



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ZOOTECNIA**



THAÍS PACHECO SANTANA

**MEMÓRIA INTERGERACIONAL: EFEITO DO AMBIENTE MATERNO SOBRE O
DESENVOLVIMENTO E METABOLISMO OXIDATIVO DA PROGÊNIE DE
CODORNAS DE POSTURA SUBMETIDAS AO ESTRESSE TÉRMICO**

**SÃO CRISTÓVÃO-SE
2019**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ZOOTECNIA**



THAÍS PACHECO SANTANA

**MEMÓRIA INTERGERACIONAL: EFEITO DO AMBIENTE MATERNO SOBRE O
DESENVOLVIMENTO E METABOLISMO OXIDATIVO DA PROGÊNIE DE
CODORNAS DE POSTURA SUBMETIDAS AO ESTRESSE TÉRMICO**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Sergipe
como parte das exigências para a
obtenção do título de Mestre em
Zootecnia.

Orientador (a): Prof^ª. Dr^ª Ana
Paula Del Vesco

Co-Orientador(a): Prof. Dr.
Leandro Texeira Barbosa

**São Cristóvão – SE
2019**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

S231m Santana, Thaís Pacheco
Memória intergeracional : efeito do ambiente materno sobre o desenvolvimento e metabolismo oxidativo da progênie de codornas de postura submetidas ao estresse térmico / Thaís Pacheco Santana ; orientadora Ana Paula Del Vesco. – São Cristóvão, SE, 2019.
84 f.

Dissertação (mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Sergipe, 2019.

1. Zootecnia. 2. Codornas. 3. Epigenética. 4. Stress oxidativo. 5. Metionina. I. Del Vesco, Ana Paula, orient. II. Título.

CDU 636.5.084.52

THAÍS PACHECO SANTANA

MEMÓRIA INTERGERACIONAL: EFEITO DO AMBIENTE MATERNO SOBRE O DESENVOLVIMENTO E METABOLISMO OXIDATIVO DA PROGENIE DE CODORNAS DE POSTURA SUBMETIDAS AO ESTRESSE TÉRMICO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

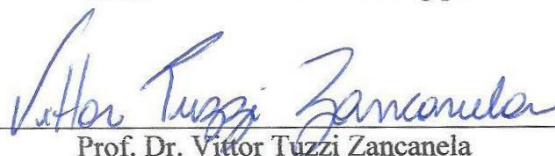
Aprovada em 22 de julho de 2019.



Prof.^a. Dr.^a. Eliane Gasparino
Universidade Estadual de Maringá



Prof.^a. Dr.^a. Roberta Pereira Miranda Fernandes
Universidade Federal de Sergipe



Prof. Dr. Victor Tuzzi Zancanela
Universidade Federal de Sergipe



Prof.^a. Dr.^a. Ana Paula Del Vesco
Universidade Federal de Sergipe

A Deus, o qual encontro forças em todos os momentos da minha vida.

A minha família, principalmente aos meus pais Selma Pacheco e Zenildo Vieira, sem vocês não seria nada, nem tão pouco chegaria até aqui.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela sua grandeza, sempre me guiando, me dando forças e coragem para chegar até aqui. Não foi nada fácil!

Aos meus pais, Selma e Zenildo, sem vocês não seria nada. Obrigada por todos os ensinamentos, pela compreensão, principalmente pela ausência durante seis meses dedicada ao meu experimento, mesmo sem entender nem saber muitas vezes o que estava se passando, e por todo o incentivo para que eu não desistisse e continue em busca do melhor para mim.

As minhas irmãs, Daniela e Isabela, muitas vezes cúmplices, e por sempre me ouvirem e me ajudarem nos momentos em que mais precisei.

As minhas amigas Bárbara, Vanessa, Eduarda, Pryanka e Thailine por todo incentivo, pela compreensão da minha ausência durante momentos que sei que precisaram de mim e principalmente por todas as palavras de conforto. Jamais poderei esquecer de você, Cinthia, por todo o companheirismo, malhação, distração, choros e principalmente pelas risadas para que os dias em Maringá fossem menos tensos.

A Angélica que não tenho nem palavras para agradecer o quanto você foi fundamental em minha passagem por Maringá, sem você não teria conseguido desenvolver e nem aprender tanta coisa. Angel, obrigada pelo companheirismo, pode contar comigo sempre!

As minhas estagiárias fofurinhas Angela, Glória e Jayne, sem a ajuda de vocês, nos momentos que tanto precisei, não sei se teria conseguido dar conta de tanta coisa.

A Lucas por todo carinho e companheirismo durante os meus momentos de desespero. Haja ouvido e noites mal dormidas de tanto me ouvir chorar.

A querida “profe” Eliane, por aceitar que eu pudesse desenvolver o meu experimento sobre a sua orientação. Obrigada por todo apoio, por todos os ensinamentos e por toda a dedicação para que tudo desse tão certo. Muito obrigada!

A minha querida “profe” Ana Paula por todos os ensinamentos, por toda ajuda, por todo apoio, principalmente por suas palavras nos momentos mais difíceis durante a sua ausência, todas as vezes que conversamos, mesmo que de longe, me sinto muito mais capaz de continuar. Profe, você é fantástica! Obrigada por acreditar em mim e por acreditar que eu posso melhorar sempre.

A Luiz pela amizade e por toda ajuda quando precisei.

Aos amigos adquiridos na UFS e UEM durante a realização do mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (PROC.407669/2016-7), Brasil. Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001. Este estudo foi em parte financiado pelo PROMOB - Programa de Estimulo a Mobilidade.

Enfim, a todos muito obrigada!

BIOGRAFIA

THAÍS PACHECO SANTANA, filha de Selma Pacheco e Zenildo Viera 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.

Em agosto de 2017 iniciou o 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.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
RESUMO GERAL	1
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	3
2. REFERÊNCIAS.....	5
Artigo 1 - Dieta materna de codornas de postura sobre a resposta ao estresse térmico da progênie em fase de crescimento.....	6
RESUMO.....	6
INTRODUÇÃO.....	8
MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
<i>Animais e delienamento experimental.....</i>	<i>10</i>
<i>Matrizes.....</i>	<i>10</i>
<i>Progênie.....</i>	<i>13</i>
<i>Avaliações.....</i>	<i>15</i>
<i>Expressão gênica.....</i>	<i>16</i>
<i>Análises bioquímicas.....</i>	<i>17</i>
<i>Relação heterofilo/linfócito.....</i>	<i>19</i>
<i>Análises estatísticas.....</i>	<i>19</i>
RESULTADOS.....	20
<i>Efeito da dieta sobre o desempenho das matrizes.....</i>	<i>20</i>
<i>Efeito do ambiente materno sobre o desenvolvimento da progênie.....</i>	<i>23</i>
<i>Efeito da temperatura ambiental no desenvolvimento da progênie.....</i>	<i>28</i>
DISCUSSÃO.....	32
AGRADECIMENTOS.....	36
REFERÊNCIAS.....	36
Artigo 2 - Efeito da temperatura no período pré-natal sobre o desempenho e metabolismo oxidativo de codornas de postura expostas ao estresse térmico na fase de crescimento.....	42
RESUMO.....	42
INTRODUÇÃO.....	43
MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
<i>Animais e delineamento experimental.....</i>	<i>45</i>
<i>Matrizes.....</i>	<i>45</i>
<i>Progênie.....</i>	<i>46</i>
<i>Avaliações.....</i>	<i>49</i>
<i>Expressão gênica.....</i>	<i>49</i>
<i>Análises bioquímicas.....</i>	<i>51</i>
<i>Relação heterofilo/linfócito.....</i>	<i>53</i>
<i>Análises estatísticas.....</i>	<i>53</i>
RESULTADOS.....	54
<i>Efeito da temperatura ambiental sobre o desempenho das matrizes.....</i>	<i>54</i>
<i>Efeito do ambiente materno sobre o desenvolvimento da progênie na fase inicial (1-15 dias de idade).....</i>	<i>57</i>
<i>Efeito do ambiente materno sobre o desenvolvimento da progênie na fase de crescimento.....</i>	<i>57</i>
<i>Efeito da temperature ambiental no desempenho da progênie na fase de crescimento.....</i>	<i>61</i>
DISCUSSÃO.....	64

AGRADECIMENTOS.....	68
REFERÊNCIAS.....	68

LISTA DE TABELAS

Artigo 1 - Dieta materna de codornas de postura sobre a resposta ao estresse térmico da progênie em fase de crescimento

Tabela 1. Composição percentual e valores nutricionais das dietas experimentais para matrizes em fase de postura	12
Tabela 2. Composição percentual e valores nutricionais da dieta experimental para codornas de postura fase inicial e de crescimento.....	14
Tabela 3. Sequência de primers utilizados na reação de qRT-PCR	17
Tabela 4. Características de desempenho de matrizes de codornas japonesas em fase de reprodução	21
Tabela 5. Número de folículos e peso relativo de órgãos de matrizes de codornas japonesas em fase de reprodução	22
Tabela 6. Coeficientes de correlação de Pearson entre a expressão de <i>GPx</i> , <i>GSS</i> , <i>HSP70</i> e <i>MSRA</i> de matrizes e sua progênie.....	27
Tabela 7. Efeito da temperatura ambiental sobre o desempenho da progênie na fase de crescimento.....	29

Artigo 2 - Efeito da temperatura no período pré-natal sobre o desempenho e metabolismo oxidativo de codornas de postura expostas ao estresse térmico na fase de crescimento

Tabela 1. Composição percentual e valores nutricionais da dieta experimental para codornas de postura fase inicial e de crescimento	48
Tabela 2. Sequência de primers utilizados na reação de qRT-PCR	51
Tabela 3. Características de desempenho de matrizes de codornas japonesas em fase de reprodução	55
Tabela 4. Número de folículos e peso relativo de órgãos de matrizes de codornas japonesas em fase de reprodução	55
Tabela 5. Coeficientes de correlação de Pearson entre a expressão de <i>GPx</i> , <i>GSS</i> , <i>HSP70</i> e <i>MSRA</i> de matrizes e sua progênie.....	60
Tabela 6. Efeito da temperatura ambiental sobre o desempenho da progênie na fase de crescimento.....	62

LISTA DE FIGURAS

Artigo 1- Dieta materna de codornas de postura sobre a resposta ao estresse térmico da progênie em fase de crescimento

Figura 1. Esquema demonstrando o delineamento experimental.....	13
Figura 2. Efeito da dieta sobre a expressão de mRNA glutaciona peroxidase (<i>GPx</i>) (A); glutaciona sintetase (<i>GSS</i>) (B), proteína do choque térmico 70 (<i>HSP70</i>) (C) e metionina sulfóxido redutase A (<i>MSRA</i>) (D) no fígado de matrizes de codornas japonesa.....	22
Figura 3. Efeito da dieta sobre o conteúdo de TBARS (nmol/mg de proteína) (A); capacidade antioxidante (%) (B) e proteínas carboniladas (nmol de grupos carbonils/mg de proteína) (C) no fígado de matrizes de codornas japonesas.....	23
Figura 4. Efeito da dieta materna sobre a taxa de mortalidade (A) e desempenho da progênie na fase inicial (1-15 dias de idade) (B).....	24
Figura 5. Efeito da dieta materna sobre o desempenho da progênie entre 15-35 dias de idade.....	25
Figura 6. Efeito da dieta materna sobre a expressão de glutaciona peroxidase (<i>GPx</i>) (A) glutaciona sintetase (<i>GSS</i>) (B), proteína do choque térmico 70 (<i>HSP70</i>) (C) e metionina sulfóxido redutase A (<i>MSRA</i>) (D) da progênie aos 35 dias de idade.....	26
Figura 7. Efeito da dieta materna sobre o conteúdo de TBARS (nmol/mg de proteína) (A); capacidade antioxidante (%) (B), proteínas carboniladas (nmol de grupos carbonils/mg de proteína) (C) e relação heterofilos:linfócitos (H/L) (D) da progênie aos 35 dias de idade.....	28
Figura 8. Efeito da temperatura ambiental sobre a expressão de mRNA glutaciona peroxidase (<i>GPx</i>) (A) glutaciona sintetase (<i>GSS</i>) (B), proteína do choque térmico (<i>HSP70</i>) (C) e metionina sulfóxido redutase (<i>MSRA</i>) (D) no fígado da progênie aos 35 dias de idade.....	30
Figura 9. Efeito da temperatura ambiental sobre o conteúdo de TBARS (nmol/mg de proteína) (A); capacidade antioxidante (%) (B) e proteínas carboniladas (nmol de grupos carbonils/mg de proteína) (C) no fígado da progênie aos 35 dias de idade.....	31

Artigo 2 - Efeito da temperatura no período pré-natal sobre o desempenho e metabolismo oxidativo de codornas de postura expostas ao estresse térmico na fase de crescimento

Figura 1. Esquema demonstrando o delineamento experimental.....	47
Figura 2. Efeito da temperatura ambiental sobre a expressão de glutaciona peroxidase (<i>GPx</i>) (A), glutaciona sintetase (<i>GSS</i>) (B), proteína do choque térmico (<i>HSP70</i>) (C) e metionina sulfóxido redutase (<i>MSRA</i>) (D) no fígado das matrizes.....	56
Figura 3. Efeito da temperatura ambiental sobre a capacidade antioxidante (%) (A); o conteúdo de TBARS (nmol/mg de proteína) (B); proteínas carboniladas (nmol de grupos carbonils/mg de proteína) (C) e relação heterofilos:linfócitos (H/L) (D).....	56
Figura 4. Efeito da temperatura ambiental materna sobre a taxa de mortalidade (A) e desempenho da progênie na fase inicial (1-15 dias de idade) (B).....	57
Figura 5. Efeito da temperatura ambiental materna sobre peso da progênie aos 15 dias de idade (A), peso aos 35 dias de idade (B) e ganho de peso (C).....	58

Figura 6. Efeito da temperatura ambiental materna sobre a expressão dos genes da glutaciona peroxidase (<i>GPx</i>) (A), glutaciona sintetase (<i>GSS</i>) (B), proteína do choque térmico 70 (<i>HSP70</i>) (C) e metionina sulfóxido redutase A (<i>MSRA</i>) (D) no fígado da progênie aos 35 dias de idade.....	59
Figura 7. Efeito da temperatura ambiental materna sobre o conteúdo de TBARS (nmol/mg de proteína) (A); capacidade antioxidante (%) (B) e proteínas carboniladas (nmol de grupos carbonils/mg de proteína) (C) (C) e relação heterofilos:linfócitos (H/L) (D) da progênie aos 35 dias de idade.....	61
Figura 8. Efeito da temperatura ambiental sobre a expressão de glutaciona peroxidase (<i>GPX</i>) (A), glutaciona sintetase (<i>GSS</i>) (B), proteína do choque térmico 70 (<i>HSP70</i>) (C) e metionina sulfóxido redutase A (<i>MSRA</i>) (D) no fígado da progênie aos 35 dias de idade.....	63
Figura 9. Efeito da temperatura ambiental sobre o conteúdo de TBARS (nmol/mg de proteína) (A); capacidade antioxidante (%) (B) e proteínas carboniladas (nmol de grupos carbonils/mg de proteína) (C) e relação heterofilo:linfócito (H/L) da progênie aos 35 dias de idade.	64

RESUMO GERAL

Pesquisas demonstram que o efeito do ambiente materno pode ser alterado para produzir efeitos benéficos na progênie através de mecanismos epigenéticos transgeracionais. Dessa forma, este trabalho tem como objetivo geral avaliar o efeito do ambiente materno sobre as respostas da progênie frente ao seu próprio ambiente na fase de crescimento de codornas de postura. Para tanto, dois trabalhos foram conduzidos: Experimento 1: Dieta materna sobre a resposta ao estresse térmico da progênie durante a fase de crescimento (conduzido em esquema fatorial 3 x 2: três dietas para as matrizes, e pra cada tratamento das mães, duas temperaturas para seus filhos) e Experimento 2: Efeito da temperatura no período pré-natal sobre o desempenho e metabolismo oxidativo de codornas de postura expostas ao estresse térmico na fase de crescimento (conduzido em esquema fatorial 2 x 2: duas temperaturas para as matrizes, e pra cada tratamento das mães, duas temperaturas para seus filhos). No experimento 1, matrizes que receberam dietas com suplementação do nível recomendado de metionina (Met1) e dieta com suplementação de metionina a cima do nível de recomendado (Met2) apresentaram maior produção de ovos, melhor eficiência alimentar, maior taxa de eclosão, maior taxa de eclosão de ovos férteis e produziram pintainhos mais pesados ($P < 0.05$). Matrizes alimentadas com dietas Met1 e Met2 também apresentaram maior expressão de glutatona sintetase (*GSS*) e metionina sulfóxido redutase A (*MSRA*), maior capacidade antioxidante e menor conteúdo de TBARS. A progênie de matrizes alimentadas com dieta Met2 apresentaram maior peso aos 15 dias, maior ganho de peso e melhor conversão alimentar (1-15 dias de idade) que a progênie de matrizes alimentados com dieta SM. Durante o período de crescimento, para progênie criada em condição de estresse térmico, a progênie de aves alimentadas com dietas com suplementação de metionina apresentaram maior peso aos 35 dias, maior ganho, maior expressão de *GSS*, *MSRA* e de proteína do choque térmico 70 (*HSP70*), maior capacidade antioxidante e menor relação heterofilo:linfócito que a progênie de matrizes alimentadas com dietas SM. Correlação positiva foi observada entre a expressão de *GPx* e *MSRA* nas matrizes e em sua progênie ($P < 0,05$). No experimento 2, menor taxa de postura, menor massa de ovo, menor expressão de metionina sulfoxido redutase A (*MSRA*), menor capacidade antioxidante e maior taxa de mortalidade da progênie na fase inicial (1-15 dias de idade) foi observada em matrizes criadas em condição de estresse térmico ($P < 0.05$). Na fase de crescimento da progenie, não houve efeito da temperatura ambiental sobre o desempenho ou metabolismo oxidativo da progênie de matrizes criadas em condição de conforto. Entretanto, quando a matriz foi submetida ao estresse, menor ganho de peso, menor expressão de *MSRA*, maior expressão de *HSP70*, maior conteúdo de proteínas carboniladas e menor relação H/L foi observada nas progênies também criadas em condição de estresse térmico. Os nossos resultados sugerem que o ambiente materno pode influenciar no desempenho e no sistema oxidativo da matriz beneficiando ou não o seu filho futuramente: sob condições de estresse térmico durante a fase de crescimento, progênie de matrizes alimentadas com dietas suplementadas com metionina respondem melhor ao ambiente do que progênie de matrizes alimentadas com dieta sem suplementação de metionina; já o estresse térmico vivenciado pela matriz, apesar de não apresentar efeitos negativos sobre o desenvolvimento e desempenho da progênie criada em conforto térmico, está associado com menor desempenho e maior nível de oxidação proteica quando a progênie também é submetida à condição de estresse.

Palavras-chave: ambiente materno; desafio ambiental; epigenética transgeracional; metionina

1. INTRODUÇÃO GERAL

A produção de pintainhos viáveis e de boa qualidade depende da genética da matriz e também de condições ambientais que podem atuar para potencializar ou reduzir o potencial genético. Dentre esses fatores, a nutrição e a temperatura ambiental podem apresentar grande impacto no desempenho da matriz e de sua progênie.

Estudos mostram que a metionina, um importante componente da dieta das aves, pode influenciar na produção e na qualidade do ovo (VIEIRA et al., 2017; SUMIATI e WIRYAWAN, 2016), aumentar a capacidade antioxidante total e minimizar a ação das espécies reativas de oxigênio (ROS) (BUNCHASAK, 2009; SANCHEZ-ROMAN et al., 2011), além de induzir a proliferação de células imunes (SHINI et al., 2005; PARVIN et al., 2009).

Junto com a dieta, o ambiente onde os animais são alojados também tem relação direta com o desempenho (LARA e ROSTAGNO, 2013). Mudanças na temperatura ambiente do galpão podem impactar aspectos importantes relacionados à saúde, reduzindo a capacidade imunológica (RAJKUMAR et al., 2011), deixando as aves mais vulneráveis a doenças, e desviando a energia que seria utilizada no desempenho produtivo para garantir a homeostase ou para combater patógenos. Em matrizes, o estresse térmico é ainda relacionado à reduzida taxa de fertilidade, produção de ovos, eclodibilidade e número de pintainhos nascidos vivos (SHARIFI et al., 2010).

Acredita-se que uma das maneiras do ambiente exercer influência sobre a expressão gênica seja através dos mecanismos epigenéticos de regulação gênica. A epigenética trata das mudanças herdáveis na expressão dos genes que são independentes de mudanças na sequência do DNA (SZYF, 2015). Estudos sugerem que a estrutura da cromatina pode ser fator determinante no controle da transcrição, e que fatores epigenéticos como as modificações das histonas e a metilação do DNA estão envolvidos nesse processo, que envolve a condensação da cromatina e o silenciamento gênico (DONKENA et al., 2010). Como os mecanismos epigenéticos são transferidos para as gerações seguintes, a epigenética transgeracional tem se tornado uma área promissora para atuar na compreensão da variação das respostas fisiológicas dos indivíduos ao meio ambiente, bem como no entendimento da herança destas respostas baseada em todos os mecanismos que não aqueles relacionados a variações na sequência de DNA. A epigenética transgeracional é o fenômeno pelo qual a informação do ambiente parental, geralmente materno, é traduzida em respostas de memória que prepararão a progênie

para seu próprio ambiente. Como consequência, os indivíduos da próxima geração podem mostrar características fenotípicas diferentes dependendo se as suas mães foram mantidas sob diferentes condições ambientais (BERGHOF et al., 2013). Vale ressaltar que o ambiente materno pode provocar efeitos positivos, ou negativos sobre os indivíduos da próxima geração. Sendo assim, esse estudo busca obter maiores informações a respeito de como o ambiente materno pode influenciar na capacidade antioxidante e desempenho da progênie submetida a diferentes condições experimentais. Para isso dois experimentos foram conduzidos: ***Experimento 1***- Dieta materna sobre a resposta de codornas de postura ao estresse térmico durante a fase de crescimento; e ***Experimento 2***- Efeito da temperatura no período pré-natal sobre o desempenho e metabolismo oxidativo de codornas de postura expostas ao estresse térmico na fase de crescimento.

2. REFERÊNCIAS

- BERGHOF, T. V. L., PARMENTIER, H. K. & LAMMERS, A. Transgenerational epigenetic effects on innate immunity in broilers: An underestimated field to be explored? **Poultry Science**, v.92, p.2904–2913, 2013.
- BUNCHASAK, C. & SILAPASORN, T. Effects of Adding Methionine in Low-Protein Diet on Production Performance, Reproductive Organs and Chemical Liver Composition of Laying Hens under Tropical Conditions. **International Journal of Poultry Science**, v. 4, p.301-308, 2005.
- DONKENA, K. V., YOUNG, C. Y. F. & TINDALL, D. J. Oxidative Stress and DNA Methylation in Prostate Cancer. **Obstetrics and Gynecology International**. Doi: 10.1155/2010/302051. 2010
- LARA, L.J. & ROSTAGNO, M.H. Impact of heat stress on poultry production. **Animals**, v.3, p.356-369, 2013.
- PARVIN, R., MANDAL, A. B., SINGH, S. M. & THAKUR, R. Effect of dietary level of methionine on growth performance and immune response in Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*). **Journal Science Food and Agriculture**, v.90, p.471-481, 2009.
- RAJKUMAR, U., REDDY, M. R., RAMA RAO, S. V. & SHANMUGAM, M. Evaluation of growth, carcass, immune response and stress parameters in Naked Neck chicken and their normal siblings under tropical winter and Summer. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v.24, p.509-516, 2011.
- SHARIFI, A. R., HORST, P. & SIMIANER, H. The effect of naked neck gene and ambient temperature and their interaction on reproductive traits of heavy broiler dams. **Poultry Science**, doi: [10.3382/ps.2009-00593](https://doi.org/10.3382/ps.2009-00593), 2010.
- SUMIATI, A. & WIRYAWAN, K. G. Egg Quality and Blood Hematology of Magelang Laying Duck Fed with Diets Containing Different Ratios of Omega 3 and Omega 6 Fatty Acids and Organic Zn. **International Journal of Poultry Science**, v. 15, p.448-453, 2016.
- SZYF, M. Nongenetic inheritance and transgenerational epigenetics. **Trends in Molecular Medicine**, v. 21, p.134-144, 2015.
- VIEIRA, D. V. G., COSTA, F. G. P., LIMAS, M. R., JÚNIOR, J. G. V., BONAPARTE, T. P. & CAVALCANTE, D. T. 2 - Hydroxy - 4 - methylthio butanoic acid and DL - methionine for Japanese quails in production. **Journal of Animal Physiology and Nutrition**, doi: [10.1111/jpn.12813](https://doi.org/10.1111/jpn.12813), 2017.

