

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE DOUTORADO INTEGRADO EM ZOOTECNIA**

**DESEMPENHO, MORFOMETRIA INTESTINAL E MICROBIOTA CECAL EM
CODORNAS DE CORTE ALIMENTADAS COM GLUTAMINA ASSOCIADA
AO ÁCIDO GLUTÂMICO E SUBMETIDAS OU NÃO A ESTRESSE TÉRMICO**

PAULO ANTONIO DA SILVA JUNIOR

**AREIA – PB
NOVEMBRO – 2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE DOUTORADO INTEGRADO EM
ZOOTECNIA**

**DESEMPENHO, MORFOMETRIA INTESTINAL E MICROBIOTA CECAL
EM CODORNAS DE CORTE ALIMENTADAS COM GLUTAMINA
ASSOCIADA AO ÁCIDO GLUTÂMICO E SUBMETIDAS OU NÃO A
ESTRESSE TÉRMICO**

PAULO ANTONIO DA SILVA JUNIOR
Zootecnista

**AREIA – PB
NOVEMBRO – 2016**

PAULO ANTONIO DA SILVA JUNIOR

**DESEMPENHO, MORFOMETRIA INTESTINAL E
MICROBIOTA CECAL EM CODORNAS DE CORTE
ALIMENTADAS COM GLUTAMINA ASSOCIADA AO ÁCIDO
GLUTÂMICO E SUBMETIDAS OU NÃO A ESTRESSE
TÉRMICO**

Tese apresentada ao Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia, da Universidade Federal da Paraíba, do qual participam a Universidade Federal Rural de Pernambuco e Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Zootecnia.

Área de Concentração: Produção Animal

Comitê de Orientação:

Profa. Dra. Patrícia Emília Naves Givisiez - Orientador Principal

Prof. Dr. Fernando Guilherme Perazzo Costa

Prof. Dr. Celso José Bruno de Oliveira

AREIA – PB
NOVEMBRO – 2016

Ficha Catalográfica Elaborada na Seção de Processos Técnicos da
Biblioteca Setorial do CCA, UFPB, campus II, Areia – PB.

S586d Silva Junior, Paulo Antonio da .
Desempenho, morfometria intestinal e microbiota cecal em codornas de corte alimentadas com glutamina associada ao ácido glutâmico e submetidas ou não a estresse térmico / Paulo Antonio da Silva Junior. - Areia: UFPB/CCA, 2016.
xiv, 99 f. : il.

Tese (Doutorado em Zootecnia) - Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2016.

Bibliografia.

Orientador: Profa. Dra. Patrícia Emília Naves Givisiez.

1. Codornas europeias. 2. Estresse ambiental. 3. Glutamato. 4. Microbiota intestinal. 5. Morfofisiologia intestinal I. Givisiez, Patrícia Emília Naves (Orientador) II. Título.

UFPB/CCA

CDU: 636.57(043.2)



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**PROGRAMA DE DOUTORADO INTEGRADO EM ZOOTECNIA
UFPB – UFC – UFRPE**

PARECER DE DEFESA DO TRABALHO DE TESE

TÍTULO: “Desempenho, morfometria intestinal e microbiota cecal em codornas de corte alimentadas com glutamina associada ao ácido glutâmico e submetidas ou não a estresse térmico”

AUTOR: Paulo Antonio da Silva Junior

ORIENTADOR: Profa. Dra. Patrícia Emília Naves Givisiez

J U L G A M E N T O

CONCEITO: APROVADO

EXAMINADORES:

Profa. Dra. Patrícia Emília Naves Givisiez
Presidente
Universidade Federal da Paraíba

Profa. Dra. Danila Barreiro Campos
Examinador
Universidade Federal da Paraíba

Profa. Dra. Sandra Roseli Valério Lana
Examinadora
Universidade Federal de Alagoas

Prof. Dr. Edilson Paes Saraiva
Examinador
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. José Humberto Vilar da Silva
Examinador
Universidade Federal da Paraíba

Areia, 28 de novembro de 2016

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

PAULO ANTONIO DA SILVA JUNIOR – Filho de Paulo Antonio da Silva e Geraldina Juliana da Silva, nasceu no dia 02 de junho de 1987 na cidade de Maceió, no estado de Alagoas. Graduou-se em Zootecnia pela Universidade Federal de Alagoas em dezembro de 2010. Em março do ano seguinte ingressou no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da mesma universidade, na área de concentração de Produção Animal, sob orientação do Prof. Dr. Geraldo Roberto Quintão Lana, defendendo em abril de 2013 dissertação intitulada por: “Rama da mandioca: uma alternativa para alimentação de codornas”, recebendo o título de Mestre em Zootecnia. Em setembro de 2013 ingressou no Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia na Universidade Federal da Paraíba, mediante processo seletivo interno, na área de concentração em Produção Animal e linha de pesquisa em Fisiologia Aviária, sob orientação da Profa. Dra. Patrícia Emília Naves Givisiez, defendendo Tese em novembro de 2016.

A Jesus, Senhor da minha vida,
exclusivamente dedico, como reconhecimento pelo
muito amor que me tem revelado e grande vitória
que me tem proporcionado.

“Porque o amor de Cristo nos constrange...” - II Co. 5¹⁴;
“Porque dEle e por Ele e para Ele são todas as coisas. Glória,
pois, a Ele eternamente. Amém.” - Rm. 11³⁶

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao meu Eterno Deus,

Senhor da minha vida, que tanto me ama e continuamente tem expressado seu cuidado e provisão para comigo. Meu coração rejubila-se ao contemplar a graciosa concretização de suas promessas em minha vida e na vida de minha família, reescrevendo nossa história e nos confiando um novo legado. Hoje, vejo parte do cumprimento daquelas palavras que me proferiu em junho de 2010: “Levanto-te como José da sua linhagem”. Obrigado, Paizão S2!!!

A minha família,

A meus pais, Paulo Antonio da Silva e Geraldina Juliana da Silva, que sempre acreditaram em mim e tanto apostaram nesse filho que, com a ajuda de Deus, apenas busca lhes trazer orgulho e lhes garantir uma vida digna, oposta aquilo que outrora tiveram.

As minhas irmãs, Joseilda da Silva, Shirleide Geralda e Shirlene Kelly, que sempre me ofereceram forças, direta e indiretamente, principalmente cuidando dos nossos pais durante esse período de minha ausência.

Ao meu “mais que chegado que um irmão”, que não poderia está em outra seção, Samuel Fereira Santos Junior, que tanto me encheu de cobranças e exortações para que eu me mantivesse no foco para o qual fui chamado. Sei que minha ausência durante esse período lhe pesou bastante, mas o agradeço por ter segurado a barra até agora. Valeu mesmo, cara! Estou voltando e, desde sempre, “tamo junto”!

A meus amigos,

Aos meus grandes irmãos, Jadiel Pinheiro e Priscilla Santos, que me acompanharam constantemente em oração, conversas e fiel torcida.

Ao meu pastor, Francisco Pedro da Silva Filho, e a minha igreja, Ministério Apostólico Belém. O apoio e compreensão de todos vocês

durante minha ausência foram imprescindíveis para que alcançasse mais essa conquista para a glória de Deus.

À UFPB,

À Coordenação do Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia (PDIZ) do Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) pela oportunidade de fazer parte deste curso que muito contribuiu para minha formação.

A minha orientadora, Profa. Dra. Patrícia Emília Naves Givisiez, que mesmo geograficamente distante durante parte desse período acadêmico e tendo tantas atribuições pessoais e profissionais, me acompanhou e me instruiu em cada etapa de minhas atividades. Ao final dessa jornada, levo comigo grande admiração pela sua competência e ética profissional associadas à sensibilidade à emoção humana, qual discerne que nem tudo é produtividade e que não somos meras “máquinas de produção científica”.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Fernando Guilherme Perazzo Costa, que me ofereceu todo suporte necessário para execução de meu primeiro experimento, além de seu constante acompanhamento e orientação.

Aos professores Dra. Danila Barreto Campos, Dr. Edilson Paes Saraiva e Dr. José Humberto Vilar da Silva pelas valiosas considerações em minha banca de defesa de tese.

Aos meus amigos e equipe de pesquisa, Alexandre Lemos, Adriano Leite, Alessandra Reigada, Andréia Batista, Candice Leon, Fátima Andrade e Mauro Saraiva. A execução de cada atividade juntos e a permuta de cada informação me foram imprescindíveis para que concluísse essa importante etapa. Esse mérito também lhes pertence!

À UFAL,

A meus orientadores de mestrado, Prof. Dr. Geraldo Roberto Quintão Lana e Profa. Dra. Sandra Roseli Valério Lana, pela importante

contribuição na execução do meu primeiro experimento de tese e importantes sugestões em meu exame de qualificação e defesa de tese.

Aos estudantes de zootecnia Ana Patrícia, Daniela Mendonça, Elisama Castro, Luis Carlos, Romilton Ferreira e Thamires Ferreira que comigo “puseram as mãos na massa” e juntos executamos meu primeiro experimento.

Às instituições colaboradoras

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudo concedida.

À Ajinomoto Animal Nutrition, pela valiosa contribuição nas pesquisas, disponibilizando os aminoácidos.

A todos vocês, MEU MUITO OBRIGADO!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiii
RESUMO GERAL.....	15
GENERAL ABSTRACT	17
CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	19

CAPÍTULO 1

Desempenho, morfometria intestinal e microbiota cecal em codornas de corte alimentadas com glutamina associada ao ácido glutâmico e submetidas ou não a estresse térmico

1. Introdução	222
1.1. Aspectos funcionais da glutamina no organismo animal.....	23
1.2. Estresse térmico e as alterações fisiológicas adaptativas em aves.....	26
1.3. Suplementação glutamina em dietas de aves submetidas a estresse térmico ambiental.....	28
1.4. Microbiota intestinal de aves	30
1.4.1. Importância da microbiota intestinal	30
1.4.2. Influência da composição dieta sobre a microbiota intestinal.....	32
1.4.3. Influência da temperatura sobre a microbiota intestinal.....	34
1.4.4. Sequenciamento do gene 16S RNAr	34
2. Referências Bibliográficas	37

CAPÍTULO 2

Suplementação dietética de glutamina associada ao ácido glutâmico sobre o desempenho, morfometria intestinal e características de carcaça de codornas de corte.....

