

## EXPRESSÃO GÊNICA DE IGF-I E GHR NO FÍGADO E MÚSCULO DO PEITO DE CODORNAS DE CORTE SUPLEMENTADAS COM DIFERENTES NÍVEIS DE METIONINA EM DUAS GERAÇÕES SUCESSIVAS

RAQUEL PILLON DELLA-FLORA<sup>1</sup>; LETÍCIA BENITEZ<sup>2</sup>; SUZANE FREITAS<sup>2</sup>; JERUSA MARTINS GERMANO<sup>2</sup>; ARIANE GONÇALVES GOTUZZO<sup>2</sup>; NELSON JOSÉ LAURINO DIONELLO<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – quelpillon@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas– dionello@ufpel.edu.br

### 1. INTRODUÇÃO

A exploração comercial das codornas de corte após a modernização da produção animal encontra-se em expansão. Novos estudos levaram à percepção de que não só alguns nutrientes são essenciais, mas que suas quantidades específicas também são muito importantes (MUTCH *et al.*, 2005). Características produtivas como taxa de ganho de peso diário e composição do ganho de peso (proteína e gordura) também são influenciadas por outros mecanismos biológicos além da alimentação. Entre estes, estão os hormônios relacionados ao crescimento, como o fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I) e o receptor do hormônio do crescimento (GHR).

A composição nutricional da dieta pode influenciar a fisiologia e a expressão de vários genes, tornando as aves mais ou menos eficientes em converter os alimentos em crescimento corporal. A metionina é o primeiro aminoácido limitante para codornas de corte, devido à composição dos alimentos utilizados em suas dietas e em função da grande exigência das aves por este aminoácido para deposição de músculos e penas.

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

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

### 2. METODOLOGIA

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Ensino e Experimentação Zootécnica Prof. Dr. Renato Rodrigues Peixoto, do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Pelotas, sendo aprovado pelo comitê de ética (CCEA 2618-2014). O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado, dividido em duas etapas. A primeira (G1), com três tratamentos de cinco repetições cada, onde o primeiro tratamento (G1T1) refere-se à dieta basal (controle), sem

adição de metionina industrial, fornecendo um teor de metionina+cistina digestível de 0,67% aos animais. O segundo (G1T2) teve a inclusão de DL-metionina, atendendo às exigências da espécie nesta fase, cuja suplementação forneceu 0,84% de metionina-cistina digestível; e o terceiro (G1T3), instituído com 20% a mais de suplementação de metionina, com um total de 1,04% de metionina+cistina. A segunda etapa (G2) contou com cinco tratamentos de cinco repetições cada, onde o primeiro tratamento (G2T1) foi composto por filhas da G1T1 recebendo a dieta basal; o segundo (G2T2) consistiu de filhas da G1T2 com suplementação de metionina atendendo as exigências da espécie; o terceiro (G2T3) de filhas da G1T3 recebendo 20% a mais de suplementação de metionina; o quarto (G2T4) composto por filhas da G1T2 recebendo a dieta basal e o quinto (G2T5) de filhas da G1T3, recebendo também a dieta basal. Em todo período experimental as aves tiveram livre acesso à água e ração. A dieta, composta à base de milho e farelo de soja, apresentou 20,0% de PB e 2.900 de EM durante todo o período experimental. As rações isonutritivas foram formuladas de acordo com Rostagno *et al.* (2011), com exceção dos níveis de metionina + cistina. Ao final do período experimental, oito animais de cada tratamento foram eutanasiados e os tecidos do fígado e peito (*Pectoralis superficialis*) coletados e armazenados em RNA Holder® (BioAgency Biotecnologia, Brasil) à -20°C, até o momento da extração de RNA. Destes, quatro de cada tratamento foram utilizados para as análises de expressão gênica.

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

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

Para síntese do cDNA, foi utilizado o kit SuperScripTM III First-Strand Synthesis Super Mix (Invitrogen Corporation, Brasil) de acordo com as normas do fabricante. As análises de PCR em tempo real foram realizadas em equipamento Bio-Rad CFX Real-Time Thermocycler (Hercules, CA, USA) utilizando o fluoróforo SYBR® Green (Invitrogen).

Os *primers* utilizados nas reações foram desenhados pelo programa Perl primer v1.1.21 de acordo com as sequências dos genes *GHR* e *IGF-1* depositados no site [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Para controle endógeno foi usado o gene  $\beta$ -actina.