1 Artigo 1. Normas de acordo com: PloS One

2
3 **Dieta materna de codornas de postura sobre a resposta ao estresse térmico da**
4 **progênie em fase de crescimento**
5

6 Thaís Pacheco Santana¹, Eliane Gasparino², Angélica Khatlab de Souza², Angela Maria
7 Favaro Elias Pereira², Leandro Teixeira Barbosa¹, Roberta Pereira Miranda Fernandes³,
8 Susan S. Lamont⁴, Ana Paula Del Vesco^{1*}
9

10 ¹Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, Brasil

11 ² Departamento de Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brasil

12 ³Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, Brasil

13 ⁴Department of Animal Science, Iowa State University, Ames, United States of
14 America

15
16 *Correspondente: apaulavesco@gmail.com
17

18 **Resumo:** O efeito do ambiente materno pode ser alterado para produzir efeitos
19 benéficos na progênie através de mecanismos epigenéticos transgeracionais. Dessa
20 forma, esse trabalho foi conduzido sobre a hipótese de que a suplementação de
21 metionina na dieta da matriz poderia contribuir para reduzir os efeitos do estresse
22 oxidativo e melhorar o desempenho de sua progênie quando submetida ao estresse
23 térmico na fase de crescimento. O experimento foi conduzido em esquema fatorial 3 x
24 2. Três dietas para as matrizes (dieta sem suplementação de metionina, SM; dieta com
25 suplementação do nível recomendado de metionina, Met1; e dieta com suplementação
26 de metionina a cima do nível de recomendado, Met2), e pra cada tratamento das mães,
27 duas temperaturas para a progênie (conforto ou estresse térmico intermitente com
28 exposição à alta temperatura por seis horas na fase de crescimento; 15-35 dias de idade -
29 34°C). Matrizes que receberam dietas Met1 e Met2 apresentaram maior produção de
30 ovos, melhor eficiência alimentar, maior taxa de eclosão, maior taxa de eclosão de ovos
31 férteis e produziram pintainhos mais pesados (P<0.05). Matrizes alimentadas com dietas
32 Met1 e Met2 também apresentaram maior expressão de glutathiona sintetase (*GSS*) e
33 metionina sulfóxido redutase A (*MSRA*), maior capacidade antioxidante e menor
34 conteúdo de TBARS. A progênie de matrizes alimentadas com dieta Met2 apresentaram
35 maior peso aos 15 dias, maior ganho de peso e melhor conversão alimentar (1-15 dias
36 de idade) que a progênie de matrizes alimentados com dieta SM. Durante o período de
37 crescimento, para progênie criada em condição de estresse térmico, a progênie de aves
38 alimentadas com dietas com suplementação de metionina apresentaram maior peso aos
39 35 dias, maior ganho, maior expressão de *GSS*, *MSRA* e de proteína do choque térmico
40 70 (*HSP70*), maior capacidade antioxidante e menor relação heterofilo:linfócito que a
41 progênie de matrizes alimentadas com dietas SM. Correlação positiva foi observada
42 entre a expressão de *GPx* e *MSRA* nas matrizes e em sua progênie (P<0,05). Nossos
43 resultados demonstram que a suplementação de metionina na dieta da matriz contribui
44 para o desenvolvimento e desempenho da progênie na fase inicial; e ainda, que sob
45 condições de estresse térmico durante a fase de crescimento, progênie de matrizes
46 alimentadas com dietas suplementadas com metionina respondem melhor ao ambiente
47 do que progênie de matrizes alimentadas com dieta sem suplementação de metionina. O

48 que indica que a suplementação de metionina na dieta da matriz foi capaz de garantir a
49 ativação de diferentes rotas metabólicas em sua progênie para aliviar os efeitos
50 negativos do estresse.

51

52 Palavras-chave: ambiente materno, epigenética, estado oxidativo.

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68

69

70

71

72

73

74

75

76

77

78

79

80

81

82

83

84

85

86

87

88

89

90

91

92

93

94

95

96

97

98 INTRODUÇÃO

99 A importância da eficiência na produção de matrizes na produção de aves pode
100 ser exemplificada através dos dados da cadeia de produção de frangos de corte em que
101 cerca de 60 bilhões de frangos são produzidos por aproximadamente 460 milhões de
102 matrizes de corte ao redor do mundo durante um ano, o que significa que uma matriz
103 produz cerca de 100 aves por ano [1].

104 Diferentes fatores podem atuar sobre os índices de desempenho alcançados pelas
105 matrizes de corte [2] ou durante a produção de ovos de codornas [3]. Santos et al. [4]
106 mostram que a idade da matriz tem influência na produção, peso dos ovos e peso da
107 progênie. Aves mais velhas apresentaram maior produção de ovos e progênie com
108 maior peso corporal aos 35 dias de idade (219,99g) que aves mais novas. A idade
109 também tem influência na taxa de fertilidade e característica dos ovos; matrizes mais
110 novas têm maior taxa de fertilidade que aves mais velhas [5]. Entretanto, aves mais
111 velhas produzem ovos mais pesados [6].

112 Assim como a idade das aves, a dieta também tem grande impacto na eficiência
113 produtiva de aves em postura. O estresse causado pela deficiência de alguns nutrientes,
114 como por exemplo, a deficiência da metionina, pode comprometer a homeostase do
115 organismo causando prejuízos ao desenvolvimento e desempenho da matriz. Alguns
116 estudos mostram que a metionina pode influenciar na produção de ovos, já que dietas
117 com suplementação deste aminoácido aumentam a taxa de produção [7] além do peso
118 dos ovos. A metionina está relacionada com a produção dos hormônios relacionados ao
119 crescimento e tem papel fundamental na síntese proteica [8]. Considerado como um
120 antioxidante, a metionina é capaz de aumentar os níveis de capacidade antioxidante total
121 podendo minimizar a ação das espécies reativas de oxigênio (ROS), além de atuar no

122 ambiente intestinal, resultando em maior eficiência na digestão e absorção de nutrientes
123 [9].

124 O efeito da manipulação da dieta ou da suplementação de alguns nutrientes na
125 dieta da matriz tem sido avaliado com o objetivo de conferir efeitos benéficos sobre
126 diferentes aspectos do desenvolvimento da progênie [10, 11, 12, 13]. Em aves, o
127 período entre a concepção do embrião e a postura, e depois, entre a incubação e a
128 eclosão é conhecido como “early life”, e as experiências encontradas nesses períodos
129 vão contribuir na determinação de como a progênie irá responder ao seu próprio
130 ambiente. Acredita-se que uma das maneiras do ambiente exercer influência sobre a
131 expressão gênica seja através dos mecanismos epigenéticos de regulação gênica. A
132 epigenética trata das mudanças herdáveis na expressão dos genes que são independentes
133 de mudanças na sequência do DNA. Estudos sugerem que a estrutura da cromatina pode
134 ser fator determinante no controle da transcrição, e que fatores epigenéticos como as
135 modificações das histonas e a metilação do DNA estão envolvidos nesse processo, que
136 envolve a condensação da cromatina e o silenciamento gênico [14]. Os efeitos da
137 epigenética transgeracional na “early life” trata das consequências observadas na
138 progênie devido às condições experienciadas pela geração parental durante o
139 desenvolvimento do embrião [15], dessa maneira, o efeito do ambiente materno pode
140 ser alterado para produzir efeitos benéficos na progênie, enquanto algumas condições
141 devem ser evitadas para reduzir os efeitos negativos [16]. Apesar do crescente interesse
142 no tema, estudos avaliando como marcas epigenéticas adquiridas devido a exposição
143 ambiental podem ser transmitidas através de mecanismos epigenéticos transgeracionais
144 ainda são escassos [17]. Dessa forma, esse trabalho foi conduzido sobre a hipótese de
145 que a suplementação de metionina na dieta da matriz poderia contribuir para reduzir os
146 efeitos do estresse oxidativo e melhorar o desempenho de sua progênie quando

147 submetida ao estresse térmico na fase de crescimento. As principais questões levantadas
148 são: (1) qual o efeito da dieta materna sobre o desenvolvimento da progênie na fase
149 inicial? (2) como as marcas adquiridas na fase de desenvolvimento (“early life”) podem
150 atuar nas respostas futuras da progênie ao seu próprio ambiente?

151

152 **MATERAIS E MÉTODOS**

153 *Animais e delineamento experimental*

154 Para avaliar o efeito do ambiente materno sobre o desenvolvimento da progênie, o
155 experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema
156 fatorial 3 x 2: três dietas para as matrizes, e para cada tratamento das matrizes, duas
157 temperaturas aplicadas para sua progênie.

158

159 *Matrizes*

160 Duzentas codornas japonesas (*coturnix coturnix japonica*) fêmeas de um dia de
161 idade foram criadas em gaiolas coletivas até 98 dias de idade. Durante esse período, o
162 desenvolvimento das aves e a taxa de postura foram monitorados diariamente. Aos 98
163 dias de idade, 30 codornas com peso médio de (154,6 g) e taxa de postura de 85% foram
164 distribuídas em três tratamentos referentes ao nível de metionina na dieta (Tabela 1):
165 dieta sem suplementação de metionina (deficiência em metionina, SM); dieta com
166 suplementação do nível recomendado de metionina de acordo com Rostagno et al. [18]
167 (Met1); e dieta com suplementação de metionina a cima do nível recomendado (Met2).
168 Durante o período experimental, as aves foram criadas em gaiolas individuais e tiveram
169 livre acesso a ração e água. As matrizes permaneceram em experimentação por 38 dias
170 (98 a 136 dias de idade): 28 dias antes de começar a coleta de ovos para incubação para

171 garantir que todos os ovos foram fertilizados durante o período experimental, e 10 dias
172 para a coleta de ovos.

173 A partir da terceira semana de experimento, 30 machos padronizados pelo peso
174 médio (161,2 g) tiveram contato diário com as matrizes durante uma hora. O efeito
175 parental dos machos foi minimizado através da realização de rodízio. Os machos foram
176 utilizados apenas para o acasalamento, e receberam ração basal e água a vontade
177 durante todo o experimento.

178 A coleta de ovos para incubação foi iniciada a partir do oitavo dia de
179 acasalamento; durante o período de 10 dias, os ovos foram coletados, identificados,
180 pesados diariamente e armazenados a temperatura ambiente de 23°C. No último dia de
181 coleta todos os ovos foram adaptados à temperatura ambiente, foram armazenados em
182 redes de fruta e então transferidos para incubadora (Chocmaster Luna 240) previamente
183 programada para atingir temperatura de 37°C e umidade relativa de 60%. Ao final dos
184 19 dias de incubação os ovos não eclodidos foram abertos e classificados como ovos
185 não fecundados ou embriões mortos.

186

187

188

189

190

191

192

193

194

195

196
197

Tabela 1. Composição percentual e valores nutricionais das dietas experimentais para matrizes em fase de postura

Ingredientes (%)	Dietas Experimentais		
	SM [†]	Met1	Met2
Milho Moído	56.639	56.303	61.746
Farelo de Soja	32.200	32.300	34.00
Sal	0.375	0.375	0.375
Óleo Vegetal	1.700	1.600	1.500
Calcário Calcítico	7.520	7.520	7.520
Fosfato Bicálcico	0.990	0.990	0.990
L-lisina HCL	0.130	0.130	0.130
DL-Metionina	-	0.335	0.630
L-Treonina	0.046	0.047	0.047
Suplemento Vitamínico e Mineral de Postura ¹	0.400	0.400	0.400
Total	100.000	100.000	100.000
Composição Energética e Nutricional			
EM (Kcal/kg)	2796.357	2795.309	2795.061
Proteína Bruta (%)	19.377	19.597	19.767
Cálcio (%)	3.151	3.151	3.151
Fósforo Disponível (%)	0.330	0.330	0.330
Sódio (%)	0.171	0.171	0.170
Aminoácidos Digestíveis (%)			
Metionina+Cistina	0.531	0.863	1.174
Lisina	1.049	1.051	1.051
Treonina	0.713	0.715	0.714
Triptofano	0.215	0.215	0.215

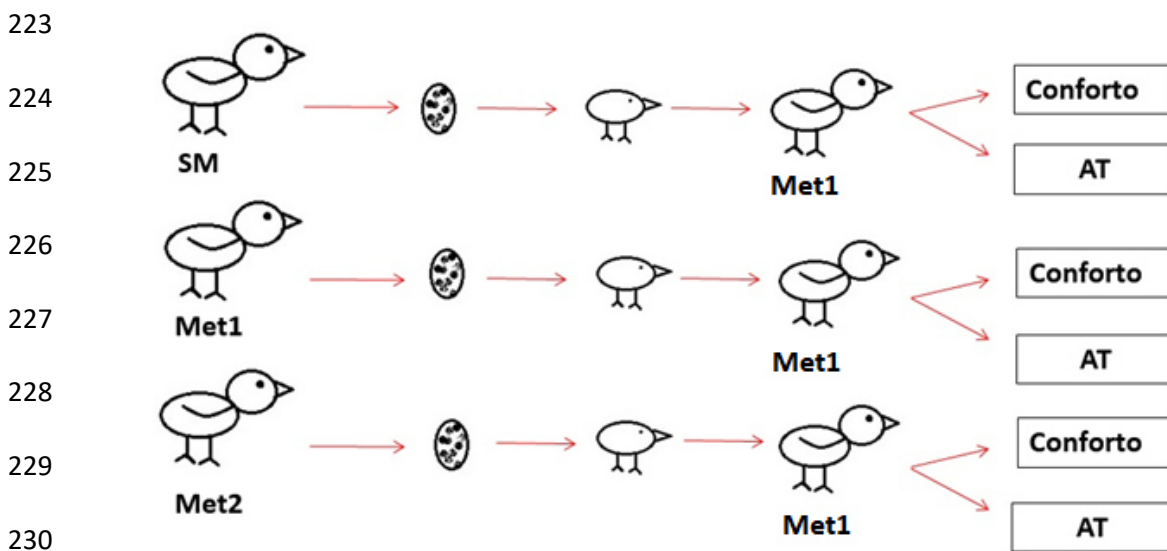
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209

¹Suplemento Vitamínico e Mineral de Postura (por Kg do produto): 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; Veiculo Q.S.P - 1.000 g/Kg.[†]SM, dieta sem suplementação de metionina; Met1, dieta com suplementação do nível recomendado de metionina; Met2, dieta com suplementação de metionina a cima do nível de recomendado.

210 *Progênie*

211 Ao nascerem todos os pintainhos (total de 150 aves) foram identificados, pesados
212 e alojados em círculo de proteção previamente aquecido com lâmpada de aquecimento,
213 contendo ração para fase inicial (Tabela 2) e água a vontade. Os pintainhos foram
214 alojados de acordo com a dieta experimental das matrizes (Figura 1).

215 Aos 15 dias de idade, as aves filhas de cada matriz foram pesadas e distribuídas
216 em dois tratamentos referentes a temperatura ambiental: aves que permaneceram em
217 conforto térmico (23°C) e aves que foram criadas em estresse térmico intermitente com
218 exposição à alta temperatura (34°C) por seis horas (período compreendido entre 10:00
219 as 16:00). As aves pertencentes ao mesmo tratamento foram alocadas em gaiolas
220 coletivas (n=13) (duas aves por gaiola) e tiveram acesso livre a água e à ração
221 formulada para atender as exigências nutricionais de acordo com Rostagno et al. [18]
222 (Tabela 2).



231 Figura 1. Esquema mostrando o delineamento experimental. Ovos de cada matriz foram coletados por 10
232 dias e incubados sob as mesmas condições. Ao nascerem os pintainhos foram alojados de acordo com a
233 dieta experimental da matriz e criados de maneira convencional sob as mesmas condições experimentais
234 até os 15 dias de idade. Aos 15 dias de idade, as aves filhas de cada matriz foram distribuídas em dois
235 tratamentos referentes a temperatura ambiental: aves que permaneceram em conforto térmico (23°C) e
236 aves que foram criadas em estresse térmico intermitente com exposição à alta temperatura (AT, 34°C) por
237 seis horas.

238

239 Tabela 2. Composição percentual e valores nutricionais da dieta experimental para codornas de
 240 postura fase inicial e de crescimento

Ingredientes (%)	Composição Percentual (%)	
	1 a 14 dias	15 a 35 dias
Milho moído	61.876	65.272
Farelo de soja	34.000	30.600
Sal	0.445	0.605
Óleo vegetal	0.300	-
Calcario calcítico	1.125	1.405
Fosfato bicálcico	1.530	1.400
L-Lisina HCL	0.123	0.138
DL-Metionina	0.185	0.165
L-Treonina	0.016	0.015
Suplemento vitamínico e mineral ¹	0.400	0.400
Total	100.000	100.000
Composição Energética e Nutricional		
	1 a 14 dias	15 a 35 dias
Energia Metabolizável (Kcal/kg)	2898.958	2910.317
Proteína Bruta (%)	20.694	19.395
Cálcio (%)	0.855	0.924
Fósforo Disponível (%)	0.450	0.420
Sódio (%)	0.199	0.260
Aminoácidos Digestíveis (%)		
	1 a 14 dias	15 a 35 dias
Metionina + Cistina	0.750	0.701
Lisina	1.101	1.030
Treonina	0.727	0.681
Triptofano	0.228	0.210

241 ¹Suplemento vitamínico e mineral de crescimento (por Kg do produto): Vit. A – 2.270.000 UI/Kg; Vit. E
 242 – 6.330 UI/Kg; Vit. B1 – 561 mg/Kg; Vit. B2 – 1.490 mg/Kg; Vit. B6 – 858 mg/Kg; Vit. B12 – 3.500
 243 mcg/Kg; Vit. K3 – 450 mg/Kg; Pantotenato Cálcio – 2.976 mg/Kg; Niacina – 8.820 mg/Kg; Ácido Fólico
 244 – 200 mg/Kg; Biotina – 20 mg/Kg; Colina – 86 mg/Kg; Zinco – 19 mg/Kg; Ferro – 14 mg/kg; Manganês
 245 – 20 mg/Kg; Cobre – 3.040 mg/Kg; Iodo – 290 mg/Kg; Cobalto 50 mg/Kg; Selênio – 88 mg/Kg;
 246 Etoxiqum – 25 mg/Kg; B.H.A – 20 mg/Kg; Veiculo Q.S.P – 1.000 mg/Kg.

247

248

249 *Avaliações*

250 Durante o período experimental das matrizes foram avaliados consumo de ração
251 (g), conversão alimentar por massa de ovo (CA/MO), conversão alimentar por dúzia de
252 ovos (CA/DO), número de ovos, taxa de postura (%), peso do ovo (g) e massa de ovo
253 (g) conforme descrito em Bastos et al. [19]. As taxas de eclosão (%), eclosão de ovos
254 férteis (%), e de morte embrionária (%) foram calculadas de acordo com Koppenol et al.
255 [10].

256 O desempenho da progênie foi avaliado nos períodos de 1-14 dias e de 15 a 35
257 dias de idade.

258 Ao final do período de coleta dos ovos das matrizes e do período experimental da
259 progênie, as aves foram abatidas por deslocamento cervical e exsaguinadas.

260 Das matrizes, os óvulos em fase F1 (fase a qual o óvulo está pronto para ser
261 liberado) foram extraídos do ovário para obtenção do peso (g) e contagem destes. O
262 peso relativo do ovário, fígado, coração, intestino e baço foi avaliado como: (peso do
263 órgão/peso da ave) x 100.

264 Das matrizes e da progênie, para a análise de expressão gênica uma amostra do
265 lóbulo esquerdo do tecido hepático foi coletada em RNAlater™ (Life Technologies do
266 Brasil, Brasil) e armazenado a -20°C. Para a obtenção da relação de
267 heterofilos/linfócitos o sangue foi coletado em um tubo a vácuo contendo heparina. Para
268 as análises bioquímicas (capacidade antioxidante total, conteúdo de proteínas
269 carboniladas e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS) o tecido do fígado
270 foi coletado em nitrogênio líquido e armazenado à -80°C.

271

272

273

274 ***Expressão gênica***

275 Para a análise de expressão gênica, amostras de fígado foram armazenadas em
276 RNA Holder® (BioAgency Biotecnologia, Brasil) à -20°C até o momento da extração
277 de RNA.

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

282 Todas as amostras de RNA foram tratadas com DNase I (Invitrogen, Carlsbad,
283 CA, EUA) seguindo as instruções do fabricante, para que fosse eliminada uma possível
284 contaminação com DNA. Para a síntese do DNA complementar (cDNA) foi utilizada o
285 kit GoScript Reverse Transcription System (Promega, Madison, Wi, EUA), utilizando 4
286 µL de RNA tratado com DNase, seguindo as instruções do fabricante.

287 Para as reações de PCR em tempo real, foi utilizado o corante fluorescente SYBR
288 GREEN (SYBR® GREEN PCR Master Mix, Applied Biosystems, EUA). A reação de
289 amplificação continha 5 µL de cDNA diluído a 40 ng, 0,5 µL de cada primer a 10 µM
290 (a concentração final da reação foi de 200 µM), 12,5 µL de SYBR® GREEN PCR
291 Master Mix e 6,5 µL de água, com um volume final de 25 µL. Para medir a eficiência
292 de cada primer, uma série de reações de 25 µl foi realizada semelhante à anterior
293 utilizando 5µL de pool de cDNA a partir de uma diluição em série (80 ng/µL, 40 ng/µL,
294 20 ng/µL e 10 ng/µL). A programação do termociclador para todos os genes foi: 95°C
295 durante 10 minutos, em seguida 40 ciclos de desnaturação e anelamento/extensão a
296 95°C durante 15 segundos e 60°C durante 1 minuto. As curvas de melting foram
297 realizadas para garantir a especificidade das análises.

298 Os primers utilizados nas reações para a amplificação dos genes da glutaciona
 299 peroxidase (*GPx*), glutaciona sintetase (*GSS*), proteína do choque térmico 70 (*HSP70*) e
 300 metionina sulfóxido redutase A (*MSRA*), foram confeccionados com base nas
 301 sequências de genes depositados em www.ncbi.nlm.nih.gov (número de acesso
 302 NM_001163245.1, XM_425692.3, NM_001006685.1, XM_004935891,
 303 respectivamente). O gene da β -actina (número de acesso L08165) foi utilizado como
 304 controle endógeno (Tabela 3). Todas as análises foram realizadas em um volume de 25
 305 μ L e em duplicatas.