Resumo.....	52
Abstract	53
Introdução	54
Material e Métodos	55

Resultados	57
Discussão	62
Conclusões	64
Referências Bibliográficas	64

CAPÍTULO 3

Caraterização da diversidade microbiana cecal de codornas de corte submetidas a estresse térmico crônico e suplementadas com glutamina associada ao ácido glutâmico.....	68
Resumo.....	69
Abstract	70
Introdução	71
Material e Métodos	72
Resultados	77
Discussão	85
Conclusões	87
Referências Bibliográficas	88

CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES.....	94
---	----

APÊNDICES.....	95
Apêndice A - Parâmetros utilizados no IM-TORNADO.....	72
Apêndice B - Perfil taxonômico total do metagenoma cecal de codornas de corte aos 21 dias de idade.....	72
Apêndice C - Perfil taxonômico total do metagenoma cecal de codornas de corte aos 42 dias de idade.....	72

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2 – Suplementação dietética de glutamina associada ao ácido glutâmico sobre o desempenho, morfometria intestinal e características de carcaça de codornas de corte

Tabela 1. Composição percentual e nutricional das dietas experimentais de um a 21 dias de idade	56
Tabela 2. Consumo de ração (CR, g), ganho de peso (GP, g) e conversão alimentar (CA, g:g) de codornas de corte submetidas a níveis de suplementação de glutamina associada ao ácido glutâmico	58
Tabela 3. Efeito da suplementação dietética de glutamina associada ao ácido glutâmico sobre a morfometria intestinal de codornas de corte aos 21 dias de idade.....	59
Tabela 4. Pesos absolutos (g) e relativos (%) de carcaça, cortes e vísceras comestíveis de codornas europeias aos 42 dias de idade submetidas a níveis de suplementação da glutamina associada ao ácido glutâmico na dieta	611

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 – Desempenho, morfometria intestinal e microbiota cecal em codornas de corte alimentadas com glutamina associada ao ácido glutâmico e submetidas ou não a estresse térmico – Referencial Teórico

Figura 1. Metabolismo da glutamina24

CAPÍTULO 3 – Desempenho, morfometria intestinal e microbiota cecal em codornas de corte alimentadas com glutamina associada ao ácido glutâmico e submetidas ou não a estresse térmico – Referencial Teórico

Figura 1. Construto final para sequenciamento em plataforma Illumina, incluindo os iniciadores específicos para as regiões hipervariáveis do gene 16S RNAr (primers 5' e 3' específicos), as sequências de ligação CS1 e CS2 do sistema Fluidigm e os adaptadores Illumina i5 e i775

Figura 2. Perfil eletroforético de pool de amplificadores (bibliotecas), indicando pico de leitura dos contrutos77

Figura 3. Gráfico de Krona do perfil taxonômico total do metagenoma cecal de codornas de corte aos 21 dias de idade.....78

Figura 4. Gráfico de Krona do perfil taxonômico total do metagenoma cecal de codornas de corte aos 42 dias de idade.....79

Figura 5. Percentual dos filos bacterianos presentes nos cecos de codornas de corte aos 21 dias de idade, submetidas aos tratamentos térmicos e dietéticos.....80

Figura 6. Percentual dos gêneros bacterianos presentes nos cecos de codornas de corte aos 21 dias de idade, submetidas aos tratamentos térmicos e dietéticos.....81

Figura 7. Percentual dos filos bacterianos presentes nos cecos de codornas de corte aos 42 dias de idade, submetidas aos tratamentos térmicos e dietéticos.....	82
Figura 8. Percentual dos gêneros bacterianos presentes nos cecos de codornas de corte aos 42 dias de idade, submetidas aos tratamentos térmicos e dietéticos.....	82
Figura 9. Índices de Shannon (A e C) e Chao1 (B e D) em função do número de sequências por amostra dos cecos de codornas de corte submetidas aos tratamentos térmicos e dietéticos testados.....	83
Figura 10. Análise de Coordenadas Principais (PCoA) UniFrac não ponderada (A e C) e ponderada (B e D) das sequências do gene do 16S RNAr de amostras dos cecos de codornas de corte submetidas aos tratamentos térmicos e dietéticos testados.....	84

**DESEMPENHO, MORFOMETRIA INTESTINAL E MICROBIOTA CECAL
EM CODORNAS DE CORTE ALIMENTADAS COM GLUTAMINA
ASSOCIADA AO ÁCIDO GLUTÂMICO E SUBMETIDAS OU NÃO A
ESTRESSE TÉRMICO**

RESUMO GERAL

Objetivou-se por meio do presente estudo avaliar o desempenho, morfometria intestinal e microbiota cecal em codornas de corte alimentadas com glutamina (Gln) associada ao ácido glutâmico (Glu) e submetidas ou não a estresse térmico. Para tanto, foram desenvolvidos três experimentos, o primeiro foi realizado no Setor de Coturnicultura do CECA/UFAL, o segundo e terceiro experimentos no Setor de Avicultura do CCHSA/UFPB. No primeiro experimento estudou-se o efeito da suplementação dietética de glutamina associada ao ácido glutâmico sobre o desempenho, morfometria intestinal e características de carcaça de codornas de corte. Foram utilizadas 800 aves não sexadas, com um dia de idade, distribuídas em delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos (0,0; 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8% de suplementação de Gln+Glu) e oito repetições com 20 aves por unidade experimental. Os resultados do desempenho, pelo teste de Dunnett, mostraram redução ($P<0,05$) no consumo de ração das aves que receberam 0,6 e 0,8% de suplementação de Gln+Glu, bem como redução no ganho de peso ($P<0,05$) ao nível de 0,8% de Gln+Glu na fase de um a 21 dias de idade. A análise regressão, excluindo-se o tratamento controle, apresentou aumento linear ($P<0,05$) no consumo de ração na fase de 22 a 42 dias. Para morfometria intestinal, pelo teste de Dunnett, constatou-se maior profundidade de cripta do duodeno ($P<0,05$) ao nível de 0,6% de Gln+Glu; menor altura de vilo do jejuno ($P<0,05$) aos níveis de 0,4; 0,6 e 0,8% de Gln+Glu; menor profundidade de cripta do jejuno ($P<0,05$) aos níveis de 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8% de Gln+Glu; e maior altura de vilo do íleo ($P<0,05$) aos níveis de 0,2; 0,6 e 0,8% de Gln+Glu, todos quando comparados ao tratamento controle; e, pela análise de regressão, excluindo-se o controle, constatou-se efeito quadrático ($P<0,05$) para a altura de vilo e profundidade de cripta do jejuno e para altura de vilo do íleo, cujos respectivos pontos de mínima estimados foram 0,59; 0,58 e 0,51%. No segundo e no terceiro experimentos objetivou-se caracterizar a microbiota

cecal de codornas de corte e elucidar o efeito do estresse térmico crônico e da suplementação dietética de glutamina associada ao ácido glutâmico sobre a diversidade microbiana. Em ambos os experimentos foram utilizadas 320 codornas de corte, distribuídas em delineamento inteiramente ao acaso, com duas condições térmicas em cada experimento [conforto e frio (experimento 1); conforto e calor (experimento 2)] e duas dietas (dieta basal e dieta suplementada com 0,2% de Gln+Glu), com oito repetições e dez aves por unidade experimental. Aos 21 e aos 42 dias de idade seis aves de cada tratamento dos experimentos 1 e 2, respectivamente, foram abatidas, colhidos os cecos e congelados a -80°C ; posteriormente procedeu-se à extração de DNA, sequenciamento e processamento das sequências geradas. Por meio da identificação das sequências geradas, constatou-se em ambas as idades maior abundância dos filos *Firmicutes*, seguido de *Bacteroidetes*, os quais foram constituídos majoritariamente pelo gêneros *Megamonas* e *Bacteroides*, respectivamente. A análise estatística não encontrou efeito ($P>0,05$) dos tratamentos térmicos e dietéticos sobre a diversidade da microbiota cecal das codornas. Conclui-se que a suplementação de glutamina e ácido glutâmico não melhora o desempenho e características de carcaça de codornas de corte, no entanto, a suplementação de 0,2% destes aminoácidos favorece o desenvolvimento morfométrico do íleo aos 21 dias de idade. A microbiota cecal de codornas de corte aos 21 e aos 42 dias de idade é composta predominantemente pelo filo *Firmicutes*, seguido de *Bacteroidetes*; e a família mais abundante nos cecos de codornas de corte é *Veillonellaceae*, cujo gênero *Megamonas* representa mais de 1/3 do total de bactérias colonizadoras. O estresse térmico crônico e a suplementação dietética de 0,2% Gln+Glu não alteram a diversidade da microbiota dos cecos de codornas de corte.

Palavras-chave: codornas europeias, estresse ambiental, glutamato, microbiota intestinal, morfofisiologia intestinal.

Performance, intestinal morphology and cecal microbiota in quails meat type fed with glutamine associated with glutamic acid and submitted or not to thermal stress

GENERAL ABSTRACT

The current study aimed to evaluate the performance, intestinal morphometry and cecal microbiota in meat type quails feed with glutamine (Gln) associated to glutamic acid (Glu) and submitted to thermal stress or not. For this, three experiments were carried out, the first one was carried out in the Coturniculture Sector of the CECA/UFAL, the second and third experiments in the Poultry Sector of CCHSA/UFPB. In the first experiment, we studied the effect of dietary supplementation of glutamine associated with glutamic acid on performance, intestinal morphology and quails carcass characteristics. Were used 800 non-sexed quails with one day old, and distributed in a completely randomized design with five treatments (0.0; 1.0; 2.0; 3.0 and 4.0 % of supplementation glutamine and glutamic acid), and eight replicates with 20 quails per experimental unity were used. In the analysis of data for performance, by Dunnett test, there was reduced ($P < 0.05$) in feed intake of the birds at the levels of 0.6 and 0.8% of Gln + Glu, and less weight gain ($P < 0.05$) at the 0.8% Gln+Glu level in the one to 21 day phase, compared to the control treatment; and, by regression analysis, excluding the control treatment, there was an increasing linear effect ($P < 0.05$) for feed intake in stage 22 to 42 days of age. For intestinal morphometry, the Dunnett's test revealed a greater depth of duodenum crypt ($P < 0.05$) at the level of 0.6% Gln+Glu; lower jejunal villus height ($p < 0.05$) levels of 0.4; 0.6 and 0.8% Gln+Glu; lower jejunum crypt depth ($P < 0.05$) levels of 0.2; 0.4; 0.6 and 0.8% Gln+Glu; and higher ileus villus height ($P < 0.05$) at levels of 0.2; 0.6 and 0.8% Gln+Glu, all when compared to the control treatment; by regression analysis, excluding the control, it was observed quadratic effect ($P < 0.05$) for the villus height and jejunum crypt depth and villus height of the ileum, whose respective minimum points were estimated 0 , 59; 0.58 and 0.51%. Carcass characteristics, cuts and edible offal of quails at 42 days were not affected ($P > 0.05$) by Gln + Glu supplementation levels. In the second and third experiments, the objective was to characterize the microbiota of meat type quails and elucidate the effect of

chronic heat stress and dietary glutamine (Gln) supplementation on glutamic acid (Glu) on microbial diversity. Two experiments, each with 320 cutting quails, were conducted in a completely randomized design with two thermal conditions in each experiment (comfort and cold (experiment 1); Comfort and heat (experiment 2)] and two diets (basal diet and diet supplemented with 0.2% Gln + Glu), with eight replicates and ten birds per experimental unit. At 21 and 42 days of age, six birds from each treatment of experiments 1 and 2, respectively, were slaughtered, collected and frozen at -80 ° C; Afterwards DNA extraction, sequencing and processing of the generated sequences were carried out. By means of the identification of the generated sequences, it was observed in both ages greater abundance of the *Firmicutes* phyla, followed by *Bacteroidetes*, which were constituted mainly by the genus *Megamonas* and *Bacteroides*, respectively. The statistical analysis did not find an effect ($P > 0.05$) of the thermal and dietary treatments on the diversity of the cecal microbiota of the quails. It is concluded that the supplementation of glutamine and glutamic acid does not improve the performance and carcass characteristics of cut quails, however, the supplementation of 0.2% of these amino acids favors the morphometric development of the ileum at 21 days of age. The cecal microbiota of meat type quails at 21 and 42 days of age is predominantly composed of *Firmicutes*, followed by *Bacteroidetes*; and the most abundant family in the quails cecum is *Veillonellaceae*, whose genus *Megamonas* represents more than 1/3 of the total colonizing bacteria. Chronic thermal stress and dietary supplementation of 0.2% Gln+Glu do not alter the microbiota diversity of cut quails ceca.

