

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**GLICEROL NA DIETA DE CODORNAS:
EXPRESSÃO DE mRNA DE GENES MITOCONDRIAIS E DE
CRESCIMENTO**

Autor(a): Stefânia Caroline Claudino da Silva
Orientador(a): Eliane Gasparino

MARINGÁ
Estado do Paraná
fevereiro - 2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**GLICEROL NA DIETA DE CODORNAS:
EXPRESSÃO DE mRNA DE GENES MITOCONDRIAIS E DE
CRESCIMENTO**

Autor(a): Stefânia Caroline Claudino da Silva
Orientador(a): Eliane Gasparino

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá Área de Concentração Produção Animal.

MARINGÁ
Estado do Paraná
fevereiro – 2012

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

S586g

Silva, Stefania Caroline Claudino da, 1985-
Glicerol na dieta de codornas : expressão de mRNA
de genes mitocondriais e de crescimento / Stefania
Caroline Claudino da Silva. -- Maringá, 2012.
46 f. : figs., tabs.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Eliane Gasparino.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia, 2012.

1. Codorna (*Coturnix coturnix* sp) - Crescimento
corporal. 2. Codorna (*Coturnix coturnix* sp) -
Estresse oxidativo. 3. Codorna (*Coturnix coturnix*
sp)- Fosforilação oxidativa. 4. Codorna (*Coturnix*
coturnix sp) - Metabolismo energético. I. Gasparino,
Eliane, orient. II. Universidade Estadual de
Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Pós-Graduação
em Zootecnia. III. Título.

CDD 21.ed. 636.6085

GVS-000408



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**GLICEROL NA DIETA DE CODORNAS: EXPRESSÃO
DO mRNA DE GENES MITOCONDRIAIS
E DE CRESCIMENTO**

Autora: Stefania Caroline Claudino da Silva

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Eliane Gasparino

TITULAÇÃO: Mestre em Zootecnia - Área de Concentração Produção
Animal

APROVADA em 02 de março de 2012.

Prof^ª Dr^ª Simone Eliza
Facioni Guimarães

Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro

Prof^ª Dr^ª Eliane Gasparino
(Orientadora)

“Não conheço nenhuma fórmula infalível para obter o sucesso, mas conheço uma forma infalível de fracassar: tentar agradar a todos.”

John F. Kennedy

Aos meus pais, Luzia e David, por plantarem este sonho em minha vida,
Aos meus irmãos, Rafael e Artur, por acreditarem na realização deste sonho,
Ao meu esposo, Alexander, por participar com muito esforço e perseverança.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir que este sonho fizesse parte de seus planos para mim.

Aos meus pais, irmãos e esposo, por serem meu pilar, meu sustento.

À minha orientadora, Eliane Gasparino, pela orientação e ensinamentos.

À Simara Márcia Marcato, pela coorientação, paciência e ensinamentos.

Às colegas Débora Marques Voltolini, Ana Paula Del Vesco e Liégie Alher Marques.

À minha amiga, Daniele Portela de Oliveira, que poderia facilmente ser chamada de irmã ou anjo da guarda, pessoa essencial nesta jornada.

À Universidade Estadual de Maringá, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia pela oportunidade de realização do curso.

À CAPES pela bolsa a mim concedida.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

STEFÂNIA CAROLINE CLAUDINO DA SILVA, filha de David Claudino da Silva e Luzia Oliveira Pinto da Silva, nasceu em 31 de julho de 1985, em Maringá no estado do Paraná.

Em janeiro de 2010, graduou-se em Zootecnia pela Universidade Estadual de Maringá, com defesa do trabalho intitulado “Frequência alélica e genotípica do gene DGAT1 em uma população de bovinos leiteiros”, sob orientação da Prof^ª. Dra. Eliane Gasparino.

Em março de 2010, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, em nível de mestrado, área de concentração “produção Animal”, realizando estudos na área de “Genética e Melhoramento Animal” na Universidade Estadual de Maringá.

Em Março de 2012, submeteu-se à defesa para obtenção do título de Mestre em Zootecnia, com a dissertação “Glicerol na Dieta de Codornas: Expressão de mRNA dos genes mitocondriais e de crescimento” sob orientação da Prof^ª. Dra. Eliane Gasparino e coorientação da Prof^ª. Dra. Simara Márcia Marcato.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
I. INTRODUÇÃO GERAL	
1. Glicerol.....	1
2. Coturnicultura.....	2
3. Eficiência alimentar e produção de ATP.....	3
4. Proteína desacopladora (UCP).....	5
5. Adenina nucleotídeo translocase (ANT).....	6
6. Citocromo c oxidase, subunidade III (COX III).....	7
7. Hormônio do crescimento (GH).....	8
8. Receptor do hormônio do crescimento (GHR).....	9
9. Fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-I).....	10
10. Literatura citada.....	12
II. OBJETIVOS GERAIS.....	18
III. EFEITO DO GLICEROL SOBRE A EXPRESSÃO DE mRNA DE GHR E IGF-I NO MÚSCULO DO PEITO DE CODORNAS DE CORTE	
1. Resumo	19
2. Introdução	20
3. Material e métodos.....	21
4. Resultados.....	23
5. Discussão	25
6. Conclusão	26
7. Referências.	27
IV. EXPRESSÃO DE MRNA DE GENES MITOCONDRIAIS ASSOCIADOS À DIETAS COM INCLUSÃO DE GLICEROL PARA CODORNAS DE CORTE AOS 28 DIAS DE IDADE	
1. Resumo	29
2. Introdução	30
3. Material e métodos.....	31
4. Resultados.....	34
5. Discussão	36
6. Conclusão	38

7. Referências..... ..	39
IV. Normas Revista Brasileira de Zootecnia	42

LISTA DE FIGURAS

	Página
I. EFEITO DO GLICEROL SOBRE A EXPRESSÃO DE mRNA DE GHR E IGF-I NO MÚSCULO DO PEITO DE CODORNAS DE CORTE	
Figura 1. Consumo total em grama (A) e conversão alimentar (B) de codornas alimentadas com rações contendo 0%, 8% e 12% de inclusão de glicerol até 28 dias de idade. As letras sobre as barras representam a comparação entre as médias. Letras diferentes representam diferença estatística ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey	24
Figura 2. Expressão do RNA mensageiro (mRNA) do fator de crescimento semelhante a insulina (A) e do receptor do hormônio do crescimento (B). Letras diferentes representam diferença estatística entre as médias de expressão dos mRNAs ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.....	24
II. EXPRESSÃO DE mRNA DE GENES MITOCONDRIAIS ASSOCIADOS A DIETAS COM INCLUSÃO DE GLICEROL PARA CODORNAS DE CORTE AOS 28 DIAS DE IDADE	
Figura 1. Consumo total em grama (A) e conversão alimentar (B) de codornas alimentadas com rações contendo 0%, 8% e 12% de inclusão de glicerol, até 28 dias de idade. As letras sobre as barras representam a comparação entre as médias. Letras diferentes representam diferença estatística ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.....	34
Figura 2. Expressão do RNA mensageiro da proteína desacopladora (A), citocromo c oxidase (B) e adenina nucleotídeo translocase (C). Letras sobre as barras representam a comparação entre as médias de expressão dos mRNAs. Letras diferentes representam diferença estatística ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.	35

LISTA DE TABELAS

	Página
I. EFEITO DO GLICEROL SOBRE A EXPRESSÃO DE mRNA DE GHR E IGF-I NO MÚSCULO DO PEITO DE CODORNAS DE CORTE	
Tabela 1. Composição centesimal da ração.....	22
II. EXPRESSÃO DE MRNA DE GENES MITOCONDRIAIS ASSOCIADOS A DIETAS COM INCLUSÃO DE GLICEROL PARA CODORNAS DE CORTE AOS 28 DIAS DE IDADE	
Tabela 1. Composição centesimal da ração.....	32

RESUMO

Este estudo foi realizado para avaliar a expressão do RNA mensageiro (mRNA) dos genes fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), receptor do hormônio do crescimento (GHR), adenina nucleotídeo translocase (ANT), citocromo c oxidase III (COX III) e proteína desacopladora (UCP), no músculo do peito de codornas com 28 dias de idade, alimentadas com dietas contendo 0, 8 e 12% de glicerol. O RNA total foi extraído (n = 10 por grupo) e cDNA amplificado usando *primers* específicos para qRT-PCR. A conversão alimentar (CA) e o consumo de ração (CR) também foram avaliados. A expressão de mRNA da UCP foi menor no grupo alimentado com 12% (0,026 UA) quando comparado com 0% (0,041 UA) e 8% de inclusão de glicerol na dieta (0,057 UA). Em contraste, a expressão de mRNA ANT e COX III foi maior no grupo alimentado com 12% de glicerol (ANT = 7,525UA; COX III = 0,863 UA), sem diferenças entre 0% (ANT = 5,572 UA; COX III = 0,357 UA) e 8% (ANT = 5,839UA; COX III = 0,415UA). A expressão do mRNA da UCP foi menor em codornas com pior CA, sendo que nestas mesmas codornas ANT e COX III foram maiores. As codornas alimentadas com ração suplementada com 8% e 12% de glicerol apresentaram maior expressão de mRNA do IGF-I, em relação àquelas sem glicerol na dieta, sendo que nível de 12% influenciou negativamente a expressão do mRNA do GHR. A inclusão de 8% de glicerol na dieta proporcionou resultados de desempenho de codornas semelhante àqueles observados para ração sem adição de glicerol, sugerindo que a inclusão de glicerol na dieta de codornas de corte pode influenciar a expressão de mRNA de genes mitocondriais e de crescimento no músculo do peito, além de promover mudanças na conversão alimentar e no consumo de ração. Considerando o desempenho e a expressão de mRNA de GHR, IGF-I, UCP, ANT e COX III no músculo do peito de codornas, a dieta com 8% de glicerol poderia ser usada sem maiores danos na alimentação de codornas com 28 dias de idade.

Palavras chave: Crescimento corporal, estresse oxidativo, fosforilação oxidativa, metabolismo energético.

ABSTRACT

This study was conducted to evaluate the expression of messenger RNA (mRNA) of insulin like growth factor-1 gene (IGF-1), growth hormone receptor (GHR), adenine nucleotide translocase (ANT), cytochrome c oxidase III (COX III) and uncoupling protein (UCP) in the breast muscle of quails with 28 days of age, fed diets containing 0, 8 and 12% glycerol. Total RNA was extracted (n = 10 per group) and cDNA amplified using specific primers by qRT-PCR. Feed conversion (FC) and feed intake (FI) were also evaluated. The mRNA expression of UCP was lower in the group fed with 12% of glycerol (0.026UA) when compared to the ones fed with 0% (0.041UA) and 8% glycerol (0.057UA). In contrast, expression of ANT and COX III mRNA in breast muscle was higher in the group fed with 12% of glycerol (ANT = 7.525UA; COX III = 0.863UA), with no differences in 0% (ANT = 5.572UA; COX III = 0.357UA) and 8% of glycerol (ANT 5.839UA; COX III = 0.415UA). The mRNA expression of UCP was lower in quails with worse FC and in these same quails ANT and COX III were higher. Quails fed with supplemented diets containing 8% and 12% of glycerol showed higher IGF-1 mRNA expression in relation to those in diets without glycerol and 12% level of glycerol in the diet negatively influenced GHR mRNA expression. The addition of 8% glycerol in the diet provided quails performance results similar to those observed in the diets without glycerol, suggesting that the inclusion of glycerol in the diet of meat quails can influence the expression of mRNA of mitochondrial and growth genes in breast muscle, besides promoting changes in feed conversion and feed intake. Considering the performance and expression of UCP, ANT and COX III mRNA in quails' breast muscle, the diet with 8% of glycerol could be used without further damages in the feed of quails at 28 days of age.

Key words: Body growth, energy metabolism, oxidative stress, oxidative phosphorylation.

INTRODUÇÃO

1. Glicerol

Em 1779, um novo poliálcool foi encontrado por Scheele durante o processo de saponificação de azeite de oliva, chamado de glicerol (composto bruto) ou glicerina (composto purificado), e novamente observado em 1858 por Pasteur, como um subproduto da fermentação alcoólica. O glicerol é subproduto da produção de biodiesel, obtido a partir da hidrólise dos ácidos graxos de óleos vegetais, como óleo de soja, pode ser encontrado em várias espécies e em grandes quantidades em óleos e gorduras (Morrison, 1994). É permitido como aditivo em alimentos, considerado como atóxico quando usado dentro dos limites de recomendação (Arruda et al., 2007).

No organismo animal, o glicerol possui grande importância no processo digestivo das gorduras, dada sua presença na molécula de mono e diglicerídios como requisito para a formação de micelas e posterior absorção (Raber et al., 2009). Uma vez absorvido, o glicerol é transportado para os tecidos ativos e convertido a gliceraldeído 3-fosfato, capaz de fornecer energia para o metabolismo celular através da via glicolítica (Guyton, 1991) ou oxidado para produção de energia, através da glicólise e ciclo do ácido cítrico (Brisson et al., 2001) que pode ser responsável por 60% do destino metabólico do glicerol em condições basais (Robergs & Griffin, 1998).

Considerado fundamental dentro de alguns sistemas metabólicos, o glicerol possui papel osmorregulador (Wang et al., 2001) além de participar do mecanismo de termorregulação do corpo, de resistência a altas temperaturas e de resposta na variação da glicemia (Yang et al., 1999). Em função do pequeno peso molecular, o glicerol é absorvido principalmente por difusão passiva pelo intestino e somente pequena

quantidade é absorvida por meio das micelas formadas pelos ácidos graxos de cadeia média e longa, juntamente com os ácidos biliares (Guyton, 1991).

Quando financeiramente rentável, o glicerol pode ser usado como um potencial substituto parcial do milho para alimentação animal (Cerrate et al., 2006), por apresentar valores energéticos semelhantes (3.434 kcal/kg), como observado por Dozier et al. (2008). O glicerol possui sabor adocicado e pequeno peso molecular (Rivaldi, 2008), influenciando o consumo de ração (Pasqueti, 2011).

A inclusão máxima recomendada de glicerol em dietas de codornas de corte até 14 dias de idade é de 10%, e de 15%, em codornas com 15 a 35 dias de idade (Pasqueti, 2011). Em frango de corte, o nível crítico recomendado é de 10%, sendo que a adição de valores superiores a essa recomendação podem ocasionar redução de desempenho (Cerrate et al., 2006), além de afetar o metabolismo dos triglicerídeos, induzindo a adaptações bioquímicas e fisiológicas (Dasari, 2007).

A inclusão elevada de glicerol nas dietas pode exceder a capacidade da enzima glicerol quinase, indicando saturabilidade do glicerol (Kato et al., 2005) e limitando sua absorção (Min et al., 2010). O glicerol não absorvido é excretado na urina (Dasari, 2007) e promove o aumento da taxa de passagem da digesta, comprometendo a utilização dos nutrientes (Gianfelici, 2009).

2. Coturnicultura

As codornas são originárias do norte da África, da Europa e da Ásia, pertencendo à família dos Fasianídeos (*Fasianidae*) e da sub-família dos *Perdicinidae*, sendo portanto, da mesma família das galinhas e das perdizes (Pinto et al., 2002). Os primeiros escritos a respeito dessa ave datam do século XII, e registram que elas eram criadas em função do seu canto, sendo os japoneses os primeiros a iniciarem estudos e cruzamentos entre as codornas, em 1910, a partir de matrizes providas da Europa, e de espécies selvagens, obtendo-se, assim, um tipo domesticado, que se determinou *Coturnix coturnix japonica*, ou codorna doméstica. A partir de então, iniciou-se a sua exploração, visando à produção de carne e ovos (Reis, 1980).

Em virtude do aumento do consumo mundial de carne, pesquisadores estão buscando alternativas que possam satisfazer as novas exigências de produtos de origem animal e, uma delas está relacionada à produção de codornas de corte (Mori et al., 2005). A criação comercial de codornas, a coturnicultura, é uma boa alternativa para a alimentação humana, sendo que seus principais produtos, a carne e os ovos, têm boa

aceitação do mercado consumidor. Tais características aliadas ao excepcional sabor de sua carne, responsável por iguarias finas e sofisticadas, além da rápida reversão de capital investido pelo criador, baixo investimento, utilização de pequenas áreas e baixos gastos com mão de obra, tornam a coturnicultura um setor promissor na produção zootécnica (Inforagro, 2011).

A coturnicultura para produção de carne é uma boa alternativa para obtenção de proteína de origem animal, pois suas instalações não necessitam de grandes investimentos, uma vez que este animal é pequeno e ocupa pouco espaço (Mori et al., 2005). A carne de codorna é aceita universalmente por ser um produto de excelente qualidade e rica em aminoácidos essenciais (Silva et al. 2009) e por apresentar baixa quantidade de gordura (Cunha, 2009).

3. Eficiência alimentar e produção de ATP

A fonte de energia do organismo provém dos nutrientes encontrados na alimentação. A energia adquirida através dos alimentos precisa ser transformada em trifosfato de adenosina (ATP) antes que possa ser aproveitada pelo organismo para as atividades de manutenção e de produção.

