eclosão (96,29%) que as aves dos demais tratamentos ($p < 0,05$). Matrizes que receberam dieta MET e HMET também tiveram maior peso de folículos (1,28 g e 1,12 g, respectivamente) que aquelas suplementadas com LMET (1,03 g) ($p < 0,05$).

A dieta também influenciou os níveis de expressão dos genes relacionados ao metabolismo lipídico ($p < 0,05$). Matrizes que receberam MET apresentaram menor nível de mRNA *ACC* quando comparadas com as aves dos demais tratamentos. Já a expressão de *FAS* foi menor quando as matrizes foram alimentadas com dieta LMET. Quando as aves foram alimentadas com suplementação de metionina (MET e HMET) o nível de expressão de *APOA1* foi maior que o das matrizes alimentadas com LMET (Figura 2).

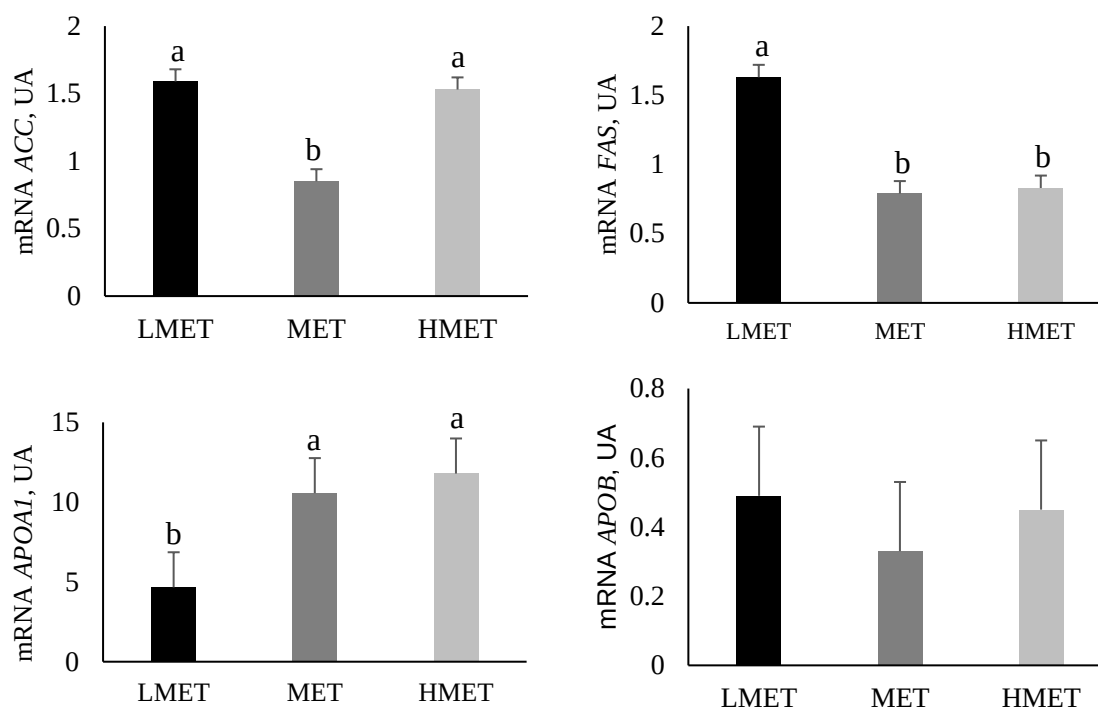


Figura 2. Expressão gênica de *ACC*, *FAS*, *APOA1* e *APOB* no fígado de matrizes de codornas japonesas. LMET, dieta sem suplementação de metionina; MET, dieta com suplementação do nível recomendado de metionina; HMET, dieta com suplementação acima do nível recomendado de metionina. ^{a,b}Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p < 0.05$). Os resultados são apresentados como média e erro padrão médio.

4.3.2 Progenie na fase inicial (1 a 14 dias) e de crescimento (15 a 35 dias)

Foi observado efeito da dieta materna sobre o desempenho da prole durante a fase inicial ($p < 0,05$). Como esperado, matrizes que foram alimentadas com dieta LMET tiveram descendentes mais leves (33,28 g) aos 15 dias de idade e com menor ganho de peso (1-15 dias de idade) (25,48 g) do que os descendentes de matrizes que foram alimentadas com MET e HMET.

A partir dos 15 dias de idade, as proles de cada matriz também foram alimentadas com diferentes dietas referentes à suplementação de metionina. Podemos observar que a dieta da prole teve efeito significativo sobre os parâmetros de desempenho: aves alimentadas com dieta com suplementação de metionina apresentaram maior peso aos 35 dias, ganho de peso e melhor conversão alimentar no período de 15-35 dias (Tabela 4).

Tabela 4. Desempenho da progênie aos 35 dias de idade

Dieta materna	Dieta progênie	P35 (g)*	GP (g)	CA
LMET [†]	LMET	89,00	58,75	5,89
	MET	122,25	82,50	6,05
	HMET	119,40	69,20	6,12
MET	LMET	103,41	69,91	4,56
	MET	117,00	64,00	4,56
	HMET	114,97	70,72	4,18
HMET	LMET	98,65	63,75	4,4
	MET	124,37	81,00	4,98
	HMET	116,60	71,26	4,93
Efeitos principais				
Dieta materna	LMET	110,21	70,07	4,94
	MET	111,79	71,94	5,16
	HMET	113,20	71,36	5,15
Dieta progênie	LMET	97,02 ^b	64,00 ^b	6,05 ^a
	MET	121,20 ^a	79,00 ^a	4,44 ^b
	HMET	116,99 ^a	70,40 ^{ab}	4,87 ^b
Valor de p				
Dieta materna		0,8825	0,9229	0,8796
Dieta progênie		< ,0001	0,0051	0,0006
Interação		0,4155	0,3630	0,9654
EPM		15,3684	12,9160	1,4744

*P35, peso da progênie aos 35 dias de idade; GP, ganho de peso; CA, conversão alimentar. [†]LMET, dieta sem suplementação de metionina; MET, dieta com suplementação do nível recomendado de metionina; HMET, dieta com suplementação acima do nível recomendado de metionina. Os resultados são apresentados como média e erro padrão médio (EPM). ^{a,b}As médias na mesma coluna seguidas por uma mesma letra difere entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Ainda na fase de crescimento, houve efeito de interação entre a dieta da matriz e a dieta da progênie sobre a expressão de *APOB* ($p < 0,05$). Dentro dos tratamentos das matrizes, o valor de expressão de *APOB* foi maior para as progênies alimentadas com MET. Também houve efeito da dieta da progênie sobre a expressão de *ACC*, *FAS* e *APOA1* ($p < 0,05$). A progênie alimentada com dieta HMET apresentou menor nível de expressão de *ACC* e *FAS* do que aves alimentadas com LMET, e as aves que receberam dieta MET e HMET apresentaram menor nível de expressão de *APOA1*. O valor de expressão de *APOA1* da progênie também foi afetado pela dieta da matriz ($p < 0,05$), onde a progênie alimentada com MET apresentou maior nível de expressão mRNA *APOA1*, quando comparadas com os demais tratamentos (Tabela 5).

Tabela 5. Expressão de genes relacionados ao metabolismo lipídico no fígado da progênie de codornas japonesas

Dieta materna	Dieta progênie	<i>ACC</i> *	<i>FAS</i>	<i>APOA1</i>	<i>APOB</i>
LMET [†]	LMET	1,81	7,59	0,71	0,12 ^c
	MET	1,67	3,98	0,13	0,31 ^b
	HMET	1,51	2,09	0,42	0,21 ^{bc}
MET	LMET	2,85	6,25	0,98	0,13 ^c
	MET	2,80	3,98	0,38	0,27 ^{bc}
	HMET	1,14	1,91	0,46	0,12 ^c
HMET	LMET	1,85	5,50	0,53	0,16 ^{bc}
	MET	1,81	4,16	0,27	0,67 ^a
	HMET	1,53	1,93	0,47	0,12 ^c
Efeitos principais					
Dieta materna	LMET	1,66	4,67	0,48 ^b	0,19
	MET	2,15	6,71	0,65 ^a	0,15
	HMET	1,71	3,81	0,46 ^b	0,25
Dieta progênie	LMET	2,17 ^a	8,66 ^a	0,74 ^a	0,13
	MET	2,09 ^{ab}	4,04 ^{ab}	0,26 ^b	0,41
	HMET	1,39 ^b	1,98 ^b	0,45 ^b	0,15
Valor de p					
Dieta materna		0,1598	0,4611	0,0188	0,0861
Dieta progênie		0,0111	0,0024	< ,0001	< ,0001
Interação		0,1079	0,4037	0,0686	0,0046
EPM		0,6050	4,1125	0,1530	0,0925

**ACC*, acetil-CoA carboxilase; *FAS*, ácido graxo sintase; *APOA1*, apolipoproteína A 1; *APOB*, apolipoproteína B.

[†]LMET, dieta sem suplementação de metionina; MET, dieta com suplementação do nível recomendado de metionina; HMET, dieta com suplementação acima do nível recomendado de metionina. Os resultados são apresentados como média e erro padrão médio (EPM).^{a, b}As médias na mesma coluna seguidas por uma mesma letra difere entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

4.4 Discussão

A suplementação de metionina na dieta contribui para o melhor desempenho reprodutivo durante a fase de postura. Esta aumenta a deposição de proteína proporcionando o aumento da taxa de postura, o peso do ovo, melhora a qualidade dos ovos e também melhora a taxa de eclosão de ovos férteis [26, 27]. Isso explica os nossos resultados, os quais pudemos observar que matrizes alimentadas com suplementação de metionina obtiveram ovos mais pesados, melhor taxa de postura e melhor taxa de eclosão.

Em aves, no início da postura a produção de lipídeos aumenta no tecido hepático devido à secreção de estrogênio. O processo da síntese de ácido graxo é realizado a partir de uma sequência de reações, que se inicia com a formação de malonil-CoA a partir da acetil-CoA, para formar ácido graxo [19, 28]. Esse processo depende das enzimas ACC e FAS, as quais tem como função regular a homeostase energética e deposição de lipídeos no corpo, e catalisar a síntese de palmitato que produz longas cadeias de ácidos graxos saturados, respectivamente. Diante disso, nossos resultados mostram que a suplementação de metionina influenciou a regulação de marcadores da síntese lipídica, onde matrizes que consumiram dieta com suplementação de metionina apresentaram menor valor de expressão dos genes *ACC* e *FAS* no fígado. Também foi possível observar nesse estudo que quando as matrizes foram alimentadas com MET e HMET as aves obtiveram maior valor de *APOA1*, principal componente proteico da lipoproteína de alta densidade (HDL) e lipoproteína de densidade muito baixa densidade (VLDL). A *APOA1* é sintetizada no fígado e intestino e associada à HDL promove a saída do colesterol das células periféricas extra-hepáticas para o fígado, onde será metabolizado [29]. A regulação negativa da expressão do gene *APOA1* pode afetar a formação de HDL, prejudicando o transporte reverso do colesterol do tecido extra-hepático para o fígado, havendo maior deposição de gordura abdominal nas aves [18].