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

308

309 Tabela 3. Sequência de primers utilizados na reação de qRT-PCR

Gene	pb ¹	TA (°C) ¹	Orientação	Sequência dos primers (5'-3')
<i>GPx</i> *	140	60	Forward	GGTGCCTCCTTTCCTATGTT
			Reverse	AGTTCAGGTTGGTTCTTCTC
<i>GSS</i>	108	60	Forward	GTGCCAGTTCCAGTTTTCTTATG
			Reverse	TCCCACAGTAAAGCCAAGAG
<i>HSP70</i>	65	60	Forward	ATGAGCACAAGCAGAAAGAG
			Reverse	TCCCTGGTACAGTTTTGTGA
<i>MSRA</i>	76	60	Forward	ATGACCCGACACAAGGAATG
			Reverse	TGGGAAAAGGTGTAGATGGC
β -actina	136	60	Forward	ACCCCAAAGCCAACAGA
			Reverse	CCAGAGTCCATCACAATACC

310 ¹pb, pares de base; TA, temperatura de anelamento.

311 **GPx*, glutaciona peroxidase; *GSS*, glutaciona sintetase; *HSP70*, proteína do choque térmico 70; *MSRA*,
 312 metionina sulfóxido redutase A.

313

314 *Análises bioquímicas*

315 Para a determinação da capacidade antioxidante total (%) 100 mg de tecido
 316 hepático foi adicionado em um tubo de ensaio contendo 1 mL de álcool metílico e
 317 homogeneizado, em seguida as amostras foram centrifugadas a 10.000 *xg* por 10
 318 minutos a 4°C, e o sobrenadante obtido foi transferido para um tubo eppendorf. Em uma

319 microplaca foram adicionados 22,5 μ L do sobrenadante e 277,5 μ L de DPPH (2,2-
320 difenil-1-picrilhidrazilo) em duplicata. A placa foi mantida no escuro por 30 minutos e
321 em seguida foi realizada a leitura da placa em espectrofotômetro (VersaMax™,
322 Molecular Devices) a 515nm.

323 Pra determinar o conteúdo de TBARS 100 mg de tecido hepático foi adicionado
324 em um tubo contendo 1 mL de tampão fosfato, homogeneizado e o homogenato
325 formado foi centrifugado a 10.000 xg por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação 500
326 μ L do sobrenadante foi transferido para um novo tubo contendo 250 μ L de ácido
327 tricloroacético (TCA) 28% diluído em ácido clorídrico (HCL) 0,25N, 250 μ L de ácido
328 tiobarbitúrico (TBA) 1% diluído em ácido acético 1:1 e 125 μ L de butilhidroxitolueno
329 (BHT) diluído em etanol. A solução foi homogeneizada e aquecida a 95°C por 15
330 minutos. Em seguida a solução foi centrifugada a 10.000 xg por 10 minutos a 4°C. Em
331 uma microplaca 300 μ L da solução, em duplicata, foram utilizadas para determinação
332 da concentração de TBARS em espectrofotômetro (VersaMax™, Molecular Devices) a
333 535 nm. Os resultados foram expressos em nmoles/mg de proteína.

334 Para dosagem de proteínas carboniladas foram utilizados 200 mg de tecido
335 hepático em 1 mL de tampão fosfato (50 mM) e EDTA (1 mM) (pH 6,7). A solução foi
336 homogeneizada e centrifugada a 10.000 xg por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante
337 coletado. Para cada amostra dois tubos foram preparados, um tubo para a reação com
338 amostra (A) e o outro para a reação controle (C). Em ambos os tubos foram adicionados
339 500 μ L de TCA 10%, 300 μ L de sobrenadante e 200 μ L de tampão fosfato e EDTA. Os
340 tubos foram homogeneizados brevemente no vortex e então centrifugados a 5.000 xg
341 por 10 minutos a 4°C. No tubo A foi adicionado 500 μ L de DNPH (10 mM) e no tubo C
342 500 μ L de HCL (2,5 N). Os tubos foram mantidos no escuro a temperatura ambiente por
343 30 minutos, a cada 15 minutos as amostras foram homogeneizadas brevemente no vortex.

344 Em ambos os tubos foram adicionados 500 μ L de TCA 10%, homogeneizados e
345 centrifugados a 5.000 xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi centrifugado e em
346 todos os tubos foram adicionados 1 mL de etanol e acetato de etila (1:1), vortex
347 novamente e os tubos foram centrifugados a 5.000 xg por 10 minutos a 4°C. Novamente
348 o sobrenadante foi descartado de ambos os tubos (A e C), adicionado 1 mL etanol e
349 acetato de etila (1:1), homogeneizado e centrifugado a 5.000 xg por 10 minutos a 4°C. O
350 sobrenadante foi descartado de ambos os tubos, nos tubos A e C foi adicionado 1 mL de
351 SDS (6%), homogeneizados no vortex e centrifugados a 10.000 xg por 110 minutos a
352 4°C. Para a leitura em espectrofotômetro (VersaMax™, Molecular Devices) a 370 nm
353 foi utilizado 200 μ L do sobrenadante, em duplicata.

354 O conteúdo de proteína de cada amostra foi obtido pelo método descrito por
355 Bradford [20].

356

357 ***Relação heterofilos/linfócitos***

358 Para determinar a relação entre heterofilos e linfócitos um esfregaço hematológico
359 foi confeccionado. Uma amostra de 10 μ l sangue foi depositada em uma lâmina
360 microscópica e com outra lâmina (distensora) fez-se um leve movimento para trás, até
361 que a gota de sangue se espalhasse até as bordas, e então esta foi distendida a sua
362 extremidade. As lâminas foram secas ao ar e então coradas seguindo as recomendações
363 descritas no kit de coloração (Instant Prov, Coloração Hematológica, Newprov). Em um
364 microscópio eletrônico, 100 células (heterófilos e linfócitos) foram contadas para
365 calcular a relação entre essas duas células.

366

367 ***Análise estatística***

368 O método $2^{-\Delta\Delta CT}$ foi utilizado para as análises de quantificação relativa. Para todos
369 os dados, o efeito de dieta das matrizes foi avaliado através da ANOVA. Para avaliar

370 como o efeito do ambiente materno influencia nas respostas da progênie ao ambiente a
371 qual são submetidos, o efeito de ambiente da progênie foi avaliado dentro das dietas das
372 matrizes. Para avaliar a possível herança genética herdada a partir de mecanismos
373 epigenéticos, o efeito do ambiente materno foi avaliado dentro do ambiente da progênie
374 (JMP software, SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA). Peso ao nascimento não foi incluído no
375 modelo, já que essa correção poderia mascarar os efeitos causados pela dieta das
376 matrizes sobre o desenvolvimento dos pintainhos antes da eclosão [13]. Todos os
377 resultados são apresentados como médias e erro padrão agrupado. A correlação de
378 Pearson foi utilizada para avaliar a relação entre a expressão gênica observada nas
379 matrizes e em sua progênie, e para avaliar a associação entre os genes avaliados.

380

381 **RESULTADOS**

382 *Efeito da dieta sobre o desempenho das matrizes*

383 Matrizes que receberam dietas Met1 e Met2 apresentaram maior número de ovos
384 e maior taxa de postura que matrizes recebendo dieta SM. Foi observado maior taxa de
385 postura, maior peso do ovo, maior massa de ovo, e melhor conversão alimentar por
386 massa de ovos ($P < 0.05$). O efeito da suplementação de metionina também foi observado
387 sobre as características de fertilidade e qualidade do pintainho; matrizes alimentadas
388 com dietas Met1 e Met2 apresentaram maior taxa de eclosão, maior taxa de eclosão de
389 ovos férteis e houve maior peso ao nascimento da progênie. Não foi observada
390 diferença entre os níveis de suplementação de metionina nas dietas Met1 e Met2
391 (Tabela 4).

392

393

394

395 Tabela 4. Características de desempenho de matrizes de codornas japonesas em fase de
396 reprodução

Características	Dieta			EP	P valor
	SM [†]	Met1	Met2		
PI, g*	164,17	158,33	162,50	6,27	0,7977
PF, g	173,33	167,50	172,50	5,17	0,6956
CR, g	850,83	794,00	822,33	102,21	0,9260
CMO, g/g	3,73 ^a	2,48 ^b	2,87 ^{ab}	0,31	0,0316
CDZ, kg/dúzia	2,94	2,24	2,67	0,25	0,1744
NO, n	24,83 ^b	29,00 ^a	28,83 ^a	1,22	0,0497
TXP, %	82,77 ^b	96,66 ^a	96,11 ^a	4,09	0,0497
PO, g	9,43 ^b	10,99 ^a	11,12 ^a	0,25	0,0003
MO, g	234,43 ^b	302,30 ^a	320,87 ^a	20,28	0,0213
TXE, %	50,93 ^b	72,92 ^a	77,78 ^a	6,79	0,0308
TEOF, %	54,93 ^b	79,30 ^a	77,78 ^a	6,47	0,0305
PN, g	6,51 ^b	8,09 ^a	8,15 ^a	0,20	<,0001

397 *PI, peso inicial (g); PF, peso final (g); CR, consumo de ração (g); CMO, conversão alimentar por massa
398 de ovo (g/g); CDZ, conversão alimentar por dúzia de ovo (g/dúzia); NO, número de ovos (n); TXP, taxa
399 de postura (%); PO, peso do ovo (g); MO, massa de ovo (g); TXE, taxa de eclosão (%); TEOF, taxa de
400 eclosão por ovos férteis (%); PN, peso ao nascimento da progênie (g).[†] SM, dieta sem suplementação de
401 metionina; Met1, dieta com suplementação do nível recomendado de metionina; Met2, dieta com
402 suplementação de metionina a cima do nível de recomendado excesso de metionina. Os resultados são
403 apresentados como médias e seus erros padrão (EP).^{a,b} Médias em uma mesma linha com diferentes letras
404 sobrescritas são significativamente diferentes pelo Teste de Tukey (P<0,05).
405

406 Não foi observado efeito da dieta sobre o número de folículos F1, mas houve
407 efeito da suplementação de metionina sobre o peso dos folículos (P=0,0475): maior
408 peso foi observado em matrizes alimentadas com dieta Met 1 (1,28 g) não diferindo
409 daquelas alimentadas com dieta Met2. Não houve efeito da suplementação de metionina
410 sobre o peso relativo do ovário, fígado, intestino, coração e baço (Tabela 5). Também
411 não foi observado efeito de dieta sobre a relação heterófilo/linfócito das matrizes.

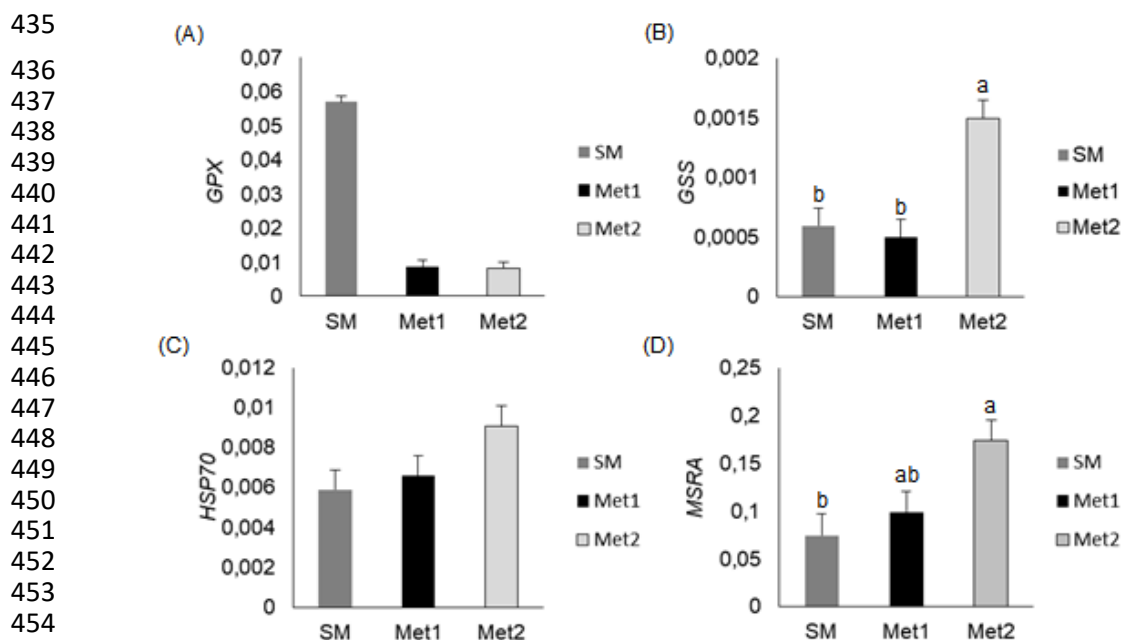
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423

424 Tabela 5. Número de folículos e peso relativo de órgãos de matrizes de codornas
 425 japonesas em fase de reprodução

	Dieta				P valor
	SM [†]	Met1	Met2	EP	
NF1, n*	4,33	4,50	4,83	0,20	0,2363
PF1, g	1,04 ^b	1,28 ^a	1,12 ^{ab}	0,06	0,0475
Ovário, %	3,26	4,02	3,76	0,22	0,0702
Fígado, %	2,88	2,64	2,73	0,18	0,6427
Intestino, %	5,19	4,64	4,42	0,30	0,2034
Coração, %	0,82	0,93	0,94	0,06	0,5984
Baço, %	0,04	0,04	0,04	0,01	0,7485

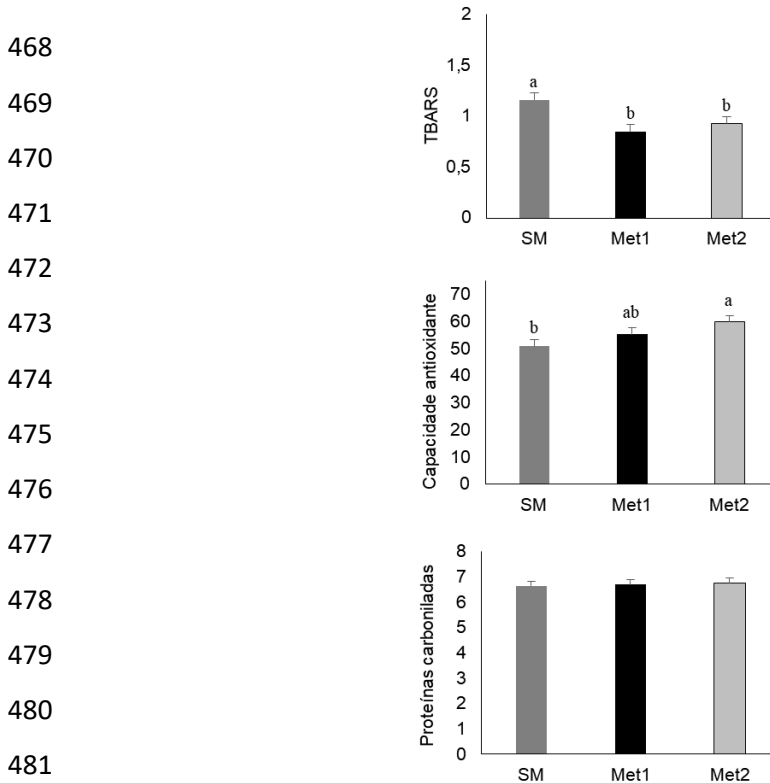
426 *NF1, número de folículos prontos (n); PF1, peso dos folículos prontos (g).[†]SM, dieta sem suplementação
 427 de metionina; Met1, dieta com suplementação do nível recomendado de metionina; Met2, dieta com
 428 suplementação de metionina a cima do nível de recomendado excesso de metionina. Os resultados são
 429 apresentados como médias e seus erros padrão (EP).^{a,b}Médias em uma mesma linha com diferentes letras
 430 sobrescritas são significativamente diferentes pelo Teste de Tukey (P<0,05).
 431

432 Efeito significativo de dieta também foi observado sobre a expressão dos genes
 433 *GSS* e *MSRA*; matrizes que receberam dieta Met2 obtiveram a maior expressão desses
 434 genes (Figura 2).



457 Figura 2. Efeito da dieta sobre a expressão de mRNA glutationa peroxidase (*GPx*) (A); glutationa
 458 sintetase (*GSS*) (B), proteína do choque térmico 70 (*HSP70*) (C) e metionina sulfóxido redutase A
 459 (*MSRA*) (D) no fígado de matrizes de codornas japonesas. SM, dieta sem suplementação de metionina;
 460 Met1, dieta com suplementação do nível recomendado de metionina; Met2, dieta com suplementação de
 461 metionina a cima do nível de recomendado. Os resultados são apresentados como médias e erros padrão
 462 (EP) representados pela barra vertical. ^{a,b} Diferentes letras sobrescritas representam diferenças
 463 significativas pelo Teste de Tukey (P<0,05). Os resultados são expressos como unidade arbitrária (UA).
 464

465 Matrizes alimentadas com dietas recebendo suplementação de metionina também
466 apresentaram maior capacidade antioxidante e menor conteúdo de TBARS que matrizes
467 recebendo dieta SM ($P < 0,05$) (Figura 3).



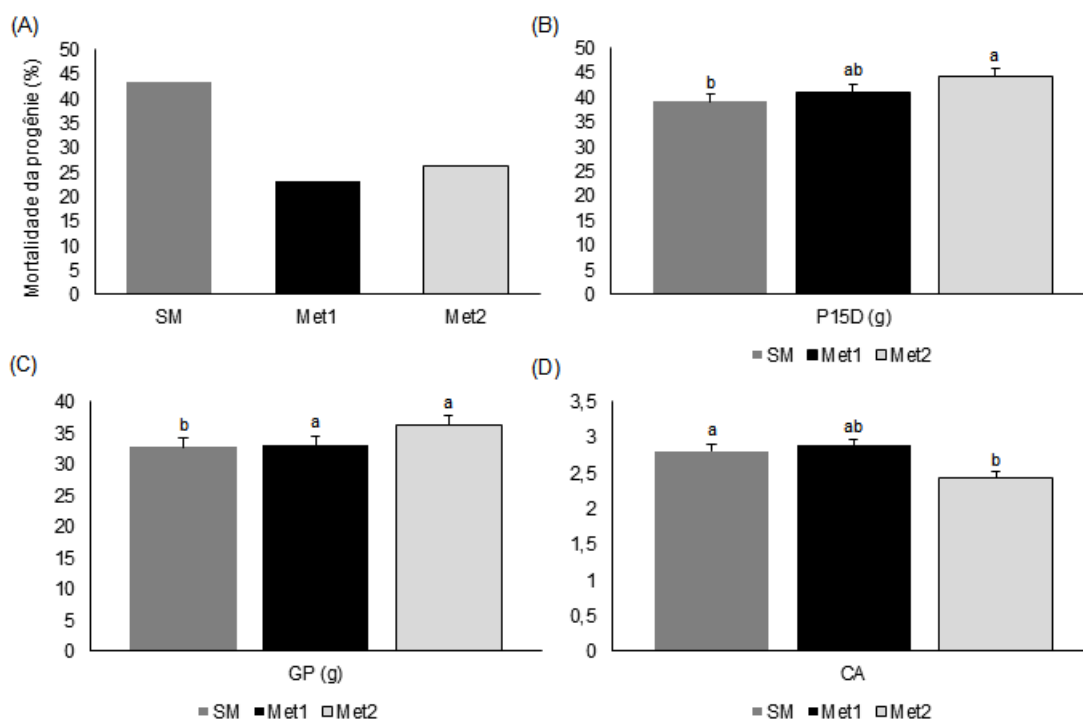
482 Figura 3. Efeito da dieta sobre o conteúdo de TBARS (nmol/mg de proteína) (A); capacidade antioxidante
483 (%) (B) e proteínas carboniladas (nmol de grupos carbonils/mg de proteína) (C) no fígado de matrizes de
484 codornas japonesas. SM, dieta sem suplementação de metionina; Met1, dieta com suplementação do nível
485 recomendado de metionina; Met2, dieta com suplementação de metionina acima do nível de
486 recomendado. Os resultados são apresentados como médias e erros padrão (EP) representados pela barra
487 vertical. ^{a,b} Diferentes letras sobrescritas representam diferenças significativas pelo Teste de Tukey
488 ($P < 0,05$).

491 *Efeito do ambiente materno sobre o desenvolvimento da progênie*

492 O efeito do ambiente materno foi avaliado sobre o desempenho da progênie em
493 dois períodos: na fase inicial (1-15 dias) e fase de crescimento (15-35 dias de idade). No
494 primeiro período de avaliação observamos menor taxa de mortalidade para a progênie
495 de matrizes alimentadas com dietas Met1 (23,33%) e Met2 (26,19%) (Figura 4). A
496 progênie de matrizes alimentadas com dieta Met2 apresentou maior peso aos 15 dias,

497 maior ganho de peso e melhor conversão alimentar que as progênes de matrizes
498 alimentados com dieta SM (Figura 4).

499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523



524 Figura 4. Efeito da dieta materna sobre a taxa de mortalidade (A) e desempenho da progênie na fase
525 inicial (1-15 dias de idade) (B; C; D). P15D, peso da progênie aos 15 dias de idade; GP, ganho de peso;
526 CA, conversão alimentar. SM, dieta sem suplementação de metionina; Met1, dieta com suplementação do
527 nível recomendado de metionina; Met2, dieta com suplementação de metionina a cima do nível de
528 recomendado. Os resultados são apresentados como médias e erros padrão (EP) representados pela barra
529 vertical. ^{a,b}Médias seguidas de diferentes letras representam diferenças significativas pelo Teste de Tukey
530 (P<0,05).

532 Aos 15 dias de idade, a progênie de cada matriz foi dividida em duas temperaturas
533 ambientais (conforto e estresse) e o efeito do ambiente materno foi avaliado dentro de
534 cada grupo experimental (Figura 5). Não foi observado efeito da dieta da matriz sobre o
535 desempenho da progênie criada em conforto térmico. Com relação à progênie criada em
536 condição de estresse térmico, observamos que as progênes de aves alimentadas com
537 dietas Met1 e Met2 apresentaram maior peso aos 35 dias e maior ganho de peso que as
538 progênes de matrizes alimentadas com dietas SM. Não foi observado efeito da dieta
539 materna sobre o consumo de ração e conversão alimentar das progênes.

540

541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584

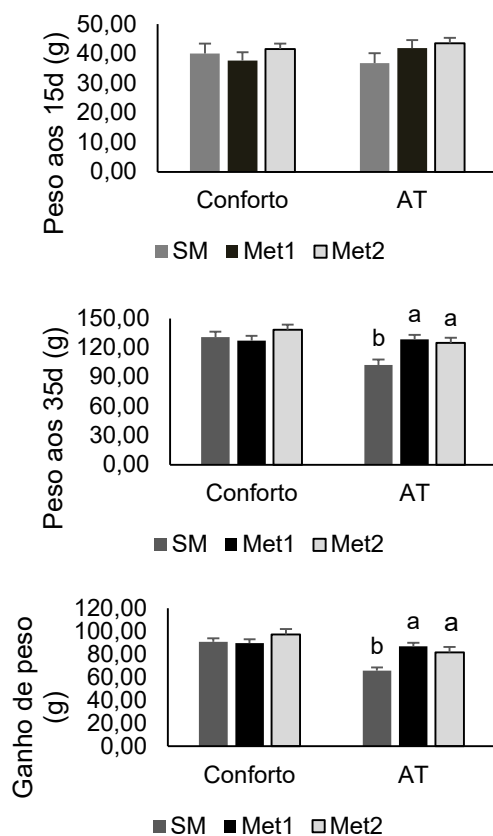


Figura 5. Efeito da dieta materna sobre o desempenho da progênie entre 15-35 dias de idade. AT, alta temperatura; SM, dieta sem suplementação de metionina; Met1, dieta com suplementação do nível recomendado de metionina; Met2, dieta com suplementação de metionina a cima do nível recomendado. Os resultados são apresentados como médias e erros padrão (EP) representados pela barra vertical. ^{a,b}As comparações são feitas dentro de ambiente da progênie e médias seguidas de diferentes letras representam diferenças significativas pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$).