A eficiência alimentar pode estar relacionada com a eficiência na produção de energia pelas células. Animais com mitocôndrias menos eficientes na produção de ATP e conseqüentemente menor produção de energia, apresentam pior conversão alimentar (Parker et al., 2008). Esta menor eficiência mitocondrial pode ser resultado de vários fatores, como o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), danos no DNA mitocondrial, além de fatores genéticos pré existentes (Ojano-Diran, 2007). Este mesmo autor sugere ainda que maior produção de ROS e maior oxidação protéica são observadas consistentemente em aves com baixa eficiência alimentar, sugerindo que estes fatores podem alterar a expressão de genes mitocondriais

No processo de síntese de trifosfato de adenosina (ATP), a cadeia respiratória transporta prótons e elétrons através da membrana interna da mitocôndria para o espaço intermembranoso, criando um gradiente de prótons. No retorno dos prótons para a matriz mitocondrial, as proteínas ATP-sintases, numa reação acoplada, utilizam a energia para fosforilar o ADP (+ Pi) e sintetizar o ATP. Durante este processo, cinco complexos enzimáticos multiprotéicos da membrana mitocondrial interna estão envolvidos; são eles: NADH: ubiquinone reductase (complex I); succinate:ubiquinone reductase (complex II); ubiquinol:cytochrome c reductase (complex III);

ferrocytochrome c:oxygen oxidoreductase (complex IV); e ATP synthase (complex V) (Lehninger et al., 1993).

Os complexos são organizados de forma que a passagem de elétrons ocorre sucessivamente para estados de energia mais baixos (complexos I, II, III e IV, respectivamente) e tem comoceptor final de elétrons o oxigênio (Hirabara et al., 2007). A oxidação de substrato gera elétrons que são incorporados às moléculas de NAD^+ e FAD, formando NADH e FADH_2 , que por sua vez transportam e transferem seus elétrons aos complexos I e II, respectivamente, onde são transportados até o complexo IV, o qual reduz a molécula de O_2 , formando H_2O , com liberação de energia em cada passagem (Hirabara et al., 2007).

Esta energia liberada é utilizada para a translocação de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranoso pelos complexos I, III e IV, gerando um gradiente de prótons que é utilizado pelo complexo V para a síntese de ATP. Desta forma, a eficiência na síntese oxidativa de energia depende do grau de acoplamento entre a oxidação de substratos e a síntese de ATP. A coordenação entre os complexos da cadeia respiratória, necessário para eficiente produção de energia e assim para animais com maior eficiência alimentar, exige quantidade e atividade equilibrada entre os complexos, sendo que qualquer desequilíbrio pode provocar vazamento de elétrons e geração de ROS (Ojano-Diran, 2007).

Há vários compostos capazes de aumentar a permeabilidade da membrana mitocondrial a prótons, funcionando, desta forma, como desacopladores mitocondriais por criarem uma via paralela à passagem pela via da ATP sintase (Hirabara et al., 2007), como por exemplo, ácidos graxos de cadeia longa, que induzem o desacoplamento através de carreadores de prótons, como as UCPs (proteínas desacopladoras) e ANT (adenina nucleotídeo transferase) (Andreyev et al., 1989), tornando as mitocôndrias menos eficientes.

Mais recentemente, estudos foram conduzidos para avaliar as diferenças de eficiência alimentar dos animais com respeito a dois principais temas, sendo o primeiro relacionado com o transporte de elétrons e de prótons pelos complexos protéicos (I, II, III, IV e V) da cadeia transportadora de elétrons (Bottje & Carstens, 2009; Krueger et al., 2008). Estes trabalhos sugerem que animais com maior consumo de ração residual, possuem falha no transporte de elétrons/prótons, reduzindo a eficiência de produção de ATP pelas mitocôndrias, o que influencia negativamente a conversão alimentar.

Animais com maior turnover protéico, possuem maior expressão de enzimas proteolíticas (ubiquitin, m-calpain e atrogin-1/MAFbx) que aumentam a degradação de proteínas corporais, o que piora o ganho de peso e, conseqüentemente, a conversão alimentar (Dehoux et al., 2003; Gomes et al., 2001).

4. Proteína desacopladora (UCP)

As UCPs localizam-se na membrana mitocondrial interna e têm função de translocação dos prótons e elétrons, desviando a energia de síntese de ATP, para a produção de calor catalisado por um vazamento de prótons (Ledesma et al., 2002).

A UCP fornece uma rota alternativa para os prótons, que não através da ATP sintase (Vidal-Puig et al., 2000), e sua ativação reduz a produção de ATP, produzindo calor a partir da energia não aproveitada para a fosforilação do ADP (Boschini & Garcia Júnior, 2005), promovendo de maneira indireta uma maior oxidação de substratos energéticos, com implicações na regulação da temperatura, do gasto energético e do peso corporal (Harrold et al., 2000).

Fleury et al. (1997) identificaram uma nova isoforma da UCP denominada UCP2. Sua função fisiológica tem relação com a regulação do metabolismo, da termogênese induzida pela dieta e controle do peso corporal (Ricquier & Bouillaud, 2000). Neste mesmo ano, Boss et al. (1997) também identificaram outra isoforma de UCP, chamada de UCP3. Esta, por sua vez, é expressa especificamente no tecido muscular e no tecido adiposo marrom, e está relacionada com o consumo de substratos energéticos e também com o controle do peso corporal, sendo regulada pela disponibilidade e pelo metabolismo de substratos energéticos como lipídios e glicose (Tsuboyama-Kasaoka & Ezaki, 2001).

Em meados de 2001, uma nova proteína chamada proteína desacopladora aviária (avUCP), que apresenta 71 a 73% de homologia com ambos os UCP2 e UCP3, foi identificada em músculos esqueléticos de frango (Raimbault et al., 2001; Toyomizu et al., 2002). A avUCP tem sido descrita como um agente que possibilita a redução da produção de ROS, por causar um leve desacoplamento na produção de ATP (Abe et al., 2006). A exposição de frangos jovens ao calor estimula a produção de superóxido mitocondrial através da sub regulação da avUCP, entretanto, frangos com expressão avUCP persistente são relativamente mais adaptados a altas temperaturas (Mujahid et al., 2006). Sendo assim, pode-se supor que a expressão adequada de UCP pode aliviar a

superprodução de superóxido mitocondrial e poderia ajudar a adaptação ao estresse oxidativo quando as aves estão expostas ao estresse térmico agudo.

Embora a UCP tenha o efeito benéfico de evitar danos ao DNA e às proteínas celulares, uma vez que reduzem a produção de radicais livres, observa-se que maior expressão do mRNA UCP pode piorar a conversão alimentar, já que pode reduzir a produção de ATP (Ojano-Dirain et al., 2007).

5. Adenina nucleotídeo translocase (ANT)

ANT é um complexo de proteínas de duas subunidades que está localizada na membrana mitocondrial interna e facilita a troca de ATP e ADP do citosol. ANT proporciona um fornecimento contínuo de ADP necessário para manter o processo de fosforilação oxidativa (Ojano-Dirain et al., 2007). Portanto, o ANT possui a função de aumentar a quantidade de ADP para ser transformado em ATP por ação da ATP sintase.

A função mitocondrial pode ser prejudicada pela incapacidade de troca do ADP/ATP entre citosol e membrana, assim pode ser que haja alguma ligação entre a expressão do ANT com a expressão do fenótipo da eficiência alimentar (Bottje et al., 2002). Ojano-Dirain et al. (2007) relataram que aves com menor expressão de ANT tiveram pior conversão alimentar em função da menor eficiência em produzir ATP.

Em humanos, quatro isoformas do ANT foram identificadas (ANT1, ANT2, ANT3 e ANT4), que apresentam diferentes padrões de expressão tecido específico. O ANT1 é predominantemente expresso no coração, músculo esquelético e cérebro. ANT2 é predominantemente expresso no fígado e nas células com maior atividade proliferativa. ANT3 é detectado em todos os tecidos. ANT4 é expresso no fígado, testículos, e células-tronco embrionárias indiferenciadas (Dolce et al., 2005).

Além da função principal da ANT de facilitar a troca ATP / ADP através da membrana interna mitocondrial, em estados onde a atividade de translocase ATP / ADP é prejudicada, ANT desempenha um papel importante na promoção de apoptose (Won et al., 2010). Assim como a UCP, evidências sugerem que ANT também é um desacoplador mitocondrial e é responsável pelo desacoplamento basal ou vazamento de prótons (Boudina & Abel, 2006).

O ANT, assim como as UCPs, também está envolvido no mecanismo de desacoplamento induzido por ácidos graxos livres (Skulachev, 1998) e tem como inibidor específico a carboxiatractilato (CAT) (Komelina & Amerkhanov, 2010; Klingenberg, 2008). Em exposição ao frio, o ANT é responsável pela maior parte do

desacoplamento de termorregulação em mitocôndrias do músculo de ratos (Simonyan & Skulachev, 1998). Além do CAT, o ANT tem como outro provável inibidor o GDP que supostamente inibe o transporte de ADP por um mecanismo competitivo, uma vez que a inibição da respiração pelo GDP aumenta à medida que a concentração de ADP diminui (Komelina & Amerkhanov, 2010).

6. Citocromo c oxidase, subunidade III (COX III)

O COX também está presente na cadeia transportadora de elétrons e relacionado com a eficiência da fosforilação oxidativa. O COX é uma subunidade do complexo protéico IV da mitocôndria composto por: citocromo c, três íons cobre divididos em dois grupos (Cu A /Cu A e Cu B nas formas cúprica oxidada e cuprosa reduzida) responsável pelo bombeamento de prótons e pelo transporte de elétrons.

A citocromo c oxidase é o último complexo protéico da cadeia transportadora de elétrons (Calhoun et al., 1994). Em mamíferos, a enzima tem uma estrutura bastante complexa, contendo 13 subunidades, dois grupos hémicos e diversos outros cofactores metálicos (Tsukihara et al., 1996). Esta enzima catalisa a reação final da cadeia de transporte de elétrons, oxidando o citocromo c e transferindo elétrons para o oxigênio, ao mesmo tempo em que bombeia prótons através da membrana (Yoshikawa et al., 2006).

O COX possui grande relevância na eficiência energética mitocondrial (Scheffler, 1999) e uma menor expressão deste gene pode ocorrer devido à menor eficiência celular ou maior dano oxidativo devido à produção de ROS (Kemp et al., 2003).

Três grandes subunidades, COX I, II, e III, são codificadas por DNA mitocondrial e sintetizados na mitocôndria, enquanto outras pequenas subunidades são codificadas por DNA nuclear, traduzidas no citosol, e importadas para dentro da mitocôndria onde todas as subunidades se unem para formar o complexo maduro citocromo c oxidase (Attardi & Schatz, 1988). COX I e II pertence ao núcleo catalítico que é fundamental para a montagem e o funcionamento do complexo. A função de COX III ainda não é bem clara (Changgong et al., 2009). Foi sugerido que COX III, que é uma proteína hidrofóbica, que pode estar envolvida na flexibilidade e/ou estabilidade do complexo (COX) (Meunier & Taanman, 2002), não sendo este fundamental para a bomba de prótons, por não estar envolvido no mecanismo de translocação (Haltia et al., 1991). Foi também demonstrado que COX III está envolvido com o estresse oxidativo (You et al., 2002).

7. Hormônio do crescimento (GH)

O melhoramento genético proporcionou grande melhora no desempenho de aves nas últimas décadas (Havenstein et al., 2003). Com respeito à evolução genética observada neste período, pode-se dizer que a seleção de aves e outros animais como suínos e bovinos em função da melhor conversão alimentar (eficiência com que os alimentos são convertidos em massa muscular) foi fundamental para obter animais com menor consumo residual de ração (Bottje & Carstens, 2009; Krueger et al., 2008).

Estudos têm mostrado que animais menos eficientes em converter os alimentos em peso corporal podem apresentar alterações na atividade de bomba de sódio e potássio, na expressão de genes da cadeia transportadora de elétrons, alterações nas concentrações de hormônios importantes como IGF-I, GH, GHR, tiroxina, triiodotironina e corticosterona. Todos estes fatores podem influenciar a utilização dos nutrientes e o metabolismo basal, podendo alterar o gasto energético corporal e, conseqüentemente, influenciar o incremento calórico dos animais (Bottje & Carstens, 2009; Johnson et al., 2003).

O número de fibras musculares encontradas dentro de um músculo é de grande importância para o potencial de crescimento de um animal, e esse número é definido durante o desenvolvimento fetal, sendo possível manipular o número de fibras musculares do feto por fatores ambientais, entretanto, uma vez que essas fibras são formadas, os números não podem ser alterados, apenas seu tamanho pode sofrer alterações (Fahey et al., 2005). Os hormônios principais do eixo somatotrófico, hormônio do crescimento (GH), fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF-I e IGF-II), além das proteínas transportadoras e receptoras, atuam diretamente no controle do metabolismo (Renaville et al., 2002).

O GH tem ação metabólica e anabólica, estimulando o crescimento tecidual e alterando o metabolismo de vários nutrientes, podendo exercer uma ação inicial no metabolismo de carboidratos de maneira semelhante à insulina (Strobl & Thomas, 1994). Os mecanismos de ação do GH podem ser divididos em ações diretas e indiretas, sendo as diretas desencadeadas pelo reconhecimento e pela ligação específica ao seu receptor de membrana (GHR) nas células-alvo, e as indiretas mediadas principalmente pela regulação da síntese dos fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF), grandes mediadores dos efeitos anabólicos do GH, principalmente relacionados ao crescimento (Cruzat et al., 2008).

Os mecanismos de ação do GH têm certo grau de dependência com os níveis de IGF-1 (Groenewegen et al., 1990) podendo causar hipertrofia das fibras musculares com efeitos menores sobre a proporção das mesmas em animais adultos (Solomon, et al., 1990), porém aparentemente exercem pouco efeito sobre as dimensões das fibras e nenhum efeito sobre a proporção destas em animais jovens (Maltin et al., 1990).

A utilização de diferentes níveis de GH circulante proporciona aumento da síntese de fibras de colágeno e dos níveis de IGF-I, sem afetar a textura muscular, gordura intramuscular, força de cisalhamento, e efeito do encurtamento pelo frio (Vestergaard et al., 1995).

8. Receptor do hormônio do crescimento (GHR)

O GHR é uma glicoproteína transmembrânica de cadeia única com 620 aminoácidos que se expressa na superfície das células hepáticas, adiposas, renais, cardíacas, intestinais, pulmonares e musculares. O receptor do hormônio do crescimento é composto por três porções: uma porção extracelular constituída por 246 aminoácidos que se liga e é dimerizada por uma única molécula de GH, contém cinco sítios potenciais de “glicosilação” e sete resíduos-cisteína que permitem o estabelecimento de 3 pontes dissulfeto dentro da cadeia, formando pequenas alças de 10-15 aminoácidos, um segmento transmembrânico curto e uma porção intracelular de 350 aminoácidos que é requerida para a transmissão dos eventos intracelulares de sinalização estimulados pelo GH (Colosi et al., 1993).

O GH atua de forma direta, desencadeando respostas através do reconhecimento e ligação ao seu receptor específico de membrana (GHR) nas células-alvo. O GHR pertence à família dos receptores das citocinas/hematopoetinas (Barton et al., 1989) e formam um complexo com o GH, sofrendo dimerização, fato este essencial para a transdução do sinal intracelular, que se inicia a partir da fosforilação de um resíduo de tirosina, por meio de proteínas acopladas ao GHR, como a janus tirosina quinase 2 (JAK2) (Han et al., 1996). Uma vez que o GHR está fosforilado, diversas proteínas intracelulares podem se ligar a ele, resultando em fosforilação das mesmas (Strobl & Thomas, 1994), e posteriormente, transmitem o sinal do GH dentro da célula (Gent et al., 2003).

Esta sinalização promove a ativação de diversas proteínas intracelulares, que são intermediárias das ações do GH (Kopchick & Andry, 2000). A expressão do mRNA do GHR, em alguns casos, pode estar relacionada com o estado nutricional e fisiológico

do animal (Lucy et al., 1998; Kobayashi et al., 1999) sendo que a capacidade de resposta ao GH nas células-alvo é principalmente dependente da expressão GHR (Talamantes & Ortiz, 2002).

Entre os principais fatores celulares ativados pelo GH estão a família de proteínas conhecidas como STAT (signal transducer and activator of transcription ou transdutor de sinal e ativador da transcrição) que, após fosforilação, também sofrem dimerização e migram para o núcleo da célula para regular a expressão dos genes alvos do GH (Han et al., 1996).