Keywords: environmental stress, european quail, glutamate, intestinal microbiota, intestinal morphophysiology.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Assim como nas demais atividades zootécnicas, a maximização produtiva associada a baixos custos de produção é o grande desafio e o maior interesse na avicultura moderna. Para tanto, a efetividade dos mecanismos digestórios membranosos e absortivos é de vital relevância, sendo determinada pelo desenvolvimento morfofisiológico intestinal e pela composição e atividade da microbiota intestinal, principalmente dos cecos, a qual pode limitar o aproveitamento dos nutrientes da dieta, e, conseqüentemente, a resposta produtiva.

A imaturidade do trato digestório é um fator limitante à capacidade de utilização de nutrientes pelos neonatos. A eficiência dos processos digestivos e absortivos depende do grau de maturidade da mucosa intestinal, medida pela altura e quantidade de vilos, o que corresponde ao número de suas células epiteliais, as quais atuarão na digestão membranosa e na absorção dos nutrientes. A maturidade da mucosa intestinal ocorre gradativamente durante as primeiras semanas de vida das aves, sendo atingida por volta da terceira semana de idade. Estratégias que possam antecipar este processo parecem ser favoráveis a melhor resposta produtiva, as quais podem ser adotadas no manejo nutricional pela utilização de nutrientes que apresentem efeito trófico sobre a mucosa.

Aliada ao papel da mucosa intestinal, a microbiota cecal simbiótica desempenha importante função na digestão de polissacarídeos, na produção de vitaminas do complexo B e K e na exclusão de agentes patogênicos. Relata-se que o estresse térmico é um dos fatores que podem promover alterações na fisiologia intestinal e, conseqüentemente, na composição da microbiota do intestino. Se esta proposição for verdadeira em codornas de corte, as perdas produtivas decorrentes desta intempérie ambiental podem estar associadas às mudanças no perfil de colonização intestinal das aves.

Estudos com frangos de corte indicam que a suplementação de glutamina e/ou ácido glutâmico pode antecipar a maturidade intestinal nas primeiras semanas de vida das aves, bem como minimizar o impacto do estresse térmico pela restauração da mucosa intestinal e síntese de moléculas que minimizam os efeitos nocivos do estresse térmico. No entanto, não se sabe se este manejo nutricional afeta a composição da microbiota cecal das aves, seja de maneira isolada ou associada ao estresse térmico.

Inferese-se que a suplementação destes aminoácidos também possa favorecer a maturidade intestinal de codornas de corte durante as primeiras semanas de vida e minimizar o impacto do estresse por frio e por calor sobre a microbiota cecal das aves.

Assumindo estas proposições, objetivou-se no primeiro capítulo descrever os aspectos funcionais da glutamina no organismo animal e o efeito do estresse térmico sobre a fisiologia e a produtividade, partindo para a indicação da suplementação dietética de glutamina em aves submetidas ao estresse térmico, considerando-se a influência da dieta e da temperatura ambiental sobre a comunidade microbiana intestinal.

O segundo capítulo apresenta um experimento executado para avaliar o efeito da suplementação dietética de glutamina associada ao ácido glutâmico sobre o desempenho produtivo, morfometria intestinal e características de carcaça de codornas de corte.

No terceiro e último capítulo objetivou-se caracterizar a microbiota cecal de codornas de corte e elucidar o efeito do estresse térmico e da suplementação dietética de glutamina associada ao ácido glutâmico sobre a diversidade microbiana.

CAPÍTULO 1

Referencial Teórico

Desempenho, morfometria intestinal e microbiota cecal em codornas de corte alimentadas com glutamina associada ao ácido glutâmico e submetidas ou não a estresse térmico

1. Introdução

A coturnicultura é a atividade pecuária que mais tem crescido no Brasil. Rapidamente tem se inserido na avicultura industrial, adotando tecnologias de produção e ganhando espaço no mercado de carne e ovos. Somente entre os anos de 2010 e 2015, o efetivo de codornas japonesas e europeias passou de aproximadamente 13 milhões para 22 milhões de aves, o que representa aumento de 69,28% no plantel nacional (IBGE, 2016).

No Brasil, as linhagens mais utilizadas para a produção de carne e ovos são a aves do genótipo europeu e japonês, respectivamente. Apesar de não haver números oficiais específicos do plantel de cada linhagem, sabe-se que a criação de aves para a produção de ovos supera bastante os lotes destinados a exploração de carne. No entanto, as fêmeas japonesas também são abatidas e suas carcaças comercializadas ao término do período de produção de ovos.

As codornas europeias, também denominadas codornas de corte, apresentam maior taxa de crescimento que as japonesas e ambas alcançam o pico máximo de taxa de crescimento aos 27 dias, período de maior deposição de proteína e água na carcaça. Após esse período, a taxa de crescimento diminui e o ganho de peso das aves passa a ter retorno progressivamente decrescente, com aumentos da deposição de gordura nas vísceras, retenção de nutrientes no ovário-oviduto e exigência de energia dietética (Silva et al., 2012). Aos 42 dias de idade, as aves de corte alcançam peso médio de 267g, consumo de ração de 848g e conversão de 3,30g/g, apresentando 55% de rendimento de carcaça, 45% de peito e 26% de coxa e sobrecoxa (Grieser et al., 2015). Nesta idade as aves já se encontram na fase reprodutiva, por isso, as fêmeas apresentam maior peso corporal que os machos, devido ao desenvolvimento do seu sistema reprodutor, no entanto, os machos apresentam melhor rendimento de carcaça (Ferreira et al., 2014). Esse curto ciclo produtivo e reprodutivo são duas das principais vantagens da criação de codornas, tornando-a uma alternativa pecuária de rápida disponibilidade de carne para mercado consumidor.

Na coturnicultura, assim como nas demais atividades zootécnicas, a otimização do potencial produtivo dos animais é meta principal na pesquisa genética e nutricional. O grande desafio da nutrição moderna é explorar ao máximo as propriedades dos

nutrientes na alimentação, de forma que sua utilização precisa e racional conceda aos animais as condições necessárias para expressarem fenotipicamente toda sua capacidade genética produtiva.

Estudos vêm sendo desenvolvidos com a finalidade de otimização da capacidade funcional do intestino das aves, utilizando nutrientes que possam melhorar o desenvolvimento da mucosa (Attia et al., 2011; Dai et al., 2011a; Sakamoto et al., 2011; Moreira Filho et al., 2015) e aumentar a expressão de transportadores intestinais (Foye et al., 2009), resultando em melhor aproveitamento dos nutrientes da dieta. Dentre os nutrientes estudados, a glutamina é destaque pela sua atuação nas condições morfofisiológicas do trato gastrointestinal, resultando em aumento da superfície de absorção da mucosa intestinal e, conseqüentemente, do desempenho zootécnico.

1.1. Aspectos funcionais da glutamina no organismo animal

A glutamina é um aminoácido neutro, sintetizado por diversas células do organismo e considerada o aminoácido mais abundante no plasma sanguíneo e no tecido muscular esquelético (Newsholme, 2003; He et al., 2010). Está envolvida em vários processos biológicos, participando da gliconeogênese, da síntese de ureia, da diferenciação e síntese celular, da síntese de nucleotídeos e ácidos nucleicos e da produção de moléculas que participam da homeostase e da proteção da integridade celular (He et al., 2010).

A síntese e o consumo de glutamina diferem dentre os tecidos do organismo, sendo a quantidade e especificidade das enzimas presentes os fatores determinantes do seu metabolismo. A glutamina sintetase catalisa a síntese de glutamina pela adição de uma molécula de amônia ao glutamato, e a glutaminase faz a reação inversa; a glutamato desidrogenase catalisa a reação reversível de glutamato a α -cetoglutarato (Figura 1) (Mohammed et al., 2013). Os principais órgãos produtores de glutamina são os músculos, o encéfalo e os pulmões, enquanto que os principais consumidores são o intestino e os rins. O fígado tanto consome como produz glutamina, devido à alta atividade das enzimas glutamina sintetase e glutaminase presentes em suas células, a depender das necessidades do organismo (Brosnan, 2003; Newsholme, 2003).