Quando avaliado o efeito da dieta materna sobre a expressão gênica da progênie observamos que para a progênie criada em condição de conforto, a maior expressão de *HSP70* foi observada para os filhos das matrizes alimentadas com dieta Met1. Já para a progênie criada em AT, filhos de matrizes alimentadas com dieta SM apresentaram menor expressão de *GSS*, *HSP70* e *MSRA* ($P < 0,05$) (Figura 6).

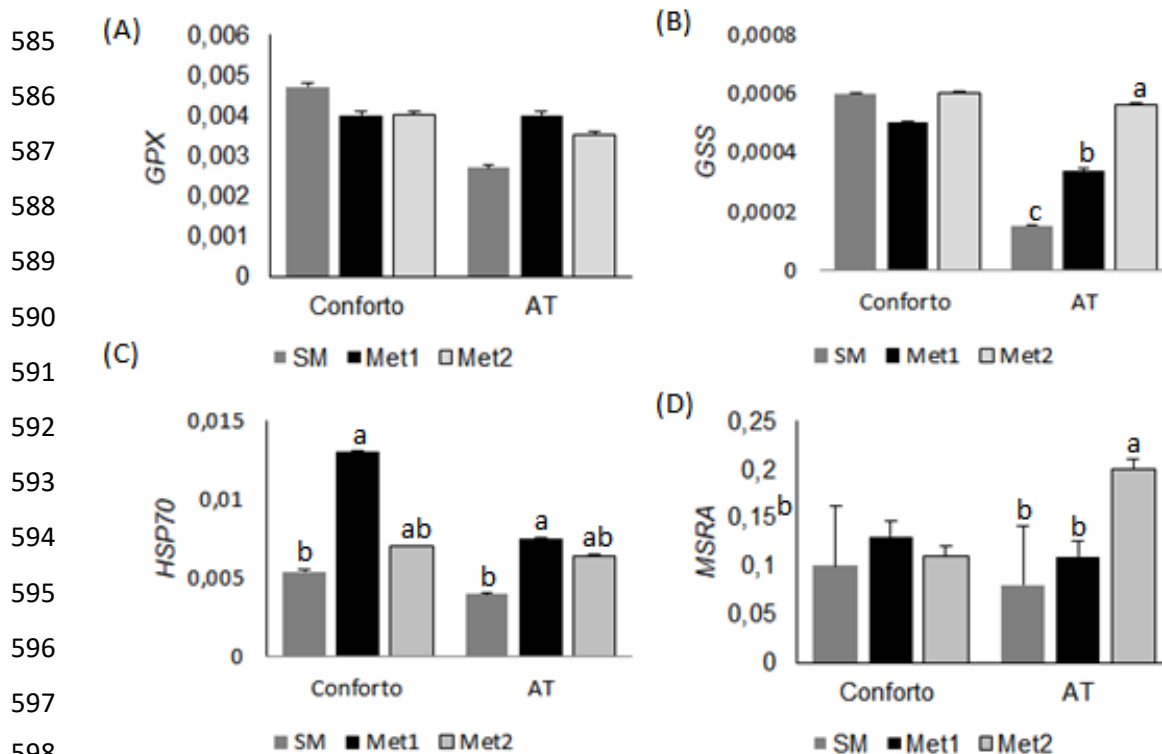


Figura 6. Efeito da dieta materna sobre a expressão de glutatona peroxidase (*GPx*) (A) glutatona sintetase (*GSS*) (B), proteína do choque térmico 70 (*HSP70*) (C) e metionina sulfóxido redutase A (*MSRA*) (D) da progênie aos 35 dias de idade. SM, dieta sem suplementação de metionina; Met1, dieta com suplementação do nível recomendado de metionina; Met2, dieta com suplementação de metionina a cima do nível de recomendado; AT, alta temperatura. Os resultados são apresentados como médias e erros padrão (EP) representados pela barra vertical. ^{a,b}As comparações são feitas dentro de ambiente da progênie e médias seguidas de diferentes letras representam diferenças significativas pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$). Os resultados são expressos como unidade arbitrária (UA).

A herança genética pode ser observada através da correlação entre o resultado de expressão gênica da matriz e de sua progênie, já que alta correlação positiva foi observada para expressão dos genes *GPx* e *MSRA* em mães e filhos ($P < 0,05$). Avaliando os resultados da progênie, também foi observado correlação positiva ($P < 0,05$) entre a expressão dos genes *GPx*, *GSS*, *HSP70* e *MSRA*. Estes resultados sugerem a atuação conjunta desses genes na resposta da progênie ao ambiente. Além da correlação positiva na progênie também podemos observar correlação positiva entre a expressão gênica da *HSP70* na matriz e *GPx* na progênie (0.45; $P = 0.0244$), entre *GSS* na matriz e *MSRA* na progênie (0.46; $P = 0.0218$) e entre *HSP70* na matriz e *MSRA* na progênie (0.51; $P = 0.0108$) (Tabela 6).

619 Tabela 6. Coeficientes de correlação de Pearson entre a expressão de *GPx*, *GSS*, *HSP70*
 620 e *MSRA* de matrizes e sua progênie

	Correlação de Pearson							
	<i>GPx</i> _(M) ¹	<i>GPx</i> _(P)	<i>GSS</i> _(M)	<i>GSS</i> _(P)	<i>HSP70</i> _(M)	<i>HSP70</i> _(P)	<i>MSRA</i> _(M)	<i>MSRA</i> _(P)
<i>GPx</i> _(M)	1	0.50*	0.29	0.20	0.58*	-0.08	0.65*	0.32
<i>GPx</i> _(P)		1	0.07	0.51*	0.45*	0.46*	0.30	0.42*
<i>GSS</i> _(M)			1	0.33	0.61*	-0.20	0.78*	0.46*
<i>GSS</i> _(P)				1	0.25	0.38	0.34	0.52*
<i>HSP70</i> _(M)					1	0.002	0.80*	0.51*
<i>HSP70</i> _(P)						1	-0.05	0.34
<i>MSRA</i> _(M)							1	0.48*
<i>MSRA</i> _(P)								1

621 ¹*GPx*_(M), glutathiona peroxidase na matriz; *GPx*_(P), glutathiona peroxidase na progênie; *GSS*_(M), glutathiona
 622 sintetase na matriz; *GSS*_(P), glutathiona sintetase na progênie; *HSP70*_(M), proteína do choque térmico 70 na
 623 matriz; *HSP70*_(P), proteína do choque térmico 70 na progênie; *MSRA*_(M), metionina sulfóxido redutase A
 624 na matriz, *MSRA*_(P), metionina sulfóxido redutase A na progênie. *Os asteriscos mostram correlação
 625 significativa (P<0,05).
 626

627 Com relação aos parâmetros oxidativos e de indicação de estresse, avaliando o
 628 efeito da dieta materna para a progênie criada em estresse térmico, observamos que os
 629 filhos de matrizes alimentadas com dieta Met2 apresentaram a maior capacidade
 630 antioxidante total (Figura 7), e filhos de matrizes alimentadas com dieta Met1
 631 apresentaram a menor relação H/L (Figura 7). Para a progênie criada em condição de
 632 conforto, a maior capacidade antioxidante foi observada em aves filhas de matrizes
 633 recebendo dieta Met1, e o menor conteúdo de proteínas carboniladas, observado em
 634 aves filhas de matrizes alimentadas com dieta Met2. Codornas filhas de matrizes
 635 alimentadas com dietas Met1 e Met2 também tiveram menor relação H/L que aves
 636 filhas de matrizes recebendo dieta SM na condição de conforto térmico.

637
 638
 639
 640
 641
 642
 643
 644
 645
 646
 647
 648
 649
 650
 651
 652
 653
 654
 655

656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691

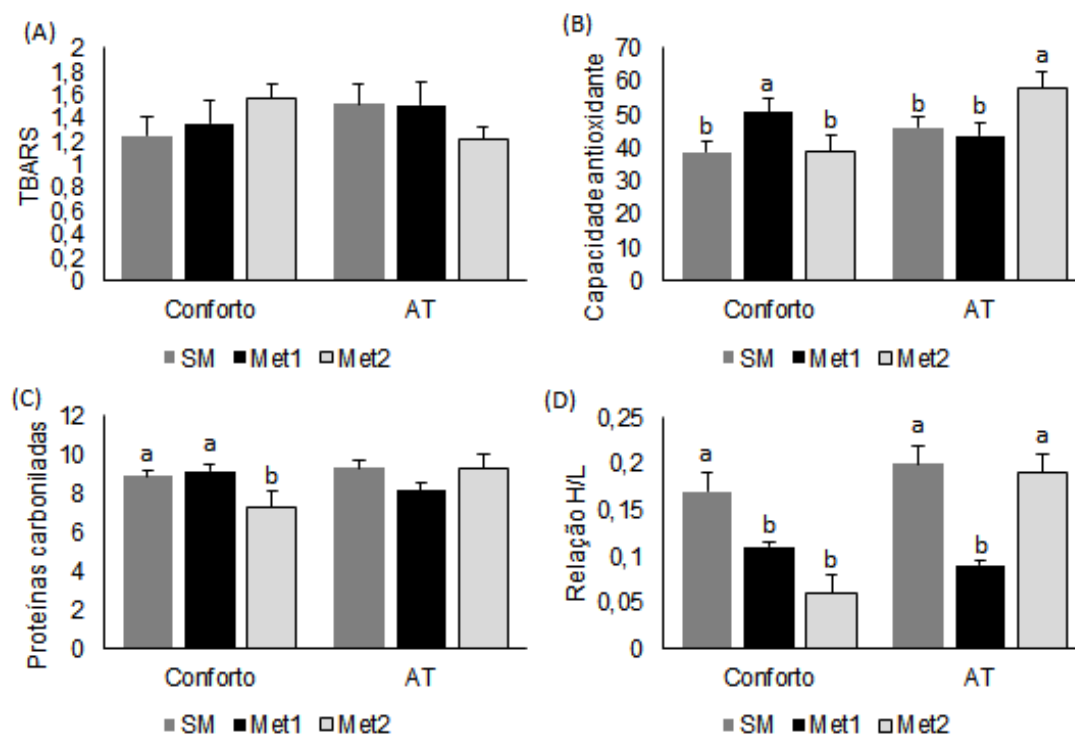


Figura 7. Efeito da dieta materna sobre o conteúdo de TBARS (nmol/mg de proteína) (A); capacidade antioxidante (%) (B), proteínas carboniladas (nmol de grupos carbonils/mg de proteína) (C) e relação heterófilos:linfócitos (H/L) (D) da progênie aos 35 dias de idade. SM, dieta sem suplementação de metionina; Met1, dieta com suplementação do nível recomendado de metionina; Met2, dieta com suplementação de metionina a cima do nível de recomendado; AT, alta temperatura. Os resultados são apresentados como médias e erros padrão (EP) representados pela barra vertical. ^{a,b} As comparações são feitas dentro de ambiente da progênie e médias seguidas de diferentes letras representam diferenças significativas pelo Teste de Tukey (P<0,05).

Efeito da temperatura ambiental no desempenho da progênie

692 Para avaliar como a progênie responderia ao seu próprio ambiente devido ao
693 ambiente materno, o efeito da temperatura ambiental foi avaliado dentro da dieta da
694 matriz (Tabela 7). Para as progênies de matrizes alimentadas com dieta SM,
695 observamos que aves criadas em condição de estresse apresentaram menor peso aos 35
696 dias de idade e menor ganho de peso que aves criadas em conforto. Não houve efeito de
697 ambiente para as progênies de matrizes alimentadas com dieta Met1 sobre nenhuma
698 característica de desempenho. Entretanto, para as progênies de matrizes alimentados
699 com dieta Met2, observamos que aves criadas em condição de conforto apresentaram
700 maior ganho de peso que aves criadas em condição de estresse (97,18 g vs 81,5 g).

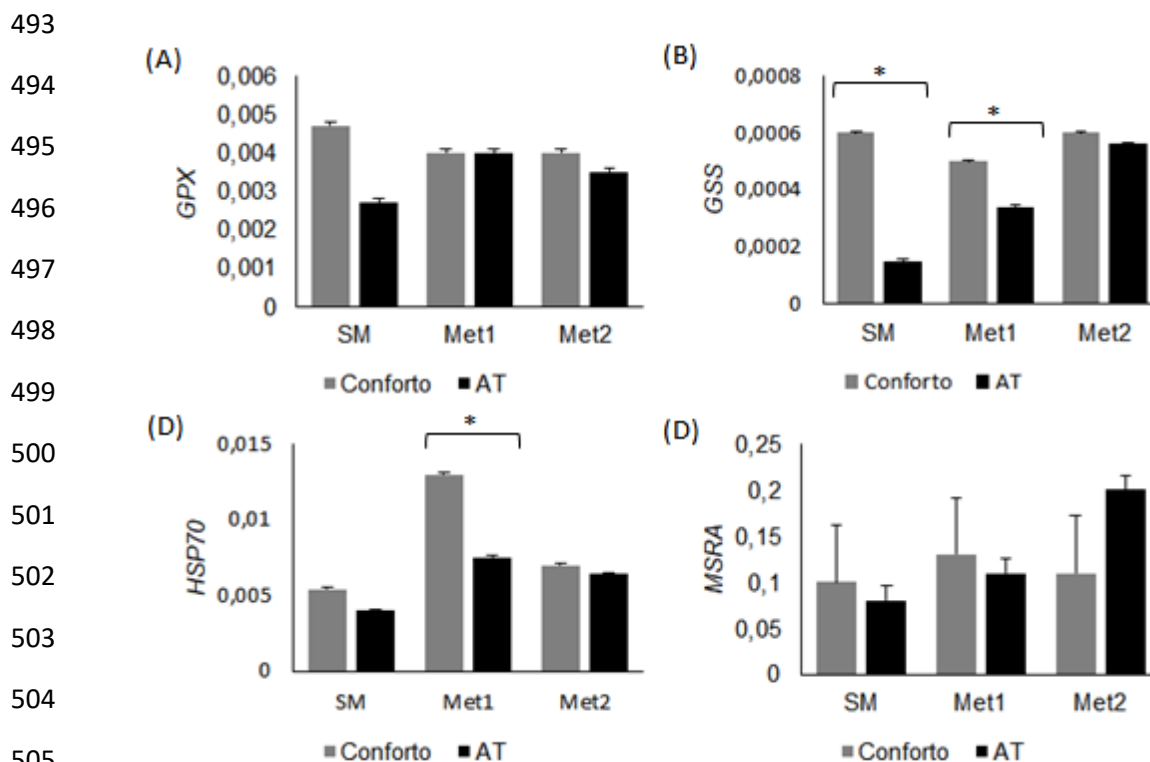
482 Tabela 7. Efeito da temperatura ambiental sobre o desempenho da progênie na fase de crescimento

	SM [†]				Met1				Met2			
	Conforto	AT [‡]	EP	P valor	Conforto	AT	EP	P valor	Conforto	AT	EP	P valor
P15, g ¹	40.00	36.75	3.40	0.5546	37.62	41.82	2.77	0.2967	41.54	43.43	1.83	0.4515
P35, g	130.80*	102.43	5.54	0.0113	127.38	128.63	4.67	0.8526	138.33	124.97	5.33	0.0657
GP, g	90.80*	65.68	2.95	0.0008	89.75	86.75	3.27	0.5266	97.18*	81.54	4.65	0.0193
CR, g	509.10	424.51	46.81	0.2513	386.00	381.71	45.65	0.9479	483.21	430.09	54.13	0.4702
CA g/g	5.70	6.48	0.63	0.4355	4.37	4.43	0.55	0.9398	4.98	5.38	0.65	0.6501

483 ¹P15, peso da progênie aos 15 dias de idade (g); P35, peso da progênie aos 35 dias de idade (g); GP, ganho de peso (g); CR, consumo de ração (g); CA, conversão alimentar; [†]
484 SM, dieta sem suplementação de metionina; Met1, dieta com suplementação do nível recomendado de metionina; Met2, dieta com suplementação de metionina a cima do
485 nível de recomendado; AT, alta temperatura. Os resultados são apresentados como médias e seus erros padrão (EP). *As comparações são feitas dentro de cada dieta e os
486 asteriscos mostram as diferenças significativas pelo test de F (P<0,05).

487

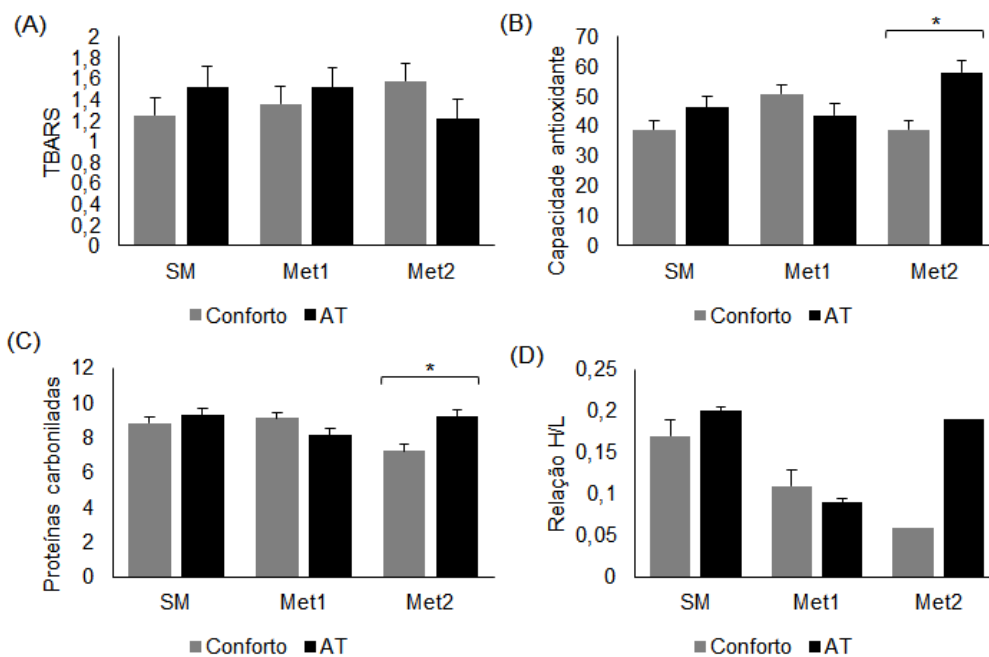
488 Com relação aos resultados relacionados à capacidade antioxidante, a progênie de
 489 matrizes alimentadas com dieta SM apresentou maior expressão de *GSS* quando criada
 490 em condição de estresse do que quando criada em conforto térmico. O padrão inverso
 491 foi observado para a progênie de matrizes alimentadas com dieta Met1: maior expressão
 492 de *GSS* foi observada em aves criadas em conforto térmico (Figura 8).



507 Figura 8. Efeito da temperatura ambiental sobre a expressão de mRNA glutationa peroxidase (*GPx*) (A)
 508 glutationa sintetase (*GSS*) (B), proteína do choque térmico (*HSP70*) (C) e metionina sulfóxido redutase
 509 (*MSRA*) (D) no fígado da progênie aos 35 dias de idade. SM, dieta sem suplementação de metionina;
 510 Met1, dieta com suplementação do nível recomendado de metionina; Met2, dieta com suplementação
 511 de metionina a cima do nível de recomendado; AT, alta temperatura. * *As comparações são feitas dentro de
 512 cada dieta e os asteriscos mostram as diferenças significativas pelo test de F ($P < 0,05$). Os resultados são
 513 expressos como unidade arbitrária (UA).

515 A progênie de matrizes alimentadas com dieta Met2 criadas em estresse térmico
 516 apresentaram maior capacidade antioxidante total e maior conteúdo de proteínas
 517 carboniladas que aves em condição de conforto (Figura 9). Cabe ressaltar que o efeito
 518 de ambiente observado sobre o ganho de peso e o conteúdo de proteínas carboniladas
 519 em aves filhas de matrizes alimentadas com dieta Met2 é provavelmente devido ao
 520 resultado positivo observado para as aves criadas em condição de conforto que se
 521 diferencia dos demais devido ao efeito benéfico da dieta materna.

522
 523
 524
 525
 526
 527
 528
 529
 530
 531
 532
 533



534 Figura 9. Efeito da temperatura ambiental sobre o conteúdo de TBARS (nmol/mg de proteína) (A);
 535 capacidade antioxidante (%) (B) e proteínas carboniladas (nmol de grupos carbonils/mg de proteína) (C)
 536 no fígado da progênie aos 35 dias de idade. SM, dieta sem suplementação de metionina; Met1, dieta com
 537 suplementação do nível recomendado de metionina; Met2, dieta com suplementação de metionina a cima
 538 do nível de recomendado; AT, alta temperatura. *As comparações são feitas dentro de cada dieta e os
 539 asteriscos mostram as diferenças significativas pelo test de F ($P < 0,05$).

540 **DISCUSSÃO**

541 Em nosso trabalho observamos que matrizes alimentadas com suplementação de
542 metionina na dieta apresentaram melhor desempenho durante a fase de postura.
543 Resultados semelhantes mostram que a suplementação de metionina resulta em maior
544 taxa de postura [7], maior peso do ovo, maior eficiência na conversão dos nutrientes da
545 dieta em produção de ovos, bem como maior qualidade do ovo produzido [21]. Esses
546 resultados podem ser devidos a maior eficiência proteica e energética [22] e a maior
547 capacidade de absorção [9] observada em aves alimentadas com suplementação de
548 metionina. Estes efeitos benéficos também podem estar relacionados a ação do eixo
549 somatotrópico, já que a suplementação de metionina é conhecida por estimular a
550 deposição de proteína através da ação do hormônio do crescimento (GH) e do Fator de
551 crescimento semelhante a insulina I (IGF-I) [8], o que poderia potencializar a produção
552 de ovos. A ação dos hormônios do eixo somatotrópico tem sido apontada no
553 desenvolvimento do sistema reprodutivo na fase que antecede a postura [23] e no
554 desempenho e qualidade dos ovos, mais tarde durante a fase de postura [24]. Entre
555 outras funções desempenhadas no ovário, o GH promove a maturação dos oócitos e o
556 crescimento e maturação dos folículos pré-antrais [25], e os IGFs atuam na produção e
557 regulação de hormônios esteroides, proliferação e diferenciação celular, inibição da
558 apoptose, seleção de folículos e prevenção da atresia folicular, além de potencializar os
559 efeitos do LH e FSH sobre a secreção de progesterona [26].

560 Além de promover melhor desempenho, a suplementação de metionina na dieta
561 também conferiu maior capacidade antioxidante e menor conteúdo de TBARS no fígado
562 das matrizes. Esses resultados podem ser devidos a maior expressão de *GSS* e *MSRA*
563 também observados em matrizes alimentadas com suplementação de metionina na dieta,
564 já que nosso grupo de pesquisa vem mostrando que a suplementação de metionina pode

565 aumentar a capacidade antioxidante através da ação do sistema da glutathione [27] e
566 através da ação direta da metionina como antioxidante através do ciclo da tioredoxina e
567 da ação da MSRA [28]. Ruan et al. [29] mostraram que a suplementação de metionina
568 aumentou os níveis de GSH, da atividade da enzima glutathione peroxidase e da
569 capacidade antioxidante total no fígado das matrizes, e ainda, que a suplementação de
570 metionina na dieta materna promoveu o aumento da capacidade antioxidante total e a
571 redução dos níveis de MDA no cérebro da progênie após a eclosão.