A expressão do GHR, que modula a síntese o IGF-I sob o controle do GH, é detectado em maior abundância no fígado, sendo que as três variantes mais expressas neste órgão são GHR 1A, GHR 1B e GHR 1C, responsáveis por 50, 35 e 15% do mRNA de GHR total respectivamente (Jiang & Lucy, 2001). Além disso, a expressão do GHR é diminuída em estado de redução de energia nutricional (Dauncey et al., 1994; Weller et al., 1994), entretanto, estados de restrição protéica apresentam pouco efeito sobre sua expressão (Straus & Takemoto, 1990). O GHR também está relacionado com o desenvolvimento fetal, sendo que sua expressão se mostra aumentada nos indivíduos que apresentam maior desenvolvimento muscular (Listrat et al., 2005; Tajika et al., 2008).

De modo geral, o aumento da taxa de crescimento, seja pela disponibilidade de energia ou ingestão de proteínas, é associado com o aumento da expressão do GHR no fígado e redução de expressão no músculo e tecido adiposo, sendo que a administração de glucose, como fonte de energia, aumenta a expressão de GHR em hepatócitos de suínos (Brameld et al., 1996).

9. Fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I)

Os IGFs são secretados por tecidos envolvidos no processo de crescimento tecidual e corporal, e além da atividade de regular o crescimento ainda apresentam ação mitogênica. Essas substâncias modulam o crescimento de forma autócrina, parácrina ou endócrina e participam da retroalimentação do hormônio de crescimento (GH) pelo eixo hipotálamo-hipófise. Além disso, o IGF-I estimula a síntese protéica e age como mediador do GH, promovendo o crescimento corporal através da diferenciação celular de condroblastos, fibroblastos e mioblastos (Gomes & Tirapegui, 1998).

Dois tipos de IGFs (IGF-I e IGF-II) foram identificados em várias espécies de animais, e são diferenciados entre si pelos fatores específicos que os regulam (Tollefsen

et al., 1989). Também chamados de somatomedinas (A e C), são peptídeos de estrutura e função semelhante à insulina. Esses peptídeos atuam na captação de glicose e aminoácidos para as células. Assim, em maiores níveis circulantes estimula a síntese protéica e diminui a degradação de proteínas. O gene IGF-1, também conhecido como somatomedina C, está envolvido nos efeitos do GH, atuando no desenvolvimento pós-natal (Grochowska et al., 2001). O GH estimula a produção local de IGF-1. O IGF-1 pode estimular o crescimento da cartilagem e crescimento longitudinal dos ossos (Isaksson et al., 1985).

O IGF-1 já foi descrito como capaz de agir na prevenção da perda da função muscular associada ao envelhecimento (Musaro et al., 2001) e de promover a hipertrofia muscular através do aumento da síntese protéica (Lee et al., 2004).

O IGF-I pode ser correlacionado positivamente à taxa de ganho de peso vivo e à eficiência alimentar, podendo exercer papel no metabolismo e na fisiologia do crescimento (Stick et al., 1998). Segundo Scanes (2009), o IGF-I possui um importante papel na taxa de crescimento de aves e quanto menor o nível de IGF-I encontrado, pior será o crescimento corporal. Tem-se observado maior síntese e menor degradação protéica em aves com maior nível de IGF-I plasmático, o que resulta em maior deposição de músculo esquelético nas aves (Conlon & Kita, 2002). A influência positiva do IGF-I sobre o músculo esquelético foi relatada por Sacheck et al. (2004). De modo geral, observa-se redução do nível do mRNA do IGF-I em aves sob jejum ou alimentadas com baixos níveis de energia ou proteína na dieta (Lauterio & Scanes, 1987), mostrando que a menor concentração de nutrientes reduziram o IGF-I das aves.

Literatura citada

- ABE, T.; MUJAHID, A.; SATO, K.; et al. Possible role of avian uncoupling protein in down-regulating mitochondrial superoxide production in skeletal muscle of fasted chickens. **FEBS Letters**, 580: 4815-4822, 2006.
- ANDREYEV, A.; BONDAREVA, T.O.; DEDUKHOVA, V.I.; et al. The ATP/ADP-antiporter is involved in the uncoupling effect of fatty acids on mitochondria. **Eur. J. Biochem.** 182:585–592. 1989.
- ARRUDA, P.V.; RODRIGUES, R.C.L.B.; FELIPE, M.G.A. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. **Revista Analytica**. N°26 Dezembro 2006/Janeiro 2007.
- ATTARDI, G.; SCHATZ, G. Biogenesis of mitochondria. **Annu. Rev. Cell Biol.** 4, 289-333. 1988.
- BARTON, D.E.; FOELLMER, B.E.; WOOD, W.I.; et al. Chromosome mapping of the growth hormone receptor gene in man and mouse. **Cytogenetics and Cell Genetics.** 50 137–141. 1989.
- BOSCHINI, R.P.; GARCIA JÚNIOR, J.R. Regulação da expressão gênica das UCP2 e UCP3 pela restrição energética, jejum e exercício físico **Rev. Nutr.**, Campinas, 18(6):753-764, nov./dez., 2005.
- BOSS, O.; SAMEC, S.; PAOLONI- GIACOBINO, A.; et al. Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissuespecific expression. **FEBS Lett.**, 408(1):39-42. 1997.
- BOTTJE, W.; CARSTENS, G. Association of mitochondrial function and feed efficiency in poultry and livestock species. **J. Anim. Sci.** 87:E48–E63. 2009.
- BOTTJE, W.; IQBAL, M.; TANG, Z.X.; et al. Association of mitochondrial function with feed efficiency within a single genetic line of male broilers. **Poult. Sci.** 81:546-555. 2002.
- BOUDINA, S.; ABEL, E.D. Mitochondrial uncoupling: a key contributor to reduced cardiac efficiency in diabetes. **Physiology** (Bethesda);21:250-8. 2006.
- BRAMELD, J.M.; GILMOUR, R.S.; BUTTERY, P.J. Glucose and Amino Acids Interact with Hormones to Control Expression of Insulin-Like Growth Factor-I and Growth Hormone Receptor mRNA in Cultured Pig Hepatocytes. **American Society for Nutritional Sciences**, p. 1208-1306. 1996.
- BRISSON, D.; VOHL, M.C; ST-PIERRE, J. et al. Glycerol: a neglected variable in etabolic process? In: **Bio Essays** v.23, p.534-542, 2001. ROBERGS, R.A.; GRIFFIN, S.E. Glycerol: Biochemistry, Pharmacokinetics and Clinical and Practical Applications. **Sports Medicine**, 3: 145-167, 1998.
- CALHOUN, M.; THOMAS, J.; GENNIS R. "The cytochrome oxidase superfamily of redox-driven proton pumps". **Trends Biochem Sci** 19 (8): 325–30. PMID 7940677. 1994.
- CERRATE, S.; YAN, F.; WANG, Z.; et al. Evaluation of glycerine from biodiesel production as a feed ingredient for broilers. **Int. J. Poult. Sci.** 11:1001–1007. 2006.
- CHANGGONG, W.U.; YAN, L.; DEPRE, C.; et al. Cytochrome c oxidase III as a mechanism for apoptosis in heart failure following myocardial infarction. **Am J Physiol Cell Physiol** 297: C928-C934, 2009.
- COLOSI, P.; WONG, K.; LEONG, S.R.; et al. Mutational analysis of the intracellular domain of the human growth hormone receptor. **Journal of Biological Chemistry** 268 12617–12623. 1993

- CONLON, M.A.; KITA, L. Muscle protein synthesis rate is altered in response to a single injection of insulin-like growth factor-I in seven-day-old Leghorn chicks. **Poult. Sci.** 81:1543-1547. 2002.
- CRUZAT, V.F.; DONATO JÚNIOR, J.; TIRAPEGUI, J.; et al. Hormônio do crescimento e exercício físico: considerações atuais. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. vol. 44, n. 4, out./dez., 2008.
- CUNHA, F.S.A. **Avaliação da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e subprodutos na alimentação de codornas (*Coturnix Japonica*)**. Tese (doutorado integrado em zootecnia: Área de concentração: Produção de não ruminantes) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Universidade Federal da Paraíba. Universidade Federal do Ceará, Pernambuco, 2009.
- DAUNCEY, M.J.; BURTON, K.A.; WHITE, P. Nutritional regulation of growth hormone receptor gene expression. **Faseb Journal**, v. 8, p.81-8, 1994.
- DEHOUX, M.J.; BENEDEN, R.P.; FERNANDEZ-CELEMIN, L.; et al. Induction of MafBx and Murf ubiquitin ligase mRNA in rat skeletal muscle after LPS injection. **FEBS Lett.**, 544:214-217. 2003.
- DOLCE, V.; SCARCIA, P.; IACOPETTA, D.; et al. A fourth ADP/ATP carrier isoform in man: identification, bacterial expression, functional characterization and tissue distribution. **FEBS Lett.**;579:633-7. 2005.
- DOZIER, W.A.; KERR, B.J.; CORZO, A.; et al. Apparent Metabolizable Energy of Glycerin for Broiler Chickens. **Poultry Science**. 87:317–322. 2008.
- FAHEY, A.J.; BRAMELD, J.M.; PARR, T.; et al. Ontogeny of factors associated with proliferation and differentiation of muscle in the ovine fetus. **Journal of Animal Science** 83(10):2330-2338. 2005.
- FLEURY, C.; NEVEROVA, M.; COLLINS, S.; et al. Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. **Nature Genet.**; 15(3): 269-72. 1997.
- GENT, J.; VAN DEN EIJNDEN, M.; VAN KERKHOF, P.; et al. Dimerization and signal transduction of the growth hormone receptor. **Molecular Endocrinol.**, v.17, p.967-975, 2003.
- GIANFELICI, M.F. **Uso de glicerol como fonte de energia para frangos de corte**. 2009. 129f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul/Faculdade de Agronomia, Porto Alegre, 2009.
- GOMES, M.D.; LECKER, S.H.; JAGOE, R.T.; et al. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 98:14440-14445. 2001.
- GOMES, M.R.; TIRAPEGUI, J. Relação entre o fator de crescimento semelhante a insulina(IGF-1) e atividade física. **Rev. bras. ativ. fis.saude**. v.3, n.4, p.66-76, abr, 1998.
- GROCHOWSKA, R.; SORENSEN, P.; ZWIERZCHOWSKI, L.; et al. Genetic variation in stimulated GH release and in IGF-I of young dairy cattle and their associations with the leucine/valine polymorphism in the GH gene. **J Anim Sci** 79:470-476. 2001.
- GROENEWEGEN, P.P.; McBRIDE, B.W.; BURTON, J.H. et al. Effect of bovine somatotropin on the growth rate, hormone profiles and carcass composition of Holstein bull calves. **Domestic Animal Endocrinology**, v.7, p.43-54, 1990.
- GUYTON, A.C. **Textbook of Medical Physiology**. W. B.Saunders Company, Philadelphia, PA. 1991.

- HALTIA, T.; SARASTE, M.; WIKSTROM, M. Subunit III of cytochrome c oxidase is not involved in proton translocation: a site-directed mutagenesis study. **EMBO J** 10: 2015-2021, 1991.
- HAN, Y.; LEAMAN, D.W.; WATLING, D.; et al. Participation of JAK and STAT proteins in growth hormone-induced signaling. **J. Biol. Chem.**, v.271, p.5947-5952, 1996.
- HARROLD, J.A.; WIDDOWSON, P.S.; CLAPHAM, J.C.; et al. Individual severity of obesity in unselected Wistar rats: relationship with hyperphagia. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**; 279(2): E340-E347. 2000.
- HAVENSTEIN, G.B.; FERKET, P.R.; QURESHI, M.A. Growth, livability, and feed conversion of 1957 versus 2001 broilers when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. **Poult. Sci.** 82:1500–1508. 2003.
- HIRABARA, S.M.; SILVEIRA, L.R.; CAMARGO, L.F.T.; et al. Efeito dos ácidos graxos no desacoplamento mitocondrial e na produção de óxido nítrico durante a contração muscular – uma hipótese. **R. bras. Ci e Mov.**; 15(2): 73-80. 2007.
- INFORAGRO - <http://inforagro.wordpress.com/2011/03/11/coturnicultura-mercado-em-expansao/#more-821>. Acesso em 02/12/2011.
- ISAKSSON, O.G.; EDEN, S.; JANSSON, J.O. Mode of action of pituitary growth hormone on target cells. **Annu Rev Physiol** 47:483–499. 1985.
- JOHNSON, D.E.; FERRELL, C.L.; JENKIN, T.G. The history of energetic efficiency research: Where have we been and where are we going? **J. Anim. Sci.** 81(E. Suppl. 1): E27–E38. 2003.
- KEMP, T. J.; CAUSTON, H.C.; CLERK, A. Changes in gene expression induced by H₂O₂ in cardiac myocytes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 307:416–421. 2003.
- KLINGENBERG, M. The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier. **Biochim Biophys Acta** 1778: 1978–2021. 2008.
- KOBAYASHI, Y.; BOYD, C.K.; BRACKEN, C.J.; et al. Reduced growth hormone receptor (GHR) messenger ribonucleic acid in liver of periparturient cattle is caused by a specific downregulation of GHR1A that is associated with decreased insulin-like growth factor I. **Endocrinology**. v. 140, p. 3947–54, 1999.
- KOMELINA, N.P.; AMERKHAPOV, Z.G. A comparative study of the inhibitory effects of purine nucleotides and carboxyatractylate on the uncoupling protein-3 and adenine nucleotide translocase. **Acta Biochimica Polonica**. Vol. 57, No 4/2010 413-419. 2010.
- KOPCHICK, J.J.; ANDRY, J.M. Growth hormone (GH), GH receptor, and signal transduction. **Mol Genet Metab** 71:293–314. 2000
- KRUEGER, W.K.; CARSTENS, G.E.; LANCASTER, P.A.; et al. Relationships between residual feed intake and apparent nutrient digestibility in growing calves. **J. Anim. Sci.** 86 (Abstract; In press). 2008.
- LAUTERIO, T.J.; SCANES, C.G. Time course of changes in plasma concentrations of the growth related hormones during protein restriction in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). **Proceeding Society Experiment Biology Medical**, v. 185, p. 420-26, 1987.
- LEDESMA, A.; LACOPA, M.G.; RIAL, E. The mitochondrial uncoupling proteins. **Genome Biol.** 3, 3015.1–3015.9 (Reviews). 2002.
- LEE, S.; BARTON, E.R.; SWEENEY, H.L.; et al. Viral expression of insulin-like growth factor-I enhances muscle hypertrophy in resistance-trained rats. **J. Appl. Physiol.** 96, 1097-1104. 2004.

- JIANG, H.; LUCY, M.C. Variants of the 5'-untranslated region of the bovine growth hormone receptor mRNA: isolation, expression and effects on translational efficiency. **Gene**, v.265, p.45-53, 2001.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Principles of biochemistry**. 2nd ed. Worth Publishers, 1993. New York, NY.
- LISTRAT, A.; HOCQUETTE, J.F.; PICARD, B.; et al. Growth hormone receptor gene expression in the skeletal muscle of normal and double-muscléd bovines during foetal development. **Reprod Nutr Dev**. 45(4):393-403. 2005
- LUCY, M.C.; BOYD, C.K.; KOENIGSFELD, A.T.; et al. Expression of somatotropin receptor messenger ribonucleic acid in bovine tissues. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 1889-1895, 1998.
- MALTIN, C.A.; DELDAY, S.M.; INNES, G.M. et al. Effects of bovine pituitary growth hormone alone or in combination with the β -agonist clenbuterol on muscle growth and composition in veal calves. *British Journal of Nutrition*, v.63, n.3, p.535-545, 1990.
- MEUNIER B.; TAANMAN J.W. Mutations of cytochrome c oxidase subunits 1 and 3 in *Saccharomyces cerevisiae*: assembly defect and compensation. **Biochim Biophys Acta** 1554: 101-107, 2002.
- MIN, Y.N.; YAN, F.; LIU, F.Z.; et al. Glycerin-A New Energy Source for Poultry. **International Journal of Poultry Science** 9 (1): 1-4, 2010.
- MORI, C.; GARCIA, E.A.; DAVAN, A.C.; et al. Desempenho e qualidade dos ovos de codornas de quatro grupos genéticos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.3, p.864-869, 2005.
- MORRISON L.R. Glycerol. In: **Encyclopedia of Chemical Technology**. New York: Wiley, pp. 921-932, 1994.
- MUJAHID, A.; SATO, K.; AKIBA, Y.; et al. Acute heat stress stimulates mitochondrial superoxide production in broiler skeletal muscle, possibly via down-regulation of uncoupling protein content. **Poult. Sci.** 85:1259-1265. 2006.
- MUSARO, A.; MCCULLAGH, K.; PAUL, A.; et al. Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. **Nat. Genet.** 27, 195-200. 2001.
- OJANO-DIRAIN, C.; TOYOMIZU, M.; WING, T.; et al. Gene expression in breast muscle and duodenum from low and high feed efficient broilers. **Poult. Sci.**, 86:372-381. 2007.
- PARKER, N.; AFFOURTIT, C.; VIDAL-PUIG, A.; et al. Energization-dependent endogenous activation of proton conductance in skeletal muscle mitochondria. **Biochem. J.**, 412:131-139. 2008.
- PASQUETTI, J.T. **Avaliação nutricional da glicerina bruta ou semipurificada, oriundas de gordura animal e óleo vegetal, para codornas de corte**. 2011. 110f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Estadual de Maringá/ Centro de Ciências Agrárias, Maringá, Paraná, 2011.
- RABER, M.R.; RIBEIRO, A.M.L.; KESSLER, A.M.; et al. suplementação de glicerol ou de lecitina em diferentes níveis de ácidos graxos livres em dietas para frangos de corte. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 3, p. 745-753, jul./set. 2009
- RAIMBAULT, S.; DRIDI, S.; DENJEAN, F.; et al. An uncoupling protein homologue putatively involved in facultative muscle thermogenesis in birds. **Biochem. J.** 353, 441-444. 2001.
- REIS, L.F.S.D. Codornizes, criação e exploração. Lisboa: **Agros**, 10, p.222, 1980.