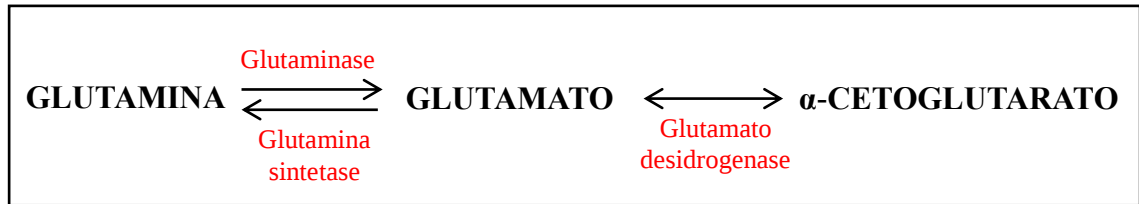


Figura 1. Metabolismo da glutamina

Por ser o principal local de síntese, estoque e liberação de glutamina para o organismo, o tecido muscular esquelético desempenha papel metabólico essencial na regulação da concentração de glutamina corporal. No músculo, a glutamina é o aminoácido livre mais abundante, sua concentração é 50-200 vezes maior do que todos os aminoácidos essenciais (Biolo et al., 1995). No entanto, a concentração de glutamina neste tecido depende do tipo de fibra que o constitui. As fibras oxidativas (“músculo vermelho”) apresentam estoque de glutamina até três vezes maior que as fibras glicolíticas (“músculo branco”), isso devido a maior atividade da glutamina sintetase e a maior disponibilidade celular de ATP para sua síntese (Turinsky & Long, 1990; Rowbottom et al., 1996; Curi et al., 2005)

No plasma sanguíneo de aves domésticas, a glutamina representa cerca de 15% do total dos aminoácidos livres, sendo o principal transportador de nitrogênio entre os órgãos, em termos quantitativos (Geraert et al., 1996). Esse transporte contribui na síntese de outros aminoácidos, e também tem grande importância na manutenção do equilíbrio ácido-base e síntese da ureia. Ao chegar aos rins, a glutamina é clivada pela ação da glutaminase fosfato-dependente e tem seu grupamento NH_3 transportado para o lúmen do túbulo coletor, associando-se ao íon H^+ e sendo excretada na forma de ácido úrico (Lemieux et al., 1985; Wright et al., 1990).

No intestino e no sistema imunológico, a glutamina apresenta-se como o principal combustível energético das células de proliferação rápida. Ao ser hidrolisada, sua cadeia carbonada pode originar o α -cetoglutarato, precursor energético integrante do ciclo de Krebs, e suas moléculas nitrogenadas fornecem átomos de nitrogênio para formação de nucleotídeos, componentes dos ácidos nucleicos, essenciais na síntese proteica e divisão celular (Newsholme et al., 2003; Curi et al., 2007). Além destas funções amplamente estudadas da glutamina, este aminoácido também está relacionado à homeostase celular e à mecanismos de proteção e reparo de proteínas de vários tecidos.

No meio intracelular, a glutamina pode sofrer hidrólise e formar o glutamato, substrato essencial para a síntese da glutathione. A glutathione, por sua vez, é um importante antioxidante endógeno do organismo animal, presente em concentrações elevadas na maioria das células de mamíferos e aves (Fläring et al., 2003; Lora et al., 2004; Marí et al., 2009). Trata-se de um tripeptídeo linear, constituído por glutamato, cisteína e glicina, presente no organismo em sua forma reduzida (GSH) ou oxidada dimerizada (GSSG), que atua na proteção da membrana celular e mitocondrial contra a ação oxidativa dos radicais livres nos fosfolípidios, além de manter os grupos tiol de muitas proteínas na forma reduzida, condição essencial para manutenção de sua função biológica normal (Arrick et al., 1983; Fläring et al., 2003).

Associada à ação da glutathione na proteção da estrutura celular, a glutamina também está relacionada à ativação de moléculas de proteção da integridade celular, conhecidas como proteínas de estresse ou choque térmico (HSP's), presentes em vários tecidos do organismo e em diversos compartimentos da célula eucariótica (Curi et al., 2005; Cruzat et al., 2009). Essas proteínas pertencem à família das chaperonas e auxiliam no reparo de estruturas na molécula proteica e na identificação e no remodelamento de proteínas danificadas durante períodos de estresse. Elas desempenham um papel importante nas células contra agentes estressores, tais como: calor, hipóxia, deficiência nutricional e radiação ultravioleta (Evdonin et al., 2006; Ghayour-Mobarhan et al., 2012). As proteínas que compõem a família HSP70 são as mais abundantes e mais estudadas, sendo consideradas as principais representantes entre as proteínas induzidas pelo estresse (Ellis, 1987).

Os processos metabólicos intracelulares e sistêmicos que envolvem a glutamina têm sua eficiência comprometida quando os animais se encontram em situações adversas que minimizam a disponibilidade de glutamina e seus precursores no organismo animal. Nos sistemas intensivos de criação, em que se busca o máximo de rendimento e otimização do espaço físico, instalações e equipamentos, os lotes tornam-se susceptíveis a inúmeros fatores estressantes, tais como superlotação, falhas nutricionais, ventilação deficiente, insuficiente consumo de água e alterações da temperatura ambiente (Furlan & Macari, 2002). Dentre estes fatores, o estresse térmico ambiental tem requerido atenção especial por produtores e pesquisadores devido às

expressivas perdas que causam na produção animal (Furlan & Macari, 2002; Manno et al., 2006).

1.2. Estresse térmico e as alterações fisiológicas adaptativas em aves

A temperatura do ar ambiente é considerada o fator climático de maior influência sobre o organismo animal, a qual interfere diretamente na produtividade por meio de alteração fisiológicas, metabólicas e comportamentais (Renaudeau et al., 2011). Para eficiência nos processos biológicos e maximização do potencial produtivo, os animais dependem de uma faixa de temperatura adequada, também chamada de zona de conforto térmico, em que a homeotermia é mantida com menor gasto energético (Macari et al., 2004). Do ponto de vista de produção, este aspecto reveste-se de muita importância pelo fato que, dentro desses limites, os nutrientes ingeridos pelos animais são mais utilizados para seu crescimento e desenvolvimento (Baêta & Souza, 1997).

Apesar de serem animais homeotérmicos, o sistema termorregulador das aves neonatas apresenta-se funcionalmente imaturo, sendo incapaz de manter a temperatura corporal interna quando o ambiente está com temperatura abaixo de faixa de conforto (Furlan & Macari, 2002). Além disso, a relação superfície/massa corporal do neonato é maior que de uma ave adulta, o que dificulta a retenção do calor corporal (Baêta & Souza, 1997). Ao longo das duas primeiras semanas de vida da ave, a eficiência da atividade térmica reguladora é adquirida gradativamente (Furlan & Macari, 2002) e durante esse período faz-se necessária a disponibilidade de uma fonte externa de calor no galpão de produção, pois a exposição dos animais ao frio compromete a eficiência produtiva, visto que grande parte da energia ingerida na ração que poderia ser utilizada para produção é desviada para a termorregulação (Cordeiro et al., 2010).

Do ponto de vista fisiológico, a exposição dos animais ao frio condiciona o organismo à várias alterações que comprometem a homeostase e a funcionalidade das células pelo aumento da produção de radicais livres (Xiang et al., 2002; Zhang et al., 2011), alterações na atividade da glutathione peroxidase (Zhao et al., 2014) e alterações na expressão de HSPs (Givisiez et al., 2003; Zhao et al., 2014), cujos efeitos depende da intensidade do estresse e do tipo de tecido atingido. Essas condições refletem em desequilíbrio no sistema oxidante/antioxidante e danos na estrutura celular, inclusive do DNA (Jia et al., 2009).

A termotolerância da ave varia em função da idade, em codornas de corte de 1 a 7 dias a zona de conforto está entre 36 e 39°C, considerando-se o índice de temperatura de globo negro e umidade (ITGU) entre 87 e 91; no período de 28 a 35 dias, a zona de conforto térmico está em torno de 25,0°C, com ITGU de 75 (Sousa 2014a,b). Ao atingirem a fase adulta, a amplitude da faixa de conforto térmico das aves abrange temperaturas mais baixas, o que as torna mais susceptíveis ao estresse por calor, sendo este o principal fator climático que limita o desenvolvimento produtivo dos animais em regiões de clima quente.

Ainda que o sistema termorregulador das aves tenha alcançado plena capacidade funcional na idade adulta, a eficiência de perda de calor da superfície corporal é limitada, principalmente devido à ausência de glândulas sudoríparas (Baêta & Souza, 1997). Assim, o mecanismo de perda de calor latente mais eficiente nestes animais é a evaporação através das vias respiratórias, caracterizada pelo aumento da frequência respiratória e perda de água pelas vias aéreas, e, conseqüentemente, de calor latente. No entanto, a intensidade e a duração do estresse podem resultar em sérias disfunções fisiológicas nos animais que comprometem a produtividade e resultam em aumento da mortalidade nos plantéis. A exemplo disso, a alcalose respiratória torna-se uma grande preocupação em sistemas de criação cujas aves estão vulneráveis às elevadas temperaturas. O aumento da frequência respiratória ocasiona redução da concentração de dióxido de carbono no sangue e, conseqüentemente, elevação do pH sanguíneo (Teeter et al., 1985); tal desequilíbrio, associado ao aumento dos níveis sanguíneos de corticosterona, ainda que não resulte diretamente na morte dos animais, os torna mais susceptíveis às doenças devido a supressão do sistema imunológico (Quinteiro-Filho et al., 2010 e 2012).

Ademais, semelhante a resposta adaptativa ao estresse por frio, o estresse por calor também desencadeia aumento da oxidação celular e maior expressão de HSP70 (Hao et al., 2012). Estas alterações são acompanhadas pela redução da concentração e a síntese de glutamina livre no organismo, o que ocasiona aumento do catabolismo proteico muscular, situação que é agravada pela redução do consumo de ração. No epitélio intestinal, há maior desgaste da mucosa, o que resulta em menor capacidade digestiva e absorviva e aumento da demanda energética para restauração e manutenção do tecido (Quinteiro-Filho et al., 2010 e 2012; Hanczakowska & Niwińska et al., 2013).

À medida que o organismo aciona os mecanismos de termorregulação para redução do impacto do ambiente térmico, seja em situações de baixas ou elevadas temperaturas, sua eficiência de utilização da energia disponível e demais nutrientes é perdida (Kerr et al., 2003; Quinteiro-Filho et al., 2012). Como resultado, observa-se piora dos índices de desempenho, aumento da taxa de mortalidade, depreciação da qualidade e conformação das carcaças, além de alterações no tamanho dos órgãos, devido ao ajuste fisiológico para aumentar ou reduzir a produção de calor corporal (Manno et al., 2006; Lara & Rostagno, 2013; Berton et al., 2015). Sob estas condições, a suplementação dietética de glutamina aumenta a disponibilidade de substrato necessário à otimização dos processos fisiológicos em termos celulares e sistêmicos.

1.3. Suplementação glutamina em dietas de aves submetidas a estresse térmico ambiental

Apesar da glutamina ser considerada um aminoácido não essencial, em situações de estresse térmico ambiental, caracterizadas por estados hipercatabólicos ou hipermetabólicos, há redução de sua concentração tecidual e sua síntese pelo organismo não é suficiente para a otimização dos processos celulares (Askanazi et al., 1980; Pierzynowski et al., 2001), o que a torna condicionalmente essencial.

A prática da suplementação dietética de glutamina minimiza a degradação muscular, aumenta o aporte energético para células de rápido crescimento e potencializa a capacidade de proteção e de restauração celular, refletindo maior manutenção e restauração da integridade da mucosa intestinal em situações de estresse térmico ambiental, resultando em melhora dos índices produtivos (Zhou et al., 1997 e 2007; Fläring et al., 2003; Dai et al., 2011a).