572 Em nosso trabalho, avaliando o efeito da dieta materna sobre o desenvolvimento
573 da progênie, observamos que a suplementação de metionina aumentou a taxa de
574 eclosão, a taxa de eclosão de ovos férteis, e o peso ao nascimento do pintainho. Já que a
575 metionina disponibilizada na dieta materna pode ser transferida para os ovos férteis
576 [30], podemos sugerir que com a suplementação na dieta das matrizes, maior quantidade
577 de metionina pode ter sido direcionada para o ovo o que pode ter contribuído para maior
578 capacidade antioxidante e maior secreção dos hormônios relacionados ao crescimento
579 proporcionando assim, a produção de pintainhos mais pesados e de melhor qualidade.
580 Podemos observar também que o efeito positivo da suplementação de metionina na
581 dieta materna se estendeu sobre o desempenho da progênie em toda fase inicial de
582 criação uma vez que aves filhas de matrizes alimentadas com dieta Met2 apresentaram
583 maior peso aos 15 dias de idade, maior ganho de peso e melhor conversão alimentar que
584 aves filhas de matrizes alimentadas com dieta deficiente em metionina. A
585 suplementação de metionina também teve impacto positivo sobre outra característica
586 importante, reduzindo a taxa de mortalidade na fase inicial de criação. O
587 desenvolvimento do embrião e a qualidade do pintinho dependem dos nutrientes
588 depositados no ovo pela matriz [31]. Esse efeito materno pode ter caráter genético [32]
589 ou ambiental, já que a nutrição materna é fator determinante na saúde e

590 desenvolvimento da progênie [33]. Nesse sentido, a suplementação de antioxidantes na
591 dieta da matriz potencializa a atividade dos sistemas antioxidantes no embrião (através
592 de ações enzimáticas e não enzimáticas), reduzindo a susceptibilidade dos tecidos ao
593 ROS produzido durante essa fase de intenso metabolismo e conferindo maior
594 viabilidade durante os primeiros dias de vida [34].

595 Apesar do documentado efeito da dieta materna sobre o desempenho da progênie
596 na fase que segue a eclosão, estudos que avaliam a interação entre as experiências
597 vividas pelo embrião com as respostas observadas futuramente quando as aves são
598 expostas ao seu próprio ambiente na fase de crescimento ainda são raros. Para ampliar o
599 conhecimento disponível sobre o assunto, em nosso trabalho o efeito do ambiente
600 materno foi avaliado sobre as respostas da progênie quando criadas em diferentes
601 temperaturas na fase de crescimento. Nós observamos que quando a progênie foi criada
602 em condição de estresse térmico, aves filhas de matrizes que receberam suplementação
603 de metionina na dieta apresentaram melhor desempenho (Met1 e Met2, Figura 3), maior
604 capacidade antioxidante (Met2) e menor relação H/L (Met1) (Figura 4). Esses
605 resultados benéficos podem ser devidos a maior expressão de *GSS* (Met2), *MSRA*
606 (Met2) e *HSP70* (Met1) também observada nessas aves (Figura 6). O que indica que a
607 suplementação de metionina na dieta da matriz foi capaz de garantir a ativação de
608 diferentes rotas metabólicas em sua progênie para aliviar os efeitos negativos do
609 estresse. A metionina é capaz de atuar reduzindo o estresse oxidativo através da
610 expressão de metionina sulfóxido e da participação na síntese da glutathiona [35], e
611 através da indução da expressão de *HSP70* em aves submetidas ao estresse térmico [36].
612 Cabe ressaltar que em nosso trabalho, correlação positiva foi observada entre a
613 expressão dos genes *GPx*, *GSS*, *HSP70* e *MSRA*, sugerindo a ação conjunta desses
614 genes.

615 Quando comparamos o desempenho da progênie dentro da dieta da mãe (Tabela
616 5), observamos que codornas filhas de matrizes alimentadas com dieta SM apresentaram
617 menor ganho de peso quando criadas em estresse térmico. Esse comportamento também
618 foi observado para codornas filhas de matrizes alimentadas com dieta Met2, entretanto,
619 cabe ressaltar que esse resultado é devido ao efeito positivo da dieta da mãe sobre o
620 desempenho da progênie criada em conforto que conferiu o maior ganho de peso
621 observado (97.18 g). Em se tratando das progênies de matrizes alimentadas com dieta
622 SM, a diferença observada no ganho de peso entre codornas criadas em diferentes
623 ambientes deve-se ao efeito negativo da deficiência de metionina na dieta materna sobre
624 o desempenho da sua progênie quando criada em condição adversa, resultando no
625 menor ganho de peso observado (65.68 g). Esses resultados nos mostram que eventos
626 que ocorrem durante a fase de desenvolvimento do embrião atuam produzindo
627 diferenças fenotípicas entre indivíduos nas fases subsequentes. De fato, de acordo com
628 Dixon et al. [16] as experiências vivenciadas nas fases iniciais de desenvolvimento são
629 importantes formadoras do fenótipo da progênie e podem determinar quão bem os
630 diferentes indivíduos irão responder ao ambiente pós natal. Dessa maneira, alterações
631 epigenéticas que atuam nessa fase tem se tornado o foco de pesquisas recentes [37].
632 Exposição a qualquer fator ambiental, como por exemplo, exposição aos efeitos
633 causados pela dieta materna, pode produzir marcas epigenéticas durante o
634 desenvolvimento, e então alterar as respostas da progênie ao seu próprio ambiente [36].
635 Em nosso estudo, essa ideia é corroborada através da correlação positiva entre a
636 expressão gênica observada na matriz e em sua progênie, já que a suplementação de
637 metionina na dieta das matrizes garantiu maior expressão de genes relacionados à
638 capacidade antioxidante na matriz, e também em sua progênie quando submetida ao
639 estresse térmico na fase de crescimento.

640 De maneira geral, nossos resultados demonstram que a suplementação de
641 metionina na dieta da matriz contribui para o desenvolvimento e desempenho da
642 progênie na fase inicial; e ainda, que sob condições de estresse térmico durante a fase de
643 crescimento, progênies de matrizes alimentadas com dietas suplementadas com
644 metionina respondem melhor ao ambiente do que progênie de matrizes alimentadas com
645 dieta sem suplementação de metionina.

646

647 **AGRADECIMENTOS**

648 Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico
649 e Tecnológico – CNPq (PROC.407669/2016-7), Brasil. Este estudo foi financiado em
650 parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil
651 (CAPES) - Código Financeiro 001. Este estudo foi em parte financiado pelo PROMOB
652 - Programa de Estimulo a Mobilidade.

653

654 **REFERÊNCIAS**

- 655 1. Berghof, TVL, Parmentier, HK, Lammers, A. Transgenerational epigenetic effects on
656 innate immunity in broilers: An underestimated field to be explored? Poultry Science.
657 2013; (92) 2904–2913.
- 658 2. Aguiar, GC, Freitas, ER, Watanabe, PH, Figueiredo CWS, Silva, LP, Nascimento,
659 GAJ, Lima, RC, Nepomuceno, RC, Sá, NL. Lighting programs for male and female
660 meat quails (*Coturnix coturnix*) raised in equatorial region. Poultry Science. 2017. doi:
661 [10.3382/ps/pex103](https://doi.org/10.3382/ps/pex103).
- 662 3. Kalvandi, O, Sadeghi, A, Karimi, A. Methionine supplementation improves
663 reproductive performance, antioxidant status, immunity and maternal antibody

664 transmission in breeder Japanese quail under heat stress conditions. Archives Animal
665 Breeding. 2019. doi: 10.5194/aab-62-275-2019.

666 4. Santos, TC, Murakami, AE, Oliveira, CAL, MOraes, GV, Stefanello, C, Carneiro,
667 TV, Feitosa, CCG, Kaneko, IN. Influence of European Quail Breeders Age on Egg
668 Quality, Incubation, Fertility and Progeny Performance. Brazilian Journal of Poultry
669 Science. 2015. doi: 10.1590/1516-635x170149-56.

670 5. Silva, MC, Noletto, RA, Vaz, RGMV, Costa, ES, Sousa, LF, Rodrigues, KF, Sousa,
671 JPL, Cruz, LA, Fonseca, FLR. Gravidade específica de ovos de matrizes pesadas com
672 diferentes idades no rendimento de incubação e no peso dos pintos pós-eclosão. Revista
673 Brasileira de Saúde e Produção Animal. 2016; (17): 214-221.

674 6. Ulmero-Franco, AM, Fasenko, GM, O’Dea Christopher, EE. Hatching egg
675 characteristics, chick quality, and broiler performance at 2 breeder flock ages and from
676 3 egg weights. Poultry Science. 2010. doi: [10.3382/ps.2009-00403](https://doi.org/10.3382/ps.2009-00403).

677 7. Sumiati, A, Wiryawan, KG. Egg Quality and Blood Hematology of Magelang Laying
678 Duck Fed with Diets Containing Different Ratios of Omega 3 and Omega 6 Fatty Acids
679 and Organic Zn. International Journal of Poultry Science. 2016; (15): 448-453.

680 8. Del Vesco, AP, Gasparino, E, Oliveira Neto, AR, Guimarães, SEF, Marcato, SMM,
681 Voltolini, DM. Dietary methionine effects on IGF-I and GHR mRNA expression in
682 broilers. Genetics and Molecular Research. 2013. doi: 10.4238/2013.December.10.2.

683 9. Elwan, HAM, Elnesr, SS, Xu, Q, Xie, C, Dong, X, Zuo, X. Effects of *In*
684 *Ovo* Methionine-Cysteine Injection on Embryonic Development, Antioxidant Status,
685 IGF-I and TLR4 Gene Expression, and Jejunum Histomorphometry in Newly Hatched
686 Broiler Chicks Exposed to Heat Stress during Incubation. Animals. 2019; 9(1). doi:
687 [10.3390/ani9010025](https://doi.org/10.3390/ani9010025).

- 688 10. Koppenol, A, Delezie, E, Wang, Y, Franssens, L, Willems, E, Ampe, B, Buyse, J,
689 Everaert, N. Effects of maternal dietary EPA and DHA supplementation and breeder
690 age on embryonic and post - hatch performance of broiler offspring. *Journal of Animal*
691 *Physiology and Animal Nutrition*. 2015. doi: [10.1111/jpn.12308](https://doi.org/10.1111/jpn.12308).
- 692 11. Moraes, TGV, Pishnamazi, A, Mba, ET, Wenger, II, Renema, RA, Zuidhof, MJ.
693 Effect of maternal dietary energy and protein on live performance and yield
694 dynamics of broiler progeny from young breeders. 2014; (93). doi: [http://dx.doi.org/](http://dx.doi.org/10.3382/ps.2014-03928)
695 [10.3382/ps.2014-03928](http://dx.doi.org/10.3382/ps.2014-03928).
- 696 12. Aigueperse, N, Calandreau, L, Bertin, A. Maternal Diet Influences Offspring
697 Feeding Behavior and Fearfulness in the Precocial Chicken. *PloS One*. 2013. doi:
698 [10.1371/journal.pone.0077583](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077583).
- 699 13. Van der Waaij, EH, Van den Brand, H, Van Harendonk, JAM, Kemp, B. Effect of
700 match or mismatch of maternal–offspring nutritional environment on the development
701 of offspring in broiler chickens. *Animal*. 2011; 5(5). doi:10.1017/S1751731110002387.
- 702 14. Donkena, KV; Young, CYF.; Tindall, DJ. Oxidative Stress and DNA Methylation in
703 Prostate Cancer. *Obstetrics and Gynecology International*. 2010. doi:
704 [10.1155/2010/302051](https://doi.org/10.1155/2010/302051).
- 705 15. Zimmer, C, Larriva, M, Boogert, NJ, Spencer, KA. Transgenerational transmission
706 of a stress-coping phenotype programmed by early-life stress
707 in the Japanese quail. *Scientific Report*. 2017. doi: [10.1038 / srep46125](https://doi.org/10.1038/srep46125).
- 708 16. Dixon, LM, Sparks, NHC, Rutherford, KMD. Early experiences matter: a review of
709 the effects of prenatal environment on offspring characteristics in poultry. *Poultry*
710 *Science*. 2016. doi: [10.3382/ps/pev343](https://doi.org/10.3382/ps/pev343).

711 17. Guerrero-Bosagna, C, Morisson, M, Liaubet, L, Bas Rodenburg, T, Has, EN,
712 Kostál, L. Transgenerational epigenetic inheritance in birds. *Environmental Epigenetics*.
713 2018. doi: [10.1093/eep/dvy008](https://doi.org/10.1093/eep/dvy008).

714 18. Rostagno HS, Albino LFT, Donzele JL, Gomes PC, Oliveira RFM, et al. (2011)
715 Brazilian tables for birds and pigs: composition of foods and nutritional requirements.
716 3th. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, Brazil.

717 19. Bastos, MS, Del Vesco, AP, Santana, TP, Santos, TS, Oliveira Junior, GM,
718 Fernandes, RPM, Barbosa, LT, Gasparino, E. The role of cinnamon as a modulator of
719 the expression of genes related to antioxidant activity and lipid metabolism of laying
720 quails. *PloS One*. 2017; doi: [10.1371/journal.pone.0189619](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189619).

721 20. Bradford, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram
722 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical*
723 *Biochemistry*. 1976; 72: 248–254.

724 21. Xiao, X, Yongxia, W, Liu, W, Ju, T, Zhan, X. Effects of different methionine
725 sources on production and reproduction performance, egg quality and serum
726 biochemical indices of broiler breeders. *Asian-Australas Journal Animal Science*. 2016.
727 doi: [10.5713/ajas.16.0404](https://doi.org/10.5713/ajas.16.0404).

728 22. Saki, AA, Harsini, MM, Tabatabaei, Zamani, P, Haghighat, M, Matin, HRH. Thyroid
729 function and egg characteristics of laying hens in response to dietary methionine levels.
730 *African Journal of Agricultural Research*. 2011. doi: [10.5897/AJAR10.826](https://doi.org/10.5897/AJAR10.826).

731 23. Pisaraei, ZA, Zare Shahneh, A, Zaghari, M, Zamiri, MJ, Mianji, GR. Effect of
732 testosterone and growth hormone injection before puberty on follicles size, rate of egg
733 production and egg characteristics of the Mazandaran Native breeder hens. *African*
734 *Journal of Biotechnology*. 2008; 7(17): 3149-3154.

- 735 24. Mohammadi, H, Ansari-Pirsaraei, Z, Mousavi, SN, Bouyeh, M. Egg quality and
736 production performance of laying hens injected with growth hormone and testosterone
737 in the late phase of production. *Animal Production Science*. 2015. doi:
738 10.1071/AN14111.
- 739 25. Silva, JRV, Figueiredo, JR, Hurk, R. Involvement of growth hormone (GH) and
740 insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. *Teriogenology*.
741 2009; 71: 1193-1208.
- 742 26. Onagbesan, O, Bruggeman, V, Decuypere, E. Intra-ovarian growth factors
743 regulating ovarian function in avian species: A review. *Animal Reproduction Science*.
744 2009; 111: 121-140.
- 745 27. Shen, YB, Ferket, P, Park, I, Malheiros, RD, Kim, SW. Effects of 290 feed grade-
746 methionine on intestinal redox status, intestinal development, and growth 291
747 performance of young chickens compared with conventional-methionine. *Journal of*
748 *Animal Science*. 2015; 93: 2977-2986.
- 749 28. Stadtman, ER, Van Remmen, H, Richardson, A, Wher, NB, Levine, RL. Methionine
750 oxidation and aging. *Biochimica Biophysica Acta*. 2005; 1703:135-140.
- 751 29. Ruan, D, Fouad, AM, Fan, Q, Xia, W, Wang, S, Chen, W, Lin, C, Wang, Y, Yang,
752 L, Zheng, C. Effects of dietary methionine on productivity, reproductive performance,
753 antioxidant capacity, ovalbumin and antioxidant-related gene expression in laying duck
754 breeders. *British Journal of Nutrition*. 2018; 119: 121-130.
- 755 30. Bunchasak, C, Silapasorn, T. Effects of Adding Methionine in Low-Protein Diet on
756 Production Performance, Reproductive Organs and Chemical Liver Composition of
757 Laying Hens under Tropical Conditions. *International Journal of Poultry Science*. 2005;
758 4(5): 301-308.

- 759 31. Uni,Z, Yair, R. Nutritional limitations during poultry embryonic development.
760 Poultry Science. 2012. doi: 10.3382/japr.2011-00478.
- 761 32. Lofti, E, Zerehdaran, S, Azari, MA. Direct and maternal genetic effects of body
762 weight traits in Japanesequail (*Coturnix coturnix japonica*). Arch.Geflügelk. 2012;
763 76(3): 150-154.
- 764 33. Surai, PF. The antioxidante properties of canthaxanthin and its potential effects in
765 the poultry eggs ando n embryonic development of the chick. Part 2. Poutry Science
766 Journal. 2012. doi: 10.1017//S0043933912000840.
- 767 34. Yigit, AA, Panda, AK, Cherian, G. The avian embryo and its antioxidante defence
768 system. Poultry Science Journal. 2014. doi: 10.1017//S0043933914000610.
- 769 35. Wang, Z, Lian, M, Li, H, Cai, L, He, H, Wu, Q, Yang, L. L-Methionine activates
770 Nrf2-ARE pathway to induce endogenous antioxidant activity for depressing ROS-
771 derived oxidative stress in growing rats. Journal of the Science of Food and Agriculture.
772 2019. doi: 10.1002/jsfa.9757
- 773 36. Guo, L, Li, R, Zhang, YF, Qin, TY, Li, QS, Li, XX, Qi, ZL. A comparison of two
774 sources of methionine supplemented at different levels on heat shock protein 70
775 expression and oxidative stress product of Peking ducks subjected to heat stress. Journal
776 of Animal Physiology and Animal Nutrition. 2018. doi: 10.1111/jpn.12722.
- 777 37. Feeney, A, Nilson, E, Skinner, MK. Epigenetics and transgenerational inheritance in
778 domesticated farm animals. Journal Animal Science and Biotechnologiy. 2014. doi:
779 <http://www.jasbsci.com/content/5/1/48>.
- 780 38. Paiva, JT, De Resende, MDV, Resende, RT, Oliveira HR, Silva, HT, Caetano GC,
781 Calderano, AA, Lopes, PS, Viana, JMS, Silva, FF. A note on transgenerational epigenetics
782 affecting egg quality traits in meat-type quail. 2018. doi:
783 10.1080/00071668.2018.1514582.

784 Artigo 2. Normas de acordo com: PloS One

785

786 **Efeito da temperatura no período pré-natal sobre o desempenho e metabolismo**
787 **oxidativo de codornas de postura expostas ao estresse térmico na fase de**
788 **crescimento**

789

790 Thaís Pacheco Santana¹, Eliane Gasparino², Angélica Khatlab de Souza², Claudson de
791 Oliveira Brito¹, Leandro Teixeira Barbosa¹, Susan J Lamont³, Ana Paula Del Vesco¹

792

793 ¹Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, Brasil

794 ²Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brasil

795 ³Department of Animal Science, Iowa State University, United States of America

796

797 *Correspondente: apaulavesco@gmail.com

798

799 **Resumo:** Uma das maneiras de minimizar os efeitos negativos do estresse é modificar a
800 habilidade que os animais têm de responder às condições estressantes. Dessa forma,
801 esse trabalho foi desenvolvido para avaliar se a temperatura ambiente em que as
802 matrizes são criadas poderia preparar a sua progênie para enfrentar ambientes de
803 desafios na fase de crescimento. O experimento foi conduzido em esquema fatorial 2 x
804 2: duas temperaturas para as matrizes (temperatura de conforto ou estresse térmico
805 contínuo- 32°C), e pra cada tratamento das mães, duas temperaturas para sua progênie
806 (conforto ou estresse térmico intermitente com exposição à alta temperatura por seis
807 horas na fase de crescimento; 15-35 dias de idade - 34°C). Menor taxa de postura,
808 menor massa de ovo, menor expressão de metionina sulfoxido redutase A (*MSRA*),
809 menor capacidade antioxidante e maior taxa de mortalidade da progênie na fase inicial
810 (1-15 dias de idade) foi observada em matrizes criadas em condição de estresse térmico
811 ($P < 0.05$). Na fase de crescimento da progênie, não houve efeito da temperatura
812 ambiental sobre o desempenho ou metabolismo oxidativo da progênie de matrizes
813 criadas em condição de conforto. Entretanto, quando a matriz foi submetida ao estresse,
814 menor ganho de peso, menor expressão de *MSRA*, maior expressão de *HSP70*, maior
815 conteúdo de proteínas carboniladas e menor relação H/L foi observada nas progênies
816 também criadas em condição de estresse térmico. Nossos resultados mostram que o
817 estresse térmico vivenciado pela matriz, apesar de não apresentar efeitos negativos
818 sobre o desenvolvimento e desempenho da progênie criada em conforto térmico, está
819 associado com menor desempenho e maior nível de oxidação proteica quando a
820 progênie também é submetida à condição de estresse.

821

822 Palavras-chave: alta temperatura, ambiente materno, progênie.

823

824

825

826

827

828

829

830

831

832 **INTRODUÇÃO**

833 As altas temperaturas ambientais ainda fazem parte do grupo dos maiores desafios
834 enfrentados na produção animal [1, 2]. O estresse por calor pode provocar efeitos
835 negativos sobre o desempenho, reduzindo a ingestão de alimento, o ganho de peso e a
836 eficiência alimentar [3], além de reduzir a capacidade imunológica tornando os animais
837 mais susceptíveis às doenças [1].

838 Em matrizes, o estresse térmico é ainda relacionado a reduzida taxa de fertilidade,
839 produção de ovos, eclodibilidade e número de pintainhos nascidos vivos [4]. Além de
840 inibir a ação do sistema imune [5], o estresse por calor também atua reduzindo a
841 capacidade reprodutiva; o calor afeta o sistema neuroendócrino ativando o eixo
842 hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) que resulta na maior produção de corticosterona e
843 menor produção das gonadotrofinas FSH (hormônio folículo estimulante) e LH
844 (hormônio luteinizante), e de estradiol. Essa disfunção hormonal está associada à baixa
845 dominância de folículos, menor qualidade da gema, e por fim, reduzida fertilidade nas
846 aves [6, 7]. Além disso, o estresse provocado pela alta temperatura faz com haja maior
847 produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) [8]. Radical livre é uma espécie
848 química a qual um ou mais elétrons estão desemparelhados e quando ligado ao oxigênio
849 são chamados de ROS [9], e são capazes de oxidar e degradar moléculas como
850 proteínas, lipídeos e também causar danos ao DNA [10]. Grande quantidade de ROS
851 durante o desenvolvimento do pintainho no ovo pode causar maior taxa de morte
852 embrionária e pintainhos com menor viabilidade [11].

853 Ainda no ovo, o desenvolvimento do pintainho pode ser influenciado pelo
854 ambiente em que a matriz vive. Acredita-se que o ambiente pode influenciar na
855 expressão de genes através da regulação gênica que ocorre devido a mecanismos
856 epigenéticos que atuam na promoção de mudanças no DNA que podem ser herdáveis;

857 dessa forma, a epigenética transgeracional trata da resposta esperada na progênie
858 devido ao ambiente materno. Seguindo o conceito de epigenética transgeracional,
859 algumas situações vivenciadas pela matriz são capazes de preparar a progênie para
860 enfrentar os desafios aos quais serão submetidos diariamente sem que haja prejuízos em
861 seu desenvolvimento, enquanto outras poderiam ser produtoras de fenótipos
862 indesejáveis para a produção animal [12, 13]. Apesar do crescente interesse na área,
863 poucos estudos ainda estão sendo desenvolvidos para que esse fato seja melhor
864 explicado. Em uma pesquisa bastante completa, Zimmer et al. [13] avaliam o efeito do
865 estresse pré e pós-natal em três gerações de codornas, e mostram que as experiências
866 pré-natal vivenciadas pela mãe não simplesmente afetaram o fenótipo de sua progênie,
867 mas também resultaram no mesmo padrão de herança de enfrentamento da prole,
868 moldando traços neuroendócrinos, fisiológicos e comportamentais [12]. Dessa forma,
869 esse trabalho foi desenvolvido para avaliar como a temperatura ambiente em que as
870 matrizes são criadas poderia influenciar em como a progênie age para enfrentar
871 ambiente de desafio na fase de crescimento. De maneira geral, nossos resultados
872 mostram que o estresse térmico vivenciado pela matriz, apesar de não apresentar efeitos
873 negativos sobre o desenvolvimento e desempenho da progênie criada em conforto
874 térmico, está associado com menor desempenho e maior nível de oxidação proteica
875 quando a progênie também é submetida à condição de estresse.