- RENAVILLE, R.; HAMMADI, M.; PORTETELLE, D. Role of the somatotropic axis in the mammalian metabolism. **Domestic Animal Endocrinology**, v.23, n.2, p.351-360, 2002.
- RICQUIER, D.; BOUILLAUD F. Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance. **J Physiol**. 529(Pt1):3-10. 2000.
- RIVALDI, J.D.; SARROUB, B.F.; FIORILO, R. et al. Glicerol de Biodiesel. **Biocnologia Ciência e Desenvolvimento**. p.44-51, Ano x, n.37, 2007/2008.
- DASARI, M. Crude Glycerol Potential Described. **Feedstuffs**, October 15, 2007.
- KATO, T.; HAYASHI, Y.; INQUE, K. et al. Glycerol Absorption by Na-Dependent Carrier-Mediated Transport in the Closed Loop of the Rat Small Intestine. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. v.28, n.3 p.553-555, 2005.
- SACHECK, J.M.; OHTSUKA, A.; MCLARY, S.C. et al. IGF-I stimulates muscle growth by suppressing protein breakdown and expression of atrophy-related ubiquitin ligases, atrogin-1 and MuRF1. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, 287 E591–E601. 2004.
- SCANES, C.G. **Perspectives o the endocrinology of poultry growth and metabolism**. Gen. Comp. Endocrinol., 2009. 163:24-32.
- SCHEFFLER, I. Mitochondria. **Wiley-Liss Inc.**, New York. 1999.
- SILVA, R.M.; FURLAN, A.C.; TON, A.P.S.; et al. E. Exigências nutricionais de cálcio e fósforo de codornas de corte em crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.8, p.1509-1517, 2009.
- SIMONYAN, R.A.; SKULACHEV, V.P. Thermoregulatory uncoupling in heart muscle mitochondria: involvement of the ATP/ADP antiporter and uncoupling protein. **FEBS Lett** 436: 81-84. 1998.
- SKULACHEV, P.V. Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. **Biochim Biophys Acta** 1363:100-124. 1998.
- SOLOMON, M.B.; CAMPBELL, R.G.; STEELE, N.C. Effect of sex and exogenous porcine somatotropin on longissimus muscle fiber characteristics of growing pigs. **J. Anim. Sci.** 68:1176-1181. 1990.
- STICK, D.A.; DAVIS, M.E.; LOERCH, S.C.; et al. Relationship between blood serum insulin-like growth factor I concentration and postweaning feed efficiency of crossbred cattle at three levels of dietary intake. **J. Anim. Sci.** 76: 498-505.1998.
- STRAUS, D.S.; TAKEMOTO, C.D. Effect of fasting on insulin-like growth factor-I (IGF-I) and growth hormone receptor mRNA levels and IGF-I gene transcription in rat liver. **Mol Endocrinol** 4:91–100. 1990.
- STROBL, J.S.; THOMAS, M. J. Human growth hormone. **Pharmacol. Rev.**, v.46, p.1-34, 1994.
- TAJIKA, Y.; MURAKAMI, T.; SATO, M.; et al. VAMP2 is expressed in myogenic cells during rat development. **Developmental Dynamics** 237(7):1886 – 1892. 2008.
- TALAMANTES, F.; ORTIZ, R. Structure and regulation of expression of the mouse GH receptor . **Journal of Endocrinology** 175, 55–59. 2002.
- TOLLEFSEN, S.E.; LAJARA, R.; CLEMMONS, D.R.; et al. Insulin-like growth factors (IGF) in muscle development. Expression of IGF-I, the IGF-I receptor, and an IGF binding protein during myoblast differentiation. **J. Biol. Chem.** 264:13810–13817. 1989.
- TOYOMIZU, M.; UEDA, M.; SATO, S.; et al. Cold-induced mitochondrial uncoupling and expression of chicken UCP and ANT mRNA in chicken skeletal muscle. **FEBS Lett**. 529:313–318. 2002.
- TSUBOYAMA-KASAOKA, N; EZAKI, O. Mitochondrial uncoupling proteins 3 (UCP3) in skeletal muscle. **Front Biosc.**; 1(6):570-4. 2001.

- TSUKIHARA, T.; AOYAMA, H.; YAMASHITA, E.; et al. "The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å.". **Science** 272 (5265): 1136–44. PMID 8638158. 1996.
- VESTERGAARD, M.; PURUP, S.; HENCKEL, P. et al. Effects of growth hormone and ovariectomy on performance, serum hormones, insulin-like growth factor-binding proteins, and muscle fiber properties of prepubertal Friesian heifers. **Journal of Animal Science**, v.73, p.3574-3584, 1995.
- VIDAL-PUIG, A.J.; GRUJIC, D.; ZHANG, C.Y.; et al. Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice. **J Biol Chem** 275: 16258–16266. 2000.
- WANG, Z.X.; ZHUGE, J.; FANG, H.; et al. Glycerol production by microbial fermentation: A review. In: **Biotechnology Advances** v.19, p.201-223, 2001.
- WELLER, P.A.; DAUNCEY, M.J.; BATES, P.C. Regulation of porcine insulin-like growth factor I and growth hormone receptor mRNA expression by energy status. **American Journal of Physiology**. v. 266, p. 776- 85, 1994.
- WON, J.C.; PARK, J.Y.; KIM, Y.M.; et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1-alpha overexpression prevents endothelial apoptosis by increasing ATP/ADP translocase activity. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**;30:290-7. 2010.
- YANG, X.J.; KOW, L.M.; FUNABASHI, T. et al. Hypothalamic glucose sensor: similarities to and differences from pancreatic beta-cell mechanisms. **Diabetes**. 48:1763-1672, 1999.
- YOSHIKAWA, S.; MURAMOTO, K.; SHINZAWA-ITOH, K.; et al. "Proton pumping mechanism of bovine heart cytochrome c oxidase". **Biochim. Biophys. Acta** 1757 (9-10): 1110-6. PMID 16904626. 2006.
- YOU, K.R.; WEN, J.; LEE, S.T.; et al. Cytochrome c oxidase subunit III: a molecular marker for N-(4-hydroxyphenyl)retinamide-induced oxidative stress in hepatoma cells. **J Biol Chem** 277: 3870-3877, 2002.

OBJETIVOS GERAIS

O objetivo foi avaliar o efeito da inclusão de glicerol sobre a expressão de mRNA do receptor do hormônio do crescimento (GHR) e do fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I), e avaliar o efeito da inclusão de glicerol sobre a expressão de mRNA da adenina nucleotídeo translocase (ANT), citocromo c oxidase III (COX III) e proteína desaclopadora (UCP), sendo ambos no músculo do peito de codornas de 28 dias de idade.

Efeito do glicerol sobre a expressão de mRNA de GHR e IGF-I no músculo do peito de codornas de corte

Resumo: Este estudo foi conduzido para avaliar a expressão do RNA mensageiro (mRNA) dos genes do receptor do hormônio do crescimento (GHR) e fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) em codornas de corte de 28 dias de idade submetidas a tratamentos com 0%, 8% e 12% de inclusão de glicerol na ração em substituição ao milho. O RNA total foi extraído do músculo do peito e o cDNA amplificado com auxílio de *primers* específicos para os genes em estudo por meio de PCR em tempo real. Também foram avaliados a conversão alimentar (CA) e o consumo de ração (CR). As codornas alimentadas com rações suplementadas com 8% e 12% de glicerol apresentaram maior expressão de mRNA do IGF-I (0,058 UA e 0,048 UA, respectivamente, em relação àquelas sem glicerol na dieta (0,029 UA), sendo que o nível de 12% de glicerol diminuiu a expressão do mRNA do GHR (0,021 UA). A inclusão de 8% na dieta, proporcionou resultados de desempenho de codornas semelhante àqueles observados para ração sem adição de glicerol. Considerando o desempenho e a expressão dos genes GHR e IGF-I, a dieta com 8% de glicerol pode ser utilizada sem prejuízos na alimentação de codornas. De modo geral, observou-se que a inclusão de glicerol na dieta de codornas até 28 dias de idade afeta a expressão de mRNA de IGF-I e GHR.

Introdução

A utilização de subprodutos em dieta de animais de interesse zootécnico pode diminuir o custo de produção, e conseqüentemente aumentar a rentabilidade da atividade. Quando financeiramente rentável, o glicerol, um subproduto da indústria do biodiesel, pode ser usado como substituto parcial do milho para alimentação animal (Cerrate et al., 2006), por apresentarem valores energéticos semelhantes (3.434 kcal/kg), (Dozier et al., 2008). Absorvido de forma passiva (Guyton, 1991), o glicerol possui sabor adocicado e pequeno peso molecular (Rivaldi, 2008), influenciando o consumo de ração (Pasqueti, 2011).

Em codornas e frango de corte, a inclusão de glicerol na dieta pode afetar características de desempenho (Raber et al., 2009; Silva, 2010; Batista, 2010) além de influenciar a expressão do mRNA de alguns hormônios e receptores relacionados ao crescimento animal, como o GH (hormônio do crescimento), IGF-1 (fator de crescimento semelhante a insulina) e GHR (receptor do hormônio do crescimento) (Gasparino et al., 2012). Mudanças na expressão destes genes podem afetar também a utilização dos nutrientes e o metabolismo basal, podendo alterar o gasto energético corporal e conseqüentemente influenciar o incremento calórico dos animais (Bottje e Carstens, 2009; Johnson et al., 2003).

O GH tem ação metabólica e anabólica, estimulando o crescimento tecidual e alterando o metabolismo de vários nutrientes, podendo exercer uma ação inicial no metabolismo de carboidratos de maneira semelhante à insulina (Strobl & Thomas, 1994). Os mecanismos de ação do GH podem ser divididos em ações diretas e indiretas, sendo as diretas desencadeadas pelo reconhecimento e ligação específica ao seu receptor de membrana (GHR) nas células-alvo, e as indiretas mediadas principalmente pela regulação da síntese dos fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF), grandes mediadores dos efeitos anabólicos do GH, principalmente relacionados ao crescimento (Cruzat et al., 2008).

Desta forma, o presente trabalho foi desenvolvido com objetivo de avaliar o efeito da inclusão de glicerol sobre a expressão de mRNA do receptor do hormônio do crescimento (GHR) e do fator de crescimento semelhante a insulina 1 (IGF-1) no músculo do peito em codornas de corte até 28 dias de idade.

Material e métodos

O presente trabalho foi submetido e aprovado pelo comitê de ética, e conduzido no setor de avicultura e no laboratório de genética molecular da Universidade Estadual de Maringá. Foram utilizadas 450 codornas de corte de um dia de idade, distribuídas em delineamento inteiramente casualizado com três tratamentos (sem glicerol), inclusão de 8% e 12% de glicerol na ração), cinco repetições e 30 codornas por unidade experimental. Os animais foram alojados em galpão convencional, em boxes de 2,5m², os quais foram forrados por cama de casca de arroz. O programa de iluminação utilizado foi o contínuo durante todo o período experimental.

Foi utilizada uma ração controle (sem glicerol), uma formulação com e outra com inclusão 8% e 12% de glicerol, todas formuladas à base de milho e farelo de soja, conforme recomendações nutricionais de Rostagno et al. (2005) e NRC (1994), exceto a inclusão de glicerol (Tabela 1).

As codornas foram pesadas aos vinte e oito dias para determinação do ganho em peso corporal. A ração experimental e as sobras foram pesadas para cálculo do consumo de ração. A conversão alimentar foi calculada como a relação entre o ganho em peso e o consumo de ração. A mortalidade foi considerada para o cálculo de conversão alimentar. Dez codornas de cada tratamento foram abatidas por deslocamento cervical aos 28 dias de idade. Uma amostra do músculo peitoral (*Pectoralis superficialis*) destas aves foi coletada, acondicionada adequadamente em RNA Holder® (BioAgency) e armazenado a -20° C até o momento da extração de RNA.

O RNA total foi extraído com uso do reagente Trizol® (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) na proporção de 1 mL para cada 100 mg de tecido. O tecido muscular foi triturado com homogenizador elétrico até à completa dissociação. Posteriormente, foram adicionados 200 µL de clorofórmio e homogeneizado manualmente por um minuto. O tecido resultante foi centrifugado por 15 minutos a 12.000 rpms a 4°C, e a fase líquida coletada e transferida para tubo de ensaio, onde 500 µL de isopropanol foram adicionados. Após, o material foi homogeneizado, centrifugado por 15 minutos a 12.000 rpms, a 4°C. O material sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 75%. Posteriormente, o material foi centrifugado novamente a 12.000 rpms por 5 minutos, e o sobrenadante descartado. O material precipitado foi seco por 15 minutos e foi homogeneizado em água destilada e desmineralizada, livre de RNase.

A concentração do RNA total foi avaliada por meio de espectrofotômetro, em comprimento de onda de 260 nm. A integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose 1% e visualizado em luz ultravioleta.

Tabela 1. Composição centesimal da ração

Ingredientes (kg)	Glicerina bruta		
	0%	8%	12%
Milho grão	54,58	46,48	42,44
Farelo de soja 45%	37,84	39,37	40,13
Glicerina bruta	-	8,00	12,00
Óleo de soja	2,88	1,44	0,73
Fosfato bicálcico	1,61	1,63	1,64
L-Lisina HCL	0,65	0,84	0,82
DL-Metionina	0,66	0,66	0,67
L-Treonina	0,44	0,43	0,43
Sal comum	0,40	0,40	0,40
Suplemento vitamínico ¹	0,40	0,40	0,40
Calcário	0,28	0,26	0,26
Suplemento mineral ¹	0,07	0,07	0,07
Antioxidante ²	0,01	0,01	0,01
Composição nutricional			
Proteína bruta (%)	23,20	23,20	23,20
Cálcio (%)	0,61	0,61	0,61
Fósforo disponível (%)	0,41	0,41	0,41
Energia metabolizável (kcal/kg)	3.000	3.000	3.000
Metionina + cistina digestível (%)	1,33	1,33	1,33
Lisina digestível (%)	1,88	1,88	1,88
Treonina digestível (%)	1,14	1,14	1,14
Triptofano digestível (%)	0,28	0,28	0,28
Sódio (%)	0,18	0,31	0,37

¹Suplementação vitamínica/mineral (níveis de garantia por kg do produto); Vit. A – 4.500.000 UI; Vit. D3 – 1.250.000 UI; Vit. E – 4.000 mg; Vit. B1 – 278 mg; Vit. B2 – 2.000 mg; Vit. B6 – 525 mg; Vit. B12 – 5.000 mcg; Vit. K3 – 1.007 mg; Pantotenato de Cálcio – 4.000 mg; Niacina – 10.000 mg; Colina – 140.000 mg; Antioxidante – 5.000 mg; Zinco – 31.500 mg; Ferro – 24.500 mg; Manganês – 38.750 mg; Cobre – 7.656 mg; Cobalto – 100 mg; Iodo – 484 mg; Selênio – 127 mg; ²BHT (Butil Hidroxi Tolueno).

Para confecção do cDNA, foi utilizado o kit SuperScripTM III First-Strand Syntesis Super Mix (Invitrogen Corporation, Brasil). Foram adicionados 6 µL de RNA total, 1 µL de oligo (dT) (50 µM oligo(dT)) e 1 µL de tampão de anelamento (Annealing

buffer). A reação foi incubada por cinco minutos a 65°C e colocada sobre o gelo por um minuto. Posteriormente, foi adicionado 10 µL de solução 2x First-Strand Reaction Mix e 2 µL de solução contendo a enzima transcriptase reversa SuperScript III e inibidor de RNase. A solução foi incubada por 50 minutos a 50°C para a síntese do DNA complementar. A reação foi incubada novamente por cinco minutos a 85°C e imediatamente colocada sob gelo. As amostras foram armazenadas a -20°C até o momento das análises subsequentes.

Para as reações de PCR em tempo real, foi utilizado o composto fluorescente SYBR GREEN (SYBR® GREEN PCR Máster Mix (Applied Biosystems, USA).

Os *primers* dos genes GHR, IGF-I e β -actina foram desenhados de acordo com as seqüências depositadas no GeneBank (NM001001293.1, FJ977570.1 e L08165), utilizando-se o site www.idtdna.com. Todas as análises foram realizadas em um volume final de 25 µL e em duplicatas.