Em relação ao efeito do ambiente materno sobre a progênie na fase inicial (1-15 dias de idade), foi possível observar que matrizes alimentadas com LMET tiveram descendentes mais leves e com menor ganho de peso. O efeito negativo da dieta materna sobre o desenvolvimento da progênie pode ser devido à deficiência de metionina durante a fase embrionária. Sabemos que os nutrientes que são depositados no ovo estão associados à quantidade que os mesmos são ingeridos pela matriz. Logo, a dieta materna é essencial para promover adequado desenvolvimento do embrião, refletindo no desempenho da progênie durante a fase inicial de produção [30, 31], influenciando o fenótipo da progênie através de modificações transcricionais [32]. Dos nutrientes que compõe a dieta das aves, o uso de aminoácidos é essencial na formulação da ração. A metionina é o primeiro aminoácido limitante para as aves e além de ser essencial para a síntese proteica, ela também desempenha um papel importante na produção de energia e aumenta a viabilidade, o desempenho e a utilização da eficiência alimentar em aves [33]. E para manter a saúde e desempenho das aves, a fim de atender às exigências nutricionais e fisiológicas destas, é necessário que a quantidade de metionina deva ser fornecida de maneira adequada [26]. Estas informações podem explicar os nossos resultados, os quais observamos que tanto o nível ideal, quanto o nível acima do recomendado de metionina na dieta da progênie proporcionou aves mais pesadas durante a fase de crescimento (15-35 dias de idade) e com melhor ganho de peso.

Acredita-se que o excesso de metionina na dieta pode promover a maior síntese de lipídeos. A homocisteína, componente produzido a partir do metabolismo da metionina, quando em grandes quantidades no organismo, aumenta o risco de doenças vasculares causada pelo excesso de gordura na corrente sanguínea [34]. Alguns autores [35] relatam que não é apenas a homocisteína que está por trás dessas doenças, outros componentes da metabolização da metionina também podem estar associados. Hirche et al. [36] e Valez-Carrasco et al. [37] sugerem que a suplementação de metionina pode aumentar as concentrações de colesterol no plasma e no fígado, aumento de homocisteína e a diminuição de HDL. As lipoproteínas

são transportadas por apolipoproteínas e a expressão gênica dessas pode servir como um indicador de síntese lipídica no organismo das aves. No entanto, em nosso estudo, a suplementação de metionina na dieta da progênie apresentou menor valor de expressão de *ACC*, *FAS* e *APOA1*, os genes estão relacionados à síntese de lipídeos e o transporte dos mesmos, sugerindo que a suplementação de metionina pode ter reduzido a deposição de gordura nas aves favorecendo o crescimento. Também observamos que a dieta materna teve efeito sobre a expressão de *APOA1* no fígado da progênie. As aves alimentadas com MET, de matrizes também alimentadas com MET, apresentaram maior valor de expressão de *APOA1*. A *APOB* é uma apolipoproteína responsável pelo transporte do colesterol para os tecidos e também tem um papel fundamental na absorção e secreção de lipídeos [38]. O acúmulo de gordura corporal está relacionado com a eficiência alimentar das aves, ou seja, aves menos eficientes tendem a acumular mais gordura e vice versa. Nós observamos que o maior valor de expressão de *APOB* foi apresentado em aves filhas de matrizes que receberam metionina em excesso e que foram alimentadas com MET. Apesar da maior expressão de *APOB*, tais aves não tiveram sua eficiência alimentar piorada, o que sugere que a suplementação de metionina não resultou em aumento na deposição de gordura abdominal.

4.5 Conclusões

Podemos concluir que a suplementação de metionina na dieta de matrizes, tanto dieta MET quanto com dieta HMET, foi essencial para melhorar os parâmetros reprodutivos das aves: melhor peso de folículos, melhor taxa de postura e melhor peso do ovo. Além disso, a suplementação de metionina na dieta das matrizes influenciou na expressão de genes que estão relacionados ao processo de formação da gema e do desenvolvimento do embrião, garantindo melhor desenvolvimento e desempenho da progênie pós-eclosão.

Além da dieta materna, a suplementação de metionina na dieta da progênie foi capaz de fazer com que a progênie expressasse o seu fenótipo mantendo boa eficiência alimentar com menor síntese de gordura.

4.6 Referências bibliográficas

1. Santana, TP.; Gasparino, E.; Bastos, MS.; Lima, AS.; Pinto, APG.; Oliveira, GMJ.; Brito, CO.; Barbosa, LT.; Del Vesco, AP. Digestible lysine effects on gene expression by Japanese quails in the pre-laying phase. *S. Afr. J. Anim. Sci.* **2019**, 49, 1104-1112.
2. Khatlab, AS.; Del Vesco, AP.; Gasparino, E.; Oliveira Neto, AR. Gender and Age Effects on the Expression of Genes Related to Lipidic Metabolism in Broiler's Liver. *Czech. J. Anim. Sci.* **2018**, 3, 103-109.
3. Fouad, AM.; El-Senousey, HK.; Yang, XJ.; Yao, JH. Dietary L-arginine supplementation reduces abdominal fat content by modulating lipid metabolism in broiler chickens. *Animal* **2013**, 7, 1239-1245.
4. Yang, Z.; Htoo, JK.; Liao, SF. Methionine nutrition in swine and related monogastric animals: Beyond protein biosynthesis. *JAFST* **2020**, 268, 1-16.
5. Tufarelli, V.; Mehrzad-Gilmalek, H.; Bouyeh, M.; Qotbi, A.; Amouei, H.; Seidavi, A.; Paz, E.; Laudadio, V. Effect of Different Levels of L-carnitine and Excess Lysine-Methionine on Broiler Performance, Carcass Characteristics, Blood Constituents, Immunity and Triiodothyronine Hormone. *Agriculture* **2020**, 10, 1-8.
6. Hrnčár, C.; Verguliaková, S.; Svorad, P.; Weis, J.; Arpášová, H.; Mindek, S.; Fik, M.; Bujko, J. Effect of L-carnitine supplementation on fattening and carcass parameters of broiler chickens. *Acta fytotech. Zootech.* **2015**, 18, 15-19.

7. Meng, GH.; Song, D.; Li, LB.; Yang, CJ.; Qu, ZX. Gao, YP. Dietary methionine requirement of Jing Brown layer hens from 9 to 17 weeks of age. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **2016**, 101, 925-935.
8. Yang, B.; Gong, J.; Jing, J.; Hao, Y.; Li, S.; Liu, G.; Feng, Z.; Zhao, G. Effects of Zinc Methionine Hydroxy Analog Chelate on Laying Performance, Serum Hormone Levels, and Expression of Reproductive Axis Related. *Front. Vet. Sci.* **2022**, 9, 1-10.
9. Carew, LB.; McMurtry, JP.; Alster, FA. Effects of Methionine Deficiencies on Plasma Levels of Thyroid Hormones, Insulin-like Growth Factors-I and -II, Liver and Body Weights, and Feed Intake in Growing Chickens. *Poul. Sci.* **2003**, 82, 1932-1938.
10. Sécula, A.; Chapuis, H.; Collin, A.; Bluy, LE.; Bodin, L.; Gress, L.; Cornuez, A.; Martin, X.; Bonnefont, CMD.; Morisson, M. Maternal dietary methionine restriction alters the expression of energy metabolism genes in the duckling liver. *BMC Genet.* **2022**, 23, 1-15.
11. Lui, R.; Tan, X.; Zhao, G.; Chen, Y.; Zhao, D.; Li, W.; Zheng, M.; Wen, J. Maternal dietary methionine supplementation influences egg production and the growth performance and meat quality of the Offspring. *Poul. Sci.* **2020**, 99, 3550-3556.
12. Bodin, L.; Sécula, A.; Chapuis, H.; Cornuez, A.; Lessire, M.; Cobo, E.; Marie-Louise, S.; Bonnefont, CMD.; Bairo, J.; Mercierand, F.; Bravo, C.; Manse, H.; Le Bourhis, MC.; Martin, X.; Pitel, F.; Bruna, JM.; Morison, M. ietary methionine defciency reduces laying performances of female common ducks and impacts traits of interest of their mule ducklings. *Poul. Sci.* **2019**, 98, 5590-5600.
13. Baião, NC.; Lara, LJC. Oil and fat in broiler nutrition. *Re. Braz. Sci. Avi.* **2005**, 7, 129-141.
14. Cherian, G. Nutrition and metabolism in poultry: role of lipids in early diet. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **2015**, 6, 1-9.
15. Smink, W.; Gerrits, W.J.J.; Hovenier, R.; Geelen, MJH.; Verstegen, MWA.; Beynen, AC. Effect of dietary fat sources on fatty acid deposition and lipid metabolism in broiler chickens. *Poult. Sci.* **2010**, 89, 2432-2440.
16. Harvey, RA.; Ferrier, DR. **Illustrated Biochemistry**. 5th rev ed. Artmed. Porto Alegre, Brazil, 2012.
17. Fielding, CF.; Fielding, PE. Molecular transport physiology of reverse cholesterol. *J. Lipid Res.* **1995**, 36, 211-228.
18. Zhuo, Z.; Lamont, SJL.; Lee, WR.; Abasht, B. RNA-Seq Analysis of Abdominal Fat Reveals Differences between Modern Commercial Broiler Chickens with High and Low Feed Efficiencies. *PLoS One.* **2015**, 10, 1-16.
19. Nelson, DL.; Cox, MM. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 5th rev. ed. Worth Publishers, New York, 2011.
20. El-Shobokshy, AS.; Abo-Samaha, MI.; El-Maksoud, EMA. Khatlab, AS. Influence of Nano-Methionine supplementation in drinking water on growth performance, lipid metabolism, and related gene expression in broiler Chicken. *JAVAR* **2022**, 9, 743-753.
21. Rostagno, HS.; Albino, LFT.; Hannas, MI.; Donzele, JL.; Sakomura, NK.; Perazzo, FG.; Saraiva, A.; Teixeira, ML.; Rodrigues, PB.; Oliveira, RF.; Barreto, SLT.; Brito, CO. **Brazilian tables for birds and pigs: composition of foods and nutritional requirements** 4th. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, Brazil, 2017.
22. Bastos, MS.; Del Vesco, AP.; Santana, TP.; Santos, TS.; Oliveira Junior, GM.; Fernandes, RPM.; Barbosa, LT.; Gasparino, E. The role of cinnamon as a modulator of the expression of genes related to antioxidant activity and lipid metabolism of laying quails. *PLoS One* **2017**, 12, 1-15.
23. Koppenol, A.; Delezie, E.; Wang, Y.; Franssens, L.; Willems, E.; Ampe, B.; Buyse, J.; Everaert, N. Effects of maternal dietary EPA and DHA supplementation and breeder age on embryonic and post-hatch performance of broiler offspring. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **2015**, 99, 36-47.