876

877

878

879

880

881

882 MATERAIS E MÉTODOS

883 *Animais e delineamento experimental*

884 Para avaliar o efeito do ambiente materno sobre o desenvolvimento da progênie, o
885 experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema
886 fatorial 2 x 2: duas temperaturas para as matrizes, e pra cada tratamento das mães, duas
887 temperaturas para a progênie.

888

889 *Matrizes*

890 Duzentas codornas japonesas (*coturnix coturnix japonica*) fêmeas de um dia de
891 idade foram criadas gaiolas coletivas até 98 dias de idade. Durante esse período, o
892 desenvolvimento das aves e a taxa de postura foram acompanhados para
893 monitoramento. Aos 98 dias de idade, 40 codornas com peso médio de (157,25 g) e taxa
894 de postura de 85% foram distribuídas em dois tratamentos referentes a temperatura
895 ambiental: aves que permaneceram em conforto térmico (23°C) (n=10) e aves que
896 foram criadas em estresse térmico crônico contínuo (32°C e 60% UR) (n=30). Durante o
897 período experimental, as aves foram criadas em gaiolas individuais e tiveram livre
898 acesso a água e à ração formulada para atender as exigências nutricionais de acordo com
899 Rostagno et al. [14] com 2899 Kcal/Kg de EM, 20,7% de PB, 3,151% de Ca, e 0,33%
900 de fósforo disponível. As matrizes permaneceram em experimentação por 38 dias: 28 dias
901 antes de começar a coleta de ovos para incubação para garantir que todos os ovos foram
902 fertilizados durante o período experimental, e 10 dias para a coleta de ovos.

903 A partir da terceira semana de experimento, 30 machos padronizados por peso
904 (cerca de 161,2 g) tiveram contato diário com as matrizes durante uma hora. O efeito
905 parental dos machos foi minimizado através da realização de rodízio. Os machos foram

906 utilizados apenas para o acasalamento, e receberam ração basal e água a vontade
907 durante todo o experimento.

908 A coleta de ovos para incubação foi iniciada a partir do oitavo dia de
909 acasalamento; durante o período de 10 dias, os ovos foram coletados, identificados,
910 pesados diariamente e armazenados a temperatura ambiente de 23°C. No último dia de
911 coleta todos os ovos de seis matrizes de cada tratamento foram adaptados à temperatura
912 do ambiente, armazenados em redes de fruta e então transferidos para incubadora
913 (Chocmaster Luna 240) previamente programada para atingir temperatura de 37°C e
914 umidade relativa de 60%. Ao final dos 19 dias de incubação os ovos não eclodidos
915 foram abertos e classificados como ovos não fecundados ou embriões mortos.

916

917 *Progenie*

918 Ao nascerem todos os pintainhos (140 aves no total) foram identificados, pesados
919 e alojados de acordo com o ambiente da matriz (Figura 1). Os pintainhos foram alojados
920 em círculo de proteção previamente aquecido com lâmpada de aquecimento, contendo
921 ração para fase inicial (Tabela 1) e água a vontade. No período de 1-15 dias, todos os
922 animais foram criados de maneira convencional, em ambiente de conforto térmico.

923 Aos 15 dias de idade, as progênies de cada matriz foram pesadas e distribuídas em
924 dois tratamentos referentes à temperatura ambiental: aves que permaneceram em
925 conforto térmico (23°C) e aves que foram criadas em estresse térmico intermitente com
926 exposição à alta temperatura (34°C) por seis horas (período compreendido entre 10:00
927 as 16:00). As aves pertencentes ao mesmo tratamento foram alocadas em gaiolas
928 coletivas (n=13) (duas aves por gaiola) e tiveram acesso livre a água e à ração
929 formulada para atender as exigências nutricionais de acordo com Rostagno et al. [14]
930 durante o período experimental).

931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984

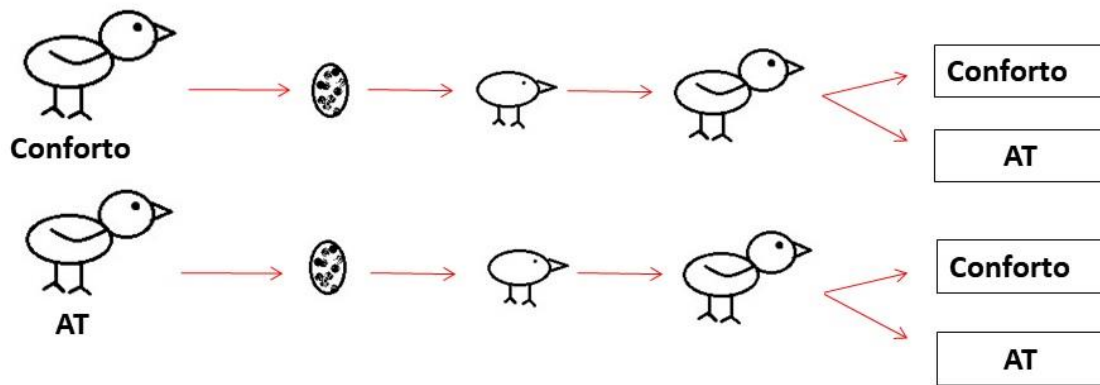


Figura 1. Esquema mostrando o delineamento experimental. Ovos de cada matriz foram coletados por 10 dias e incubados sob as mesmas condições. Ao nascerem os pintainhos foram alojados de acordo com a temperatura experimental da matriz e criados de maneira convencional sob as mesmas condições experimentais até os 15 dias de idade. Aos 15 dias de idade, as aves filhas de cada matriz foram distribuídas em dois tratamentos referentes a temperatura ambiental: aves que permaneceram em conforto térmico (23°C) e aves que foram criadas em estresse térmico intermitente com exposição à alta temperatura (AT, 34°C) por seis horas.

985 Tabela 1. Composição percentual e valores nutricionais da dieta experimental para codornas de
 986 postura fase inicial e de crescimento

Ingredientes (%)	Composição Percentual (%)	
	1 a 14 dias	15 a 35 dias
Milho moído	61.876	65.272
Farelo de soja	34.000	30.600
Sal	0.445	0.605
Óleo vegetal	0.300	-
Calcário calcítico	1.125	1.405
Fosfato bicálcico	1.530	1.400
L-Lisina HCL	0.123	0.138
DL-Metionina	0.185	0.165
L-Treonina	0.016	0.015
Suplemento vitamínico e mineral ¹	0.400	0.400
Total	100.000	100.000
Composição Energética e Nutricional		
	1 a 14 dias	15 a 35 dias
Energia Metabolizável (Kcal/kg)	2898.958	2910.317
Proteína Bruta (%)	20.694	19.395
Cálcio (%)	0.855	0.924
Fósforo Disponível (%)	0.450	0.420
Sódio (%)	0.199	0.260
Aminoácidos Digestíveis (%)		
	1 a 14 dias	15 a 35 dias
Metionina + Cistina	0.750	0.701
Lisina	1.101	1.030
Treonina	0.727	0.681
Triptofano	0.228	0.210

987 ¹Suplemento vitamínico e mineral de crescimento (por Kg do produto): Vit. A – 2.270.000 UI/Kg; Vit. E
 988 – 6.330 UI/Kg; Vit. B1 – 561 mg/Kg; Vit. B2 – 1.490 mg/Kg; Vit. B6 – 858 mg/Kg; Vit. B12 – 3.500
 989 mcg/Kg; Vit. K3 – 450 mg/Kg; Pantotenato Cálcio – 2.976 mg/Kg; Niacina – 8.820 mg/Kg; Ácido Fólico
 990 – 200 mg/Kg; Biotina – 20 mg/Kg; Colina – 86 mg/Kg; Zinco – 19 mg/Kg; Ferro – 14 mg/kg; Manganês
 991 – 20 mg/Kg; Cobre – 3.040 mg/Kg; Iodo – 290 mg/Kg; Cobalto 50 mg/Kg; Selênio – 88 mg/Kg;
 992 Ettoxiquim – 25 mg/Kg; B.H.A – 20 mg/Kg; Veículo Q.S.P – 1.000 mg/Kg.

993

994

995 *Avaliações*

996 Durante o período experimental das matrizes foram avaliados a mudança no
997 peso (g), consumo de ração (g), conversão alimentar por massa de ovo (CA/MO),
998 conversão alimentar por dúzia de ovos (CA/DO), número de ovos, taxa de postura (%),
999 peso do ovo (g) e massa de ovo (g) conforme descrito em Bastos et al.[15]. As taxas de
1000 eclosão (%), de ovos férteis (%), e de morte embrionária (%) foram calculadas de
1001 acordo com Kopenol et al. [16].

1002 O desempenho da progênie foi avaliado nos períodos de 1-14 dias e de 15 a 35
1003 dias de idade.

1004 Ao final do período de coleta dos ovos das matrizes e do período experimental
1005 da progênie, as aves foram abatidas por deslocamento cervical e exsaguinadas.

1006 Nas matrizes, os óvulos em fase F1 (óvulos prontos para serem liberados) foram
1007 extraídos do ovário para obtenção do peso (g) e contagem destes. O peso relativo do
1008 ovário, fígado e coração foi avaliado como (peso do órgão/peso da ave) x 100.

1009 Para a análise de expressão gênica das matrizes e da progênie, uma amostra do
1010 lóbulo esquerdo do tecido hepático foi coletado em RNAlater™ (Life Technologies do
1011 Brasil, Brasil) e armazenado a -20°C. Para a obtenção da relação de
1012 heterofilos/linfócitos o sangue foi coleado em um tubo a vácuo contendo heparina. Para
1013 as análises bioquímicas (capacidade antioxidante total, conteúdo de proteínas
1014 carboniladas e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS), tecido do fígado
1015 foi coletado em nitrogênio líquido e armazenado à -80°C.

1016

1017 *Expressão gênica*

1018 Para a análise de expressão gênica, foram abatidas, por deslocamento cervical,
1019 cinco aves de cada tratamento ao final do período experimental de 35 dias e foram

1020 coletadas amostras de tecido do fígado. As amostras foram armazenadas em RNA
1021 Holder® (BioAgency Biotecnologia, Brasil) à -20°C até o momento da extração de
1022 RNA.

1023 O RNA total foi extraído com uso do reagente Trizol® (Invitrogen, Carlsbad CA,
1024 USA) de acordo com as normas do fabricante, na proporção de 1 mL para cada 80 mg
1025 de tecido. A integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose a 1%, corado com
1026 brometo de etídio (10 mg/mL) e visualizado sob luz ultravioleta.

1027 Todas as amostras de RNA foram tratadas com DNase I (Invitrogen, Carlsbad,
1028 CA, EUA) seguindo as instruções do fabricante, para que fosse eliminada uma possível
1029 contaminação com DNA. Para a síntese do DNA complementar (cDNA) foi utilizada o
1030 kit GoScript Reverse Transcription System (Promega, Madison, Wi, EUA), utilizando
1031 4µL de RNA tratado com DNase, seguindo as instruções do fabricante.

1032 Para as reações de PCR em tempo real, foi utilizado o corante fluorescente SYBR
1033 GREEN (SYBR® GREEN PCR Master Mix, Applied Biosystems, EUA). A reação de
1034 amplificação continha 5 µL de cDNA diluído, 0,5 µL de cada primer a 10 µM (a
1035 concentração final da reação foi de 200 µM), 12,5 µL de SYBR® GREEN PCR Master
1036 Mix e 6,5 µL de água, com um volume final de 25 µL. Para medir a eficiência de cada
1037 primer, uma série de reações de 25 µl foi realizada semelhante à anterior utilizando 5µL
1038 de pool de cDNA a partir de uma diluição em série (80 ng/µL, 40 ng/µL, 20 ng/µL e 10
1039 ng/µL). A programação do termociclador para todos os genes foi: 95°C durante 10
1040 minutos, em seguida 40 ciclos de desnaturação e anelamento/extensão a 95°C durante
1041 15 segundos e 60°C durante 1 minuto. As curvas de melting foram realizadas para
1042 garantir a especificidade das análises.

1043 Os primers utilizados nas reações para a amplificação dos genes da glutathione
1044 peroxidase (*GPx*), glutathione sintetase (*GSS*), proteína do choque térmico 70 (*HSP70*) e

1045 metionina sulfóxido redutase A (*MSRA*), foram confeccionados com base nas
 1046 sequências de genes depositados em www.ncbi.nlm.nih.gov (número de acesso
 1047 NM_001163245.1, XM_425692.3, NM_001006685.1, XM_004935891,
 1048 respectivamente), o gene da β -actina (número de acesso L08165) foi utilizado como
 1049 controle endógeno (Tabela 2). Todas as análises foram realizadas em um volume de 25
 1050 uL e em duplicatas.

1051 As eficiências de amplificação foram semelhantes para os genes de interesse,
 1052 entre 90% e 110% de eficiência.

1053
 1054

Tabela 2. Sequência de primers utilizados na reação de qRT-PCR

Gene	pb ¹	TA (°C) ¹	Orientação	Sequência dos primers (5'-3')
<i>GPx</i> *	140	60	Forward	GGTGCCTCCTTTCTATGTT
			Reverse	AGTTCAGGTTGGTTCTTCTC
<i>GSS</i>	108	60	Forward	GTGCCAGTTCAGTTTTCTTATG
			Reverse	TCCCACAGTAAAGCCAAGAG
<i>HSP70</i>	65	60	Forward	ATGAGCACAAGCAGAAAGAG
			Reverse	TCCCTGGTACAGTTTTGTGA
<i>MSRA</i>	76	60	Forward	ATGACCCGACACAAGGAATG
			Reverse	TGGGAAAAGGTGTAGATGGC
β -actina	136	60	Forward	ACCCCAAAGCCAACAGA
			Reverse	CCAGAGTCCATCACAATACC

1055 ¹pb, pares de base; TA, temperatura de anelamento

1056 **GPx*, glutathiona peroxidase; *GSS*, glutathiona sintetase; *HSP70*, proteína do choque térmico 70; *MSRA*,
 1057 metionina sulfóxido redutase A.

1058

1059 *Análises bioquímicas*

1060 Para a determinação da capacidade antioxidante total (%) 100 mg de tecido
 1061 hepático foi adicionado em um tubo de ensaio contendo 1 mL de álcool metílico e
 1062 homogeneizado, em seguida as amostras foram centrifugadas a 10.000 xg por 10
 1063 minutos a 4°C, e o sobrenadante obtido foi transferido para um tubo eppendorf. Em uma
 1064 microplaca foram adicionados 22,5 µL do sobrenadante e 277,5 µL de DPPH (2,2-
 1065 difenil-1-picrilhidrazilo) em duplicata. A placa foi mantida no escuro por 30 minutos e

1066 em seguida foi realizada a leitura da placa em espectrofotômetro (VersaMax™,
1067 Molecular Devices) a 515nm.

1068 Pra determinar o conteúdo de TBARS 100 mg de tecido hepático foi adicionado
1069 em um tubo contendo 1 mL de tampão fosfato, homogeneizado e o homogenato
1070 formado foi centrifugado a 10.000 *xg* por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação 500
1071 µL do sobrenadante foi transferido para um novo tubo contendo 250 µL de ácido
1072 tricloroacético (TCA) 28% diluído em ácido clorídrico (HCL) 0,25 N, 250 µL de ácido
1073 tiobarbitúrico (TBA) 1% diluído em ácido acético 1:1 e 125 µL de butilhidroxitolueno
1074 (BHT) diluído em etanol. A solução foi homogeneizada e aquecida a 95°C por 15
1075 minutos. Em seguida a solução foi centrifugada a 10.000 *xg* por 10 minutos a 4°C. Em
1076 uma microplaca 300 µL da solução, em duplicata, foram utilizadas para determinação
1077 da concentração de TBARS em espectrofotômetro (VersaMax™, Molecular Devices) a
1078 535 nm. Os resultados foram expressos em nmoles/mg de proteína.

1079 Para dosagem de proteínas carboniladas foram utilizados 200 mg de tecido
1080 hepático em 1 mL de tampão fosfato (50 mM) e EDTA (1 mM) (pH 6,7). A solução foi
1081 homogeneizada e centrifugada a 10.000 *xg* por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante
1082 coletado. Para cada amostra dois tubos foram preparados, um tubo para a reação com
1083 amostra (A) e o outro para a reação controle (C). Em ambos os tubos foram adicionados
1084 500 µL de TCA 10%, 300 µL de sobrenadante e 200 µL de tampão fosfato e EDTA. Os
1085 tubos foram homogeneizados brevemente no vortex e então centrifugados a 5.000 *xg*
1086 por 10 minutos a 4°C. No tubo A foi adicionado 500 µL de DNPH (10 mM) e no tubo C
1087 500 µL de HCL (2,5 N). Os tubos foram mantidos no escuro a temperatura ambiente por
1088 30 minutos, a cada 15 minutos as amostras foram homogeneizadas brevemente no vortex.
1089 Em ambos os tubos foram adicionados 500 µL de TCA 10%, homogeneizados e
1090 centrifugados a 5.000 *xg* por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi centrifugado e em

1091 todos os tubos foram adicionados 1 mL de etanol e acetato de etila (1:1), vortex
1092 novamente e os tubos foram centrifugados a 5.000 *xg* por 10 minutos a 4°C. Novamente
1093 o sobrenadante foi descartado de ambos os tubos (A e C), adicionado 1 mL etanol e
1094 acetato de etila (1:1), homogeneizado e centrifugado a 5.000 *xg* por 10 minutos a 4°C. O
1095 sobrenadante foi descartado de ambos os tubos, nos tubos A e C foi adicionado 1 mL de
1096 SDS (6%), homogeneizados no vortex e centrifugados a 10.000 *xg* por 110 minutos a
1097 4°C. Para a leitura em espectrofotômetro (VersaMax™, Molecular Devices) a 370 nm
1098 foi utilizado 200 µL do sobrenadante, em duplicata.

1099 O conteúdo de proteína de cada amostra foi obtido pelo método descrito por Bradford
1100 [17].

1101

1102 ***Relação heterofilos/linfócitos***

1103 Para determinar a relação entre heterofilos e linfócitos um esfregaço hematológico
1104 foi confeccionado. Uma amostra de 10 µl sangue foi depositada em uma lâmina
1105 microscópica, com outra lâmina (distensora) fez-se um leve movimento para trás, até
1106 que a gota de sangue se espalhasse até as bordas, e então esta foi distendida a sua
1107 extremidade. As lâminas foram secas ao ar e então coradas seguindo as recomendações
1108 descritas no kit de coloração (Instant Prov, Coloração Hematológica, Newprov). Em um
1109 microscópio eletrônico 100 células (heterofilos e linfócitos) foram contadas para
1110 calcular a relação entre essas duas células.

1111

1112 ***Análise estatística***

1113 O método $2^{-\Delta\Delta CT}$ foi utilizado para as análises de quantificação relativa. Para todos
1114 os dados, o efeito de dieta para as matrizes foi avaliado através da ANOVA. Para
1115 avaliar como o efeito do ambiente materno influencia nas respostas da progênie ao
1116 ambiente a qual são submetidos, o efeito de ambiente da progênie foi avaliado dentro

1117 das dietas das matrizes. Para avaliar a possível herança genética herdada a partir de
1118 mecanismos epigenéticos, o efeito do ambiente materno foi avaliado dentro do ambiente
1119 da progênie (JMP software, SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA). Peso ao nascimento não
1120 foi incluído no modelo, já que essa correção poderia mascarar os efeitos causados pela
1121 dieta das matrizes sobre o desenvolvimento dos pintainhos antes da eclosão [18]. Todos
1122 os resultados são apresentados como médias e erro padrão agrupado. A correlação de
1123 Pearson foi utilizada para avaliar a relação entre a expressão gênica observada nas
1124 matrizes e em sua progênie, e para avaliar a associação entre os genes avaliados.

1125

1126 **RESULTADOS**

1127 *Efeito da temperatura ambiental sobre o desempenho das Matrizes*

1128 O efeito da temperatura ambiental foi avaliado sobre o desempenho das matrizes
1129 em fase de reprodução (Tabela 3). Como esperado, matrizes que foram criadas em
1130 condição de estresse térmico apresentaram menor taxa de postura (cerca de 28% menor)
1131 e menor massa de ovos que matrizes em condição de conforto ($P < 0.05$). Não foi
1132 observado, entretanto, efeito da temperatura sobre o peso do ovo, taxa de eclosão, taxa
1133 de eclosão de ovos férteis, e sobre o peso do nascimento dos pintainhos.

1134

1135

1136

1137

1138

1139

1140

1141

1142 Tabela 3. Características de desempenho de matrizes de codornas japonesas em fase de
1143 reprodução

Características	Ambiente			P valor
	Conforto	AT [†]	EP	
PI, g [†]	160,00	165,83	6,35	0,5307
PF, g	173,33	171,67	3,45	0,7402
CR, g/g	850,00*	625,17	70,87	0,0487
CMO, g/g	2,74	2,77	0,23	0,9142
CDZ, g/dúzia	2,48	2,56	0,19	0,7727
NO, n	28,66*	20,17	1,08	0,0002
TXP, %	95,55*	67,22	3,60	0,0002
PO, g	10,93	11,17	0,32	0,6034
MO, g	313,61*	224,53	13,27	0,0008
TXE, %	68,51	62,47	7,38	0,5750
TEOF, %	71,69	75,59	7,11	0,7061
PN, g	7,72	7,98	0,15	0,2174

1144 [†]PI, peso inicial (g); PF, peso final (g); CR, consumo de ração (g); CMO, conversão alimentar por massa
1145 de ovo (g/g); CDZ, conversão alimentar por dúzia de ovo (g/dúzia); NO, número de ovos (n); TXP, taxa
1146 de postura (%); PO, peso do ovo (g); MO, massa de ovo (g); TXE, taxa de eclosão (%); TEOF, taxa de
1147 eclosão por ovos férteis (%); PN, peso ao nascimento da progênie (g).[†]AT, alta temperatura. Os resultados
1148 são apresentados como médias e seus erros padrão (EP). *Os asteriscos representam diferenças
1149 significativas pelo teste de F (P<0,05).
1150
1151

1152 Não foi observado efeito do ambiente sobre o número e peso de folículos prontos,
1153 ou o peso relativo do ovário, fígado, coração e baço (Tabela 4).