Os dados foram analisados utilizando-se o procedimento GLM do SAS (2000). O procedimento *univariate* foi utilizado para verificar a normalidade dos resíduos da expressão dos genes em estudo (expressos com $2^{-\Delta Ct}$) e dados de produção. Foi utilizado ANOVA com três tratamentos e dez repetições por tratamento (dietas sem, com 8% e 12% de inclusão de glicerol). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Resultados

O desempenho de codornas de um a 28 dias de idade, recebendo diferentes níveis de glicerol na ração é mostrado na Figura 1.

Não foi observado efeito significativo dos tratamentos sobre o ganho em peso, porém houve aumento significativo para o consumo de ração e conversão alimentar das codornas. O consumo de ração foi significativamente maior para o grupo de codornas que receberam ração com 12% de glicerol e não diferiu estatisticamente entre os grupos que receberam ração com 0% e 8%. O grupo de aves do tratamento com 12% apresentou pior conversão alimentar (2,34) em relação ao grupo de codornas que receberam ração sem glicerol (1,99). Isto representou em média uma piora de 14,59% na conversão alimentar das codornas na fase de crescimento estudada.

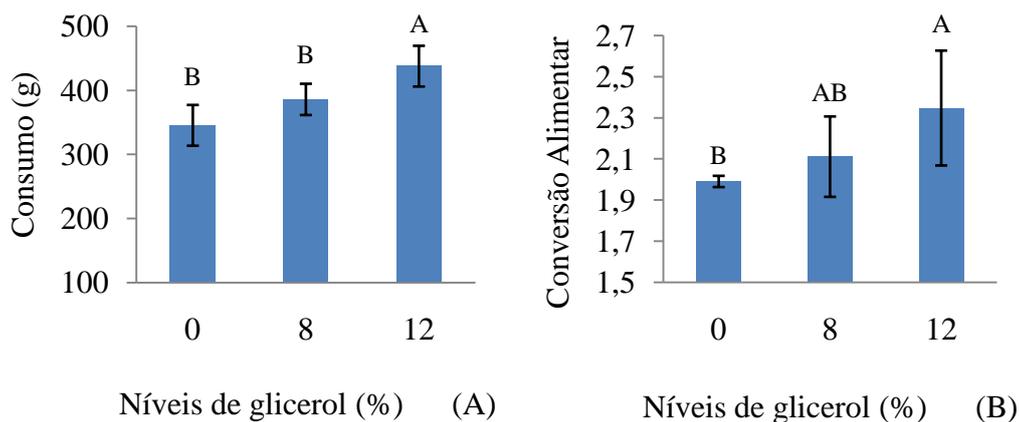


Figura 1. Consumo total em grama (A) e conversão alimentar (B) de codornas alimentadas com rações contendo 0%, 8% e 12% de inclusão de glicerol, para codornas aos 28 dias de idade. As letras sobre as barras (desvios-padrão) representam a comparação entre as médias. Letras diferentes representam diferenças estatísticas entre as médias ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

A composição das dietas também exerce forte efeito sobre a expressão de genes do eixo GH-IGF. Estudos mostram que a expressão do mRNA do IGF I e GHR no fígado e músculo dos animais pode ser alterada pela dieta fornecida em função dos níveis energéticos, protéicos e mesmo de substituição de ingredientes (Katsumata et al., 2002).

Neste estudo, a expressão do mRNA do GHR e IGF-I no músculo do peito (*Pectoralis superficialis*) de codornas de 28 dias de idade é mostrada na Figura 2.

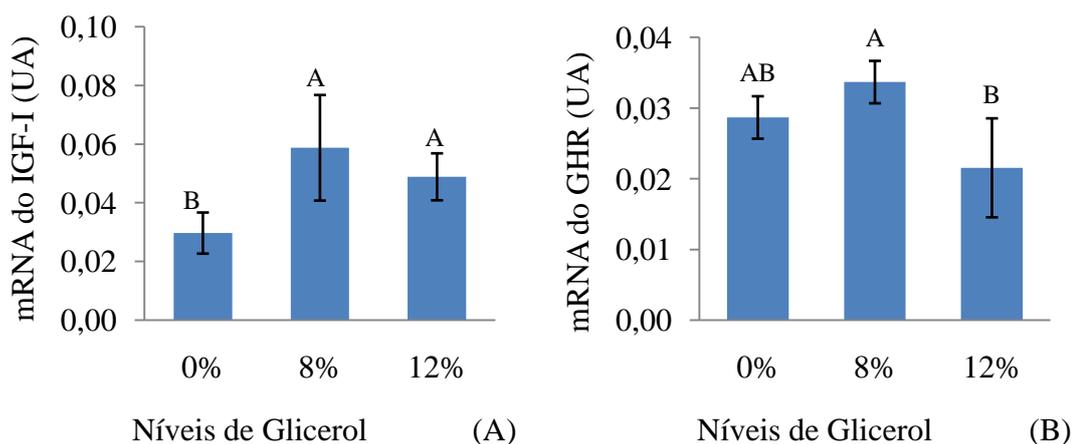


Figura 2. Expressão do RNA mensageiro (mRNA) do fator de crescimento semelhante a insulina (A) e do receptor do hormônio do crescimento (B). As letras sobre as barras (desvios-padrão) representam a comparação entre as médias. Letras diferentes representam diferenças estatísticas entre as médias ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Codornas alimentadas com ração suplementada com 12% de glicerol apresentaram expressão de mRNA do GHR no músculo do peito menor em relação às aquelas com 8% glicerol na dieta (0,021 vs 0,033), entretanto, quando comparados ao tratamento sem glicerol (0,028) a expressão do mRNA do GHR das codornas tratadas com 12% de glicerol não mostrou diferença significativa.

Os níveis de 8% e 12% de glicerol influenciaram a expressão do mRNA do IGF-I, que foi aumentada em 34% comparado com o tratamento sem glicerol. As aves do tratamento com 8% de glicerol tiveram a expressão de mRNA do IGF-I semelhante àquela observado para o grupo de 12% de glicerol.

De modo geral, o grupo de codornas que recebeu ração com 8% de glicerol apresentou maiores valores absolutos de expressão de mRNA tanto para o GHR quanto para o IGF-I.

Discussão

A inclusão dos níveis de glicerol avaliados neste estudo influenciou de maneira distinta a expressão dos genes avaliados, mostrando que pode existir influência destes nutrientes sobre a expressão de genes importantes no crescimento. Estas alterações na expressão desses genes podem explicar em parte os resultados obtidos no desempenho das aves.

De acordo com a literatura, o valor máximo recomendado de inclusão de glicerol em dietas de codornas de corte de 15 a 35 dias de idade é de 15% (Pasquetti, 2011). Entretanto, a inclusão de 12% de glicerol pode ter excedido a capacidade metabólica dos animais, limitado sua absorção (Min et al., 2010), sugerido a necessidade novos estudos para determinar a inclusão máxima de glicerol nessa faixa de idade. Além disso, a inclusão de glicerol, tanto 8% quanto 12%, promoveu aparente aumento de umidade na cama, sugerindo um aumento da taxa de passagem da digesta, comprometendo a utilização dos nutrientes (Gianfelici, 2009).

Os componentes da dieta alteram a concentração de GH e IGF-I circulante (Bernal et al., 2002). Os animais que receberam a dieta, contendo glicerol, apresentaram maiores valores de expressão de mRNA de IGF-1. O glicerol apresenta altas taxas de absorção intestinal, chegando a 89% de absorção em ratos, devido ao seu baixo peso molecular e por ser absorvido passivamente, em vez de formar uma micela, como observado para os ácidos graxos de cadeia média e longa (Guyton, 1991). Esta alta absorção aparentemente desencadeou um quadro de alta disponibilidade energética para os

animais que receberam dieta contendo glicerol, promovendo o aumento de expressão de mRNA de IGF-I, na tentativa de converter esta energia em crescimento, uma vez que estímulo do crescimento em resposta ao aumento no consumo de energia é regulado pelo aumento do IGF-I (Weller et al., 1994). Entretanto, tal crescimento não foi observado, provavelmente, pelo aumento da taxa de passagem da digesta observado nestes animais, e conseqüentemente, pelo menor aproveitamento dos outros componentes da dieta. Gasparino et al. (2012) observaram redução na expressão de IGF-I em codornas com 14 dias de idade que receberam ração com 12% de glicerol. Tal redução, não foi observada neste trabalho sugerindo que, aos 28 dias de idade, haja um possível mecanismo de adaptação dos animais à dieta com este nível de glicerol.

A capacidade de resposta ao GH nas células-alvo é principalmente dependente da expressão GHR (Talamantes & Ortiz, 2002). Desta forma, os níveis de mRNA de IGF-I observados em maior quantidade nos animais que receberam ração com 12% glicerol, podem ter diminuído os níveis de GH por meio de feedback negativo, reduzindo consecutivamente a necessidade e os níveis de mRNA de GHR nestes mesmo animais, de forma semelhante ao observado em estados de subnutrição, jejum ou absorção deficiente de nutrientes, onde ocorre uma redução de expressão de mRNA do GHR (Straus & Takemoto, 1990). Em contrapartida, os animais que receberam ração com 8% de glicerol apresentaram maior expressão de mRNA de GHR quando comparados aos animais que receberam 12%, sugerindo que a inclusão de 8% pode ser utilizada sem redução nos padrões de expressão de mRNA de GHR.

Analisando-se os resultados obtidos, é possível inferir que o nível de um nutriente ou o próprio nutriente, como a inclusão do glicerol em substituição ao milho, é capaz de ocasionar maior ou menor resposta na expressão gênica e afetar o desempenho dos animais. Considerando as recomendações de uso do glicerol na literatura, os resultados obtidos indicam que esse produto pode realmente ser utilizado nas rações para codornas, entretanto, um nível superior a 8% não seria recomendando.

Conclusão

A inclusão de glicerol na dieta de codornas de corte até 28 dias de idade promove alterações sobre a expressão de mRNA do receptor do hormônio do crescimento (GHR) e do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) no músculo do peito.

Referências

- BATISTA, E. **Avaliação nutricional do glicerol para codornas de corte**. 2010. 69f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Estadual de Maringá/ Centro de Ciências agrárias, Maringá, Paraná, 2010.
- BERNAL, F.E.M. ; FERRO, M.I.T. ; FERRO, J. A.; et al. Expressão de fatores hormonais envolvidos no crescimento de frangos de corte alimentados com diferentes níveis nutricionais. **ARS Veterinária**, Jaboticabal-SP, v. 18, n. 1, p. 94-99, 2002.
- BOTTJE, W.; CARSTENS, G. Association of mitochondrial function and feed efficiency in poultry and livestock species. **J. Anim. Sci.** 87:E48–E63. 2009.
- CERRATE, S.; YAN, F. ; WANG, Z.; et al. Evaluation of glycerine from biodiesel production as a feed ingredient for broilers. **Int. J. Poult. Sci.** 11:1001–1007. 2006.
- CRUZAT, V.F.; DONATO JÚNIOR, J.; TIRAPÉGUI, J.; et al. Hormônio do crescimento e exercício físico: considerações atuais. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. vol. 44, n. 4, out./dez., 2008.
- DOZIER III, W.A.; KERR, B.J.; CORZO, A.; et al. Apparent Metabolizable Energy of Glycerin for Broiler Chickens. **Poultry Science**. 87:317–322. 2008.
- GASPARINO, E. ; GUIMARÃES, S.E.F. ; MARTINS, E.N.; et al. Effect of glycerol on mRNA expression of growth hormone, insulin-like growth factor, and mitochondrial breast muscle genes of Japanese quails. **Poultry Science** (Print), 2012. (no prelo).
- GIANFELICI, M.F. **Uso de glicerol como fonte de energia para frangos de corte**. 2009. 129f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul/Faculdade de Agronomia, Porto Alegre, 2009.
- GUYTON, A.C. **Textbook of Medical Physiology**. W. B.Saunders Company, Philadelphia, PA. 1991.
- JOHNSON, D.E.; FERRELL, C.L. AND JENKIN, T.G. The history of energetic efficiency research: Where have we been and where are we going? **J. Anim. Sci.** 81(E. Suppl. 1): E27–E38. 2003.
- KATSUMATA, M.; KAWAKAMI, S.; KAJI, Y.; et al. Differential regulation of porcine hepatic IGF1 mRNA expression and plasma IGF-I concentration by a low lysine diet. **J. Nutr.** 132:688-692. 2002.
- MIN, Y.N.; YAN, F.; LIU, F.Z. et al. Glycerin-A New Energy Source for Poultry. **International Journal of Poultry Science** 9 (1): 1-4, 2010.
- NRC - NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirement of poultry**. 9th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC. 1994.
- PASQUETTI, J. T. **Avaliação nutricional da glicerina bruta ou semipurificada, oriundas de gordura animal e óleo vegetal, para codornas de corte**. 2011. 110f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Estadual de Maringá/ Centro de Ciências agrárias, Maringá, Paraná, 2011.
- RABER, M.R.; RIBEIRO, A.M.L.; KESSLER, A.M.; et al. suplementação de glicerol ou de lecitina em diferentes níveis de ácidos graxos livres em dietas para frangos de corte. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 3, p. 745-753, jul./set. 2009.
- RIVALDI, J.D.; SARROUB, B.F.; FIORILO, R. et al. Glicerol de Biodiesel. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. p.44-51, Ano x, n.37, 2007/2008.

- ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L.; et al. **Brazilian tables for poultry and swine: composition of feedstuffs and nutritional requirements**. 2 ed., Department of Animal Science. Viçosa Federal University, Viçosa, Minas Gerais, Brazil. 2005.
- STRAUS, D.S.; TAKEMOTO, C.D. Effect of fasting on insulin-like growth factor-I (IGF-I) and growth hormone receptor mRNA levels and IGF-I gene transcription in rat liver. **Mol Endocrinol** 4:91–100. 1990.
- STROBL, J.S.; THOMAS, M.J. Human growth hormone. **Pharmacol. Rev.**, v.46, p.1-34, 1994.
- TALAMANTES, F.; ORTIZ, R. Structure and regulation of expression of the mouse GH receptor . **Journal of Endocrinology** 175, 55–59. 2002.
- WELLER, P.A.; DAUNCEY, M.J.; BATES, P.C. Regulation of porcine insulin-like growth factor I and growth hormone receptor mRNA expression by energy status. **American Journal of Physiology**. v. 266, p. 776-85. 1994.

Expressão de mRNA de genes mitocondriais associados a dietas com inclusão de glicerol para codornas de corte aos 28 dias de idade

Resumo: O estudo foi realizado para avaliar a expressão do RNA mensageiro (mRNA) de genes mitocondriais que estão envolvidos no metabolismo energético: adenina nucleotídeo translocase (ANT), citocromo c oxidase III (COX III) e proteína desacopladora (UCP) no músculo do peito de codornas japonesas com 28 dias de idade, alimentados com dietas contendo 0, 8 e 12% de glicerol. O RNA total foi extraído (n = 10 por grupo) e o cDNA amplificado usando *primers* específicos para qRT-PCR. A conversão alimentar (CA) e o consumo de ração (CR) foram avaliados. A expressão de mRNA de UCP foi menor no grupo alimentado com 12% de glicerol (0,026 UA) quando comparado com 0% (0,041 UA) e 8% de glicerol (0,057 UA). Em contraste, a expressão de mRNA ANT e COX III no músculo do peito foi maior no grupo alimentado com 12% de glicerol (ANT = 7,525 UA; COX III = 0,863 UA), sem diferenças entre 0% (ANT = 5,572 UA; COX III = 0,357 UA) e 8% de glicerol (ANT = 5,839 UA; COX III = 0,415 UA). A expressão de mRNA de UCP observada no músculo do peito de codornas foi menor em aves com pior CA, enquanto nestes mesmos animais ANT e COX III apresentaram maiores valores de expressão ($p < 0,05$). Estes resultados indicam que existem diferenças na expressão de mRNA dos genes mitocondriais avaliados no músculo do peito de codornas aos 28 dias de idade entre os animais que se alimentaram com dietas com diferentes concentrações de glicerol.

Palavras chave: cadeia transportadora de elétrons, expressão gênica, fosforilação oxidativa, metabolismo energético.

Introdução

A utilização de subprodutos em dieta de animais de interesse zootécnico podem diminuir o custo de produção, e conseqüentemente aumentar a rentabilidade da atividade. Quando financeiramente rentável, o glicerol, um subproduto da indústria do biodiesel, pode ser usado como substituto parcial do milho para alimentação animal (Cerrate et al., 2006) por apresentarem valores energéticos semelhantes (3.434 kcal/kg) (Dozier et al., 2008). Absorvido de forma passiva (Guyton, 1991), o glicerol possui sabor adocicado e pequeno peso molecular (Rivaldi, 2008), influenciando o consumo de ração (Pasquetti, 2011).

Em codornas e frango de corte, a inclusão de glicerol na dieta pode afetar características de desempenho (Raber et al., 2009; Batista, 2010) além de influenciar a expressão do mRNA de alguns genes mitocondriais relacionados eficiência na síntese de ATP e estresse oxidativo, como o ANT (Adenina nucleotídeo translocase), COX III (citocromo c oxidase III) e UCP (proteína desacopladora) (Gasparino et al., 2012).