24. Lei, L.; Lixian, Z. Effect of 24 h fasting on gene expression of AMPK, appetite regulation peptides and lipometabolism related factors in the hypothalamus of broiler chicks. *Asian-australas. J. Anim. Sci.* **2012**, *25*, 1300-1308.
25. Jiang, RR.; Zhao, GP.; Zhao, JP.; Chen, JL.; Zheng, MQ.; Liu, RR.; Wen, J. Influence of dietary nicotinic acid supplementation on lipid metabolism and related gene expression in two distinct broiler breeds of female chickens. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **2014**, *98*, 822-829.
26. Alagawany, M.; El-Hack, ME.; Arif, M.; Ashour, EA. Individual and combined effects of crude protein, methionine and probiotic levels on laying hen productive performance and nitrogen pollution in the manure. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2016**, *23*, 22906-22913.
27. Xiao, X.; Wang, Y.; Liu, W.; Juu, T.; Xhan, X. Effects of different methionine sources on production and reproduction performance, egg quality and serum biochemical indices of broiler breeders. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* **2017**, *30*, 828-833.
28. Carvalheira, JBC.; Zecchin, HG.; Saad, MJA. Vias de sinalização da insulina. *Arch. Braz. Endoc. Metab.* **2002**, *46*, 419-425.
29. Spady, DK. Reverse Cholesterol Transport and Atherosclerosis Regression. *Circulation* **1999**, *100*, 576-578.
30. Dixon, LM.; Sparks, NHC.; Rutherford, KMD. Early experiences matter: a review of the effects of prenatal environment on offspring characteristics in poultry. *Poul. Sci.* **2016**, *95*, 489-499.
31. Surai, PF.; Fisinin, VI.; Karadas, F. Antioxidant systems in chick embryo development. Part 1. Vitamin E, carotenoids and selenium. *Anim. Nutr.* **2016**, *2*, 1-11.
32. Lv, Z.; Fan, H.; Song, B.; Li, G.; Liu, D.; Guo, Y. Supplementing Genistein for Breeder Hens Alters the Fatty Acid Metabolism and Growth Performance of Offsprings by Epigenetic Modification. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2019**, *2019*, 1-15.
33. Rehman, AU.; Arif, M.; Husnain, MM.; Alagawany, M.; El-Hack, MEA.; Taha, AE.; Elnesr, SS.; Abdel-Latif, MA.; Othman, SI.; Allam, AA. Growth Performance of Broilers as Influenced by Different Levels and Sources of Methionine Plus Cysteine. *Anim.* **2019**, *9*, 1-12.
34. Brattström, L.; Wilcken, DEL. Homocysteine and cardiovascular disease: cause or effect? *Am. J. Clin. Nutr.* **72**, 315-323.
35. Barter, PJ.; Rey, KA. Homocysteine and Cardiovascular Disease Is HDL the Link? *Circulation* **2006**, *99*, 565-566.
36. Hiche, F.; Schröder, A.; Knoth, B.; Stang, GI.; Eder, K. Effect of dietary methionine on plasma and liver cholesterol concentrations in rats and expression of hepatic genes involved in cholesterol metabolism. *BJN* **2006**, *95*, 879-888.
37. Valez-Carrasco, W.; Merkel, M.; Twiss, CO.; Smith, JD. Dietary methionine effects on plasma homocysteine and HDL metabolism in mice. *J. Nutr. Biochem.* **2008**, *19*, 362-370.
38. Cruz, VAR.; Schenkel, FS.; Savegnago, RP.; Grupioni, NV.; Stafuzza, NB.; Sarglzael, M.; Ibelli, AMG.; Peixoto, JO.; Ledur, MC.; Munari, DP. Association of Apolipoprotein B and Adiponectin Receptor 1 Genes with Carcass, Bone Integrity and Performance Traits in a Paternal Broiler Line. *PLos One* **2015**, *10*, 1-15.

5. ARTIGO 2

EFEITO DA DIETA MATERNA SOBRE O AMBIENTE INTESTINAL DA PROGÊNIE DE CODORNAS JAPONESAS ALIMENTADAS COM DIFERENTES NÍVEIS DE METIONINA

Artigo formatado de acordo com as normas do periódico Animals

RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar a morfometria do intestino delgado e a expressão de genes relacionados ao transporte de glicose e aminoácidos no duodeno de matrizes e da progênie de codornas japonesas alimentadas com diferentes níveis de metionina na dieta. Para isso, o experimento foi conduzido em esquema fatorial 3 x 3, sendo três dietas referentes à suplementação de metionina para as matrizes e para cada tratamento das matrizes, três dietas referentes à suplementação de metionina para sua progênie. Observamos que houve efeito da dieta sobre os parâmetros morfológicos do duodeno e jejuno das matrizes ($p < 0,05$). Em relação à expressão dos genes transportadores de aminoácidos Y+L 1 (*SLC7A7*), transportador de glicose (*SLC2A2*), cotransportador de glicose dependente de sódio (*SLC5A1*) e ocludina (*OCLN*), os maiores níveis de expressão destes foi observado no duodeno de matrizes alimentadas com dieta suplementada com o nível acima do recomendado de metionina (HMET). Houve efeito da dieta materna sobre os parâmetros morfológicos do intestino delgado da progênie ($p < 0,05$). Para matrizes alimentadas com dieta suplementada com nível recomendado de metionina (MET), a progênie também alimentada com MET apresentou maior valor de expressão de *OCLN*. Já para as matrizes que receberam dieta HMET, a progênie alimentada com MET apresentou maior nível de expressão dos genes *OCLN*, *SLC2A2* e *SLC5A1*. Concluimos que a dieta HMET pode melhorar o desenvolvimento e desempenho intestinal tanto das matrizes quanto da progênie, no entanto, para a progênie a dieta materna também pode influenciar nestes mesmos parâmetros.

Palavras-chave: absorção de nutrientes; morfometria e transportador de aminoácidos

5.1 Introdução

Codornas são aves menores que pertencem à ordem dos Galináceos, do gênero *Coturnix* e que ocupam boa parte do mercado da avicultura. Sabe-se que o maior investimento na produção de codornas é em relação à nutrição e para atingir melhor desempenho durante a fase de postura, o consumo médio de ração nesta fase é de 25 g/dia [1]. As espécies mais conhecidas e difundidas são as *Coturnix japônica* e *Coturnix coturnix*.

A postura é um processo biológico complexo, sendo influenciada por diversos fatores, por exemplo, a idade [2], peso [3], temperatura ambiental [4], programa de iluminação [5] e, em especial, pela dieta [6]. A nutrição, além de beneficiar a taxa de crescimento, a reprodução e produção, também é capaz de minimizar os efeitos do ambiente sobre a ave. Dessa forma, trabalhos mostram que a máxima eficiência na produção de ovos férteis ocorre quando os nutrientes que compõem a dieta são fornecidos em quantidades adequadas. Dentre os nutrientes importantes na nutrição de aves estão os aminoácidos que desempenham papel essencial no crescimento e desempenho dos animais [7, 8, 9]. A metionina é o primeiro aminoácido limitante para as aves, sendo fundamental para a síntese proteica, é doador de enxofre e está envolvido na síntese de poliamina. A metionina é precursora de carnitina e cistina; também atua como grupo doador de metila para a formação da coenzima S-adenosilmetionina e garante funcionamento normal do metabolismo celular [10]. A metionina ainda possui papel importante nas funções fisiológicas, tendo ação antioxidante, prevenindo a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), e está ligada à função imunológica, tendo participação no crescimento de órgãos imunológicos e também na produção das células de defesa [4, 11].

Com relação à ação da metionina durante a fase inicial de desenvolvimento das aves, a suplementação de metionina *in ovo* promove maior peso do intestino delgado, aumento da altura dos vilos e profundidade das criptas, e aumento da massa e número de enterócitos que proporciona a proliferação e diferenciação das células intestinais, promovendo a integridade estrutural das vilosidades [12]. Nazem et al. [13] observaram que ao serem injetados altos níveis de metionina (40 mg/ovo) *in ovo*, o desenvolvimento morfológico do intestino dos embriões é melhorado, apresentando maior altura, largura e área de profundidade das criptas em todos os segmentos do intestino delgado das aves, o que favorecerá a digestão e permitirá o aumento do peso corporal e melhor desenvolvimento das aves após a eclosão.

Uma vez que a manipulação do ambiente inicial pode modular as respostas fisiológicas da progênie, está crescendo o número de trabalhos que mostram como o fenótipo da mãe age sobre o fenótipo da progênie [14, 15]. Segundo Santana et al. [6], a suplementação de metionina na dieta matriz contribui para o desenvolvimento e o desempenho da progênie durante a fase inicial. O desenvolvimento do embrião depende dos nutrientes depositados no ovo pela matriz e a metionina utilizada na dieta materna contribui com a secreção de hormônios relacionados ao crescimento que proporcionam a produção de pintainhos mais pesados e de melhor qualidade. E ainda, quando recém-nascidas, o desenvolvimento da função imune das aves é lento, deixando-as mais suscetíveis a ataques de patógenos, o que pode reduzir o desempenho durante o crescimento [16, 17]. A saúde intestinal está diretamente relacionada à alimentação das aves, e a colonização da microbiota do trato gastrointestinal é vital na absorção dos nutrientes [18]. De acordo com Jiang et al. [19], a dieta materna pode melhorar a função imune intestinal da progênie modulando a microbiota intestinal, acelerando a sua função e maturação, e também ativam a inflamação intestinal quando a progênie é desafiada por algum fator estressante em seu próprio ambiente [20].

Como descrito acima, a suplementação de metionina na dieta das aves tem sido investigada de maneira minuciosa nos últimos anos. Também tem sido tema de novos estudos como a suplementação de metionina durante o desenvolvimento embrionário pode contribuir com o desempenho futuro da ave. Entretanto, ainda são escassos os trabalhos mostrando o efeito da dieta materna sobre o desenvolvimento intestinal da progênie. Dessa forma, nesse estudo levantamos a hipótese de que o ambiente intestinal da progênie pode ser modulado através da suplementação de metionina na dieta materna, e irá responder de acordo com a interação dieta materna x dieta da progênie. Para avaliar essa hipótese, avaliamos a morfometria do intestino delgado e a expressão dos genes relacionados ao transporte de glicose e aminoácidos no duodeno de matrizes e da progênie de codornas japonesas alimentadas com diferentes níveis de metionina na dieta.

5.2 Materiais e Métodos

Este estudo foi realizado de acordo com as especificações do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA – nº 2402310719) da Universidade Estadual de Maringá, Brasil.

5.2.1 Matrizes

Duzentas codornas japonesas (*Coturnix japonica*) fêmeas de um dia de idade foram criadas em gaiolas coletivas até 98 dias de idade. Durante esse período, foram observados diariamente o desenvolvimento e a taxa de postura das aves. Aos 98 dias de idade, 30 codornas com peso médio de 154,6 g e taxa de postura de 85% foram realojadas em gaiolas individuais e distribuídas em três tratamentos referentes à suplementação de metionina: dieta sem suplementação de metionina (LMET); dieta com suplementação do nível recomendado de metionina, de Rostagno et al. [1] (0,86% - MET); e dieta com suplementação acima do recomendado de metionina (1,17% HMET) (Tabela 1). As matrizes permaneceram em experimentação dos 98 aos 136 dias de idade, totalizando 38 dias: sendo 28 dias antes de começar a coleta de ovos para incubação, para garantir que todos os ovos fossem fertilizados durante o período experimental, e 10 dias para a coleta de ovos. Durante o período experimental as aves tiveram livre acesso à ração e água.

Na terceira semana de experimentação, 30 machos padronizados pelo peso médio (161,2 g) tiveram contato diário de uma hora com as matrizes. O efeito parental dos machos foi minimizado através de realização de rodízio. Os machos foram utilizados apenas para o acasalamento, e tiveram livre acesso à ração formulada para atender às exigências desses animais e água.

Diariamente os ovos foram coletados, identificados, pesados e armazenados individualmente em sacos de plástico à temperatura ambiente, e no final desse período, foram transferidos para incubadora (Chocomaster Luna 240) previamente programada para atingir temperatura de 37 °C e umidade relativa de 60%. Ao final dos 19 dias de incubação, os ovos não eclodidos foram abertos e classificados como ovos não fecundados ou embriões mortos.