A influência da suplementação dietética de glutamina sobre a resposta bioquímica e fisiológica adaptativa em frangos de corte submetidos ao estresse crônico por frio foi estudada por Fathi et al. (2015). A exposição prolongada a baixas temperaturas promoveu acentuado estresse oxidativo no plasma sanguíneo e no fígado dos animais, situação caracterizada pelo aumento dos níveis do radical livre malondialdeído e redução da atividade da glutathione peroxidase das aves aos 21 e 42 dias de idade. Também se constatou aumento da atividade das enzimas aspartato e alanina aminotransferases no plasma sanguíneo, evidenciando estado hipermetabólico

nas aves submetidas ao estresse. No entanto, todas estas alterações bioquímicas e fisiológicas foram contornadas pela suplementação de glutamina, o que também lhes conferiu redução da taxa de mortalidade das aves.

Dai et al. (2011a) estudaram o efeito da suplementação dietética de glutamina em frangos de corte submetidos a condições cíclicas de estresse por calor nas fases de crescimento e engorda. Os autores constaram aumento de 23,2% do ganho de peso e redução de 7,5% da conversão alimentar dos animais que receberam suplementação de 0,5% de glutamina sobre os animais do grupo controle. O peso da carcaça, rendimento de carcaça e peso do peito das aves suplementadas também foram superiores aos daquelas submetidas às mesmas condições de estresse calórico e que não receberam a suplementação de glutamina. Salmanzadeh et al. (2013) relataram melhoras no desempenho e características de carcaça de perus submetidos a estresse por calor que receberam suplementação dietética de glutamina, o que lhes foram atribuídas ao aumento da altura de vilos do duodeno e, principalmente, do jejuno, possibilitando melhor assimilação e utilização dos nutrientes.

Hao et al. (2012) verificaram que frangos submetidos a estresse por calor agudo que receberam doses parenterais de glutamina (0,75 mg/kg de peso corporal) tiveram a expressão de HSP70 duodenal e jejunal aumentada, bem como manutenção da mucosa intestinal. Estes autores relataram ainda forte correlação entre o aumento da proteína HSP70 com a maior atividade da amilase, lipase, tripsina e fosfatase alcalina nos animais que receberam infusão do aminoácido.

A melhora na resposta produtiva e na resistência das aves aos efeitos do estresse térmico talvez não estejam restritas à atuação isolada da glutamina sobre a fisiologia sistêmica e intestinal, sabe-se que a microbiota do intestino também exerce grande influência na integridade da mucosa intestinal e sobre os processos digestório, absorptivo e metabólico, podendo ser corresponsável por tais respostas (Langhout et al., 2000; Looft et al., 2014). Tal proposição leva-se a inferir que fatores favoráveis à estabilidade do ambiente intestinal propiciam à otimização das atividades microbianas no intestino, resultando em benefícios ao hospedeiro; o contrário também deve ser verdade, a instabilidade nas condições fisiológicas do meio intestinal pode comprometer a atividade da microbiota colonizadora e resultar perdas produtivas.

1.4. Microbiota intestinal de aves

1.4.1. Importância da microbiota intestinal

A microbiota intestinal é uma realidade complexa, tanto devido a sua diversidade de espécies microbianas, como pela sua interação entre si e com o hospedeiro. Os integrantes microbianos apresentam importante relação ecológica de mutualismo com o hospedeiro, em que o animal fornece substratos e ambiente propício ao crescimento microbiano e os microrganismos executam atividades essenciais na maturação do sistema imunológico intestinal, desenvolvimento morfofisiológico da mucosa, síntese e degradação de nutrientes, além de interferirem no metabolismo nutricional do hospedeiro.

Apesar de representar um desafio à imunidade, a microbiota intestinal desempenha importante papel sobre desenvolvimento e maturidade dos tecidos linfóides e sobre a manutenção e regulação da imunidade intestinal (Sommer & Bäckhed, 2013). Durante o período fetal, as células indutoras do tecido linfóide (LTi) são responsáveis pelo desenvolvimento do tecido linfóide associado ao intestino (GALT); após o nascimento, sua maturação depende da colonização microbiana. A presença de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), como lipopolissacarídeos, resíduos de manose e ácidos teicoicos na superfície dos microrganismos, ativam a resposta imune inata, pela atividade de reconhecimento dos receptores tipo Toll (TLRs). Assim, a imunidade inata, caracterizada pela resposta rápida a grande variedade de estímulos, através da ação de macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células Natural Killer (Cruvinel et al., 2010; Thaïss et al., 2014), é dependente da presença dos microrganismos para sua maturação.

Importantes alterações morfológicas e fisiológicas intestinais também são induzidas pela colonização microbiana. Estudos relatam que animais livres de germes (germ-free) apresentam menor peso do intestino delgado e dos cecos (Langhout et al., 2000), além de apresentarem cecos bastante distendidos, com grande quantidade de muco acumulado e, conseqüentemente, as fezes mais pastosas (Smith et al., 2007). Pintainhos germ-free apresentam menor quantidade de células caliciformes e menor expressão gênica de MUC2 no intestino delgado, comparados com aves convencionalmente colonizadas (Cheled-Shoval et al., 2014); nestes animais o ambiente intestinal é caracterizado por pH mais elevado e menor viscosidade intestinal (Langhout

et al., 2000). Por outro lado, a proliferação de patógenos também pode ocasionar mudanças indesejadas na morfologia intestinal dos animais. Frangos inoculados com *Eimeria* spp. e *Clostridium perfringens* apresentaram enterite necrótica com diminuição da altura das vilosidades e da relação vilo/cripta (Golder et al., 2011). Fasina et al. (2010) também relataram que o desafio com *Salmonella* Typhimurium ocasionou aumento da densidade das células caliciformes e diminuição do comprimento dos vilos e da relação vilo/cripta, apresentando “esfoliamento” do epitélio.

A colonização e estabilização da microbiota “saudável” impede a proliferação de grupos microbianos nocivos pelo mecanismo de exclusão competitiva (Fiocchi & Sousa, 2012). A exclusão competitiva refere-se à redução ou inibição da colonização de agente patogênico por meio de alguns mecanismos: ocupação física de um sítio, competição de recursos em determinado nicho físico ou químico, ou injúria do microrganismo. Além de ser importante mecanismo de proteção para o animal, a exclusão pelos microrganismos mutualistas evita o desequilíbrio ecológico e funcional no intestino causado pelo alojamento de microrganismos patogênicos (Oakley et al., 2014).

Os microrganismos intestinais utilizam parte dos nutrientes dietéticos para seu crescimento e podem contribuir nos processos digestivos dos animais. No entanto, a especificidade de degradação dos componentes da dieta varia entre os segmentos intestinais. Looft et al. (2014) descreveram os estágios de degradação de carboidratos em suínos, constatando no íleo predominância de bactérias do filo *Firmicutes*, grande expressão gênica de transportadores bacterianos de monossacarídeos e aminoácidos, presença de genes de enzimas amilolíticas e ausência de enzimas que degradam pectina e hemiceluloses. Em contrapartida, o filo *Bacteroidetes* representou cerca da metade da microbiota no intestino grosso, onde foi encontrada grande quantidade de enzimas que degradam polissacarídeos não amiláceos.

A digestão de carboidratos estruturais é a principal contribuição nutricional da microbiota do intestino grosso sobre a digestão e de aproveitamento de nutrientes, pois os animais não sintetizam enzimas que fazem a hidrólise de ligações betas presentes entre as moléculas (Brito et al., 2009). Contudo, os microrganismos celulolíticos executam essa atividade e disponibilizam como produtos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), que são absorvidos pelas células intestinais e contribuem no balanço

energético (Tremaroli & Bäckhed, 2012), além de estimularem o aumento na área de superfície de absorção pelo desenvolvimento de células epiteliais (Dibner & Richards, 2005; Kien et al., 2007), condicionarem melhor absorção de minerais e inibirem o crescimento de patógenos (Van Immerseel et al., 2005). Outra importante contribuição nutricional dos microrganismos do intestino grosso é síntese de vitamina K e da maioria das vitaminas do complexo B, tais como biotina, cobalamina, ácido fólico, ácido nicotínico, ácido pantotênico, piridoxina, riboflavina e tiamina (Ichihashi et al., 1992; Berg et al., 1996; Tremaroli & Bäckhed, 2012).

Dada a importância da microbiota no aproveitamento de nutrientes e na saúde intestinal e sistêmica do hospedeiro, o conhecimento dos elementos que interferem na diversidade microbiana faz-se necessário, visto que sua manipulação pode contribuir para o desempenho das aves.

1.4.2. Influência da composição dieta sobre a microbiota intestinal

A composição da dieta influencia diretamente a diversidade microbiana intestinal, tanto pela disponibilidade de determinados componentes, como pelas alterações fisiológicas ocasionadas, ou por ambos os fatores, os quais podem favorecer ou limitar o crescimento de grupos microbianos específicos (Oviedo-Rondón, 2009).

O uso de promotores de crescimento e coccidiostáticos na dieta, prática comum e importante na produção aviária, mostra-se uma das principais estratégias de manipulação da constituição da comunidade microbiana intestinal. Um estudo avaliou os efeitos da monensina como coccidiostático e virginiamicina e tilosina como promotores de crescimento sobre o perfil metagenômico cecal de frangos de corte ao longo do período produtivo (Danzeisen et al., 2011). Os resultados mostraram que houve mudanças na estrutura da microbiota ao longo do período produtivo ocasionadas pela ação dos aditivos. Em outro estudo, a adição de penicilina na dieta de frangos resultou em aumento da proporção do filo *Firmicutes* (58,15% vs 91,5%) e diminuição da proporção do filo *Bacteroides* (31,1% vs 2,96%) no ceco de frangos de corte (Singh et al., 2013). Videnska et al. (2013) caracterizaram a microbiota presente nas fezes poedeiras de 15 e 46 semanas de idade antes e após a inclusão dietética de tetraciclina e de estreptomicina e observaram mudanças rápidas na comunidade microbiana induzidas pela ação dos antibióticos, com aumento da prevalência da *Lactobacillales* e

Enterobacteriales. No entanto, a restauração da complexidade da microbiota após a interrupção da terapia era quase tão rápida como as alterações decorrentes da sua implantação.