Animais menos eficientes em converter os alimentos em peso corporal podem apresentar alterações na atividade de bomba de sódio e potássio e na expressão de genes da cadeia transportadora de elétrons (Gasparino et al., 2012). Todos estes fatores podem influenciar a utilização dos nutrientes e o metabolismo basal, podendo alterar o gasto energético corporal e conseqüentemente influenciar o incremento calórico dos animais (Bottje & Carstens, 2009; Johnson et al., 2003; Yunianto et al., 1997, Rosebrough & Murtry, 1993; Curtis, 1983).

Recentemente, estudos foram conduzidos para avaliar as diferenças de eficiência alimentar dos animais, relacionando-as com o transporte de elétrons e de prótons pelos complexos protéicos (I, II, III, IV e V) da cadeia transportadora de elétrons (Bottje & Carstens, 2009; Krueger et al., 2008; Iqbal et al., 2005; Bottje et al., 2002). Estes trabalhos sugerem que animais com maior consumo de ração residual, possuem falha no transporte de elétrons/prótons, reduzindo a eficiência de produção de ATP pelas mitocôndrias, o que influencia negativamente a conversão alimentar.

Apesar de se encontrar muitos estudos que mostrem a relação entre conversão alimentar e a cadeia transportadora de elétrons ou o *turnover* protéico, estas pesquisas utilizaram frangos de corte ou bovinos recebendo a mesma ração, buscando-se diferenciação entre indivíduos de uma mesma população, o que pode ser fundamental para direcionar futuros programas de melhoramento genético. Entretanto, pouco se tem

estudado sobre o possível efeito de diferentes nutrientes ou de seus níveis na ração sobre a expressão de genes mitocondriais.

As informações existentes sobre o efeito de níveis nutricionais sobre a fosforilação oxidativa, mostraram que rações com maior inclusão de proteína bruta ou de ácidos graxos de cadeia longa reduziram a síntese de ATP ou a relação ADP:O₂ (Clandinin, 1978). Renner et al. (1979) encontraram menor eficiência energética em frangos alimentados com alta inclusão de óleo de colza, atribuindo esse resultado ao desacoplamento da fosforilação oxidativa.

Verifica-se assim, a necessidade de realizar estudos sobre o efeito de nutrientes e seus níveis sobre a expressão de genes relacionados com a cadeia transportadora de elétrons, na tentativa de entender melhor a influência dos nutrientes sobre a fosforilação oxidativa. Desta forma, o presente trabalho foi desenvolvido com objetivo de avaliar o efeito da inclusão de glicerol sobre a expressão de mRNA dos genes que codificam as proteínas ANT, COX III e UCP em codornas de corte aos 28 dias de idade.

Material e métodos

O presente trabalho foi conduzido no setor de avicultura e no laboratório de genética molecular do departamento de Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá. Foram utilizadas 450 codornas de corte de um dia de idade, distribuídas em delineamento inteiramente casualizado com três tratamentos (sem glicerol, inclusão de 8% e 12% de glicerol na ração), cinco repetições e 30 codornas por unidade experimental. Os animais foram alojados em galpão convencional, em boxes de 2,5m², os quais foram forrados por cama de casca de arroz. O programa de iluminação utilizado foi o contínuo durante todo o período experimental.

Foram utilizadas três dietas experimentais, sendo uma ração controle (sem glicerol), e outras duas com a inclusão 8% e 12% de glicerol, todas formuladas à base de milho e farelo de soja, conforme recomendações nutricionais de Rostagno et al., (2005) e NRC (1994), exceto a inclusão de glicerol (Tabela 1).

As codornas foram pesadas aos 28 dias para determinação do ganho de peso corporal. A ração experimental e as sobras foram pesadas para cálculo do consumo de ração. A conversão alimentar foi calculada como a relação entre o ganho de peso e o consumo de ração. A mortalidade foi considerada para o cálculo de conversão alimentar. Dez codornas de cada tratamento foram abatidas por deslocamento cervical aos 28 dias de idade. Uma amostra do músculo peitoral (*Pectoralis superficialis*) destas

aves foi coletada, acondicionada adequadamente em RNA Holder® (*BioAgency, Carlsbad CA, USA*) e armazenado a -20°C até o momento da extração de RNA.

Tabela 1. Composição centesimal da dieta

Ingredientes (kg)	Glicerina bruta		
	0%	8%	12%
Milho grão	54,58	46,48	42,44
Farelo de soja 45%	37,84	39,37	40,13
Glicerina bruta	-	8,00	12,00
Óleo de soja	2,88	1,44	0,73
Fosfato bicálcico	1,61	1,63	1,64
L-Lisina HCL	0,65	0,84	0,82
DL-Metionina	0,66	0,66	0,67
L-Treonina	0,44	0,43	0,43
Sal comum	0,40	0,40	0,40
Suplemento vitamínico ¹	0,40	0,40	0,40
Calcário	0,28	0,26	0,26
Suplemento mineral ¹	0,07	0,07	0,07
Antioxidante ²	0,01	0,01	0,01
Composição nutricional			
Proteína bruta (%)	23,20	23,20	23,20
Cálcio (%)	0,61	0,61	0,61
Fósforo disponível (%)	0,41	0,41	0,41
Energia metabolizável (kcal/kg)	3.000	3.000	3.000
Metionina + cistina digestível (%)	1,33	1,33	1,33
Lisina digestível (%)	1,88	1,88	1,88
Treonina digestível (%)	1,14	1,14	1,14
Triptofano digestível (%)	0,28	0,28	0,28
Sódio (%)	0,18	0,31	0,37

¹Suplementação vitamínica/mineral (níveis de garantia por kg do produto); Vit. A – 4.500.000 UI; Vit. D3 – 1.250.000 UI; Vit. E – 4.000 mg; Vit. B1 – 278 mg; Vit. B2 – 2.000 mg; Vit. B6 – 525 mg; Vit. B12 – 5.000 mcg; Vit. K3 – 1.007 mg; Pantotenato de Cálcio – 4.000 mg; Niacina – 10.000 mg; Colina – 140.000 mg; Antioxidante – 5.000 mg; Zinco – 31.500 mg; Ferro – 24.500 mg; Manganês – 38.750 mg; Cobre – 7.656 mg; Cobalto – 100 mg; Iodo – 484 mg; Selênio – 127 mg; ²BHT (Butil Hidroxi Tolueno).

O RNA total foi extraído com uso do reagente Trizol® (*Invitrogen, Carlsbad CA, USA*) na proporção de 1mL para cada 100mg de tecido. O tecido muscular foi triturado com homogenizador elétrico até a completa dissociação. Posteriormente foram adicionados 200µL de clorofórmio e homogeneizado manualmente por um minuto. O

tecido resultante foi centrifugado por 15 minutos a 12.000 rpms a 4°C, e a fase líquida coletada e transferida para tubo de ensaio, onde 500µL de isopropanol foram adicionados. Após, o material foi homogeneizado, centrifugado por 15 minutos a 12.000 rpms, a 4°C. O material sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1mL de etanol 75%. Posteriormente o material foi centrifugado novamente a 12.000 rpms por cinco minutos, e o sobrenadante descartado. O material precipitado foi seco por 15 minutos e foi homogeneizado em água destilada e desmineralizada, livre de RNase.

A concentração do RNA total foi avaliada por meio de espectrofotômetro, em comprimento de onda de 260nm. A integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose 1% e este, visualizado em luz ultravioleta.

Para confecção do cDNA foi utilizado o *kit SuperScript™ III First-Strand Syntesis Super Mix (Invitrogen Corporation, Brasil)*. Foram adicionados 6µL de RNA total, 1µL de oligo (dT) (50µM oligo(dT)₂₀) e 1µL de tampão de anelamento (Annealing buffer). A reação foi incubada por cinco minutos a 65°C e então colocadas sobre o gelo por um minuto. Posteriormente foi adicionado 10µL de solução *2x First-Strand Reaction Mix* e 2µL de solução contendo a enzima transcriptase reversa *SuperScript III* e inibidor de RNase. A solução foi incubada por 50 minutos a 50°C para a síntese do DNA complementar. A reação foi então incubada novamente por cinco minutos a 85°C e imediatamente colocada sob gelo. As amostras foram armazenadas a -20°C até o momento das análises subsequentes.

Para as reações de PCR em tempo real foi utilizado o composto fluorescente SYBR GREEN (*SYBR® GREEN PCR Máster Mix (Applied Biosystems, USA)*).

Os primers dos genes COXIII (NP_006921), ANT (AB088686) e UCP (AB088685) utilizados foram obtidos de Ojano-Dirain et al (2007). As seqüências podem ser obtidas no site www.ncbi.nlm.nih.gov.

Foi utilizado o gene da β-actina como controle endógeno da reação. Todas as análises foram realizadas em um volume final de 25µL e em duplicatas.

Os dados foram analisados utilizando-se o procedimento GLM do SAS (2000). O procedimento UNIVARIATE foi utilizado para verificar a normalidade dos resíduos da expressão dos genes em estudo (expressos com $2^{-\Delta C_t}$) e dados de produção. Foi utilizado ANOVA com três tratamentos e dez repetições por tratamento (dietas sem, com 8% e com 12% de inclusão de glicerol). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Resultados

O desempenho de codornas de um a 28 dias de idade recebendo diferentes níveis de glicerol na ração é mostrado na Figura 1.

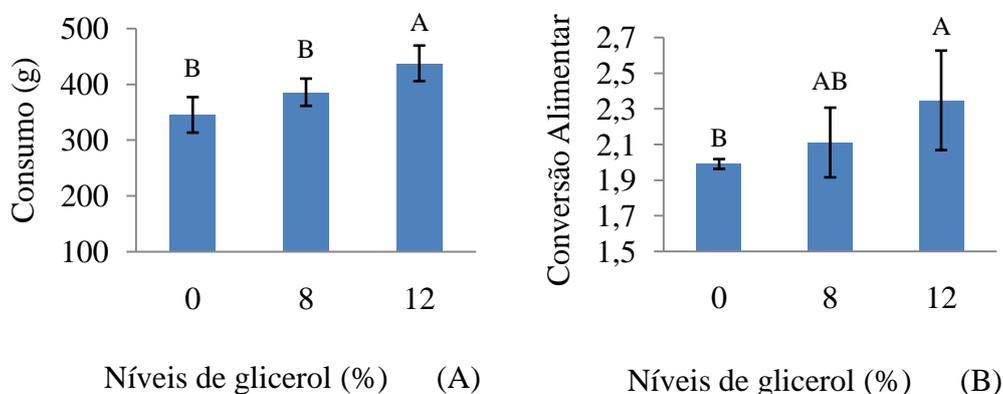


Figura 1. Consumo total em grama (A) e conversão alimentar (B) de codornas alimentadas com rações contendo 0%, 8% e 12% de inclusão de glicerol, para codornas aos 28 dias de idade. As letras sobre as barras (desvios-padrão) representam a comparação entre as médias. Letras diferentes representam diferenças estatísticas entre as médias ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Não foi observado efeito significativo dos tratamentos sobre o ganho de peso (0% = $173,41\text{g} \pm 15,33\text{g}$; 8% = $183,22\text{g} \pm 10,18\text{g}$ e 12% = $188,48\text{g} \pm 21,30\text{g}$), porém houve aumento significativo para o consumo de ração e conversão alimentar das codornas. O consumo de ração foi significativamente maior para o grupo de codornas que receberam ração com 12% de glicerol, sendo que o consumo não diferiu estatisticamente entre os grupos que receberam ração com 8% e sem glicerol. O grupo de aves do tratamento com 12% de glicerol também apresentou a pior conversão alimentar (2,34) em relação aos grupos de codornas que receberam ração sem glicerol (1,99). Isto representou em média uma piora de 14,59% na conversão alimentar das codornas na fase de um a 28 dias de idade.

Embora não tenham sido encontrados primers específicos para os genes adenina nucleotídeo translocase (ANT), citocromo c oxidase III (COX III) e proteína desacopladora (UCP), os primers de *Gallus gallus* utilizados para a análise por PCR em tempo real mostraram-se adequados para o desenvolvimento deste trabalho. As análises das curvas de dissociação não revelaram qualquer presença de produtos inespecíficos ou formação de dímero de primers, mostrando a confiabilidade dos dados na estimativa da expressão de mRNA dos genes avaliados.

A expressão do mRNA do ANT, COX III e UCP no músculo peitoral de codornas com 28 dias de idade são mostrados na Figura 2.

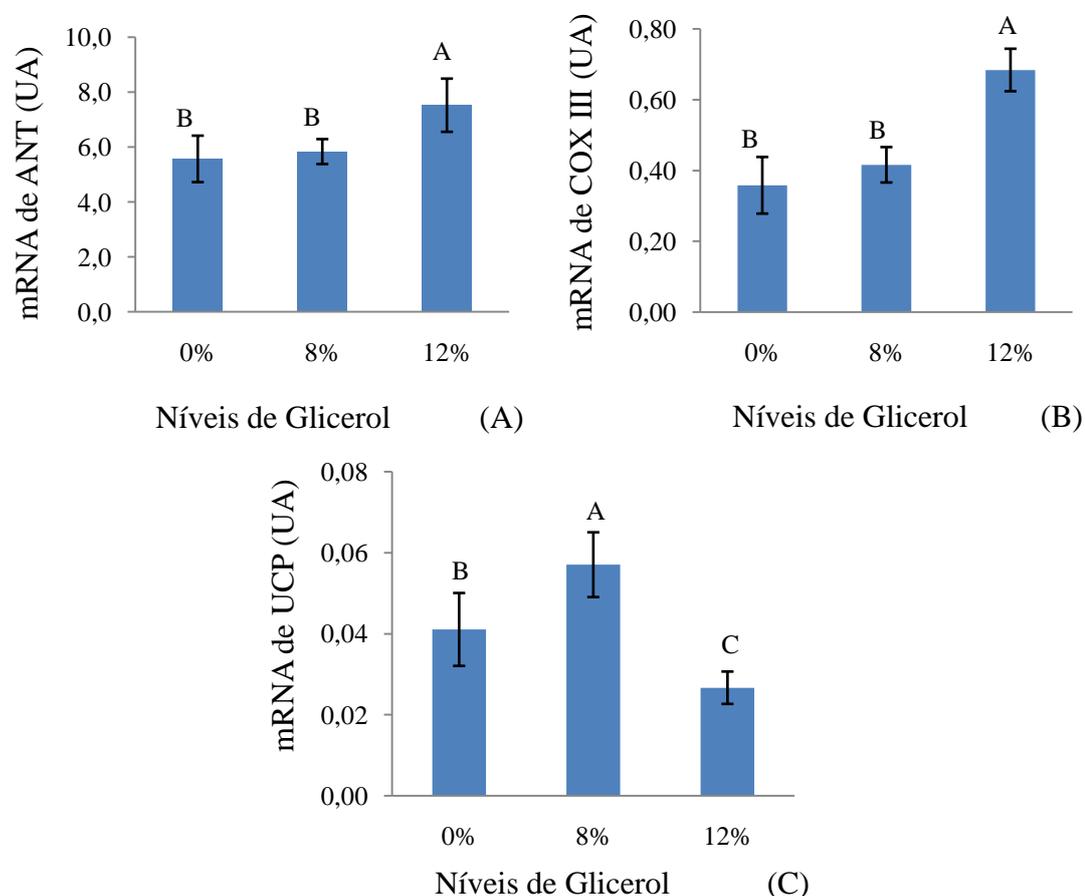


Figura 2. Expressão do RNA mensageiro da adenina nucleotídeo translocase (A), citocromo c oxidase (B) e da proteína desacopladora (C). Letras sobre as barras (desvios-padrão) representam a comparação entre as médias de expressão dos mRNAs. Letras diferentes representam diferenças estatísticas entre as médias ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

A suplementação de 12% de glicerol na ração das codornas aumentou 35% e 29% a expressão do mRNA do gene responsável pelas trocas de ADP/ATP da membrana interna mitocondrial (ANT) em relação ao tratamento sem glicerol e com 8% respectivamente. Quando se adicionou 8% de glicerol, não se observou diferença na expressão de mRNA de ANT em relação ao grupo controle (sem glicerol).

A expressão do mRNA do COX III no músculo *pectoralis superficialis* de codorna, comportou-se de maneira semelhante a expressão do ANT, onde a suplementação de 12% de glicerol na ração das codornas aumentou 91% e 64% a expressão do mRNA COX III em relação ao tratamento sem glicerol e com 8%

respectivamente. Quando se adicionou 8% de glicerol, não se observou diferença na expressão de mRNA de ANT em relação ao grupo controle.

A suplementação de 12% de glicerol promoveu uma redução de 35% e 53% na expressão do mRNA de UCP em relação ao tratamento sem glicerol e com 8% respectivamente. Os valores de expressão de mRNA da UCP foram superiores tanto para o tratamento sem glicerol (0,041 vs. 0,057) quanto para o tratamento com 12% (0,026 vs. 0,057).