Tabela 1. Composição percentual e valores nutricionais das dietas experimentais fornecidas para matrizes de codornas japonesas em fase de postura (98 a 136 dias de idade)

Ingredientes (kg)	Dietas Experimentais		
	LMET [†]	MET	HMET
Milho moído	56,63	56,30	56,08
Farelo de soja	32,20	32,30	32,30
Sal	0,37	0,37	0,37
Óleo vegetal	1,70	1,60	1,50
Calcário calcítico	7,52	7,52	7,52
Fosfato bicalcico	0,99	0,99	0,99
L-Lisina HCL	0,13	0,13	0,13
DL-Metionina	-	0,33	0,65
L-Treonina	0,04	0,04	0,04
Mistura vitamínica e mineral ¹	0,40	0,40	0,40
Total	100	100	100
Composição Energética e Nutricional			
Energia metabolizável (kcal/kg)	2796	2795	2795
Proteína bruta (%)	19	19	19
Cálcio (%)	3,15	3,15	3,15
Fósforo digestível (%)	0,33	0,33	0,33
Sódio (%)	0,17	0,17	0,17
Aminoácidos (%)			
Metionina+Cistina digestível	0,53	0,86	1,17
Lisina digestível	1,04	1,05	1,05
Treonina digestível	0,71	0,71	0,71
Triptofano digestível	0,21	0,21	0,21

¹Mistura vitamínica e mineral de postura (por kg de ração): Vit. A = 2.250.000 UI/kg; Vit. D3 = 500.00 UI/kg; Vit. E = 7.000 UI/kg; Vit. B1 = 450 mg/kg; Vit. B2 = 1.000 mg/kg; Vit. B6 = 450 mg/kg; Vit. B12 = 3.500 mg/kg; Vit. K3 = 420 mg/kg; Pantetonato cálcio = 2.500 mg/kg; Niacina = 7.000 mg/kg; Ácido Fólico = 180 mg/kg; Biotina = 15 mg/kg; Colina = 55 g/kg; Zinco = 12 g/kg; Ferro = 12 g/kg; Manganês = 15 g/kg; Cobre = 3.000 mg/kg; Iodo = 250 mg/kg; Cobalto = 50 mg/kg; Selênio = 72 mg/kg; Etoxiqum = 40 mg/kg; B.H.A = 40 mg/kg; Veículo Q.S.P = 1.000 g/kg. [†]LMET, dieta sem suplementação de metionina; MET, dieta com suplementação do nível recomendado de metionina; HMET, dieta com suplementação acima do nível recomendado de metionina.

5.2.2 Progenie

Para avaliar o efeito do ambiente materno sobre o desenvolvimento intestinal da progênie, o experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 3, sendo três dietas para as matrizes, e para cada tratamento das matrizes, três dietas para sua progênie.

Após o nascimento, um total de 234 pintainhos foram anilhados, pesados e alojados em círculo de proteção previamente aquecido com lâmpada de aquecimento contendo ração para a fase inicial (Tabela 2) e água à vontade. Os pintainhos foram alojados de acordo com a dieta experimental das matrizes e criados de maneira convencional sob as mesmas condições experimentais até os 15 dias de idade (Figura 1).

Aos 15 dias de idade, as progênies de cada matriz foram pesadas e distribuídas em três tratamentos referentes à suplementação de metionina: dieta sem suplementação de metionina (LMET); dieta com suplementação do nível recomendado de metionina, de Rostagno et al. [1] (0,70% de metionina - MET); e dieta com suplementação acima do nível recomendado de metionina (0,90% de metionina - HMET) (Tabela 2). As aves que pertenciam ao mesmo tratamento foram alocadas em gaiolas coletivas ($n=13$), sendo duas aves por gaiola e tiveram livre acesso à ração e água.

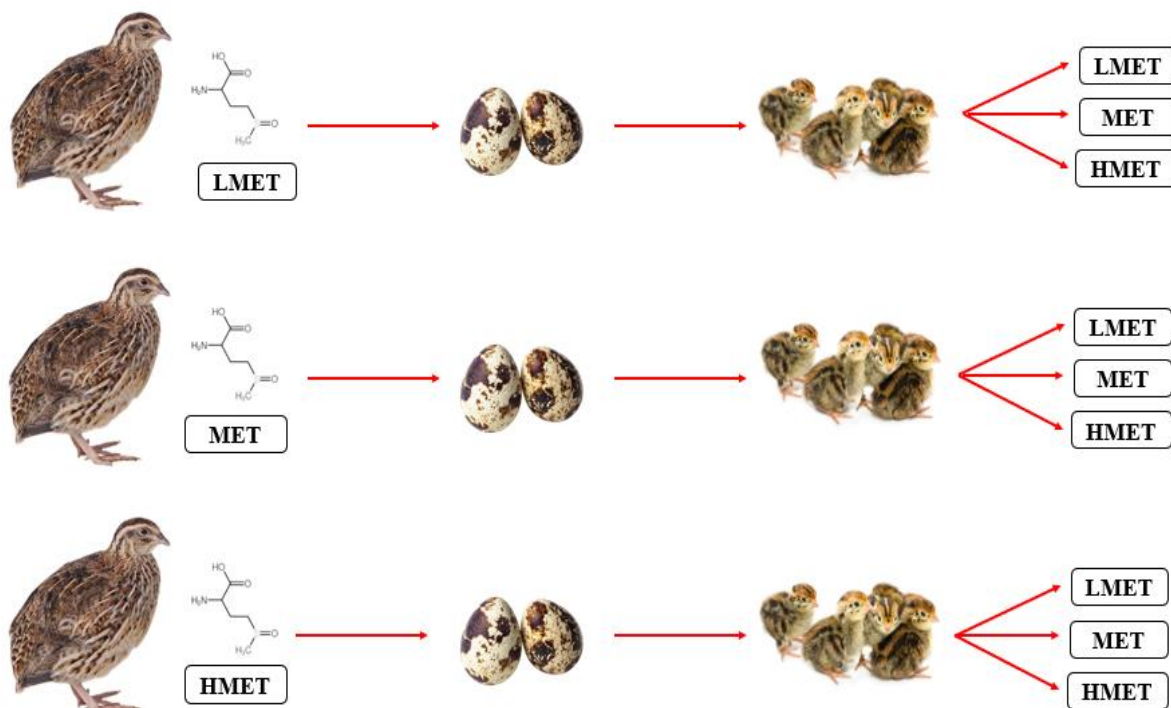


Figura 1. Representação esquemática do delineamento experimental. Ovos de cada matriz foram coletados por 10 dias e incubados sob as mesmas condições. Ao nascerem, os pintainhos foram alojados de acordo com a dieta experimental da matriz e criados de maneira convencional sob as mesmas condições experimentais até os 15 dias de idade. Aos 15 dias de idade, as aves filhas de cada matriz foram distribuídas em três tratamentos referentes à suplementação de metionina: aves que receberam dieta sem suplementação de metionina (LMET); dieta suplementada com o nível recomendado de metionina (MET); e dieta com suplementação acima do nível recomendado de metionina (HMET).

Tabela 2. Composição percentual e valores nutricionais das dietas experimentais fornecidas para progênie de codornas japonesas em fase inicial e de crescimento

Ingredientes (kg)	Composição Percentual			
	1 a 14 dias	15 a 35 dias		
		LMET [†]	MET	HMET
Milho moído	61,87	65,53	65,27	65,06
Farelo de soja	34,00	30,50	30,60	30,60
Sal	0,44	0,60	0,60	0,60
Óleo vegetal	0,30	1,70	1,60	1,50
Calcário calcítico	1,12	1,40	1,40	1,40
Fosfato bicálcico	1,53	1,40	1,40	1,40
L-Lisina HCL	0,12	0,13	0,13	0,13
DL-Metionina	0,18	-	0,16	0,37
L-Treonina	0,01	0,01	0,01	0,01
Mistura vitamínica e mineral ¹	0,40	0,40	0,40	0,40
Total	100	100	100	100
Composição Energética e Nutricional				
Energia metabolizável (kcal/kg)	2898	2908	2910	2013
Proteína bruta (%)	20	19	19	19
Cálcio (%)	0,88	0,92	0,92	0,92
Fósforo digestível (%)	0,45	0,42	0,42	0,42
Sódio (%)	0,19	0,21	0,21	0,21
Aminoácidos (%)				
Metionina+Cistina digestível	0,75	0,53	0,70	0,90
Lisina digestível	1,10	1,02	1,03	1,02
Treonina digestível	0,72	0,68	0,68	0,68
Triptofano digestível	0,22	0,21	0,21	0,21

¹Mistura vitamínica e mineral de postura (por kg de ração): Vit. A = 2.250.000 UI/kg; Vit. D3 = 500.00 UI/kg; Vit. E = 7.000 UI/kg; Vit. B1 = 450 mg/kg; Vit. B2 = 1.000 mg/kg; Vit. B6 = 450 mg/kg; Vit. B12 = 3.500 mg/kg; Vit. K3 = 420 mg/kg; Pantetonato cálcio = 2.500 mg/kg; Niacina = 7.000 mg/kg; Ácido Fólico = 180 mg/kg; Biotina = 15 mg/kg; Colina = 55 g/kg; Zinco = 12 g/kg; Ferro = 12 g/kg; Manganês = 15 g/kg; Cobre = 3.000 mg/kg; Iodo = 250 mg/kg; Cobalto = 50 mg/kg; Selênio = 72 mg/kg; Etoxiqum = 40 mg/kg; B.H.A = 40 mg/kg; Veículo Q.S.P = 1.000 g/kg. [†]LMET, dieta sem suplementação de metionina; MET, dieta com suplementação do nível recomendado de metionina; HMET, dieta com suplementação acima do nível recomendado de metionina.

5.2.3 Morfometria intestinal

Após o período de coleta de ovos das matrizes e do período experimental da progênie, as aves foram abatidas por deslocamento cervical e ensanguinhadas. Para avaliar a altura das vilosidades e a profundidade de cripta, amostras do duodeno, jejuno e íleo foram coletadas. Os segmentos de 1,0 cm de diâmetro foram abertos longitudinalmente, lavados em solução tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4) e fixados em solução de Bouin por 36 horas. As amostras foram preparadas segundo a técnica descrita por Junqueira e Junqueira [21].

Desidratação: a primeira etapa da inclusão (a desidratação) consiste na retirada da água dos tecidos e a sua substituição por álcool, na seguinte sequência de soluções com concentrações crescentes de álcool: 70, 80, 90% e duas baterias de álcool etílico absoluto (100%) pelo período de 6 horas cada.

Diafanização: na segunda etapa, o álcool presente nos tecidos é substituído por xilol, sendo as amostras mantidas em álcool e xilol (1:1) por uma hora e posteriormente colocadas em duas baterias de xilol com 30 minutos cada.

Inclusão em parafina: na impregnação o xilol é substituído por parafina, por meio de banho por 12 horas em parafina fundida em estufa entre 56 a 58 °C. Uma vez impregnados, os tecidos são colocados em formas de papel, à temperatura ambiente, contendo parafina fundida e deixando-a endurecer.