Além dos promotores de crescimento e coccidiostáticos que são utilizados propositalmente para modulação da diversidade microbiana, os nutrientes presentes nos alimentos também interferem diretamente sobre o crescimento microbiano. O nível de fibras dietéticas, por exemplo, pode desencadear uma série de mudanças no lúmen intestinal que favorecem o crescimento de grupos microbianos específicos em detrimento de outros. As fibras hidrossolúveis em contato com a água formam um gel viscoso que dificulta o acesso dos microrganismos ao nutriente e aumenta a retenção de água promovendo a sensação de saciedade, o que ocasiona diminuição do consumo de ração. Além disso, estas fibras reduzem a taxa de passagem e promovem maior perda endógena, pelo aumento da produção de muco e descamação do epitélio (Parson et al., 1985). Todos estes fatores condicionam predominância dos microrganismos de rápido crescimento sobre aqueles de crescimento lento. Nos cecos das aves, o aumento da produção de AGCC, resultantes da fermentação das fibras, leva à diminuição do pH luminal, inibindo o crescimento de microrganismos sensíveis às condições de acidez e aos ácidos produzidos (Van Immerseel et al., 2005), condições que são favoráveis ao aumento de microrganismos do filo *Firmicutes* (Salonen & Vos, 2014).

O perfil aminoacídico da dieta é outro fator limitante ao crescimento microbiano, devido à preferência de determinadas estirpes por aminoácidos específicos. Seguindo esta proposição, Dai et al. (2010) avaliaram a utilização de aminoácidos por bactérias cultivadas *in vitro* oriundas de diferentes segmentos do intestino delgado de suínos. Baseados na taxa de desaparecimento dos aminoácidos no meio após 24 horas de incubação, os autores classificaram os aminoácidos em três grupos: aminoácidos de elevada taxa de utilização (lisina, arginina, treonina, leucina e de glutamato), os quais foram consumidos em 50% e 90%, nas respectivas 12 e 24 horas após o cultivo; aminoácidos de média utilização (isoleucina, valina e histidina), cuja taxa de utilização foi menor que 40% após 12 horas de cultivo e 50-80% depois de 24 horas; e aminoácidos de baixa taxa de utilização (prolina, metionina, fenilalanina e triptofano), que apenas 35% deles desapareceram do após 24 horas de cultivo.

Em geral, os peptídeos e aminoácidos absorvidos pelas bactérias são utilizados para a síntese de componentes celulares ou catabolizado através de diferentes vias. No entanto, vários aminoácidos oriundos da degradação de proteína também podem ser utilizados na síntese de AGCC. Os aminoácidos utilizados por bactérias anaeróbias para a síntese de acetato são: glicina, treonina, glutamato, lisina, ornitina e aspartato (Barker, 1981); a treonina, o glutamato e a lisina podem ser utilizado para a síntese de butirato; o propionato é produzido principalmente a partir da treonina (Davila et al., 2013), sendo esta o mais versátil aminoácido, dando origem aos três AGCC. Os aminoácidos de cadeia ramificada (valina, leucina e isoleucina), por sua vez, estão associados à síntese de ácidos graxos de cadeia longa (Elsden et al., 1978). Dentre as bactérias fermentadoras de aminoácidos do trato intestinal, estirpes pertencentes aos grupos de *Clostridium* spp., *Fusobacterium* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Veillonella* spp., *Megasphaera elsdenii*, *Acidaminococcus fermentans*, e *Selenomonas ruminantium* têm sido amplamente estudadas (Dai et al., 2011b).

O teor lipídico da dieta também exerce importante influência sobre a diversidade microbiana intestinal. Os lipídeos regulam positivamente a taxa de passagem do alimento no intestino, conferindo maior tempo de contato dos microrganismos com os nutrientes presentes na dieta e favorecendo as espécies que utilizam os ácidos graxos como substrato energético, tais como bactérias lipolíticas do gênero *Clostridium* e *Pseudomonas*, por exemplo (Muys & Willemse, 1965). No entanto, dietas com alto teor em gorduras estimulam maior produção de bile, a qual pode afetar a composição da microbiota em termos quantitativos e de diversidade taxonômica, visto que a bile tem efeito bactericida (Salonen & Vos, 2014). Um estudo de investigação da obesidade induzida pelo fornecimento de ração com alta densidade calórica em suínos identificou aumento na proporção dos filos *Firmicutes* em comparação com *Bacteroidetes* nas fezes dos animais. Os autores constataram que dietas com alta densidade calórica são responsáveis pela mudança da composição da comunidade microbiana do intestino e que a obesidade induzida pela dieta está associada com o aumento na abundância relativa de *Firmicutes* (Pedersen et al., 2013).

1.4.3. Influência da temperatura sobre a microbiota intestinal

Existem relatos de que o ambiente térmico pode modular o perfil microbiano dos cecos das aves pelo crescimento de microrganismos patogênicos e bactérias mutualistas (Burkholder et al., 2008; Song et al., 2014; Borsoi et al., 2015; Tsiouris et al., 2015), contudo, a temperatura ambiental não aparenta afetar diretamente a colonização e o crescimento dos microrganismos do intestino das aves, visto que o sistema termorregulador atua continuamente na manutenção da temperatura interna do corpo, a qual é mantida dentro de estreito limite de variação (Macari et al., 2004; Nascimento et al., 2012). No entanto, os mecanismos que são acionados para efetivação da termorregulação influenciam diretamente as condições do ambiente intestinal, limitando o crescimento de determinados grupos microbianos e favorecendo outros (Macari et al., 2004). Segundo Oviedo-Rondón (2009), qualquer perturbação no ecossistema entérico por alterações na imunidade geral ou fisiologia do intestino das aves, pode promover modificações na estrutura da comunidade microbiana.

Em condições de estresse por frio, por exemplo, observam-se várias mudanças comportamentais, fisiológicas e metabólicas ocorrem no organismo com vistas a evitar a perda de calor para o ambiente e conservar o calor metabólico produzido (Furlan & Macari, 2002). Sob tais condições, os animais tendem a agrupar-se e abrigar-se longe de correntes de ar e superfícies frias; apresentam-se com suas penas eriçadas, pela ação dos músculos eretores dos folículos da pele que se contraem para formação de camada de ar isolante entre as penas; os vasos sanguíneos da pele também se contraem, promovendo vasoconstrição periférica, o que ocasiona aumento do fluxo sanguíneo no núcleo do corpo; e observa-se aumento do consumo de ração dos animais, devido à elevação da taxa metabólica para maior produção de calor (Macari et al., 2004).

Respostas comportamentais e fisiológicas inversas e outras mais são observadas quando os animais são submetidos à condição de estresse por calor. A fim de aumentar a dissipação de calor, os animais aumentam sua área corporal, agachando-se ou ficando em pé com as asas abertas afastadas do corpo (Carvalho et al., 2014); a frequência respiratória é drasticamente aumentada visando a perda de calor pelas vias respiratórias (Tan et al., 2010), o que pode desencadear alcalose respiratória, pela redução do dióxido de carbono no sangue e, conseqüentemente, aumento no pH sanguíneo (Teeter et al., 1985); o fluxo de sangue é desviado para os tecidos periféricos para facilitar a perda de calor pelos processos de condução, radiação e convecção (Takahashi et al., 2009); a

ingestão de água é aumentada para resfriamento do trato gastrointestinal e manutenção do equilíbrio hídrico (Bruno & Macari et al., 2002); e há redução na ingestão de alimento, o que contribui na redução da carga calórica pela atividade metabólica (Takahashi et al., 2009).

Assim, tanto o estresse por calor como o estresse por frio promovem condições adversas que resultam em grandes mudanças no fluxo de nutrientes no lúmen intestinal, na taxa de passagem do alimento ao longo do trato digestório (Tsukada et al., 2002), na consistência da digesta (Tan et al., 2010), no fluxo sanguíneo intestinal (Furlan & Macari, 2002), na síntese e secreção de enzimas digestivas (Hai et al., 2000; Tsukada et al., 2002), na integridade da mucosa intestinal (Marchini et al., 2011; Porto et al., 2015) e da sua camada de proteção e no pH do lúmen intestinal (Hassan et al., 2009; Tsiouris et al., 2015). Dessa forma, infere-se que todas as alterações ocasionadas pelo estresse térmico sobre o ambiente intestinal exercem importante influência sobre a diversidade da microbiota, tanto em termos de riqueza taxonômica, como em termos quantitativos de espécies.

1.4.4. Sequenciamento do gene 16S RNAr

A caracterização da diversidade da microbiota intestinal em termos taxonômicos e quantitativos é possível por meio de técnicas biomoleculares que fazem a identificação microbiana pela leitura de seu genoma. Atualmente sabe-se que a diversidade das bactérias é maior que de qualquer outro grupo de organismos, no entanto, os meios de cultivo são, em maior ou menor extensão, seletivos a grupos particulares (Wintzingerode et al., 1997). Sabe-se ainda que mais de 90% das espécies de microbianas não são representadas quando os métodos tradicionais de cultivo são utilizados, devido às necessidades especiais de crescimento de espécies (Rappe & Giovannoni, 2003). A técnica de sequenciamento metagenômico permite que o universo microbiótico de amostras seja identificado a partir gene 16S RNAr. Essa abordagem permite a visualização dos ecossistemas como unidades biológicas com os seus próprios mecanismos genéticos, indo além da consideração de espécies individuais (Handelsman, 2004; Pessoa Filho, 2011).

Para análise de amostras metagenômicas fundamentalmente e resumidamente, seguem-se as seguintes fases: coleta da amostra ambiental, extração de DNA,

sequenciamento do gene 16S RNAr, processamento das sequências (avaliação da qualidade e filtragem das sequências) e identificação das sequências. As ferramentas de bioinformática auxiliam na interpretação dos resultados gerados pelo sequenciamento, permitindo identificar os genes por meio de comparações com sequências depositadas em bancos de dados de domínio público (Pessoa Filho et al., 2011).

Em suma, ao considerar o papel da glutamina na fisiologia sistêmica e intestinal, o estudo de sua suplementação sobre a resposta produtiva torna-se importante, objetivando-se alcançar melhores índices de desempenho dos animais. Muitos estudos já foram feitos com frangos de corte, perus e poedeiras comerciais (Bartell & Batal, 2007; Dong et al., 2010; Zavarize et al., 2011; Salmanzadeh & Shahryar, 2013; Shakeri et al., 2014), contudo, não há relatos na literatura científica de trabalhos realizados com codornas de corte. Ademais, outra vertente também não explorada é o efeito do estresse térmico sobre a colonização microbiana intestinal, tanto de maneira isolada, como associado à suplementação de aminoácidos que favorecem a manutenção do epitélio intestinal e são nutrientes utilizados por grupos microbianos específicos, como a glutamina e o ácido glutâmico. Partindo deste proposto, este estudo avaliou a suplementação dietética de glutamina associada ao ácido glutâmico sobre a resposta produtiva de codornas de corte e o efeito do estresse térmico sobre diversidade microbiana cecal.