Discussão

A inclusão dos níveis de glicerol avaliados neste estudo influenciou de maneira distinta a expressão de todos os genes avaliados, mostrando que pode existir influência destes nutrientes sobre a expressão de genes importantes para crescimento. Estas alterações na expressão desses genes podem explicar em parte os resultados obtidos no desempenho das aves.

O consumo de ração apresentou um padrão crescente conforme o aumento de glicerol, sendo o maior consumo observado nos animais que receberam a dieta com 12% de glicerol, que pode ter ocorrido pela maior palatabilidade da dieta com glicerol, dado que este possui sabor adocicado (Pasquetti, 2011). Respostas a esse consumo não foram observadas em ganho de peso, e conversão alimentar, sendo a pior conversão observada nos animais que receberam 12% de glicerol. De acordo com a literatura, o valor máximo recomendado de inclusão de glicerol em dietas de codornas de corte de 15 a 35 dias de idade é de 15% (Pasquetti, 2011). Entretanto, a inclusão de 12% de glicerol pode ter excedido a capacidade metabólica dos animais, limitado sua absorção (Min et al., 2010), sugerido a necessidade novos estudos para determinar a inclusão máxima de glicerol nessa faixa de idade. Além disso, a inclusão de glicerol, tanto 8% quanto 12%, promoveu aparente aumento de umidade na cama, sugerindo um aumento da taxa de passagem da digesta, comprometendo a utilização dos nutrientes (Gianfelici, 2009).

O maior nível de glicerol avaliado (12%) alterou a expressão de todos os genes avaliados, mostrando que existe influência dos nutrientes da ração sobre a expressão de genes da cadeia transportadora de elétrons, responsáveis pela produção de energia corporal. Estas alterações na expressão de genes podem explicar em parte os resultados obtidos no desempenho das codornas.

Em frangos de corte, a relação entre a função mitocondrial e a eficiência alimentar tem sido relatada (Parker et al., 2008). Durante a fosforilação oxidativa podem existir falhas na condução de prótons do espaço intermembranoso para a matriz mitocondrial (Brand et al., 1995) devido ao desacoplamento no transporte de prótons causados por proteínas específicas que funcionam como desacopladores de membrana, como a ANT e a UCP, podendo causar ineficiência mitocondrial (Rolfe & Brand, 1996 e 1997).

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que codornas alimentadas com 12% de glicerol apresentaram maior expressão de mRNA de ANT, que tem como papel principal a troca de ATP e ADP (Ojano-Dirain et al., 2007). Em contrapartida, codornas que receberam os menores níveis de suplementação (0 e 8%) tiveram a expressão de ANT inalteradas. Desta forma, sugere-se que o excesso de glicerol pode aumentar a expressão de ANT, uma vez que em situações onde a função de troca ADP-ATP é prejudicada, ANT desempenha um papel importante na redução de ROS e na indução de apoptose (Won et al., 2010), sugerindo um provável aumento na produção de ROS mitocondrial promovida pelo nível de 12% de glicerol. Deste modo, este aumento de expressão de ANT pode ser visto como uma resposta induzida pelo ROS, dado que ANT é conhecido por ter capacidade de desacoplamento (Boudina & Abel, 2006), o que poderia reduzir a produção de ROS mitocondrial (Andreyev et al., 1988 e 1989; Echtay et al., 2002).

A pior conversão alimentar dos animais alimentados com 12% de glicerol associados à maior expressão de ANT são fortes indícios da ação prejudicial da dieta sobre a atividade de troca ATP / ADP, tornando-os animais menos eficientes em produzir energia. Estes resultados de expressão de ANT corroboram com Tinsley et al. (2010) e Iqbal et al. (2004) que encontraram maior expressão de ANT em animais com baixa eficiência alimentar quando comparados a animais com alta eficiência alimentar.

Quanto a expressão do mRNA de COX III, observou-se que as aves que receberam ração suplementada com 12% de glicerol apresentaram 91% e 68% de aumento de expressão em relação àquelas que receberam 0% e 8% de glicerol respectivamente. Como no presente estudo, outros têm encontrado maior expressão de COX III em aves com pior conversão alimentar (Tinsley et al., 2010; Iqbal et al., 2004 e 2005; Lassiter et al., 2004).

Embora o mecanismo exato ainda não esteja determinado, a maior expressão de COX III em aves com baixa eficiência alimentar poderia representar uma resposta compensatória ao estresse oxidativo por aumentar a oxidação de proteínas (Iqbal et al.,

2004). O aumento na expressão de COX III nos animais alimentados com 12% de glicerol é um forte indício do provável aumento de ROS provocado pela dieta, uma vez que sua função está mais intimamente ligada a respostas ao estresse oxidativo do que a atividades referentes ao translocamento de prótons (You et al., 2002).

Outro gene presente na cadeia transportadora de elétrons e relacionado com a eficiência da fosforilação oxidativa é a UCP. Com base no provável aumento da produção de ROS provocado pela dieta com 12% de glicerol, evidenciados pelo aumento de expressão de ANT e COX III, esperava-se um aumento da expressão de UCP neste tratamento, uma vez que UCP tem a ação benéfica de reduzir a produção de radicais livres (Miwa et al., 2003). Entretanto, os resultados encontrados para a expressão de UCP para os animais que consumiram ração com 12% de glicerol foram contrários ao esperado. A maior expressão de UCP nas dietas com 0 e 8% de glicerol pode ter ocorrido devido a maior quantidade de ácidos graxos de cadeia longa (Abe et al., 2006) proveniente do óleo de soja presente em concentrações mais altas nestas dietas, em relação aquela com 12% de glicerol, corroborando com os resultados obtidos por Gasparino et al. (2012).

Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam que embora as rações sejam isoenergéticas, a fonte de energia utilizada influencia a expressão gênica da UCP, ANT e COX III, o que conseqüentemente influenciou o desempenho das codornas de um a 28 dias de idade. Diferentes concentrações de glicerol na dieta de codornas na fase de um a 28 dias de idade promoveram alterações no desempenho destes animais, os quais podem ter ocorrido em função de mudanças na expressão dos genes mitocondriais (COX III, ANT, UCP). Isto indica claramente que estudos moleculares, que avaliam as expressões gênicas dos animais auxiliam a entender melhor porque o desempenho de aves é piorado ou melhorado em função de diferentes nutrientes e de seus níveis utilizados nas rações.

A inclusão de 8% de glicerol na dieta proporcionou resultados de desempenho de codornas semelhantes aqueles observados para ração sem adição de glicerol, sugerindo-se que a inclusão até este nível nas rações não provocariam efeitos negativos.

Conclusão

A inclusão de glicerol na dieta de codornas de corte até 28 dias de idade promove alterações sobre a expressão de mRNA ANT, COX III, e UCP no músculo do peito.

Referências

- ABE, T; MUJAHID, A.; SATO, K.; et al. Possible role of avian uncoupling protein in down-regulating mitochondrial superoxide production in skeletal muscle of fasted chickens. **FEBS Letters**, 580: 4815-4822.
- ANDREYEV, A.; BONDAREVA, T.O.; DEDUKHOVA, V.I.; et al. Carboxyatractylate inhibits the uncoupling effect of free fatty acids. **FEBS Lett.** 1988.
- ANDREYEV, A.; BONDAREVA, T.O.; DEDUKHOVA, V.I.; et al. The ATP/ADP-antiporter is involved in the uncoupling effect of fatty acids on mitochondria. **Eur. J. Biochem.** 182:585–592. 1989.
- BATISTA, E. Avaliação nutricional do glicerol para codornas de corte. 2010. 69f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Estadual de Maringá/ Centro de Ciências agrárias, Maringá, Paraná, 2010.
- BOTTJE, W.; CARSTENS, G. Association of mitochondrial function and feed efficiency in poultry and livestock species. **J. Anim. Sci.** 87:E48–E63. 2009.
- BOTTJE, W.; IQBAL, M.; TANG, Z.X.; et al. Association of mitochondrial function with feed efficiency within a single genetic line of male broilers. **Poult. Sci.** 81:546-555. 2002.
- BOUDINA, S.; ABEL, E.D. Mitochondrial uncoupling: a key contributor to reduced cardiac efficiency in diabetes. **Physiology** (Bethesda);21:250-8. 2006.
- BRAND, M.D.; CHIEN, L.F.; AINSCOW, E.K.; ROLFE, D.F.S. AND PORTER, R.K. The causes and function of mitochondrial proton leak. **Biochim. Biophys. Acta**, 1187:132-139. 1995.
- CERRATE, S.; YAN, F.; WANG, Z.; et al. Evaluation of glycerine from biodiesel production as a feed ingredient for broilers. **Int. J. Poult. Sci.** 11:1001–1007. 2006.
- CLANDININ, M.T. The role of dietary long chain fatty acids in mitochondrial structure and function. Effects on rat cardiac mitochondrial respiration. **J. Nutr.**, 108:273-281. 1978.
- CURTIS, S.E. Environmental management in animal agriculture. Ames, Iowa: Iowa State University Press, pp.409. 1983.
- DOZIER, W.A.; KERR, B.J.; CORZO, A.; et al. Apparent Metabolizable Energy of Glycerin for Broiler Chickens. **Poultry Science**. 87:317–322. 2008.
- ECHTAY, K.S.; ROUSSEL. D.; ST-PIERRE, J.; et al. Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. **Nature** 415: 96-99. 2002
- GASPARINO, E. ; GUIMARÃES, S.E.F. ; MARTINS, E.N.; et al. Effect of glycerol on mRNA expression of growth hormone, insulin-like growth factor, and mitochondrial breast muscle genes of Japanese quails. **Poultry Science** (Print), 2012. (no prelo).
- GIANFELICI, M.F. Uso de glicerol como fonte de energia para frangos de corte. 2009. 129f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul/Faculdade de Agronomia, Porto Alegre, 2009.
- GUYTON, A.C. **Textbook of Medical Physiology**. W. B.Saunders Company, Philadelphia, PA. 1991.
- IQBAL, M; PUMFORD, N.R.; TANG, Z.X.; et al. Compromised liver mitochondrial function and complex activity in low feed efficient broilers are associated with higher oxidative stress and differential protein expression. **Poult. Sci.**, 84:933-941. 2005.
- IQBAL, M; PUMFORD, N.R.; TANG, Z.X.; et al. Low feed efficient broilers within a single genetic line exhibit higher oxidative stress and protein expression in breast muscle with lower mitochondrial complex activity. **Poult. Sci.**, 83:474-484. 2004.

- JOHNSON, D.E.; FERRELL, C.L.; JENKIN, T.G. The history of energetic efficiency research: Where have we been and where are we going? **J. Anim. Sci.** 81(E. Suppl. 1): E27–E38. 2003.
- KRUEGER, W.K.; CARSTENS, G.E.; LANCASTER, P.A.; et al. Relationships between residual feed intake and apparent nutrient digestibility in growing calves. **J. Anim. Sci.** 86(Abstract; In press). 2008.
- LASSITER, K.; IQBAL, M.; OJANO-DIRAIN, C.; et al. Differential expression of mitochondrial and extra-mitochondrial proteins in lymphocytes of low and high feed efficient broilers within a single male line. **Poult. Sci.** 83(Suppl. 1):188. 2004.
- MIN, Y.N.; YAN, F.; LIU, F.Z. et al. Glycerin-A New Energy Source for Poultry. *International Journal of Poultry Science* 9 (1): 1-4, 2010.
- MIWA, S.; ST-PIERRE, J.; PARTRIDGE, L. et al. Superoxide and hydrogen peroxide production in Drosophila mitochondria. **Free Rad. Biol. Med.** 35:938-948. 2003.
- NRC - NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirement of poultry.** 9th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC. 1994.
- OJANO-DIRAIN, C.; TOYOMIZU, M.; WING, T.; et al. Gene expression in breast muscle and duodenum from low and high feed efficient broilers. **Poult. Sci.**, 86:372-381. 2007.
- PARKER, N.; AFFOURTIT, C.; VIDAL-PUIG, A.; et al. Energization-dependent endogenous activation of proton conductance in skeletal muscle mitochondria. **Biochem. J.**, 412:131-139. 2008.
- PASQUETTI, J. T. Avaliação nutricional da glicerina bruta ou semipurificada, oriundas de gordura animal e óleo vegetal, para codornas de corte. 2011. 110f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Estadual de Maringá/ Centro de Ciências agrárias, Maringá, Paraná, 2011.
- RABER, M.R.; RIBEIRO, A.M.L.; KESSLER, A.M.; et al. suplementação de glicerol ou de lecitina em diferentes níveis de ácidos graxos livres em dietas para frangos de corte. *Ciência Animal Brasileira*, v. 10, n. 3, p. 745-753, jul./set. 2009.
- RENNER, R.; INNIS, S.N.; CLANDININ, M.T. Effects of high low erucic acid rapseed oils on energy metabolism and mitochondrial function of the chick. **J. Nutr.**, 109:378-387. 1979.
- RIVALDI, J.D.; SARROUB, B.F.; FIORILO, R. et al. Glicerol de Biodiesel. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. p.44-51, Ano x, n.37, 2007/2008.
- ROLFE, D.F.; BRAND, M.D. Contribution of mitochondrial proton leak to skeletal muscle respiration and to standard metabolic rate. **An. J. Physiol.** 271:C1380-C1389. 1996.
- ROLFE, D.F.; BRAND, M.D. The physiological significance of mitochondrial proton leak in animal cells and tissues. **Biosci. Resp.** 17:9-16. 1997.
- ROSEBROUGH, R.W.; McMURTRY, J. P. Protein and energy relationship in the broiler chicken. II. Effects of protein quantity and quality on metabolism. **British Journal of Nutrition**, v. 70, p. 667-78, 1993.
- ROSTAGNO, H.S., ALBINO, L.F.T., DONZELE, J.L., et al. **Brazilian tables for poultry and swine: composition of feedstuffs and nutritional requirements.** 2 ed., Department of Animal Science. Viçosa Federal University, Viçosa, Minas Gerais, Brazil. 2005.
- TINSLEY, N.; IQBAL, M.; PUMFORD, N.R.; et al. Investigation of mitochondrial protein expression and oxidation in heart muscle in low and high feed efficient male broilers in a single genetic line. **Poultry Science.** 89 :349-352 doi: 10.3382/ps.2009-00138. 2010.

- WON, J.C.; PARK, J.Y.; KIM, Y.M.; et.al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1-alpha overexpression prevents endothelial apoptosis by increasing ATP/ADP translocase activity. *Arterioscler, Thromb. Vasc. Biol.* 30, 290-297. 2010.
- YOU, K.R.; WEN, J.; LEE, S.T.; et al. Cytochrome c oxidase subunit III: a molecular marker for N-(4-hydroxyphenyl)retinamide-induced oxidative stress in hepatoma cells. *J Biol Chem* 277: 3870-3877, 2002.
- YUNianto, V.D.; HAYASHI, K.; KANEDA, S.; et al. Effect of environmental temperature on muscle protein turnover and meat production in tube-fed broiler chickens. *British Journal of Nutrition*, 77:897-909. 1997.

Normas para preparação de trabalhos científicos para publicação na Revista Brasileira de Zootecnia

Instruções gerais

A RBZ publica artigos científicos originais nas áreas de Aquicultura; Forragicultura; Melhoramento, Genética e Reprodução; Ruminantes; Não-Ruminantes; e Sistemas de Produção Animal e Agronegócio.

O envio dos manuscritos é feito exclusivamente pelo *site* da SBZ (<http://www.sbz.org.br>), menu Revista (<http://www.revista.sbz.org.br>), juntamente com o termo de compromisso, conforme instruções no link "Submissão de manuscritos".

O texto deve ser elaborado segundo as normas da RBZ e orientações disponíveis no link "Instruções aos autores".

O pagamento da taxa de tramitação (pré-requisito para emissão do número de protocolo), no valor de R\$ 45,00 (quarenta e cinco reais), deve ser realizado por meio de boleto bancário ou cartão de crédito, conforme instruções no *site* da SBZ (<http://www.sbz.org.br>), link "Pagamentos".

A taxa de publicação para **2011** é diferenciada para associados e não-associados da SBZ. Considerando-se artigos completos, para associados, a taxa é de R\$ 140,00 (até 8 páginas no formato final) e R\$ 50,00 para cada página excedente. Uma vez aprovado o manuscrito, todos os autores devem estar em dia com a anuidade da SBZ do ano corrente, exceto coautores que não militam na área, desde que não sejam o primeiro autor e que não publiquem mais de um artigo no ano corrente (reincidência). Para não-associados, serão cobrados R\$ 110,00 por página (até 8 páginas no formato final) e R\$ 220,00 para cada página excedente.

Idioma: inglês.