Microtomia: os cortes nos blocos foram feitos em micrótomo, com a espessura de 6 mm sendo as fitas obtidas durante a microtomia transferidas para o banho-maria mantido a 40 °C. Os cortes foram distendidos na superfície da água e depois colocados na superfície de uma lâmina mergulhada no banho-maria.

Coloração: para a coloração, os cortes foram desparafinizados e colocados na estufa a 60 °C por 30 minutos, a seguir, colocados em duas baterias de xilol (cinco minutos cada), depois mergulhados em soluções decrescentes de álcool a 100, 90, 80, 70% denominada de hidratação, pelo período de três minutos cada e, posteriormente, em água comum por três minutos.

Os cortes foram então corados pela solução aquosa de hematoxilina de um em um por meio minuto e deixados em água comum por cinco minutos. Posteriormente, corados pela solução eosina por três minutos, permanecendo em água comum por cinco minutos. Após esta etapa, iniciou a desidratação na seguinte sequência de soluções com concentrações crescentes de álcool: 70, 80, 90% por dois minutos cada e duas baterias de álcool etílico absoluto (100%) pelo período de dois e três minutos cada, iniciando-se a diafanização, com duas baterias de xilol por cinco minutos cada.

As lâminas foram montadas com uma gota de bálsamo do Canadá sobre o corte e, a seguir, colocou-se a lamínula. Foi confeccionada uma lâmina por segmento contendo 2 cortes e foram realizadas medições (comprimento em linha reta, de acordo com unidade adotada - μm) de 10 vilosidades e em mais 10 criptas bem orientadas do duodeno e jejuno, utilizando-se microscópio óptico.

5.2.4 Isolamento de RNA e síntese de cDNA

Para a análise de expressão gênica, amostras do duodeno foram coletadas em RNAlater™ (Life Technologies do Brasil, Brasil) e armazenadas a -20 °C até o momento da extração de RNA.

O RNA total foi extraído com o uso do reagente Trizol® (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) de acordo com as normas do fabricante, na proporção de 1 mL para cada 80 mg de tecido. A integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio (10 mg/mL) e visualizado sob luz ultravioleta.

Todas as amostras foram tratadas com DNase I (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) seguindo as instruções do fabricante, para que fosse eliminada uma possível contaminação com DNA. Para a síntese do DNA complementar (cDNA) foi utilizado o kit High-Capacity cDNA

Reverse Transcription (Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA), utilizando 10 µL de RNA tratado com DNase I, seguindo as instruções do fabricante.

Para as reações de PCR em tempo real, foi utilizado o fluoróforo SYBR GREEN (SYBR® GREEN PCR Master Mix, Applied Biosystems, EUA). A reação de amplificação continha 5 µL de cDNA diluído a 40 ng, 0,5 µL de cada primer a 10 µM (a concentração final da reação foi de 200 nM), 12,5 µL de SYBR® GREEN PCR Master Mix e 6,5 µL de água ultra pura, com volume final de 25 µL. Para medir a eficiência de cada primer, uma série de reações de 25 µL foi realizada semelhante à anterior utilizando 5 µL de pool de cDNA a partir de uma diluição em série (80 ng/µL, 40 ng/µL, 20 ng/µL e 10 ng/µL). A programação do termociclador para todos os genes foi: 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. As curvas de melting foram realizadas para garantir a especificidade das análises.

Os primers utilizados nas reações para a amplificação dos genes transportadores de glicose (*SLC2A2*), cotransportador de glicose dependente de sódio (*SLC5A1*), transportador de aminoácidos neutros (*SLC6A19*), transportador de aminoácido Y+L 1 (*SLC7A1*) e ocludina (*OCN*) foram confeccionados com base nas sequências de genes depositados em www.ncbi.nlm.nih.gov. O gene da *β-actina* foi utilizado como controle endógeno (Tabela 3). Todas as análises foram realizadas em um volume de 25 µL e em duplicatas.

As eficiências de amplificação foram semelhantes para os genes de interesse, entre 90 e 110% de eficiência.

Tabela 3. Sequência de primers utilizados para RT-qPCR

Gene ¹	Sequência do primer 5'→3'	pb ²	Nº de acesso
<i>SLC2A2</i>	F: CGCAGAAGGTGATAGAAGC R: ACACAGTGGGGTCCTCAAAG	180	XM_015878220.2
<i>SLC5A1</i>	F: GCCATGGCCAGGGCTTA R: CAATAACCTGATCTGTGCACCAGTA	160	XM_015878220.2
<i>SLC6A19</i>	F: TCTATTGAAGATTCGGGCAC R: AATGGTAAGCACAAGGTATGG	153	XM_419056.6
<i>SLC7A1</i>	F: TGTGAGCCAGAGAAGGA R: CACAAGGAGATAAAGCAAAGTC	118	XM_418326.6
<i>OCN</i>	F: ACGGCAGCACCTACCTCAA R: GGGCGAAGAAGCAGATGAG	123	D21837.1
<i>β-actina</i>	F: ACCCCAAAGCCAAACAGA R: CCAGAGTCCATCACAATACC	136	L08165.1

¹*SLC2A2*, transportador de glicose 2; *SLC5A1*, cotransportador de glicose dependente de sódio; *SLC6A19*, transportador de aminoácidos neutros dependentes de sódio; *SLC7A1*, transportador de aminoácido Y+L 1; *OCN*, ocludina.²pb, pares de bases.

5.2.5 Análise estatística

O método $2^{-\Delta CT}$ foi utilizado para as análises de quantificação relativa. Para todos os dados, o efeito dos tratamentos foi avaliado através da ANOVA One-way. Para avaliar como o efeito do ambiente materno influencia nas respostas da progênie ao seu próprio ambiente, o efeito da dieta da progênie foi avaliado dentro da dieta das matrizes. Quando observado efeito significativo dos tratamentos, as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$; SAS Inst. Inc., NC, USA). Todos os resultados são apresentados como médias e erro padrão médio.

5.3 Resultados

5.3.1 Matrizes

Observamos efeito significativo da dieta sobre a altura dos vilos e profundidade de cripta no duodeno das matrizes ($p < 0,05$). As aves que receberam suplementação com

metionina (MET e HMET) apresentaram maior largura de vilo (87,79 e 81,51 μm , respectivamente) que as aves LMET. Foi observado que a profundidade de cripta foi maior para aves suplementadas com MET (71,80 μm) quando comparadas com os demais tratamentos (Tabela 4).

No jejuno observamos que as matrizes que receberam dieta MET e HMET apresentaram maior profundidade de cripta (67,76 μm e 66,63 μm , respectivamente) que aquelas que receberam dieta LMET (61,50 μm) ($p < 0,05$) (Tabela 4).

Não houve efeito dos tratamentos sobre os parâmetros de morfometria avaliados no íleo.

Tabela 4. Efeito da dieta sobre a morfometria do duodeno de matrizes de codornas japonesas

Duodeno	Dieta				Valor de p
	LMET [†]	MET	HMET	EPM	
AV (μm) ¹	568,04	625,05	589,86	185,01	0,2373
LV (μm)	74,03 ^b	87,79 ^a	81,51 ^{ab}	28,48	0,0320
PC (μm)	63,20 ^b	71,80 ^a	63,54 ^b	13,77	0,0007
VSA (mm^2)	0,14	0,17	0,16	0,0767	0,0593
V:C	8,99	8,70	9,28	3,01	0,8266
Jejuno	LMET	MET	HMET	EPM	Valor de p
AV (μm)	494,48	465,29	470,89	93,97	0,1985
LV (μm)	72,07	78,52	77,31	16,19	0,0706
PC (μm)	61,50 ^b	67,76 ^a	66,63 ^a	11,24	0,0059
VSA (mm^2)	0,11	0,11	0,11	0,0338	0,9408
V:C	8,04	6,87	7,07	4,73	0,4830
Íleo	LMET	MET	HMET	EPM	Valor de p
AV (μm)	369,45	364,07	364,08	64,74	0,8715
LV (μm)	67,31	67,11	62,85	16,07	0,2322
PC (μm)	60,11	60,34	57,20	12,09	0,2884
VSA (mm^2)	0,08	0,07	0,07	0,0237	0,3822
V:C	6,15	6,03	6,36	1,39	0,5799

[†]LMET, dieta sem suplementação de metionina; MET, dieta com suplementação do nível recomendado de metionina; HMET, dieta com suplementação acima do nível recomendado de metionina. Os resultados são apresentados como média e erro padrão médio (EPM). ¹AV, altura de vilo; LV, largura de vilo; PC, profundidade de cripta; VSA, área de superfície das vilosidades; V:C, relação vilo:cripta. ^{a,b}As médias na mesma linha seguidas por uma mesma letra difere entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Na Figura 2 podemos observar que houve efeito da dieta sobre os níveis de expressão dos genes transportadores de glicose (*SLC2A2*), transportador de aminoácido Y+L 1 (*SLC7A1*), ocludina (*OCN*), cotransportador de glicose dependente de sódio (*SLC5A1*) e transportador de aminoácidos neutros dependentes de sódio (*SLC6A19*) ($p < 0,05$) no duodeno das matrizes. A maior expressão de *SLC7A1* e *OCN* foi observada em aves que receberam dieta HMET. Não houve diferença significativa entre as aves alimentadas com LMET e MET. Aves recebendo dieta LMET apresentaram maior expressão de *SLC5A1* que aves que receberam qualquer nível de suplementação de metionina na dieta. Aves recebendo dieta MET apresentaram menor expressão de *SLC2A2* e *SLC6A19* que aves que foram alimentadas com maior nível de suplementação de metionina na dieta.

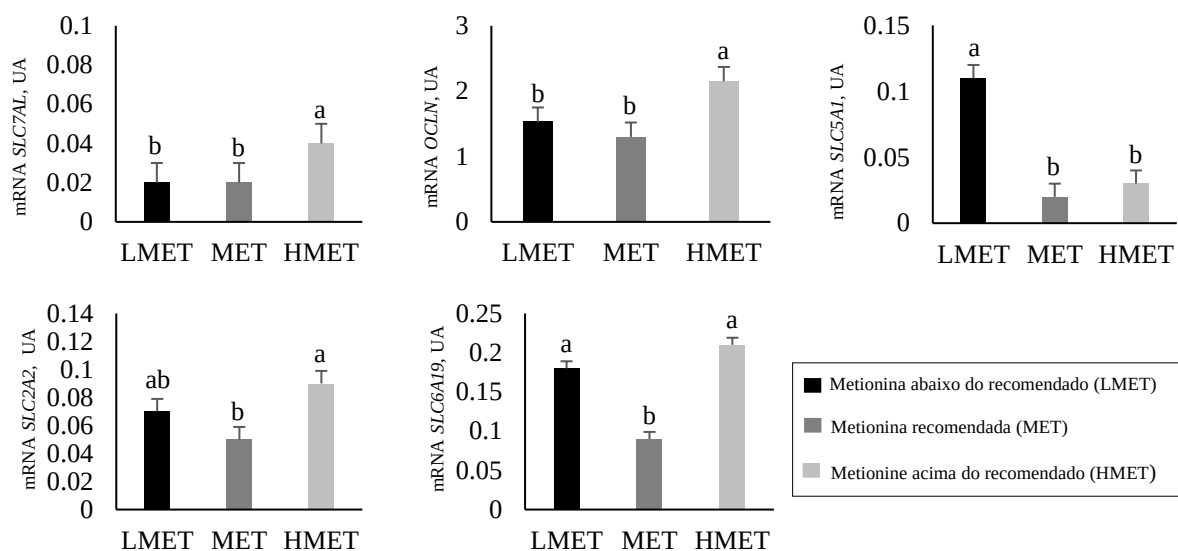


Figura 2. Expressão gênica de *SLC7A7*, *OCLN*, *SLC5A1*, *SLC2A2* e *SLC6A19* no duodeno de matrizes de codornas japonesas. *SLC2A2*, transportador de glicose 2; *SLC5A1*, cotransportador de glicose dependente de sódio; *SLC6A19*, transportador de aminoácidos neutros dependentes de sódio; *SLC7A7*, transportador de aminoácido Y+L 1; *OCLN*, ocludina. LMET, dieta sem suplementação de metionina; MET, dieta com suplementação do nível recomendado de metionina; HMET, dieta com suplementação acima do nível recomendado de metionina. ^{a,b}Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Os resultados são apresentados como média e erro padrão médio.