A quantificação relativa da expressão diferencial (QR) foi calculada utilizando o método de comparação de CT (comparative threshold cycle method) (Livack e Schmittgen, 2001), utilizando-se a equação  $QR = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ . O método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  foi utilizado para as análises onde as diferenças entre os grupos foram testadas usando o teste t-Student para dados não pareados (SAS, 2000). Todos os dados foram expressos na forma de média  $\pm$  DP, considerando-se diferenças significativas para valores de  $P < 0,05$ .

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Restrições de nutrientes na dieta materna causam grande impacto na metilação do DNA de genes importantes ou de regiões gênicas durante o

desenvolvimento fetal, resultando em um efeito aparente posterior (BIDLACK, RODRIGUEZ, 2012). Neste estudo observou-se que no terceiro tratamento, onde as duas gerações receberam metionina além da exigência nutricional para esta fase, a expressão gênica não diferiu dos outros tratamentos. Porém, no quinto tratamento, onde apenas a primeira geração recebeu maior suplementação houve uma expressão significativamente maior do *GHR* tanto no músculo como no fígado e também do *IGF-1* no músculo (Tabela.1). O *IGF-1* no fígado no tratamento quatro, onde as aves receberam conforme as exigências somente na primeira geração, também apresentou maior expressão gênica comparado com o tratamento dois que era o seu controle, onde as aves receberam a suplementação da metionina conforme as exigências nas duas gerações. Este resultado complementa a afirmação de FERREIRA *et al.* (2012), que observaram redução do consumo alimentar a partir do nível 0,96% de suplementação de metionina, devido ao fato de que a metionina em excesso torna-se tóxica para as aves. A metionina tem sido relatada como o aminoácido mais tóxico para aves quando ingerido em excesso (GRIMINGER, FISHER, 1968). Grande concentração de metionina também causa a diminuição do crescimento e da ingestão da dieta a níveis de três a quatro vezes abaixo do exigido. Seu excesso sofre oxidação que resulta na produção do sulfato, levando a uma acidose metabólica. Esta, por sua vez, pode contribuir para uma variedade de problemas nas aves, como baixa mineralização óssea e diminuição da espessura da casca (KLASING, 1998).

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

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

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

\*Na quantificação relativa do RNAmensageiro o Tratamento 1 tem média 1 e desvio padrão 0 <sup>1</sup> Músculo <sup>2</sup> Fígado

Neste estudo, como pode-se observar na Tabela 2 apesar dos tratamentos que receberam uma maior suplementação de metionina terem uma maior expressão do *IGF-1*, isto não interferiu significativamente no crescimento das aves. Porém, observa-se que as aves que nunca receberam metionina na dieta, tiveram um pior ganho de peso. Os resultados estão de acordo com PINTO *et al.* (2003) que também não observaram efeito dos aminoácidos sulfurosos sobre o peso final em codornas de postura. Nos níveis estudados não foi observada diferença nas variáveis consumo alimentar e conversão alimentar. Estes resultados são corroborados com os encontrados por FERREIRA *et al.*, (2012), que também não encontraram influência dos níveis de metionina+cistina total em codornas de corte sobre a conversão alimentar.

Tabela 2. Resultados de ganho de peso, consumo alimentar e conversão alimentar dos 21 aos 42 dias de idade em codornas de corte, na segunda geração, nos cinco tratamentos

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

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

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

#### 4. CONCLUSÕES

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

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIDLACK, W.R.; RODRIGUEZ, R.L. **Nutritional Genomics**. New York: CRC Press. 2012, 399p.
- FERREIRA, F.; CORRÊA, G.S.S.; CORRÊA, A.B. Teor de metionina + cistina total para codornas de corte do grupo genético EV2 durante o período de crescimento. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v.64, n.3, p.665-674, 2012.
- GRIMINGER, P., E FISHER, H. Methionine excess and chick growth. **Poult. Scie.**, v.47, pag.1271, 1968.
- KLASING, K.C. **Comparative avian nutrition**. New York: Cab International, 1998. 350p
- MUTCH, D. M.; WAHLI, W.; WILLIAMSON, G. Nutrigenomics and nutrigenetics: the emerging faces of nutrition. **The FASEB Journal**. Vol (19) 1602-1616, 2005.
- PFAFFL, M.W.A. New mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v.29, n.9, p.2002-2007, 2001.
- PINTO, R.; FERREIRA, A.S.; DONZELE, J.L. et al. Exigência de metionina mais cistina para codornas Japonesas em crescimento. **Rev. Bras. Zootec.**, v.32, p.1174-1181, 2003.
- ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L. et al. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 3. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2011. 252p.