1154
1155 Tabela 4. Número de folículos e peso relativo de órgãos de matrizes de codornas
1156 japonesas em fase de reprodução

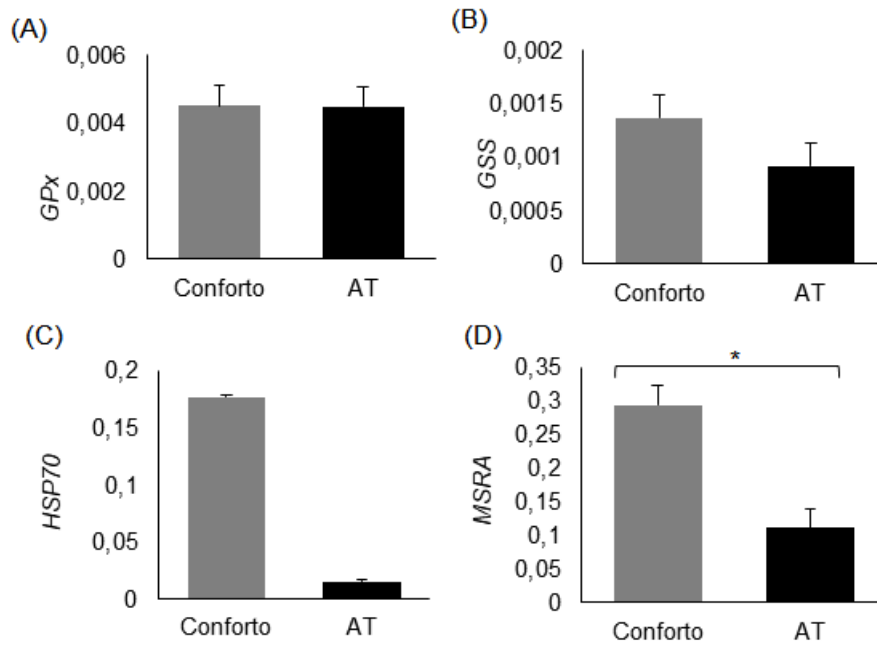
	Ambiente			P valor
	Conforto	AT [†]	EP	
NF1, n*	4,20	4,10	0,31	1,0000
PF1, g	1,32	1,13	0,13	0,3325
Ovário, %	3,66	3,45	0,30	0,6491
Fígado, %	2,82	3,03	0,17	0,4135
Coração, %	0,81	0,85	0,01	0,3497
Baço, %	0,05	0,04	0,01	0,4748

1157 *NFG, número de folículos prontos para serem liberados (n); PFG, peso dos folículos prontos para serem
1158 liberados (g). [†]AT, alta temperatura. Os resultados são apresentados como médias e seus erros padrão
1159 (EP).
1160

1161 Observamos menor expressão do gene *MSRA* (Figura 2) e capacidade antioxidante
1162 (Figura 3) em matrizes criadas em condições de estresse térmico. Não houve efeito
1163 significativo da temperatura ambiental sobre os demais parâmetros avaliados.

1164

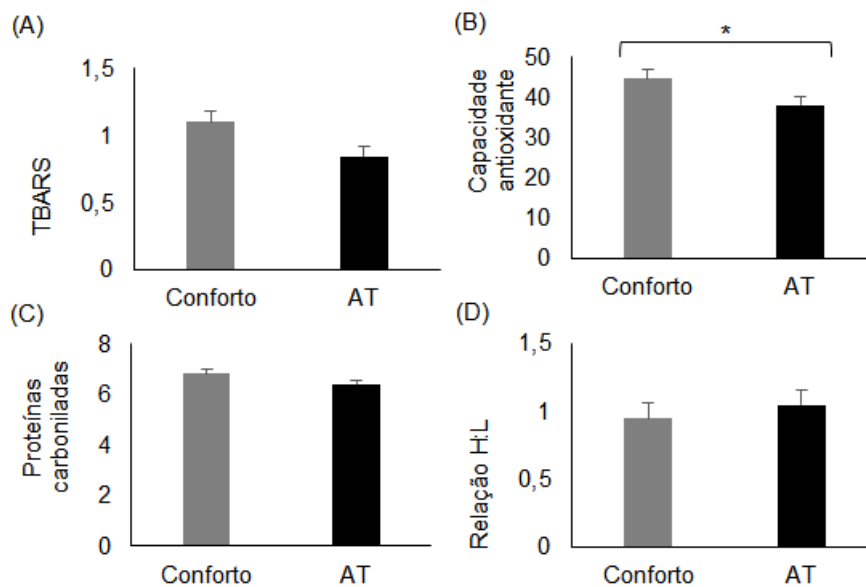
1165
1166
1167
1168
1169
1170
1171
1172
1173
1174
1175
1176



1177 Figura 2. Efeito da temperatura ambiental sobre a expressão de glutaciona peroxidase (*GPx*) (A),
1178 glutiona sintetase (*GSS*) (B), proteína do choque térmico (*HSP70*) (C) e metionina sulfóxido redutase
1179 (*MSRA*) (D) no fígado das matrizes. AT, alta temperatura. *O asterisco representa diferença significativa
1180 pelo teste de F ($P<0,05$). Os resultados são expressos como unidade arbitrária (UA).

1181
1182

1183
1184
1185
1186
1187
1188
1189
1190
1191
1192
1193
1194
1195
1196
1197
1198
1199

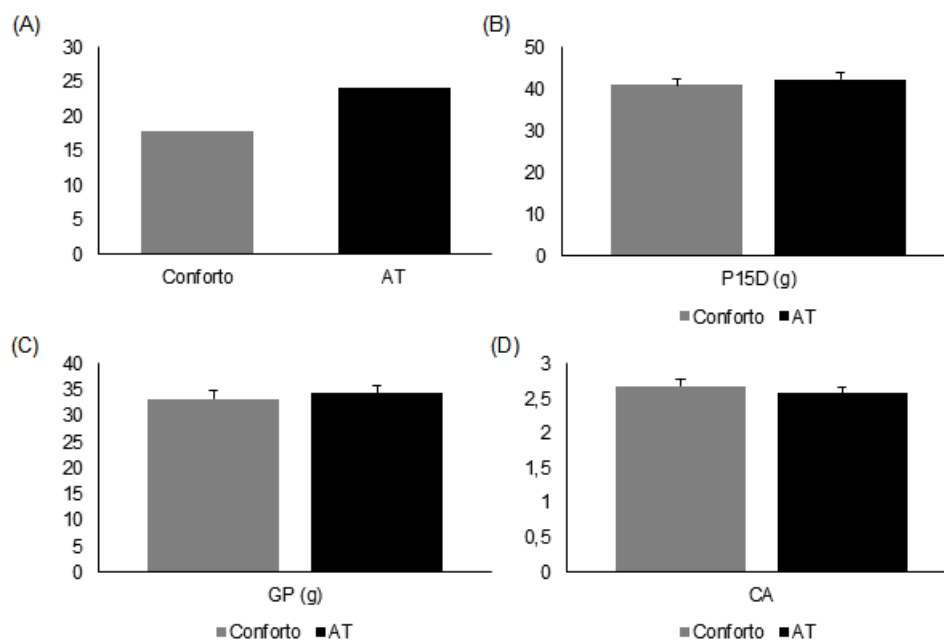


1200 Figura 3. Efeito da temperatura ambiental sobre a capacidade antioxidante (%) (A); o conteúdo de
1201 TBARS (nmol/mg de proteína) (B); proteínas carboniladas (nmol de grupos carbonil/mg de proteína) (C)
1202 e relação heterofilos:linfócitos (H/L) (D). AT, alta temperatura. *O asterisco representa diferença
1203 significativa pelo teste de F ($P<0,05$).

1204
1205
1206
1207

1208 ***Efeito do ambiente materno sobre o desenvolvimento da progênie na fase inicial (1-15***
1209 ***dias de idade)***

1210 Para a avaliação do efeito do ambiente materno na fase inicial da progênie, todos
1211 os pintainhos foram criados sob as mesmas condições ambientais até os 15 dias de
1212 idade. Podemos observar menor taxa de mortalidade entre as progênies de matrizes
1213 criadas em conforto quando comparados aos das matrizes criadas em estresse térmico,
1214 17,94% vs 24,13%, respectivamente; entretanto, não houve efeito do ambiente materno
1215 sobre o peso aos 15 dias e sobre o ganho de peso no período (Figura 4).



1216

1217 Figura 4. Efeito da temperatura ambiental materna sobre a taxa de mortalidade (A) e desempenho da
1218 progênie na fase inicial (1-15 dias de idade) (B; C; D). P15D, peso da progênie aos 15 dias de idade; GP,
1219 ganho de peso; CA, conversão alimentar. AT, alta temperatura.

1220

1221

1222 ***Efeito do ambiente materno sobre o desenvolvimento da progênie na fase de***
1223 ***crescimento)***

1224 Aos 15 dias de idade, a progênie de cada matriz foi dividida em duas temperaturas
1225 ambientais e o efeito do ambiente materno foi avaliado dentro de cada grupo
1226 experimental (Figura 5). Não foi observado efeito do ambiente da matriz sobre o

1227 desempenho da progênie criada em conforto térmico. Entretanto, para a progênie criada
1228 em estresse, observamos que os filhos de matrizes criadas em estresse térmico
1229 apresentaram menor ganho de peso que aves filhas de matrizes criadas em conforto.

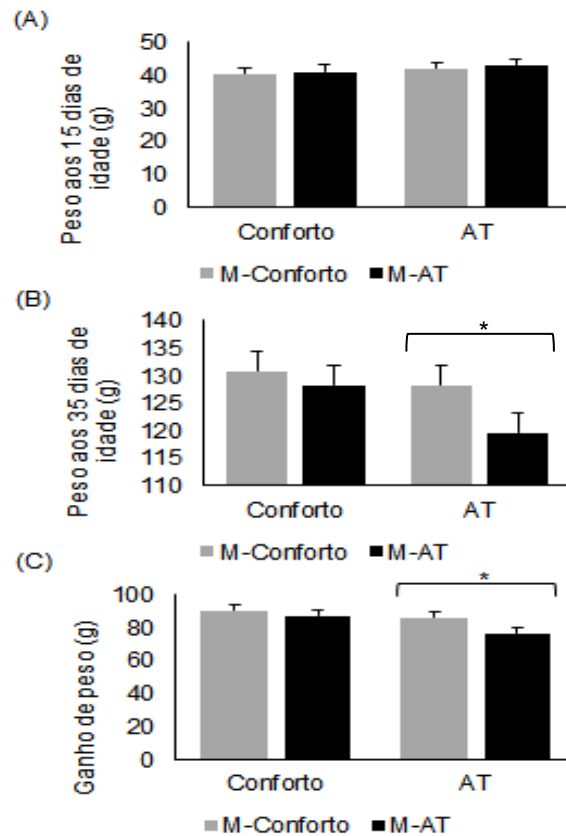
1230

1231

1232

1233

1234



1235

1236

1237

1238

1239

1240

1241

1242

1243

1244

1245

1246

1244 Figura 5. Efeito da temperatura ambiental materna sobre peso da progênie aos 15 dias de idade (A), peso
1245 aos 35 dias de idade (B) e ganho de peso (C). AT, alta temperatura. M-Conforto, matrizes criadas em
1246 conforto térmico; M-AT, matrizes criadas sob alta temperatura. *As comparações são feitas dentro do
1247 ambiente da progênie e o asterisco representa diferença significativa pelo teste de F ($P < 0,05$).
1248

1249

1250

1251

1252

1253

1254

1255

Com relação aos parâmetros oxidativos e de indicação de estresse, avaliando o efeito do ambiente da matriz para a progênie criada em estresse térmico, observamos que aves filhas de matrizes criadas sob alta temperatura apresentaram maior expressão do gene *HSP70* e menor expressão de *MSRA* ($P < 0,05$). Para a progênie criada em condição de conforto, a progênie de matrizes criadas em AT apresnetaram maior expressão de *GSS* e *HSP70* que a progênie de matrizes que permaneceram em conforto térmico (Figura 6).

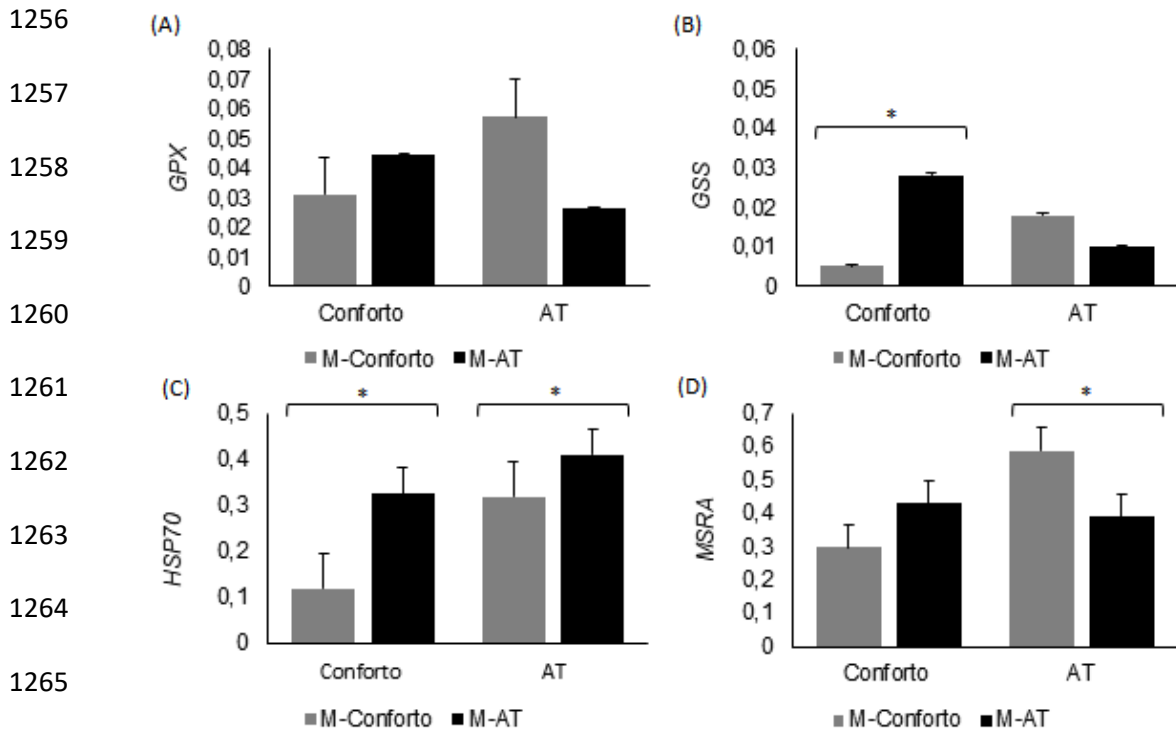


Figura 6. Efeito da temperatura ambiental materna sobre a expressão dos genes da glutaciona peroxidase (*GPx*) (A), glutaciona sintetase (*GSS*) (B), proteína do choque térmico 70 (*HSP70*) (C) e metionina sulfóxido redutase A (*MSRA*) (D) no fígado da progênie aos 35 dias de idade. AT, alta temperatura. *As comparações são feitas dentro de ambiente da progênie e os asteriscos mostram diferenças significativas pelo teste de F ($P < 0,05$). Os resultados são expressos como unidade arbitrária (UA).

Avaliando os resultados de correlação na progênie, podemos observar correlação positiva entre a expressão gênica dos genes *GPx* e *HSP70* (0.66; $P=0.0020$), *GPx* e *MSRA* (0.7; $P=0.0007$) e *GSS* e *HSP70* (0.61; $P=0.0047$) (Tabela 5).

1286 Tabela 5. Coeficientes de correlação de Pearson entre a expressão de *GPx*, *GSS*, *HSP70* e *MSRA* de
 1287 matrizes e sua progênie

		Correlação de Pearson							
		<i>GPx</i> _(M) ¹	<i>GPx</i> _(P)	<i>GSS</i> _(M)	<i>GSS</i> _(P)	<i>HSP70</i> _(M)	<i>HSP70</i> _(P)	<i>MSRA</i> _(M)	<i>MSRA</i> _(P)
<i>GPx</i> _(M)		1	-0.06	0.24	0.17	0.17	0.05	0.14	-0.06
<i>GPx</i> _(P)			1	-0.01	0.24	0.03	0.66*	-0.10	0.7*
<i>GSS</i> _(M)				1	0.20	0.05	0.23	0.60*	-0.18
<i>GSS</i> _(P)					1	0.39	0.61*	0.18	0.10
<i>HSP70</i> _(M)						1	0.10	0.27	0.16
<i>HSP70</i> _(P)							1	-0.23	0.33
<i>MSRA</i> _(M)								1	0.03
<i>MSRA</i> _(P)									1

1288 ¹*GPx*_(M), glutathione peroxidase na matriz; *GPx*_(F), glutathione peroxidase na progênie; *GSS*_(M), glutathione
 1289 sintetase na matriz; *GSS*_(P), glutathione sintetase na progênie; *HSP70*_(M), proteína do choque térmico 70 na
 1290 matriz; *HSP70*_(P), proteína do choque térmico 70 na progênie; *MSRA*_(M), metionina sulfóxido redutase A
 1291 na matriz, *MSRA*_(P), metionina sulfóxido redutase A na progênie. *Os asteriscos mostram correlação
 1292 signficativa (P<0,05).
 1293

1294 Avaliando o efeito do ambiente da matriz para a progênie criada em estresse
 1295 térmico, observamos também que aves filhas de matrizes criadas sob alta temperatura
 1296 apresentaram maior conteúdo de proteínas carboniladas e menor relação H/L que aves
 1297 filhas de matrizes criadas em conforto térmico. Não foram observados efeitos do
 1298 ambiente materno sobre nenhuma das características avaliadas para codornas criadas em
 1299 conforto térmico (Figura 7).

1300

1301

1302

1303

1304

1305

1306

1307

1308

1309

1310
1311
1312
1313
1314
1315
1316
1317
1318
1319
1320
1321
1322
1323
1324
1325
1326

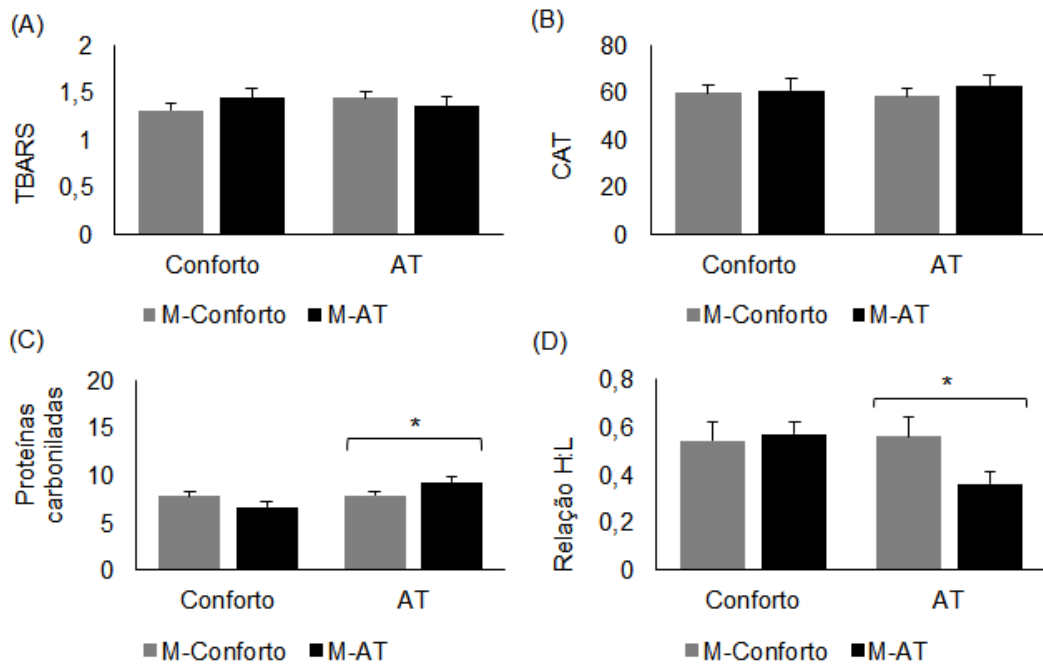


Figura 7. Efeito da temperatura ambiental materna sobre o conteúdo de TBARS (nmol/mg de proteína) (A); capacidade antioxidante (%) (B) e proteínas carboniladas (nmol de grupos carbonils/mg de proteína) (C) e relação heterófilos:linfócitos (H/L) (D) da progênie aos 35 dias de idade. AT, alta temperatura. *As comparações são feitas dentro de ambiente da progênie e os asteriscos mostram diferenças significativas pelo teste de F ($P < 0,05$).

1327 *Efeito da temperatura ambiental no desempenho da progênie na fase de crescimento*

1328 Para avaliar como a progênie responderia ao seu próprio ambiente devido ao
1329 ambiente materno, o efeito da temperatura ambiental da progênie foi avaliado dentro de
1330 cada ambiente materno (Tabela 6). Para as progênies de matrizes criadas sob alta
1331 temperatura, observamos que aves criadas em condição de estresse apresentaram menor
1332 ganho de peso que aves criadas em conforto (76,45 g vs 87,17 g). Não houve efeito de
1333 ambiente para as progênies de matrizes criadas em conforto térmico sobre nenhuma
1334 característica de desempenho.