5.3.2 Progênie na fase inicial (1 a 14 dias) e de crescimento (15 a 35 dias)

Como o objetivo era avaliar como a dieta materna poderia influenciar na resposta da progênie ao seu próprio ambiente, o efeito da dieta da progênie foi avaliado dentro de cada dieta da matriz.

No duodeno, para a progênie das matrizes alimentadas com dieta LMET, a progênie alimentada com dieta com suplementação de metionina apresentou maior AV, maior VSA e maior relação V:C que a progênie que recebeu dieta sem suplementação de metionina (Tabela 5).

Para a progênie das matrizes alimentadas com dieta MET, maior AV, LV, VSA e maior relação V:C foi observada na progênie que também recebeu dieta MET (Tabela 5).

Para a progênie das matrizes alimentadas com dieta HMET, a suplementação de qualquer nível de metionina na dieta foi capaz de aumentar a largura do vilo. Já a área de superfície das vilosidades é maior quando a progênie também recebe dieta HMET. Progênie recebendo dieta LMET apresentou maior altura de vilo e relação V:C (Tabela 5).

Tabela 5. Parâmetros morfométricos e área de superfície absorptiva do duodeno de progênie de codornas japonesas alimentadas com diferentes níveis de metionina

Dieta materna – LMET					
Duodeno	Dieta progênie			EPM	Valor de <i>p</i>
	LMET[†]	MET	HMET		
AV (μm)*	683,16 ^b	815,51 ^a	820,66 ^a	99,72	< ,0001
LV (μm)	110,40	114,92	107,08	28,67	0,5207
PC (μm)	75,96	77,73	77,11	12,66	0,8433
VSA (mm ²)	0,23 ^b	0,29 ^a	0,27 ^a	0,07	0,0034
V:C	9,18 ^b	10,76 ^a	10,98 ^{ab}	2,23	0,0035
Dieta materna – MET					
	Dieta progênie			EPM	Valor de <i>p</i>
	LMET	MET	HMET		
AV (μm)	563,27 ^a	530,39 ^{ab}	497,02 ^b	91,15	0,0222
LV (μm)	75,41 ^b	82,17 ^a	86,39 ^{ab}	21,56	0,0070
PC (μm)	61,15	65,15	67,63	11,49	0,1469
VSA (mm ²)	0,13	0,15	0,13	0,04	0,0846
V:C	9,34 ^b	8,41 ^{ab}	7,51 ^a	2,07	0,0041
Dieta materna – HMET					
	Dieta progênie			EPM	Valor de <i>p</i>
	LMET	MET	HMET		
AV (μm)	915,47 ^a	713,23 ^b	835,01 ^a	178,82	< ,0001
LV (μm)	85,74 ^b	103,34 ^a	114,70 ^a	28,05	< ,0001
PC (μm)	76,66	76,63	76,51	14,80	0,9989
VSA (mm ²)	0,24 ^b	0,23 ^b	0,31 ^a	0,11	0,0023
V:C	12,46 ^a	9,69 ^b	11,01 ^{ab}	3,03	0,0006

[†]LMET, dieta sem suplementação de metionina; MET, dieta com suplementação do nível recomendado de metionina; HMET, dieta com suplementação acima do nível recomendado de metionina. *AV, altura de vilo; LV, largura de vilo; PC, profundidade de cripta; VSA, área de superfície das vilosidades; V:C, relação vilo:cripta. ^a

^bAs médias na mesma linha seguidas por uma mesma letra difere entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Os resultados são apresentados como média e erro padrão médio (EPM).

No jejuno, para a progênie das matrizes alimentadas com dieta LMET, a suplementação de metionina causou aumento da largura dos vilos e a área de superfície das vilosidades. Entretanto, a progênie alimentada com dieta HMET apresentou menor relação V:C que a progênie que recebeu dieta MET e dieta LMET (Tabela 6).

Para a progênie das matrizes alimentadas com dieta MET, a progênie alimentada com dieta HMET apresentou menor largura de vilo, profundidade de cripta e relação V:C (Tabela 6).

Para a progênie das matrizes alimentadas com dieta HMET, a progênie alimentada com dieta HMET apresentou maior altura de vilo, largura de vilo, profundidade de cripta e área de superfície das vilosidades (Tabela 6).

Tabela 6. Parâmetros morfométricos e área de superfície absorptiva do jejuno de progênie de codornas japonesas alimentadas com diferentes níveis de metionina

Dieta materna – LMET					
Jejuno	Dieta progênie			EPM	Valor de <i>p</i>
	LMET[†]	MET	HMET		
AV (µm)*	563,27 ^a	530,39 ^{ab}	497,02 ^b	91,15	0,0222
LV (µm)	75,41 ^b	92,17 ^a	86,39 ^{ab}	21,56	0,0070
PC (µm)	61,78	65,15	67,63	11,49	0,1469
VSA (mm ²)	0,13	0,15	0,13	0,04	0,0846
V:C	9,34 ^a	8,41 ^{ab}	7,51 ^b	2,07	0,0041
Dieta materna – MET					
	Dieta progênie			EPM	Valor de <i>p</i>
	LMET	MET	HMET		
AV (µm)	528,49 ^a	517,56 ^a	439,48 ^b	70,08	< ,0001
LV (µm)	83,79	79,78	79,38	19,43	0,4564
PC (µm)	70,31 ^a	64,09 ^b	60,18 ^b	11,02	< ,0001
VSA (mm ²)	0,13 ^a	0,13 ^a	0,11 ^b	0,03	0,0008
V:C	7,65 ^{ab}	8,23 ^a	7,48 ^b	1,40	0,0212
Dieta materna – HMET					
	Dieta progênie			EPM	Valor de <i>p</i>
	LMET	MET	HMET		
AV (µm)	511,59 ^b	507,49 ^b	577,51 ^a	90,79	0,0003
LV (µm)	91,77 ^{ab}	83,47 ^b	93,00 ^a	19,59	0,0390
PC (µm)	65,67 ^b	67,59 ^b	76,52 ^a	13,44	0,0005
VSA (mm ²)	0,14 ^{ab}	0,13 ^b	0,17 ^a	0,04	0,0004
V:C	7,95	7,78	7,71	1,73	0,8293

[†]LMET, dieta sem suplementação de metionina; MET, dieta com suplementação do nível recomendado de metionina; HMET, dieta com suplementação acima do nível recomendado de metionina. *AV, altura de vilo; LV, largura de vilo; PC, profundidade de cripta; VSA, área de superfície das vilosidades; V:C, relação vilo:cripta.^{a, b}As médias na mesma linha seguidas por uma mesma letra difere entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Os resultados são apresentados como média e erro padrão médio (EPM).

No íleo, para a progênie das matrizes alimentadas com dieta LMET, a progênie alimentada com dieta HMET apresentou maior largura de vilo, maior profundidade de cripta e maior área de superfície das vilosidades, e menor relação V:C que a progênie que recebeu dieta sem suplementação (Tabela 7).

Para a progênie das matrizes alimentadas com MET, a progênie alimentada com dieta LMET apresentou maior altura de vilo que as aves recebendo dieta HMET. Maior largura de vilo foi observada em aves recebendo dieta MET (Tabela 7).

Já para a progênie das matrizes alimentadas com dieta HMET, a suplementação de qualquer nível de metionina na dieta foi capaz de aumentar a altura de vilo, a largura do vilo, a profundidade de cripta, a área de superfície das vilosidades e a relação V:C em relação à progênie que recebeu dieta LMET (Tabela 7).

Tabela 7. Parâmetros morfométricos e área de superfície absorptiva do íleo de progênie de codornas japonesas alimentadas com diferentes níveis de metionina

Dieta materna – LMET					
Íleo	Dieta progênie			EPM	Valor de <i>p</i>
	LMET[†]	MET	HMET		
AV (µm)*	345,82	351,13	355,45	68,69	0,8625
LV (µm)	67,14 ^b	72,30 ^{ab}	81,95 ^a	19,35	0,0129
PC (µm)	55,75 ^b	56,02 ^b	65,61 ^a	13,18	0,0046
VSA (mm ²)	0,07	0,08	0,09	0,03	0,0694
V:C	6,33 ^a	6,42 ^a	5,58 ^b	1,16	0,0089
Dieta materna – MET					
	Dieta progênie			EPM	Valor de <i>p</i>
	LMET	MET	HMET		
AV (µm)	397,79 ^a	372,72 ^{ab}	364,35 ^b	55,23	0,0082
LV (µm)	65,19 ^b	81,52 ^a	70,00 ^b	19,79	0,0002
PC (µm)	64,81	63,45	61,68	12,81	0,4739
VSA (mm ²)	0,08 ^{ab}	0,09 ^a	0,07 ^b	0,02	0,0078
V:C	6,32	6,08	6,02	1,24	0,5348
Dieta materna – HMET					
	Dieta progênie			EPM	Valor de <i>p</i>
	LMET	MET	HMET		
AV (µm)	297,89 ^b	367,60 ^c	442,01 ^a	104,57	< ,0001
LV (µm)	67,95 ^b	82,17 ^a	80,23 ^a	18,98	0,0041
PC (µm)	58,26 ^b	63,52 ^{ab}	67,88 ^a	11,90	0,0027
VSA (mm ²)	0,06 ^b	0,09 ^a	0,11 ^a	0,04	< ,0001
V:C	5,23 ^b	5,87 ^{ab}	6,47 ^a	1,36	0,0006

[†]LMET, dieta sem suplementação de metionina; MET, dieta com suplementação do nível recomendado de metionina; HMET, dieta com suplementação acima do nível recomendado de metionina. *AV, altura de vilo; LV, largura de vilo; PC, profundidade de cripta; VSA, área de superfície das vilosidades; V:C, relação vilo:cripta. ^a,

^bAs médias na mesma linha seguidas por uma mesma letra difere entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Os resultados são apresentados como média e erro padrão médio.

Os resultados de expressão dos genes relacionados ao transporte de glicose e aminoácidos, e da proteína de junção no duodeno da progênie estão apresentados na Figura 6.

Para a progênie das matrizes alimentadas com MET, a progênie alimentada também com dieta MET apresentou a maior expressão de *OCN* ($p = 0,0109$). Não houve efeito dos tratamentos sobre os demais genes avaliados (Tabela 8).

Para a progênie das matrizes alimentadas com dieta HMET, a progênie alimentada com dieta MET apresentou a maior expressão dos genes *SLC2A2* ($p < ,0001$), *SLC5A1* ($p = 0,0131$) e *OCN* ($p = 0,0002$.) (Tabela 8).