2. Referências Bibliográficas

ARRICK, B. A.; NATHAN, C. F.; COHN, Z. A. Inhibition of glutathione synthesis augments lysis of murine tumor cells by sulfhydryl-reactive antineoplastics. **Journal of Clinical Investigation**, v.71, p.258-267, 1983.

ASKANAZI, J.; CARPENTIER, Y. A.; MICHELSEN, C. B.; ELWYN, D. H.; FURST, P.; KANTROWITZ, L. R.; GUMP, F. E.; KINNEY, J. M. Muscle and plasma amino acids following injury: influence of intercurrent infection. **Annals of Surgery**, v.192, p.78-85, 1980.

ATTIA, Y. A.; HASSAN, R. A.; TAG EL-DIN, A. E.; ABOU-SHEHEMA, B. M. Effect of ascorbic acid or increasing metabolizable energy level with or without supplementation of some essential amino acids on productive and physiological traits of slow-growing chicks exposed to chronic heat stress. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.95, p.744-755, 2011.

BAÊTA, F. C.; SOUZA, C. F. **Ambiência em edificações rurais conforto térmico**. 1.ed. Viçosa: UFV, 1997. 246p.

BARKER, H. A. Amino acid degradation by anaerobic bacteria. **Annual Review of Biochemistry**, v.50, p.23-40, 1981.

BARTELL, S. M.; BATAL, A. B. The effect of supplemental glutamine on growth performance, development of the gastrointestinal tract, and humoral immune response of broilers. **Poultry Science**, v.86, p.1940-1947, 2007.

BERG, R. D. The indigenous gastrointestinal microflora. **Trends in Microbiology**, v.4, p.430-435, 1996.

BERTON, M. P.; DOURADO, R. DE C.; LIMA, F. B. F. DE; RODRIGUES, A. B. B.; FERRARI, F. B.; VIEIRA, L. D. DO C.; BORBA, H. Growing-finishing performance and carcass yield of pigs reared in a climate-controlled and uncontrolled environment. **International Journal of Biometeorology**, v.59, p.955-960, 2015.

BIOLO, G.; FLEMING, R. Y.; MAGGI, S. P.; WOLFE, R. R. Transmembrane transport and intracellular kinetics of amino acids in human skeletal muscle. **American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, v.268, p.E75-E84, 1995.

BORSOI, A.; QUINTEIRO-FILHO, W. M.; CALEFI, A. S.; PIANTINO FERREIRA, A. J.; ASTOLFI-FERREIRA, C. S.; FLORIO, J. C.; PALERMO-NETO, J. Effects of cold stress and Salmonella Heidelberg infection on bacterial load and immunity of chickens. **Avian Pathology**, v.44, p.490-497, 2015.

BRITO, M. S.; OLIVEIRA, C. F. S.; SILVA, T. R. G.; LIMA, R. B.; MORAIS, S. N.; DA SILVA, J. H. V. Polissacarídeos não amiláceos na nutrição de monogástricos—revisão. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.2, p.111-117, 2009.

BROSNAN, J. T. **Interorgan amino acid transport and its regulation**. The Journal of Nutrition, v.133, p.2068S-2072S, 2003.

BRUNO, L. D. G.; MACARI, M. Ingestão de água: mecanismos regulatórios. In: MACARI, M.; FURLAN, R.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**, 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2002. Cap.16, p. 201-208.

BURKHOLDER, K. M.; THOMPSON, K. L.; EINSTEIN, M. E.; APPLGATE, T. J.; PATTERSON, J. A. Influence of stressors on normal intestinal microbiota, intestinal morphology, and susceptibility to Salmonella enteritidis colonization in broilers. **Poultry Science**, v.87, p.1734-1741, 2008.

CARVALHO, G. B.; LOPES, J. B.; SANTOS, N. P. S.; REIS, N. B. N., CARVALHO, W. F., SILVA, S. F., CARVALHO, D. A; SILVA, E. M.; SILVA, S. M. Comportamento de frangos de corte criados em condições de estresse térmico alimentados com dietas contendo diferentes níveis de selênio. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.14, p.785-797, 2014.

Cheled-Shoval, S. L.; Gamage, N. W.; Amit-Romach, E.; Forder, R.; Marshal, J.; Van Kessel, A.; Uni, Z. Differences in intestinal mucin dynamics between germ-free and conventionally reared chickens after mannan-oligosaccharide supplementation. **Poultry Science**, v.93, 636-644, 2014.

CORDEIRO, M. B.; TINÔCO, I. D. F.; SILVA, J. N.; VIGODERIS, R. B.; PINTO, F. D. A. D. C.; CECON, P. R. Conforto térmico e desempenho de pintos de corte submetidos a diferentes sistemas de aquecimento no período de inverno. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, v.217-224, 2010.

CRUVINEL, W. D. M.; MESQUITA JÚNIOR, D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S. D.; SILVA, N. P. D.; ANDRADE, L. E. C. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.50, p.434-447, 2010.

CRUZAT, V. F.; PETRY, É. R.; TIRAPEGUI, J. Glutamina: aspectos bioquímicos, metabólicos, moleculares e suplementação. **Revista Brasileira de Medicina e Esporte**, v.15, p.392-397, 2009.

CURI, R.; LAGRANHA, C. J.; SELLITTI, D. F.; PROCOPIO, J.; PITHON-CURI, T. C.; CORLESS, M.; NEWSHOLME, P. Molecular mechanisms of glutamine action. **Journal of Cellular Physiology**, v.204, p.392-401, 2005.

DAI, S. F.; GAO, F.; ZHANG, W. H.; SONG, S. X.; XU, X. L.; ZHOU, G. H. Effects of dietary glutamine and gamma-aminobutyric acid on performance, carcass characteristics and serum parameters in broilers under circular heat stress. **Animal Feed Science and Technology**, v.168, p.51-60, 2011a.

DAI, Z. L.; WU, G.; ZHU, W. Y. Amino acid metabolism in intestinal bacteria: links between gut ecology and host health. **Frontiers in Bioscience**, v.16, p.1768-1786, 2011b.

DAI, Z. L.; ZHANG, J.; WU, G.; ZHU, W. Y. Utilization of amino acids by bacteria from the pig small intestine. **Amino Acids**, v.39, p.1201-1215, 2010.

DANZEISEN, J. L.; KIM, H. B.; ISAACSON, R. E.; TU, Z. J.; JOHNSON, T. J. Modulations of the chicken cecal microbiome and metagenome in response to anticoccidial and growth promoter treatment. **PLoS One**, v.6, p.e27949, 2011.

DAVILA, A. M.; BLACHIER, F.; GOTTELAND, M.; ANDRIAMIHAJA, M.; BENETTI, P. H.; SANZ, Y.; TOMÉ, D. Intestinal luminal nitrogen metabolism: role of the gut microbiota and consequences for the host. **Pharmacological Research**, v.68, p.95-107, 2013.

DIBNER, J. J.; RICHARDS, J.D. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. **Poultry Science**, v.84, p.634-643, 2005.

DONG, X. Y.; YANG, C. F.; TANG, S. Q.; JIANG, Q. Y.; ZOU, X. T. Effect and mechanism of glutamine on productive performance and egg quality of laying hens. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v.23, 1049-1056, 2010.

ELLIS, J. Proteins as molecular chaperones. **Nature**, v.328, p.378-379, 1987.

ELSDEN, S. R.; HILTON, M. G. Volatile acid production from threonine, valine, leucine and isoleucine by clostridia. **Archives of Microbiology**, v.117, p.165-172, 1978.

EV DONIN, A. L.; MARTYNOVA, M. G.; BYSTROVA, O. A.; GUZHOVA, I. V.; MARGULIS, B. A.; MEDVEDEVA, N. D. The release of Hsp70 from A431 carcinoma cells is mediated by secretory-like granules. **European Journal of Cell Biology**, v.85, p.443-455, 2006.

FASINA, Y. O.; HOERR, F. J; MCKEE, S. R.; CONNER, D. E. Influence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection on intestinal goblet cells and villous morphology in broiler chicks. **Avian Diseases**, v.54, p.841-847, 2010.

FATHI, M.; HEIDARI, M.; AHMADISEFAT, A. A.; HABIBIAN, M.; MOEINI, M. M. Influence of dietary glutamine supplementation on performance, biochemical indices and enzyme activities in broilers with cold-induced ascites. **Animal Production Science**, 2015.

FERREIRA, F.; CORRÊA, G. S.; CORRÊA, A. B.; SILVA, M. A.; FELIPE, V. P.; WENCESLAU, R. R.; FREITAS, L. S.; SANTOS, G. G.; GODINHO, R. M.; CLIMACO, W. L. S.; CARAMORI JÚNIOR, J. G.; DALSECCO, L. S. Características de carcaça de codornas de corte EV1 alimentadas com diferentes níveis de metionina+cistina total. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.66, p.1855-1864, 2014.

FIOCCHI, C.; SOUSA, H. S. P. Microbiota Intestinal - Sua importância e função. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v.100, p.30-38, 2012.

FLÄRING, U. B.; ROOYACKERS, O. E.; WERNERMAN, J.; HAMMARQVIST, F. Glutamine attenuates post-traumatic glutathione depletion in human muscle. **Clinical Science**, v.104, p.275-282, 2003.

FOYE, O. T.; ASHWELL, C.; UNI, Z., FERKET, P. R. The Effects of Intra-Amnionic Feeding of Arginine And/or β -Hydroxy- β -Methylbutyrate on Jejunal Gene Expression in

the Turkey Embryo and Hatchling. **International Journal of Poultry Science**, v.8, p.437-445, 2009.

FURLAN, R. L.; MACARI, M. Termorregulação. In: MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2002. Cap.17, p. 209-228.

GERAERT, P. A.; PADILHA, J. C. F.; GUILLAUMIN, S. Metabolic and endocrine changes induced by chronic heat exposure in broiler chickens: biological and endocrinological variables. **British Journal of Nutrition**, v.75, p.205-216, 1996.

GHAYOUR-MOBARHAN, M.; SABER, H.; FERNS, G. A. The potential role of heat shock protein 27 in cardiovascular disease. **Clinica Chimica Acta**, v.413, p.15-24, 2012.

GIVISIEZ, P. E. N.; FURLAN, R. L.; MALHEIROS, E. B.; MACARI, M. Incubation and rearing temperature effects on Hsp70 levels and heat stress response in broilers. **Canadian Journal of Animal Science**, v.83, p.213-220, 2003.

GOLDER, H. M.; GEIER, M. S.; FORDER, R. E. A.; HYND, P. I.; HUGHES, R. J. Effects of necrotic enteritis challenge on intestinal micro-architecture and mucin profile. **British Poultry Science**, v.52, p.500-506, 2011.