1156 Tabela 6. Efeito da temperatura ambiental sobre o desempenho da progênie na fase de crescimento

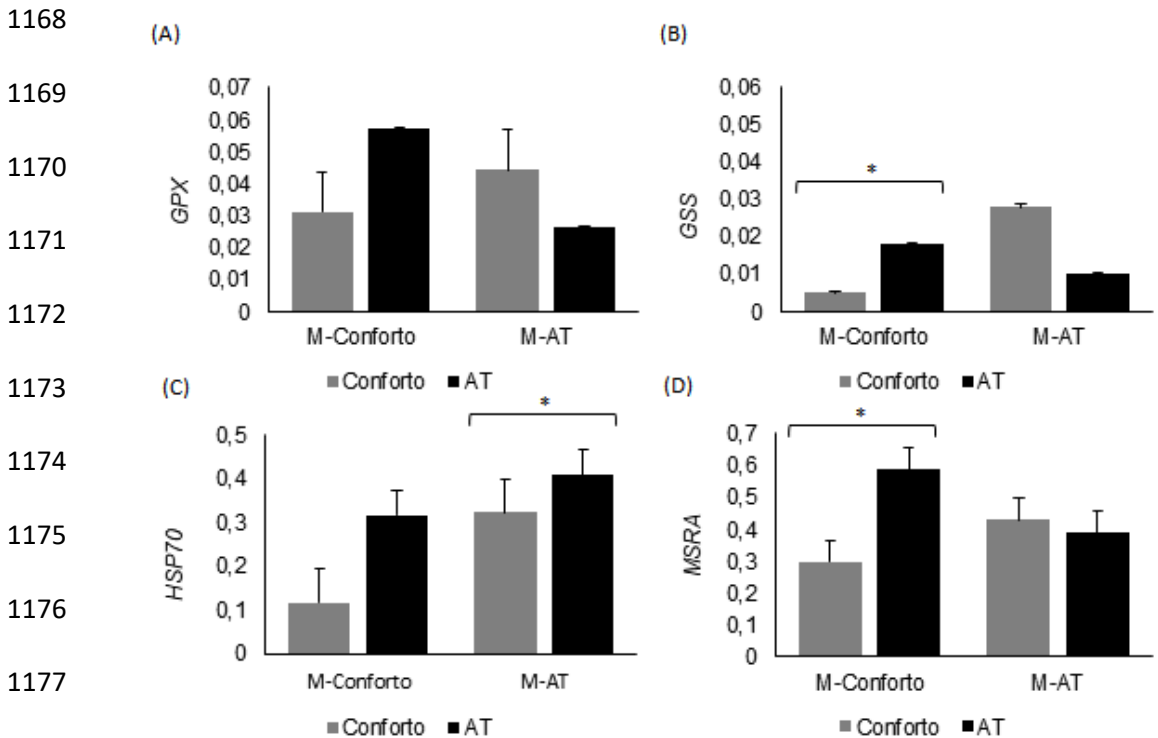
	Matrizes em Conforto		EP	P valor	Matrizes em AT		EP	P valor
	Conforto	AT [†]			Conforto	AT		
P15, g [‡]	40.53	42.07	1.71	0.5446	41.11	43.11	1.96	0.4768
P35, g	130.73	128.23	3.56	0.6358	128.28	119.57	3.66	0.5562
GP, g	90.20	86.15	3.39	0.4242	87.17*	76.45	3.51	0.0369
CR, g	369.85	435.33	31.98	0.1748	384.24	421.52	39.57	0.7239
CA, g/g	4.16	5.27	0.45	0.1066	4.54	5.54	0.55	0.5948

1157 [‡]P15, peso da progênie aos 15 dias de idade (g); P35, peso da progênie aos 35 dias de idade (g); GP, ganho de peso (g); CR, consumo de ração (g); CA, conversão alimentar;
 1158 [†]AT, alta temperatura. Os resultados são apresentados como médias e seus erros padrão (EP). *As comparações são feitas dentro do ambiente materno e o asterisco mostra
 1159 diferença significativa pelo teste de F (P<0,05).
 1160

1161

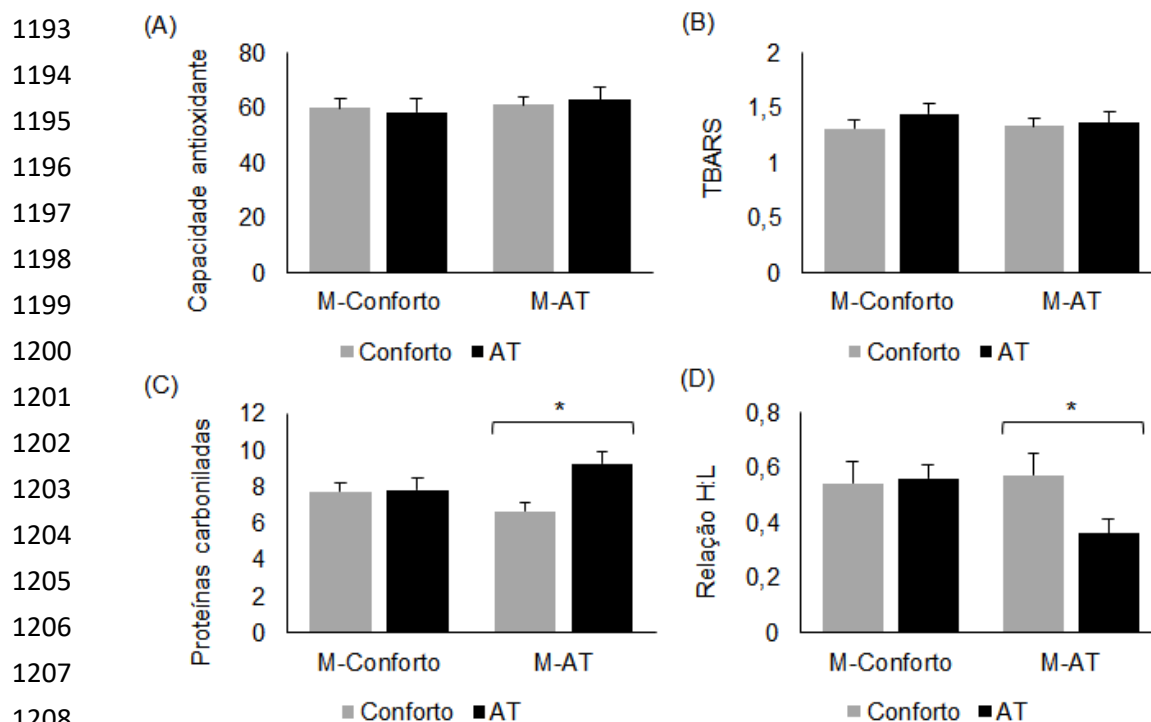
1162

1163 Avaliando o efeito da temperatura ambiental da progênie sobre a expressão
 1164 gênica, observamos que para a progênie de matrizes criadas em conforto térmico, maior
 1165 expressão de *GSS* e *MRSA* foi apresentada por aves criadas em AT. Já para a progênie
 1166 de matrizes criadas em condição de estresse térmico, maior expressão de *HSP70* foi
 1167 também observada em aves criadas sob alta temperatura (Figura 8).



1178
 1179 Figura 8. Efeito da temperatura ambiental sobre a expressão de glutationa peroxidase (*GPX*) (A),
 1180 gltationa sintetase (*GSS*) (B), proteína do choque térmico 70 (*HSP70*) (C) e metionina sulfóxido redutase
 1181 A (*MSRA*) (D) no fígado da progênie aos 35 dias de idade. M-Conforto, matrizes criadas em conforto
 1182 térmico; M-AT, matrizes criadas sob alta temperatura. AT, alta temperatura. *As comparações são feitas
 1183 dentro do ambiente materno e os asteriscos representam diferenças significativas pelo teste de F ($P < 0,05$).
 1184 Os resultados são expressos como unidade arbitrária (UA).
 1185
 1186

1187 Para a progênie de matrizes criadas em condição de estresse térmico, também
 1188 observamos maior conteúdo de proteínas carboniladas e menor relação H/L em
 1189 codornas criadas em condição de estresse quando comparada a progênie criada em
 1190 conforto térmico. Não houve efeito de ambiente para a progênie de matrizes criadas em
 1191 condição de conforto térmico (Figura 9).
 1192



1209 Figura 9. Efeito da temperatura ambiental sobre o conteúdo de TBARS (nmol/mg de proteína) (A);
 1210 capacidade antioxidante (%) (B) e proteínas carboniladas (nmol de grupos carbonils/mg de proteína) (C)
 1211 e relação heterofilo:linfócito (H/L) da progênie aos 35 dias de idade. M-Conforto, matrizes criadas em
 1212 conforto térmico; M-AT, matrizes criadas sob alta temperatura. AT, alta temperatura. *As comparações
 1213 são feitas dentro do ambiente materno e os asteriscos representam diferenças significativas pelo teste de F
 1214 ($P < 0,05$).

1215

1216 DISCUSSÃO

1217 Em nosso trabalho, matrizes criadas em alta temperatura durante a fase de postura
 1218 apresentaram menor desempenho que matrizes em condição de conforto térmico. Estes
 1219 resultados são semelhantes aos encontrados por El- Tarabany et al. [2], onde codornas
 1220 de postura criadas em estresse térmico apresentaram menor consumo de ração, menor
 1221 número de ovos produzidos e menor massa de ovo. Apesar dos complexos mecanismos
 1222 de atuação do estresse térmico sobre a produção e qualidade do ovo ainda não serem
 1223 completamente entendidos, alguns fatores podem contribuir para os resultados
 1224 geralmente observados em aves submetidas ao estresse durante a fase de postura, como
 1225 por exemplo a reduzida atividade ovariana devido à baixa ingestão de alimentos [19]; de

1226 acordo com Song et al. [20], o estresse térmico desempenha um papel único sobre
1227 importantes neuropeptídios relacionados ao controle do apetite em aves, como os
1228 hormônios grelina e colecistoquinina, o que pode resultar em reduzido consumo de
1229 ração e menor produção de ovos.

1230 Menor atividade ovariana, seguida de menor produção de ovos também poderia
1231 ser resultado de alterada atividade de neurotransmissores [21], ou devido ao menor
1232 fluxo sanguíneo destinado ao ovário, menor secreção de T3, estrogênio e progesterona,
1233 e de secreção do hormônio folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH) observada em
1234 aves em condição de estresse térmico [22]. Rozemboin et al. [23] sugerem um possível
1235 efeito direto do estresse térmico sobre a atividade ovariana através da redução dos
1236 hormônios esteroides no plasma e da expressão de enzimas esteroidogênicas nos
1237 folículos, o que pode atuar impedindo o desenvolvimento dos folículos [24, 25, 26].

1238 Quando submetidas ao estresse térmico, além do desempenho, o estado oxidativo
1239 das aves também é comprometido como pode ser observado através da menor
1240 capacidade antioxidante total observada no fígado de matrizes criadas em alta
1241 temperatura (Figura 1). Zhang et al. [27] mostram que aves criadas em estresse térmico
1242 apresentam menor níveis de glutathiona (GSH) e menor atividade da enzima superóxido
1243 dismutase (SOD) que leva à reduzida capacidade antioxidante e aumentado conteúdo de
1244 MDA, diminuindo a capacidade da ave de combater o ROS. Em nosso trabalho, a
1245 reduzida capacidade antioxidante observada em matrizes criadas em condição de
1246 estresse pode ser devido também a menor expressão de *MSRA*. A metionina sulfóxido
1247 atua convertendo resíduos de metionina oxidada (metionina sulfóxido) e eliminando a
1248 ação do ROS. Diversos estudos tem demonstrado a capacidade da *MSRA* de reduzir os
1249 danos causados pelo estresse oxidativo [28].

1250

1251 O estresse térmico materno durante a fase de postura também tem sido apontado
1252 como responsável por alterações metabólicas que prejudicam o desempenho
1253 embrionário, a eclodibilidade e o desempenho da progênie [29]. De acordo com os
1254 autores, a menor eclodibilidade poderia estar associada à perturbação da função
1255 hormonal ou à redução da penetração de espermatozóides nos óvulos de aves com
1256 temperatura corporal elevada resultando em maior mortalidade embrionária. Em nosso
1257 trabalho não observamos efeito do ambiente da matriz sobre o peso do ovo, taxa de
1258 eclosão, taxa de eclosão de ovos férteis, ou sobre o desempenho da sua progênie na fase
1259 inicial. Esse resultado pode ser devido à seleção inicial feita durante a condução do
1260 experimento, já que das 30 matrizes criadas em condição de estresse térmico, foram
1261 incubados apenas os ovos das seis matrizes que foram consideradas superiores de
1262 acordo com a taxa de postura, consumo de ração, tamanho e peso do ovo. Mesmo
1263 antecipando que os efeitos do estresse térmico poderiam ser reduzidos, essa medida foi
1264 tomada para permitir a execução do experimento, já que para ser avaliada cada matriz
1265 deveria ter pelo menos dois filhos avaliados em cada ambiente na fase de crescimento.

1266 De acordo com Dixon et al. [12], diversos fatores que afetam o ambiente ao qual o
1267 embrião é exposto antes da postura ou antes da eclosão pode afetar o desenvolvimento
1268 da progênie. Ainda de acordo com os autores, o estresse aplicado ao ambiente materno
1269 pode atuar através de heranças epigenéticas para determinar o fenótipo da progênie. A
1270 exposição da matriz às condições de estresse poderia promover adaptações de tal forma
1271 que as gerações seguintes responderiam melhor quando submetidas a desafios no futuro
1272 [30]. Isso porque uma das maneiras de minimizar os efeitos negativos do estresse, é
1273 modificar a habilidade que os animais tem de responder às condições estressante, e de
1274 acordo com Zulkifli et al. [31], há evidencias de que experiências estressantes no
1275 período pré-natal poderia contribuir para a resposta dada a estímulos adversos

1276 subsequentes. Ainda de acordo com os autores, nem sempre os animais devem ser pré-
1277 condicionados ao mesmo estressor para ter sua resposta futura melhorada; avaliando o
1278 efeito do condicionamento ao calor e a restrição de alimentos nos primeiros dias de
1279 vida, os autores observaram que quando as aves foram expostas ao estresse térmico aos
1280 35 dias de idade, apresentaram menor relação H/L que aves que não haviam passado
1281 pelo condicionamento anterior. Os resultados, entretanto, não mostram evidências claras
1282 que a combinação de fatores aplicados nos primeiros dias de vida poderia contribuir
1283 para as respostas fisiológicas ao estresse enfrentado posteriormente.

1284 Por outro lado, condições adversas vivenciadas pela geração materna também
1285 pode ser associada à produção de progênie mais susceptível a diferentes desafios e
1286 doenças [32]. Já que as respostas da progênie podem ser moldadas pelo padrão de
1287 herança transmitido pela geração parental [13], pode ser esperado que quando criados
1288 em estresse térmico, as progênie de matrizes criadas em alta temperatura também
1289 apresentariam menor desempenho [13]. Avaliando os resultados da progênie durante a
1290 fase de crescimento, observamos que quando a matriz foi submetida ao estresse, as
1291 progênie também criadas em estresse térmico obtiveram menor ganho de peso, menor
1292 expressão de *MSRA*, maior expressão de *HSP70*, maior conteúdo de proteínas
1293 carboniladas e menor relação H/L que as progênie criadas em condição de conforto.
1294 Entretanto, quando a progênie de matrizes criadas em conforto foram submetidas ao
1295 estresse na fase de crescimento, nós observamos maior expressão de *GSS* e *MSRA*, que
1296 pode ter contribuído para aumentar a capacidade antioxidante, e assim, manter os níveis
1297 de proteína carbonilada e de oxidação lipídica semelhantes as aves criadas em conforto.
1298 Esses resultados em conjunto indicam que o efeito do estresse térmico sofrido pela
1299 matriz pode potencializar os efeitos maléficos do estresse no ambiente futuro da
1300 progênie.

1301 De maneira geral, nossos resultados mostram que o estresse térmico vivenciado
1302 pela matriz, apesar de não apresentar efeitos negativos sobre o desenvolvimento e
1303 desempenho da progênie criada em conforto térmico, está associado com menor
1304 desempenho e maior nível de oxidação proteica quando a progênie também é submetida
1305 à condição de estresse. Esses resultados podem ser devidos a menor expressão de *MSRA*
1306 observada nas matrizes e em sua progênie quando submetidas ao estresse térmico.

1307

1308 **AGRADECIMENTOS**

1309 Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico
1310 e Tecnológico – CNPq (PROC.407669/2016-7), Brasil. Este estudo foi financiado em
1311 parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil
1312 (CAPES) - Código Financeiro 001. Este estudo foi em parte financiado pelo PROMOB
1313 - Programa de Estimulo a Mobilidade.

1314

1315 **REFERÊNCIAS**

- 1316 1. Rajkumar, U, Reddy, MR, Rama Rao, SV, Shanmugam, M. Evaluation of growth,
1317 carcass, immune response and stress parameters in Naked Neck chicken and their
1318 normal siblings under tropical winter and Summer. *Asian-Australasian Journal of*
1319 *Animal Sciences*. 2011; (24): 509-516.
- 1320 2. El-Tarabany, MS. Impact of temperature-humidity index on egg-laying
1321 characteristics and related stress and immunity parameters of Japanese quails.
1322 *International Journal of Biometrology*. 2015; 60(7): 957-964.
- 1323 3. Hosseini-Vashan, SJ, Golian, A, Yaghobfar, A. Growth, immune, antioxidant, and
1324 bone responses of heat stress-exposed broilers fed diets supplemented with tomato
1325 pomace. *International Journal of Biometrology*. 2015. doi: 10.1007/s00484-015-1112-9.

- 1326 4. Sharifi, AR, Horst, P, Simianer, H. The effect of naked neck gene and ambient
1327 temperature and their interaction on reproductive traits of heavy broiler dams. Poultry
1328 Science. 2010. doi: [10.3382/ps.2009-00593](https://doi.org/10.3382/ps.2009-00593).
- 1329 5. Quinteiro-Filho, WM, Rodrigues, MV, Ribeiro, A, Ferraz-De-Paula, V, Pinheiro,
1330 ML, Sá, LR, Ferreira, AJ, Palermo-Neto, J. Acute heat stress impairs performance
1331 parameters and induces mild intestinal enteritis in broiler chickens: role of acute
1332 hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation. Journal Animal Science. 2012. doi:
1333 [10.2527/jas.2011-3949](https://doi.org/10.2527/jas.2011-3949).
- 1334 6. Elnagar, AS, Sheideler, SE, Beck, MM. Reproductive hormones, hepatic deiodinase
1335 messenger ribonucleic acid, and vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive cells
1336 in hypothalamus in the heat stress-induced or chemically induced hypothyroid laying
1337 hen. Poultry Science. 2010. doi: [10.3382/ps.2010-00728](https://doi.org/10.3382/ps.2010-00728).
- 1338 7. Nawab, A, Ibtishama, F, Li, G, Kieser, B, Wu, J, Liua, W, Zhao, Y, Nawab, Y, Lid,
1339 K, Xiao, M, An, L. Heat stress in poultry production: Mitigation strategies to overcome
1340 the future challenges facing the global poultry industry. Journal of Thermal Biology.
1341 2018; (78): 131-139.
- 1342 8. Mujahid, A, Akiba, Y, Toyomizu, M. Olive oil-supplemented diet alleviates acute
1343 heat stress-induced mitochondrial ROS production in chicken skeletal muscle.
1344 American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.
1345 2009. doi: [10.1152/ajpregu.90974.2008](https://doi.org/10.1152/ajpregu.90974.2008).
- 1346 9. Gutteridge, J.M.C.; Mitchell, J. Redox imbalance in the critically ill. British Medical
1347 Bulletin. 1999; (55): 49-75.
- 1348 10. Ronsein, GE, Miyamoto, S, Bechara, E, Di Mascio, P. Oxidação de proteínas por
1349 oxigênio singlete: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações
1350 biológicas. Química Nova. 2006; (29): 563-568.

- 1351 11. Ozawa, M, Hirabayashi, M, Kanai, Y. Developmental competence and oxidative
1352 state of mouse zygotes heat-stressed maternally or in vitro. *Reproduction*. 2002; (124):
1353 683-689.
- 1354 12. Dixon, LM, Sparks, NHC, Rutherford, KMD. Early experiences matter: a review of
1355 the effects of prenatal environment on offspring characteristics in poultry. *Poultry*
1356 *Science*. 2016. doi: 10.3382/ps/pev343.
- 1357 13. Zimmer, C, Larriva, M, Boogert, NJ, Spencer, K. Transgenerational transmission
1358 of a stress-coping phenotype programmed by early-life stress in the Japanese quail.
1359 2017. doi: 10.1038/srep46125.
- 1360 14. Rostagno HS, Albino LFT, Donzele JL, Gomes PC, Oliveira RFM, et al. (2011)
1361 Brazilian tables for birds and pigs: composition of foods and nutritional requirements.
1362 3th. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, Brazil.
- 1363 15. Bastos, MS, Del Vesco, AP, Santana, TP, Santos, TS, Oliveira Junior, GM,
1364 Fernandes, RPM, Barbosa, LT, Gasparino, E. The role of cinnamon as a modulator of
1365 the expression of genes related to antioxidant activity and lipid metabolism of laying
1366 quails. *PloS One*. 2017; doi: [10.1371/journal.pone.0189619](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189619)
- 1367 16. Koppenol, A, Delezie, E, Wang, Y, Franssens, L, Willems, E, Ampe, B, Buyse, J,
1368 Everaert, N. Effects of maternal dietary EPA and DHA supplementation and breeder
1369 age on embryonic and post-hatch performance of broiler offspring. *Journal of Animal*
1370 *Physiology and Animal Nutrition*. 2015. doi: [10.1111/jpn.12308](https://doi.org/10.1111/jpn.12308)
- 1371 17. Lowry, OH, Rosebrough, NJ, Farr, AL, Randall, R. Protein measurement with the
1372 Folin phenol reagent. *Journal Biology*. 1951.
- 1373 18. Van der Waaij, EH, Van den Brand, H, Van Harendonk, JAM, Kemp, B. Effect of
1374 match or mismatch of maternal–offspring nutritional environment on the development
1375 of offspring in broiler chickens. *Animal*. 2011; 5(5). doi:10.1017/S1751731110002387

- 1376 19. Ayo, JO, Obidi, JA, Rekwot, PI. Effects of Heat Stress on the Well-Being, Fertility,
1377 and Hatchability of Chickens in the Northern Guinea Savannah Zone of Nigeria: A
1378 Review. International Scholarly Research Network. 2011. doi:10.5402/2011/838606.
- 1379 20. Song, Z, Liu, L, Sheikhamadi, A, Jiao, H, Lin, H. Effect of Heat Exposure on Gene
1380 Expression of Feed Intake Regulatory Peptides in Laying Hens. Journal of Biomedicine
1381 and Biotechnology. 2012. doi:10.1155/2012/484869.
- 1382 21. Dobson, H, Ghuman, S, Prabhakar, S, Smith, R. A conceptual model of the
1383 influence of stress on female reproduction. *Reproduction*. 2003; (125): 151-163.
- 1384 22. Anjun, MS, Sandhu, MA, Ur-Rahman, Z, Safdar, A. Circulating metabolic and
1385 reproductive hormone changes in laying hens kept under various heat-combating
1386 systems. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 2016. doi:10.3906/vet-
1387 1602-84.
- 1388 23. Rozenboim, I, Tako, E, Gal-Garber, O, Proudman, JA, Uni, Z. The Effect of Heat
1389 Stress on Ovarian Function of Laying Hens. *Poultry Science*. 2007; (86):1760-1765.
- 1390 24. Dantzer, R, Kelley, KW. Stress and immunity: an integrated view of relationships
1391 between the brain and the immune system. *Life Science*. 1989. doi: [10.1016/0024-
1392 3205\(89\)90345-7](https://doi.org/10.1016/0024-3205(89)90345-7).
- 1393 25. Donoghue, DJ, Krueger, BF, Hargis, BM, Miller, AM, El Halawani, M. Thermal
1394 Stress Reduces Serum Luteinizing Hormone and Bioassayable Hypothalamic Content of
1395 Luteinizing Hormone-Releasing Hormone in Hens. *Biology Reproduction*. 1989. doi:
1396 [10.1095/biolreprod41.3.419](https://doi.org/10.1095/biolreprod41.3.419).
- 1397 26. Attia, YA, El-Hamid, A, El-Hamid, EA, Abedalla, A, Berika, MA, Al-Harhi, MA,
1398 Kuck, O, Sahin, K, Abou-Shehema, B. Laying performance, digestibility and plasma
1399 hormones in laying hens exposed to chronic heat stress as affected by betaine, vitamin

1400 C, and/or vitamin E supplementation. SpringerPlus. 2016. doi: [10.1186/s40064-016-](https://doi.org/10.1186/s40064-016-3304-0)
1401 [3304-0](https://doi.org/10.1186/s40064-016-3304-0).

1402 27. Zhang, M, Zou, X, Li, H, Dong, X, Zhao, W. Effect of dietary g-aminobutyric acid
1403 on laying performance, egg quality, immune activity and endocrine hormone in heat-
1404 stressed Roman hens. Animal Science Journal. 2011. doi: [10.1111/j.1740-](https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2011.00939.x)
1405 [0929.2011.00939.x](https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2011.00939.x).

1406 28. Bin, P, Huang, R, Zhou, X. Oxidation resistance of the sulfur amino acids
1407 methionine and cysteine. BioMed Research International. 2017. doi:
1408 <https://doi.org/10.1155/2017/9584932>.

1409 30. Zhu, YW. Li, WX, Lu, L, Zhang, LY, Ji, C, Lin, X, Liu, HC, Odle, J, Luo, XG.
1410 Impact of maternal heat stress in conjunction with dietary zinc supplementation on
1411 hatchability, embryonic development, and growth performance in offspring
1412 broilers. Poultry Science. 2017. doi: [10/3382/ps/pew481](https://doi.org/10.3382/ps/pew481).

1413 31.

1414 32. Bertin, A, Chanson, M, Delaveau, J, Mercierand, F, Mostl, E, Calandreau, L,
1415 Arnould, C, Leterrier, C, Collin, A. Moderate Heat Challenge Increased Yolk Steroid
1416 Hormones and Shaped Offspring Growth and Behavior in Chickens. PloS One. 2013.
1417 doi: [10.1371/journal.pone.0057670](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057670) .

1418 31. Zulkifli, I, Liew, PK, Israf, DA, Omar, AR, Hair-Bejo, M. Effects of early age feed
1419 restriction and heat conditioning on heterophil/lymphocyte ratios, heat shock protein 70
1420 expression and body temperature of heat-stressed broiler chickens. Journal of Thermal
1421 Biology. 2003; (28): 217-222.

1422 30. Jenmalm, MC. Childhood Immune Maturation and Allergy Development:
1423 Regulation by Maternal Immunity and Microbial Exposure. American Journal of
1424 Reproductive Immunology. 2011. doi: [10.1111/j.1600-0897.2011.01036.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2011.01036.x).