Atualmente, são aceitas submissões de artigos em português, os quais deverão ser obrigatoriamente vertidos à língua inglesa (responsabilidade dos autores) após a aprovação pelo conselho editorial. As versões em inglês deverão ser realizadas por pessoas com fluência na língua inglesa (serão aceitas versões tanto no inglês norte-americano como no inglês britânico). Constitui prerrogativa do corpo editorial da RBZ solicitar aos autores a revisão de sua tradução ou o cancelamento da tramitação do manuscrito, mesmo após seu aceite técnico-científico, quando a versão em língua inglesa apresentar limitações ortográficas ou gramaticais que comprometam seu correto entendimento.

Tipos de Artigos

Artigo completo: constitui o relato completo de um trabalho experimental. O texto deve representar processo de investigação científica coeso e propiciar seu entendimento, com explanação coerente das informações apresentadas.

Comunicação: constitui relato sucinto de resultados finais de um trabalho experimental, os quais possuem plenas justificativas para publicação, embora com volume de informações insuficiente para constituir artigo completo. Os resultados utilizados como base para a feitura da comunicação não poderão ser posteriormente utilizados parcial ou totalmente para apresentação de artigo completo.

Nota técnica: constitui relato de avaliação ou proposição de método, procedimento ou técnica que apresenta associação com o escopo da RBZ. Quando possível, a nota técnica deve apresentar as vantagens e desvantagens do novo método, procedimento ou técnica proposto, bem como sua comparação com aqueles previamente ou atualmente utilizados. Deve apresentar o devido rigor científico na análise, comparação e discussão dos resultados.

Revisão: constitui abordagem do estado da arte ou visão crítica de assuntos de interesse e relevância para a comunidade científica. Somente poderá ser submetida a convite do corpo editorial da RBZ.

Editorial: constitui abordagem para esclarecimento e estabelecimento de diretrizes técnicas e/ou filosóficas para estruturação e feitura de artigos a ser submetidos e avaliados pela RBZ. Será redigida por ou a convite do corpo editorial da RBZ.

Estrutura do artigo (artigo completo)

O artigo deve ser dividido em seções com título centralizado, em negrito, na seguinte ordem: Resumo, Abstract, Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusões, Agradecimentos (opcional) e Referências. Não são aceitos subtítulos. Os parágrafos devem iniciar a 1,0 cm da margem esquerda.

Formatação de texto

O texto deve ser digitado em fonte Times New Roman 12, espaço duplo (exceto Resumo, Abstract e Tabelas, que devem ser elaborados em espaço 1,5), margens superior, inferior, esquerda e direita de 2,5; 2,5; 3,5; e 2,5 cm, respectivamente.

O manuscrito pode conter até 25 páginas. As linhas devem ser numeradas da seguinte forma: Menu ARQUIVO/ CONFIGURAR PÁGINA/LAYOUT/NÚMEROS DE LINHA.../ NUMERAR LINHAS (numeração contínua) e a paginação deve ser contínua, em algarismos arábicos, centralizada no rodapé.

O arquivo deverá ser enviado utilizando a extensão .doc. Não enviar arquivos nos formatos pdf, docx, zip ou rar.

Manuscritos com número de páginas superior a 25 (acatando-se o máximo de 30 páginas) poderão ser submetidos acompanhados de carta encaminhada ao Editor Científico contendo justificativa para o número de páginas excedentes. Em caso de aceite da justificativa, a tramitação ocorrerá normalmente e, uma vez aprovado o manuscrito, os autores deverão arcar com o custo adicional de publicação por páginas excedentes. Caso não haja concordância com a justificativa por parte do Editor Científico, o manuscrito será reencaminhado aos autores para adequação às normas, a qual deverá ser realizada no prazo máximo de 30 dias. Em caso do não-recebimento da versão neste prazo, proceder-se-á ao cancelamento da tramitação (não haverá devolução da taxa de tramitação).

Título

Deve ser preciso, sucinto e informativo, com 20 palavras no máximo. Digitá-lo em negrito e centralizado, segundo o exemplo: **Valor nutritivo da cana-de-açúcar para bovinos**. Deve apresentar chamada de rodapé "1" somente quando a pesquisa foi financiada. Não citar "parte da tese..."

Autores

A RBZ permite até **oito autores**. A primeira letra de cada nome/sobrenome deve ser maiúscula (Ex.: Anacleto José Benevenuto). Não listá-los apenas com as iniciais e o último sobrenome (Ex.: A.J. Benevenuto).

Digitare os nomes dos autores separados por vírgula, centralizado e em negrito, com chamadas de rodapé numeradas e em sobrescrito, indicando apenas a instituição à qual estavam vinculados à época de realização da pesquisa (instituição de origem), e não a atual. Não citar vínculo empregatício, profissão e titulação dos autores. Informar o endereço eletrônico somente do responsável pelo artigo.

Resumo

Deve conter no máximo 1.800 caracteres com espaços. As informações do resumo devem ser precisas. Resumos extensos serão devolvidos para adequação às normas. Deve sumarizar objetivos, material e métodos, resultados e conclusões. Não deve conter introdução nem referências bibliográficas.

O texto deve ser justificado e digitado em parágrafo único e espaço 1,5, começando por RESUMO (ABSTRACT), iniciado a 1,0 cm da margem esquerda.

A partir da obrigatoriedade de tradução dos manuscritos para a língua inglesa, a versão final (artigo formatado) apresentará somente o resumo em inglês (abstract). Assim, manuscritos submetidos em português deverão conter apenas o RESUMO, o qual será posteriormente vertido para o inglês, e manuscritos submetidos em inglês deverão apresentar somente o ABSTRACT.

Palavras-chave

Apresentar até seis (6) palavras-chave (key words) imediatamente após o resumo (abstract), respectivamente, em ordem alfabética. Devem ser elaboradas de modo que o trabalho seja rapidamente resgatado nas pesquisas bibliográficas. Não podem ser retiradas do título do artigo. Digitá-las em letras minúsculas, com alinhamento justificado e separadas por vírgulas. Não devem conter ponto-final.

Seguindo-se o padrão de normas para o resumo/abstract, manuscritos submetidos em português deverão conter somente palavras-chave, as quais serão traduzidas posteriormente à aprovação, e artigos em inglês, somente key words.

Introdução

Deve conter no máximo 2.500 caracteres com espaços, resumindo a contextualização breve do assunto, as justificativas para a realização da pesquisa e os objetivos do trabalho. Evitar discussão da literatura na introdução. A comparação de hipóteses e resultados deve ser feita na discussão.

Trabalhos com introdução extensa serão devolvidos para adequação às normas.

Material e Métodos

Se for pertinente, descrever no início da seção que o trabalho foi conduzido de acordo com as normas éticas e aprovado pela Comissão de Ética e Biossegurança da instituição.

Descrição clara e com referência específica original para todos os procedimentos biológicos, analíticos e estatísticos. Todas as modificações de procedimentos devem ser explicadas.

Resultados e Discussão

É facultada ao autor a feitura desta seção combinando-se os resultados com a discussão ou em separado, redigindo duas seções, com separação de resultados e discussão. Dados suficientes, todos com algum índice de variação, devem ser apresentados para permitir ao leitor a interpretação dos resultados do experimento. Na seção discussão deve-se interpretar clara e concisamente os resultados e integrá-los aos resultados de literatura para proporcionar ao leitor uma base ampla na qual possa aceitar ou rejeitar as hipóteses testadas. Evitar parágrafos soltos, citações pouco relacionadas ao assunto e cotejamentos extensos.

Conclusões

Devem ser redigidas em parágrafo único e conter no máximo 1.000 caracteres com espaço.

Resuma claramente, sem abreviações ou citações, as inferências feitas com base nos resultados obtidos pela pesquisa. O importante é buscar entender as generalizações que governam os fenômenos naturais, e não particularidades destes fenômenos.

As conclusões são apresentadas usando o presente do indicativo.

Agradecimentos

Esta seção é opcional. Deve iniciar logo após as Conclusões.

Abreviaturas, símbolos e unidades

Abreviaturas, símbolos e unidades devem ser listados conforme indicado na página da RBZ, link "Instruções aos autores", "Abreviaturas".

Deve-se evitar o uso de abreviações não-consagradas, como por exemplo: "o T3 foi maior que o T4, que não diferiu do T5 e do T6". Este tipo de redação é muito cômoda para o autor, mas é de difícil compreensão para o leitor.

Os autores devem consultar as diretrizes estabelecidas regularmente pela RBZ quanto ao uso de unidades.

Estrutura do artigo (comunicação e nota técnica)

Devem apresentar antes do título a indicação da natureza do manuscrito (Comunicação ou Nota Técnica) centralizada e em negrito.

As estruturas de comunicações e notas técnicas seguirão as diretrizes definidas para os artigos completos, limitando-se, contudo, a 14 páginas de tamanho máximo.

As taxas de tramitação e de publicação aplicadas a comunicações e notas técnicas serão as mesmas destinadas a artigos completos, considerando-se, porém, o limite de 4 páginas no formato final. A partir deste, proceder-se-á à cobrança de taxa de publicação por página adicional.

Tabelas e Figuras

É imprescindível que todas as tabelas sejam digitadas segundo menu do Microsoft® Word "Inserir Tabela", em células distintas (não serão aceitas tabelas com valores separados pelo recurso ENTER ou coladas como figura). Tabelas e figuras enviadas fora de normas serão devolvidas para adequação.

Devem ser numeradas sequencialmente em algarismos arábicos e apresentadas logo após a chamada no texto.

O título das tabelas e figuras deve ser curto e informativo, evitando a descrição das variáveis constantes no corpo da tabela.

Nos gráficos, as designações das variáveis dos eixos X e Y devem ter iniciais maiúsculas e unidades entre parênteses.

Figuras não-originais devem conter, após o título, a fonte de onde foram extraídas, que deve ser referenciada.

As unidades, a fonte (Times New Roman) e o corpo das letras em todas as figuras devem ser padronizados.

Os pontos das curvas devem ser representados por marcadores contrastantes, como círculo, quadrado, triângulo ou losango (cheios ou vazios).

As curvas devem ser identificadas na própria figura, evitando o excesso de informações que comprometa o entendimento do gráfico.

As figuras devem ser gravadas nos programas Microsoft® Excel ou Corel Draw® (extensão CDR), para possibilitar a edição e possíveis correções.

Usar linhas com no mínimo 3/4 ponto de espessura.

As figuras deverão ser exclusivamente monocromáticas.

Não usar negrito nas figuras.

Os números decimais apresentados no interior das tabelas e figuras dos manuscritos em português devem conter vírgula, e não ponto.

Citações no texto

As citações de autores no texto são em letras minúsculas, seguidas do ano de publicação. Quando houver dois autores, usar & (e comercial) e, no caso de três ou mais autores, citar apenas o sobrenome do primeiro, seguido de et al.

Comunicação pessoal (ABNT-NBR 10520).

Somente podem ser utilizadas caso sejam estritamente necessárias ao desenvolvimento ou entendimento do trabalho. Contudo, não fazem parte da lista de referências, por isso são colocadas apenas em nota de rodapé. Coloca-se o sobrenome do autor seguido da expressão "comunicação pessoal", a data da comunicação, o nome, estado e país da instituição à qual o autor é vinculado.

Referências

Baseia-se na Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT (NBR 6023).

As referências devem ser redigidas em página separada e ordenadas alfabeticamente pelo(s) sobrenome(s) do(s) autor(es).

Digitá-las em espaço simples, alinhamento justificado e recuo até a terceira letra a partir da segunda linha da referência. Para formatá-las, siga as seguintes instruções:

No menu FORMATAR, escolha a opção PARÁGRAFO... RECUO ESPECIAL, opção DESLOCAMENTO... 0,6 cm. Em obras com dois e três autores, mencionam-se os autores separados por ponto-e-vírgula e, naquelas com mais de três autores, os três primeiros seguidos de et al.

As iniciais dos autores não podem conter espaços. O termo et al. não deve ser italizado nem precedido de vírgula.

Indica(m)-se o(s) autor(es) com entrada pelo último sobrenome seguido do(s) prenome(s) abreviado(s), exceto para nomes de origem espanhola, em que entram os dois últimos sobrenomes.

O recurso tipográfico utilizado para destacar o elemento título é negrito.

No caso de homônimos de cidades, acrescenta-se o nome do estado (ex.: Viçosa, MG; Viçosa, AL; Viçosa, RJ).

Obras de responsabilidade de uma entidade coletiva

A entidade é tida como autora e deve ser escrita por extenso, acompanhada por sua respectiva abreviatura. No texto, é citada somente a abreviatura correspondente.

Quando a editora é a mesma instituição responsável pela autoria e já tiver sido mencionada, não deverá ser citada novamente.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY - AOAC. **Official methods of analysis**. 16.ed. Arlington: AOAC International, 1995. 1025p.

Livros e capítulos de livro

Os elementos essenciais são: autor(es), título e subtítulo (se houver), seguidos da expressão "In:", e da referência completa como um todo. No final da referência, deve-se informar a paginação.

Quando a editora não é identificada, deve-se indicar a expressão *sine nomine*, abreviada, entre colchetes [s.n.]. Quando editor e local não puderem ser indicados na publicação, utilizam-se ambas as expressões, abreviadas, e entre colchetes [S.I.: s.n.].

LINDHAL, I.L. Nutrición y alimentación de las cabras. In: CHURCH, D.C. (Ed.) **Fisiologia digestiva y nutrición de los ruminantes**. 3.ed. Zaragoza: Acríbia, 1974. p.425-434.

NEWMANN, A.L.; SNAPP, R.R. **Beef cattle**. 7.ed. New York: John Wiley, 1997. 883p.

Teses e Dissertações

Recomenda-se não citar teses e dissertações. Deve-se procurar referenciar sempre os artigos publicados na íntegra em periódicos indexados. Excepcionalmente, se necessário citar teses e dissertações, indicar os seguintes elementos: autor, título, ano, página, nível e área do programa de pós-graduação, universidade e local.

CASTRO, F.B. **Avaliação do processo de digestão do bagaço de cana-de-açúcar auto-hidrolisado em bovinos**. 1989. 123f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/Universidade de São Paulo, Piracicaba.

SOUZA, X.R. **Características de carcaça, qualidade de carne e composição lipídica de frangos de**

corte criados em sistemas de produção caipira e convencional. 2004. 334f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

Boletins e relatórios

BOWMAN, V.A. **Palatability of animal, vegetable and blended fats by equine.** (S.L.): Virgínia Polytechnic Institute and State University, 1979. p.133-141 (Research division report, 175).

Artigos

O nome do periódico deve ser escrito por extenso. Com vistas à padronização deste tipo de referência, não é necessário citar o local; somente volume, intervalo de páginas e ano.

MENEZES, L.F.G.; RESTLE, J.; BRONDANI, I.L. et al. Distribuição de gorduras internas e de descarte e 4 REV. SOC. BRAS. ZOOT. componentes externos do corpo de novilhos de gerações avançadas do cruzamento rotativo entre as raças Charolês e Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.338-345, 2009.

Citações de artigos aprovados para publicação deverão ser realizadas preferencialmente acompanhadas do respectivo DOI.

FUKUSHIMA, R.S.; KERLEY, M.S. Use of lignin extracted from different plant sources as standards in the spectrophotometric acetyl bromide lignin method. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 2011. doi: 10.1021/jf104826n (no prelo).

Congressos, reuniões, seminários etc

Citar o mínimo de trabalhos publicados em forma de resumo, procurando sempre referenciar os artigos publicados na íntegra em periódicos indexados.

CASACCIA, J.L.; PIRES, C.C.; RESTLE, J. Confinamento de bovinos inteiros ou castrados de diferentes grupos genéticos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 30., 1993, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1993. p.468.

EUCLIDES, V.P.B.; MACEDO, M.C.M.; OLIVEIRA, M.P. Avaliação de cultivares de *Panicum maximum* em pastejo. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 36., 1999, Porto Alegre. **Anais...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Zootecnia/Gmosis, [1999]. (CD-ROM).

Artigo e/ou matéria em meios eletrônicos

Na citação de material bibliográfico obtido via internet, o autor deve procurar sempre usar artigos assinados, sendo também sua função decidir quais fontes têm realmente credibilidade e confiabilidade.

Quando se tratar de obras consultadas *on-line*, são essenciais as informações sobre o endereço eletrônico, apresentado entre os sinais < >, precedido da expressão "Disponível em:" e a data de acesso do documento, precedida da expressão "Acesso em:".

NGUYEN, T.H.N.; NGUYEN, V.H.; NGUYEN, T.N. et al. [2003]. Effect of drenching with cooking oil on performance of local yellow cattle fed rice straw and cassava foliage. **Livestock Research for Rural Development**, v.15, n.7, 2003. Disponível em: <<http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd15/7/nhan157.htm>> Acesso em: 28 jul. 2005.

REBOLLAR, P.G.; BLAS, C. [2002]. **Digestión de la soja integral en rumiantes.** Disponível em: <http://www.ussoymeal.org/ruminant_s.pdf> Acesso em: 12 out. 2002.

SILVA, R.N.; OLIVEIRA, R. [1996]. Os limites pedagógicos do paradigma da qualidade total na educação. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPe, 4., 1996, Recife. **Anais eletrônicos...** Recife: Universidade Federal do Pernambuco, 1996.