Para a progênie das matrizes alimentadas com dieta LMET, não houve efeito da dieta da progênie sobre nenhum dos genes avaliados (Tabela 8).

Tabela 8. Expressão de *SLC2A2*, *SLC5A1*, *SLC7AL*, *SLC6A19* e *OCLN* no duodeno da progênie de codornas japonesas

Dieta materna – LMET					
Gene	Dieta progênie			EPM	Valor de <i>p</i>
	LMET[†]	MET	HMET		
<i>SLC2A2</i> *	0,12	0,29	0,21	0,12	0,2139
<i>SLC5A1</i>	0,07	0,07	0,07	0,03	0,9645
<i>SLC7AL</i>	0,03	0,03	0,05	0,03	0,7015
<i>SLC6A19</i>	0,23	0,31	0,21	0,10	0,3535
<i>OCLN</i>	0,84	0,99	1,11	0,24	0,3438
Dieta materna – MET					
	Dieta progênie			EPM	Valor de <i>p</i>
	LMET	MET	HMET		
<i>SLC2A2</i>	0,09	0,13	0,15	0,04	0,2706
<i>SLC5A1</i>	0,06	0,08	0,07	0,02	0,4662
<i>SLC7AL</i>	0,02	0,03	0,02	0,01	0,0824
<i>SLC6A19</i>	0,21	0,29	0,27	0,15	0,7897
<i>OCLN</i>	0,49 ^b	0,69 ^a	0,58 ^{ab}	0,07	0,0109
Dieta materna – HMET					
	Dieta progênie			EPM	Valor de <i>p</i>
	LMET	MET	HMET		
<i>SLC2A2</i>	0,06 ^b	0,17 ^a	0,07 ^b	0,01	< ,0001
<i>SLC5A1</i>	0,04 ^{ab}	0,07 ^a	0,02 ^b	0,01	0,0131
<i>SLC7AL</i>	0,01	0,01	0,03	0,01	0,2110
<i>SLC6A19</i>	0,19	0,23	0,21	0,03	0,3934
<i>OCLN</i>	0,41 ^b	0,59 ^a	0,23 ^c	0,06	0,0002

[†]LMET, dieta sem suplementação de metionina; MET, dieta com suplementação do nível recomendado de metionina; HMET, dieta com suplementação acima do nível recomendado de metionina. **SLC2A2*, transportador de glicose 2; *SLC5A1*, transportador de glicose dependente de sódio; *SLC7AL*, transportador de aminoácido Y+L 1; *SLC6A19*, transportador de aminoácidos neutros 1; *OCLN*, ocludina. ^{a, b}As médias na mesma linha seguidas por uma mesma letra difere entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Os resultados são apresentados como média e erro padrão médio (EPM).

5.4 Discussão

No presente estudo, um dos nossos objetivos foi avaliar o efeito da suplementação de metionina sobre a integridade das estruturas que compõem o epitélio de revestimento intestinal de codornas japonesas. Em nossos resultados observamos que a suplementação de metionina aumentou a largura dos vilos no duodeno e a profundidade de cripta no duodeno e no jejuno das matrizes. Esses resultados indicam que a suplementação de metionina pode promover, de maneira mais eficiente, o *turnover* celular mantendo adequada absorção intestinal [22].

Para proporcionar melhor desenvolvimento e desempenho das aves, é fundamental que os nutrientes fornecidos via dieta sejam absorvidos adequadamente no intestino delgado. O intestino delgado é dividido em três segmentos: duodeno, jejuno e íleo. Morfologicamente, os segmentos são semelhantes, no entanto, possuem diferenças no tamanho e forma das vilosidades que os compõem. No duodeno estas vilosidades são largas e curtas, no jejuno longas, e no íleo são mais curtas. O epitélio de revestimento intestinal das aves é formado pelas vilosidades, que ampliam a área de absorção dos nutrientes. Essas vilosidades são estruturas cônicas e em sua base encontram-se as criptas [23]; o número, tamanho e forma variam de acordo com a região, tornando-se mais delgadas no sentido do duodeno para o íleo [24]. A profundidade das criptas está ligada à regeneração de células, como os enterócitos, que constituem os vilos [25]. Os enterócitos estão envolvidos na digestão e no transporte dos nutrientes, e quanto maior o número de células produzidas, maior o tamanho dos vilos, resultando em maior a área de absorção dos nutrientes [26].

Outro objetivo do nosso estudo foi avaliar como a dieta materna poderia influenciar na resposta da progênie ao seu próprio ambiente. Constatamos que o efeito da dieta materna, principalmente matrizes alimentadas com suplementação acima do nível recomendado de metionina (HMET), é capaz de melhorar os parâmetros morfológicos da progênie, e quando estas recebem dieta suplementada com nível acima do recomendado de metionina, garantem resultados ainda mais eficientes em relação à morfologia do duodeno, jejuno e íleo de codornas japonesas. Em aves, durante a gametogênese, mudanças epigenéticas causadas pelo ambiente materno podem afetar o fenótipo da progênie pós-eclosão [27]. Autores [28, 29] revelam que a partir da modulação da nutrição materna, a funcionalidade, a barreira e a saúde intestinal da progênie são melhoradas. O efeito da suplementação de metionina na dieta da matriz sobre os parâmetros morfológicos da prole de aves ainda é pouco estudado, no entanto, de acordo com Azad et al. [30], a suplementação de metionina na dieta pode melhorar a morfologia intestinal da progênie, aumentando a altura das vilosidades nos três segmentos do intestino delgado, a profundidade de cripta e a relação vilo cripta no jejuno.

No intestino delgado os aminoácidos são transportados através de proteínas associadas à membrana celular que facilitam a entrada ou saída de substratos nas células [31]. A DL-Metionina é transportada para o corpo por meio do transporte ativo. Esse transporte acontece pelo transportador de aminoácidos neutros 1 (B^0AT1), encontrado na borda em escova das células epiteliais do intestino e pelo transportador de aminoácidos neutros e catiônicos 1 (y^+LAT1), encontrado na membrana basolateral [32]. O B^0AT1 apresenta maior afinidade por aminoácidos de cadeia lateral mais longa, como a metionina. A metionina também pode ser transportada da corrente sanguínea para o interior do enterócito por meio do transportador de aminoácidos neutros e catiônicos 1 (y^+LAT1) [33].

De acordo com Villalobos et al. [34], a suplementação de metionina estimula a expressão de transportadores de aminoácidos. Com a suplementação de DL-metionina na dieta das aves, a expressão do gene *SLC6A19* no intestino delgado das aves pode ser aumentada, desempenhando um papel importante na absorção gastrointestinal deste aminoácido [35, 36], assim como mostram os nossos resultados. O maior valor de expressão de *SLC6A19* e *SLC7A1* foi observado no duodeno de matrizes alimentadas com HMET.

Já em relação aos transportadores de glicose, SGLT1 e GLUT2, sabe-se que estes atuam em conjunto na absorção de glicose no intestino. Em nosso estudo observamos que a suplementação de metionina na dieta materna diminuiu os níveis de mRNA *SLC5A1* e aumentou os níveis de mRNA *SLC2A2*. Foi possível observar também que a progênie de matrizes que recebeu dieta com suplementação de metionina, quando foi alimentada com MET, obtiveram maior expressão dos genes *SLC2A2*, *SLC5A1* e *OCN*. Assim como na morfologia intestinal, são escassos os trabalhos que falam sobre o efeito da suplementação de metionina na dieta de matrizes sobre a expressão de genes relacionados ao transporte de aminoácidos e glicose.

Os transportadores de glicose GLUT2 e SGLT1, além de transportar, podem regular os níveis de glicose no ambiente intestinal. Entretanto, em animais, os aminoácidos são os principais precursores de glicose, e a deficiência destes na dieta pode causar diminuição dos níveis de glicose [37]. O SGLT1 presente na borda em escova dos enterócitos transporta a molécula de glicose para o interior da célula e, na membrana basolateral, o GLUT2 transporta a glicose para o exterior da célula, regulando os níveis de glicose no enterócito e possivelmente no plasma sanguíneo [22, 38, 39]. A glicose é uma importante fonte de energia para o organismo, sua maior absorção acontece no duodeno através da glicólise, a degradação da glicose produz piruvato, posteriormente ácido láctico, produzindo energia em forma de ATP para manter a homeostase [40]. São escassos os trabalhos que falam sobre o efeito da suplementação de metionina na dieta de matrizes sobre a expressão de genes relacionados ao transporte de aminoácidos e glicose. Segundo Zhang et al. (2016) [41], a suplementação de isoleucina na dieta aumenta a expressão de *SLC5A1* e *SLC2A2*, proporciona aumento da transcrição destes genes nas células da cripta, regulando o transporte da glicose.

Ao ser metabolizada dentro das células intestinais, a metionina proporciona o desenvolvimento dos enterócitos, que são unidos por complexos juncionais, que com o auxílio de proteínas de oclusão (claudina e ocludina) regulam a permeabilidade e a difusão das membranas [42]. Aves desafiadas por estresse de calor apresentam baixos níveis destas proteínas [43], no entanto, quando estas têm a dieta suplementada com metionina, os níveis de expressão de *OCN* e claudina (*CLDN-1*) aumentam, impedindo a entrada de patógenos que possam afetar o ambiente intestinal [44, 45]. Logo, com base em nossos resultados, onde matrizes alimentadas com HMET obtiveram maior expressão de *OCN*, pode-se dizer que a suplementação com nível acima do recomendado de metionina pode minimizar os efeitos deletérios causados por fatores que possam modificar as estruturas do duodeno das aves.

5.5 Conclusões

Com base nos resultados obtidos, podemos concluir que a suplementação de metionina, principalmente a suplementação com HMET, é essencial para melhorar os parâmetros morfológicos do intestino e expressão de genes relacionados ao transporte de aminoácidos, glicose e junção de oclusão no intestino delgado de matrizes de codornas japonesas.

Foi possível observar também, que além da dieta materna ser capaz de modular o desenvolvimento e funcionamento intestinal da progênie, a dieta desta também pode influenciar nesses parâmetros, principalmente àquela que recebeu dieta HMET.

5.6 Referências Bibliográficas

1. Rostagno, H. S. et al. *Brazilian Tables for Birds and Pigs: Composition of Foods and Nutritional Requirements*, 3rd edn., 2017.
2. Albino, L.F.T.; Barreto, S.L.T. *Criação de codornas para produção de ovos e carne*. Viçosa: Aprenda fácil, 2003.

3. Othman, R.A.; Amin, Rehman, S. Effect of egg size, age of hen and storage period on fertility, hatchability, embryo mortality and chick malformations in eggs of Japanese quail (*Coturnix japonica*). *J Agr Vet Sci* 2014, 7, 101-106.
4. Santana, T.P.; Gasparino, E.; Khatlab, A.S.; Brito, C.O.; Barbosa, L.T.; Lamont, S.J.; Del Vesco, A.P. Effect of prenatal ambient temperature on the performance physiological parameters, and oxidative metabolism of Japanese quail (*Coturnix japonica*) layers exposed to heat stress during growth. *Sci. Rep.* 2021, 11, 1-11.
5. Watanabe, G.C.A.; Melo, M.C.A.; Santos, E.O.; Cordeiro, C.N.; Nepomuceno, R.F.; Watanabe, P.H.; Freitas, E.R. Lighting programs at growing phase and their effects on performance and egg quality of meat quails at laying reared in equatorial region. *Res. Sq.* 2022. doi: 0.21203/rs.3.rs-2013855/v1.
6. Santana, T.P.; Gasparino, E.; Khatlab, A.S.; Pereira, A.M.F.E.; Barbosa, L.T.; Fernandes, R.P.M.; Lamont, S.J.; Del Vesco, A.P. Effects of maternal methionine supplementation on the response of Japanese quail (*Coturnix japonica*) chicks to heat stress. *J. Anim. Sci.* 2023, doi: 10.1093/jas/skad042.
7. Younis, D.T. Effect of sorghum and methionine supplementation in productive performance and the quality of hatching eggs of two quail strains. *Iraqi. J. Vet. Sci.* 2014, 38, 22-27.
8. Rehman, A.U.; Arif, M.; Husnain, M.M.; Alagawany, M.; El-Hack, M.E.; Taha, A.E.; Elnesr, S.S.; Abdel-Latif, M.A.; Othman, S.I.; Allam, A.A. Growth Performance of Broilers as Influenced by Different Levels and Sources of Methionine Plus Cysteine. *Anim.* 2019, 9, 1-12.
9. Reda, F.M.; Ismail, I.E.; El-Mekkawy, M.M.; Frag, M.R.; Mahmoud, H.K.; Alagawany, M. Dietary supplementation of potassium sorbate, hydrated sodium calcium aluminosilicate and methionine enhances growth, antioxidant status and immunity in growing rabbits exposed to aflatoxin B1 in the diet. *J. Anim. Phys. Anim. Nutr.* 2019, 104, 196-203.
10. Yang, Z.; Htoo, J.K.; Liao, S.F. Methionine nutrition in swine and related monogastric animals: Beyond protein biosynthesis. *Anim. Feed Sci. Techn.* 2020, 268, 1-16.
11. Kalvandi, O.; Sadeghi, A.; Karimi, A. Methionine supplementation improves reproductive performance, antioxidant status, immunity and maternal antibody transmission in breeder Japanese quail under heat stress conditions. *Arch. Anim. Breed.* 2019, 62, 275-286.
12. Dang, D.X.; Zhou, H.; Lou, Y.; Li, D. Effects of methionine and/or disaccharide injected in the amnion of geese on post-hatching pectoral muscle and small intestine development, glycogen reserves, jejunum morphology, and digestive enzymes activities. *Poul. Sci.* 2022, 101, 1-8.
13. Nazem, M.N.; Sajjadian, S.M. Kheirandish, R. Mohammadrezaei, H. Histomorphometric analysis of the small intestine of broiler chick embryos injected in ovo with methionine. *Anim. Prod. Sci.* 2017, 59, 133-139.
14. Danchin, E.; Charmantier, A.; Champagne, F.A.; Mesoudi, A.; Pujol, B.; Blanchet, S. Beyond DNA: integrating inclusive inheritance into an extended theory of evolution. *Nat. Rev. Genet.* 2011, 12, 475-486.
15. Day, T.; Bonduriansky, R. A Unified Approach to the Evolutionary Consequences of Genetic and Nongenetic Inheritance. *Am. Nat.* 2011, 178, 18-36.
16. Barshira, E.; Friedman, A. Development and adaptations of innate immunity in the gastrointestinal tract of the newly hatched chick. *DCI* 2006, 30, 930-941.
17. Li, S.; Zhi, L.; Liu, Y.; Shen, J.; Liu, L.; Yao, J.; Yang, X. Effect of in ovo feeding of folic acid on the folate metabolism, immune function and epigenetic modification of immune effector molecules of broiler. *BJN* 2016, 115, 411-421.
18. Yadav, S.; Jha, R. Strategies to modulate the intestinal microbiota and their effects on nutrient utilization, performance, and health of poultry. *J. Anim. Sci. Biotech.* 2019, 10, 1-11.
19. Jiang, J.; Qi, L.; Wei, Q.; Shi, F. Maternal stevioside supplementation improves intestinal immune function of chicken offspring potentially via modulating gut microbiota and down-

- regulating the promoter methylation level of suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1). *Anim Nutr* 2022, 10, 329-346.
20. Wang, C.; Wei, S.; Liu, B.; Wang, F.; Lu, Z.; Jin, M.; Wang, Y. Maternal consumption of a fermented diet protects offspring against intestinal inflammation by regulating the gut microbiota. *Gut Microbes* 2022, 14, 1-23.
 21. Junqueira, L.C.U.; Junqueira, L.M.M.S. *Técnicas básicas de citologia e histologia*. Publisher: Santos Publishing, 1983.
 22. Boleli, I.C.; Maiorka, A. Macari, M. estrutura funcional do trato digestório. *Fis Avi Apl Fra Cor* 2002, 2, 75-98.
 23. Junqueira, L.C.; Carneiro, J. *Basic Histology: text and atlas*. 15^a ed. Publisher: McGraw Hill/Medical. 2018
 24. Reece, W.O. *Dukes' Physiology of domestic animals*, 13th ed. Wiley-Blackwell, 2015.
 25. Moraes, L.R.; Delicado, M.E.A.; Cruz, A.S.; Silva, H.T.F.N.P.; Alves, C.V.B.V.; Campos, S.B.; Saraiva, E.P.; Costa, F.P.; Guerra, R.R. Methionine supplementing effects on intestine, liver and uterus morphology, and on positivity and expression of Calbindin-D28k and TRPV6 epithelial calcium carriers in laying quail in thermoneutral conditions and under thermal stress. *PLoS One* 2021, 16, 1-22.
 26. Boaro, M. Morfofisiologia do trato intestinal. *Conf Fac Cie Tec Avi* 2009, 27.
 27. Kumar, H.; Chaudhary, A.; Sing, A.; Sukhija, N.; Panwar, A.; Saravanan, K.; Bhaladhare, A.; Kaisa, K.; Panigrahi, M. A review on epigenetics: Manifestations, modifications, methods & challenges. *J Entom Zool Stu* 2020, 8, 780-786.
 28. Wang, C.; Wei, S.; Liu, B.; Wang, F.; Lu, Z.; Jin, M.; Wang, Y. Maternal consumption of a fermented diet protects offspring against intestinal inflammation by regulating the gut microbiota. *Gut Microbes*, 2022, 14, 1-24.
 29. Xiao, X.; Wang, Y.; Liu, W.; Ju, T.; Zhan, X Dietary sodium butyrate improves female broiler breeder performance and offspring immune function by enhancing maternal intestinal barrier and microbiota. *Poul. Sci.* 2017, 2023, 102, 1-12.
 30. Azad, M.A.K.; Bin, P.; Liu, G.; Fang, J.; Fang, J.; Li, T.; Yin, Y. Effects of different methionine levels on offspring piglets during late gestation and lactation. *Food Funct.* 2018, 9, 5843-5854.
 31. Matthews, J.C. *Farm Animals*. Publisher: CABI Publishing. Wallingford, 2000, pp. 3-23.
 32. Pramod, A.B.; Foster, J.; Carvelli, L.; Henry, L.K. SLC6 transporters: structure, function, regulation, disease association and therapeutics. *Mol Asp Med* 2013, 34, 197-219.
 33. Mastrototaro, L.; Sponder, G.; Saremi, B.; Aschenbach, J.R. Gastrointestinal Methionine Shuttle: Priority Handling of Precious Goods. *IUBMB Life* 2016, 68, 924-934.
 34. Villalobos, H.G.; Trejo, A.M.; Piña, B.A.A.; Htool, J.K.; Ramírez, M.C. Effects of dietary protein and amino acid levels on the expression of selected cationic amino acid transporters and serum amino acid concentration in growing pigs. *Arch Anim Nutr* 2012, 66, 257-270.
 35. Romanet, S.; Aschenbach, J.R.; Pieper, R.; Zentek, J.; Htoo, J.K.; Whelan, R.A.; Mastrototaro, L. Expression of proposed methionine transporters along the gastrointestinal tract of pigs and their regulation by dietary methionine sources. *Genes Nutr* 2021, 16, 2-15.
 36. Zhang, S.; Saremi, B.; Gilbert, E.R.; Wong, E.A. Physiological and biochemical aspects of methionine isomers and a methionine analogue in broilers. *Poult. Sci* 2017, 96, 425-439.
 37. Ma, B.; Zhang, L.; Li, J, Xing, T.; Jiang, Y.; Gao, F. Heat stress alters muscle protein and amino acid metabolism and accelerates liver gluconeogenesis for energy supply in broilers. *Poul. Sci.* 2021, 100, 215-223.
 38. Uldry, M.; Thorens, B. The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. *PFLUG ARCH EUR J PHY* 2004, 447, 480-489.
 39. Araujo, J.R.; Martel, F. Regulation of intestinal glucose absorption a brief review. *Arqui Med* 2009, 23, 35-43.
 40. Rodwell, V.W.; Bender, D.A.; Botham, K.M.; Kennelly, P.J.; Weil, P.A. *Harper's Illustrated Biochemistry*, 30th ed. McGraw-Hill Medical Publishing, 2015.

41. Zhang, S.; Yang, Q.; Ren, M.; Qiao, S.; He, P.; Li, D.; Zeng, X. Effects of isoleucine on glucose uptake through the enhancement of muscular membrane concentrations of GLUT1 and GLUT4 and intestinal membrane concentrations of Na⁺/glucose co-transporter 1 (SGLT-1) and GLUT2. *BJN* 2016, 116, 593-602.
42. Awad, W. A.; Hess, C. e Hess, M. Enteric pathogens and their toxin-induced disruption of the intestinal barrier through alteration of tight junctions in chickens. *Toxins (Basel)* 2017, 9, 1-22.
43. Su, S.; Miska, K.B.; Fetterer, R>H.; Jenkins, M.C.; Wong, E.A. Expression of digestive enzymes and nutrient transporters in *Eimeria acervulina*-challenged layers and broilers. *Poult Sci* 2014, 93, 1217-1226.
44. Del Vesco, A.P.; Khatlab, A.S.; Santana, T.P.; Pozza, P.C.; Soares, M.A.M.; Brito, C.O.; Barbosa, L.T.; Gasparino, E. Heat stress effect on the intestinal epithelial function of broilers fed methionine supplementation. *Livest. Sci.* 2020, 240, 1-9.
45. Chang, Y.; Tang, H.; Zhang, Z.; Yang, T.; Wu, B.; Zhao, H.; Liu, G.; Chen, X.; Tian, G.; Cai, J.; Wu, F.; Jia, G. Zinc Methionine Improves the Growth Performance of Meat Ducks by Enhancing the Antioxidant Capacity and Intestinal Barrier Function. *Front. Vet. Sci.* 2022, 9, 1-13.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O efeito da suplementação de metionina na dieta de matrizes, principalmente a dieta HMET, pode modular o metabolismo lipídico, proporcionando a expressão de genes relacionados à síntese e transporte de lipídeos, melhorando o desempenho reprodutivo das aves. A suplementação de metionina também pode proporcionar a proliferação de células responsáveis pelo desenvolvimento das vilosidades intestinais, aumentando a absorção de nutrientes essenciais para que a ave possa expressar máximo potencial de desempenho produtivo.

Além disso, a dieta materna pode ter efeito sobre a progênie, modulando o metabolismo lipídico e o ambiente intestinal destas aves para que possam expressar seu fenótipo em seu próprio ambiente.