GRIESER, D. O.; MARCATO, S. M.; FURLAN, A. C.; ZANCANELA, V.; BATISTA, E.; TON, A. P. S.; PERINE, T. P.; STANQUEVIS, C. E. Desempenho e rendimento de carcaça e partes de três diferentes linhagens de codornas. **Zootecnia Tropical**, v.33, p.61-72, 2015.

HAI, L.; RONG, D.; ZHANG, Z. Y. The effect of thermal environment on the digestion of broilers. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.83, p.57-64, 2000.

HANCZAKOWSKA, E.; NIWIŃSKA, B. Glutamine as a feed supplement for piglets: a review/Glutamina jako dodatek do paszy dla prosiąt: przegląd. **Annals of Animal Science**, v.13, p.1-14, 2013.

HANDELSMAN, J. Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.68, p.669-685, 2004.

HAO, Y.; GU, X. H.; WANG, X. L. Overexpression of heat shock protein 70 and its relationship to intestine under acute heat stress in broilers: 1. Intestinal structure and digestive function. **Poultry Science**, v.91, p.781-789, 2012.

HASSAN, A. M.; ABDELAZEEM, H. M.; REDDY, P. G. Effect of some water supplements on the performance and immune system of chronically heatstressed broiler chicks. **International Journal of Poultry Science**, v.8, p.432-436, 2009.

HE, Y.; HAKVOORT, T. B. M.; KÖHLER, S. E.; VERMEULEN, J. L. M.; WAART, D. R.; THEIJE, C.; TEN HAVE, G. A. M.; VAN EIJK, H. M. H.; KUNNE, C.; LABRUVERE, W. T.; HOUTEN, S. M.; SOKOLOVIC, M.; RUIJTER, J. M.; DEUTZ, N. E. P.; LAMERS, W. H. Glutamine synthetase in muscle is required for glutamine production during fasting and extrahepatic ammonia detoxification. **Journal of Biological Chemistry**, v.285, p.9516-9524, 2010.

ICHIHASHI, T.; TAKAGISHI, Y.; UCHIDA, K.; YAMADA, H. Colonic absorption of menaquinone-4 and menaquinone-9 in rats. **The Journal of Nutrition**, v.122, p.506–512, 1992.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. **Produção da Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro: IBGE, v.43, 2016. 49p. Disponível em:<<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 30 set. 2016.

JIA, W.; SLOMINSKI, B. A.; BRUCE, H. L.; BLANK, G.; CROW, G.; JONES, O. Effects of diet type and enzyme addition on growth performance and gut health of broiler chickens during subclinical *Clostridium perfringens* challenge. **Poultry Science**, v.88, p.132-140, 2009.

KERR, B. J.; SOUTHERN, L. L.; BIDNER, T. D.; FRIESEN, K. G.; EASTER, R. A. Influence of dietary protein level, amino acid supplementation, and dietary energy

levels on growing-finishing pig performance and carcass composition. **Journal of Animal Science**, v.81, p.3075-3087, 2003.

KIEN, C. L.; BLAUWIEKEL, R.; BUNN, J. Y.; JETTON, T. L.; FRANKEL, W. L.; HOLST, J. J. Cecal infusion of butyrate increases intestinal cell proliferation in piglets. **The Journal of Nutrition**, v.137, p.916-922, 2007.

LANGHOUT, D. J.; SCHUTTE, J. B.; DE JONG, J.; SLOETJES, H.; VERSTEGEN, W. A.; TAMMINGA, S. Effect of viscosity on digestion of nutrients in conventional and germ-free chicks. **British Journal of Nutrition**, v.83, p.533-540, 2000.

LARA, L. J.; ROSTAGNO, M. H. Impact of heat stress on poultry production. **Animals**, v.3, p.356-369, 2013.

LEMIEUX, G.; BERKOFISKY, J.; QUENNEVILLE, A.; LEMIEUX, C. Net tubular secretion of bicarbonate by the alligator kidney. Antimammalian response to acetazolamide. **Kidney international**, v.28, p.760-766, 1985.

LOOFT, T.; ALLEN, H. K.; CANTAREL, B. L.; LEVINE, U. Y.; BAYLES, D. O.; ALT, D. P.; HENRISSAT, B.; STANTON, T. B. Bacteria, phages and pigs: the effects of in-feed antibiotics on the microbiome at different gut locations. **The ISME Journal**, v.8, p.1566-1576, 2014.

LORA, J.; ALONSO, F. J.; SEGURA, J. A.; LOBO, C.; MÁRQUEZ, J.; MATÉS, J. M. Antisense glutaminase inhibition decreases glutathione antioxidant capacity and increases apoptosis in Ehrlich ascitic tumour cells. **European Journal of Biochemistry**, v.271, p.4298-306, 2004.

MACARI, M.; FURLAN, R.L.; MAIORKA, A. Aspectos fisiológicos e de manejo para manutenção da homeostase térmica e controle de síndromes metabólicas. In: MENDES, A. A.; NAAS, I.A.; MACARI, M. **Produção de frangos de corte**. Campinas: Facta, 2004. p.137-156.

MANNO, M. C.; OLIVEIRA, R. D.; DONZELE, J. L.; OLIVEIRA, W. D.; VAZ, R. G. M. V.; SILVA, B. A. N.; SARAIVA, E. P; LIMA, K. D. S. Efeitos da temperatura

ambiente sobre o desempenho de suínos dos 30 aos 60 kg. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, p.471-477, 2006.

MARCHINI, C. F. P.; SILVA, P. L.; NASCIMENTO, M. R. B. M.; BELETTI, M. E.; SILVA, N. M.; GUIMARAES, E. C. Body weight, intestinal morphometry and cell proliferation of broiler chickens submitted to cyclic heat stress. **International Journal of Poultry Science**, v.10, p.455-460, 2011.

MARÍ, M.; MORALES, A.; COLELL, A.; GARCÍA-RUIZ, C.; FERNÁNDEZ-CHECA, J. C. Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.11, p.2685-2700, 2009.

MOHAMED, A.; DENG, X.; KHURI, F. R.; OWONIKOKO, T. K. Altered glutamine metabolism and therapeutic opportunities for lung cancer. **Clinical Lung Cancer**, v.15, p.7-15, 2014.

MOREIRA FILHO, A. L. B.; OLIVEIRA, C. J. B.; OLIVEIRA, H. B.; CAMPOS, D. B.; GUERRA, R. R.; COSTA, F. G. P.; GIVISIEZ, P. E. N. High Incubation Temperature and Threonine Dietary Level Improve Ileum Response Against Post-Hatch Salmonella Enteritidis Inoculation in Broiler Chicks. **PloS One**, v.10, p.e0131474, 2015.

MUYS, G. T.; WILLEMSE, R. The detection and enumeration of lipolytic microorganisms by means of a modified Eykman-plate method. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.31, p.103-112, 1965.

NASCIMENTO, S. T.; SILVA, I. J. O. D.; MOURÃO, G. B.; CASTRO, A. C. D. Bands of respiratory rate and cloacal temperature for different broiler chicken strains. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.41, p.1318-1324, 2012.

NEWSHOLME, P.; LIMA, M.M.R.; PROCOPIO, J.; CURI, T. C. P.; DOI, S. Q.; BAZZOTE, R. B.; CURI, R. Glutamine and glutamato as vital metabolites. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.36, p.153-163, 2003.

OAKLEY, B. B.; LILLEHOJ, H. S.; KOGUT, M. H.; KIM, W. K.; MAURER, J. J.; PEDROSO, A.; LEE, M. D.; COLLETT, S. R.; JOHNSON, T. J.; COX, N. A. The

chicken gastrointestinal microbiome. **Federation of European Microbiological Societies -Microbiology Letters**, v.360, p.100-112, 2014.

OVIEDO-RONDÓN, E. O. Molecular methods to evaluate effects of feed additives and nutrients in poultry gut microflora. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.209-225, 2009.

PARSONS, C. M. A; POTTER, L. M.; BLISS, B. A. True metabolizable energy corrected to nitrogen equilibrium. **Poultry Science**, Champaign, v.61, n.11, p. 2241 – 2246, 1985.

PEDERSEN, R.; ANDERSEN, A. D.; MØLBAK, L.; STAGSTED, J.; BOYE, M. Changes in the gut microbiota of cloned and non-cloned control pigs during development of obesity: gut microbiota during development of obesity in cloned pigs. **BMC Microbiology**, v.13, p.1-9, 2013.

PESSOA FILHO, M. A. C. P. Metagenômica: princípios e aplicações. In: FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M.; REIS JUNIOR, F. B. **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina: Embrapa Cerrados. Cap. 6, p.175-194, 2011.

PIERZYNOWSKI, S. G.; VALVERDE, P. J. L.; HOMMEL-HANSEN, T.; STUDZINSKI, T. Glutamine in gut metabolism. In: PIVA, A.; KNUDSEN, K. E. B.; LINDBERG, J. E. **Gut environment of pigs**. Nottingham: University Press, p.43-62, 2001.

PORTO, M. L.; GIVISIEZ, P. E. N.; SARAIVA, E. P.; COSTA, F. G. P.; MOREIRA FILHO, A. L. B.; ANDRADE, M. F. S.; BRANDÃO, P. A.; GUERRA, R. R. Glutamic acid improves body weight gain and intestinal morphology of broiler chickens submitted to heat stress. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, p.17, p.355-362, 2015.

QUINTEIRO-FILHO, W. M.; RIBEIRO, A.; FERRAZ-DE-PAULA, V.; PINHEIRO, M. L.; SAKAI, M.; SÁ, L. R. M.; FERREIRA, A. J. P.; PALERMO-NETO, J. Heat stress impairs performance parameters, induces intestinal injury, and decreases macrophage activity in broiler chickens. **Poultry Science**, v.89, p.1905-1914, 2010.

QUINTEIRO-FILHO, W. M.; RODRIGUES, M. V.; RIBEIRO, A.; FERRAZ-DE-PAULA, V.; PINHEIRO, M. L.; SA, L. R. M.; PALERMO-NETO, J. Acute heat stress impairs performance parameters and induces mild intestinal enteritis in broiler chickens: Role of acute hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation. **Journal of Animal Science**, v.90, p.1986-1994, 2012.

RAPPE, M. S.; GIOVANNONI, S. J. The uncultured microbial majority. **Annual Reviews in Microbiology**, v.57, p.369-394, 2003.

RENAUDEAU, D.; GOURDINE J. L. A metaanalysis of the effects of high ambient temperature on growing-finishing pigs performance. **Journal of Animal Science**, v.89, p.2220-2230, 2011.

ROWBOTTOM, D. G.; KEAST, D.; MORTON, A. R. The emerging role of glutamine as an indicator of exercise stress and overtraining. **Sports Medicine**, v.21, p.80-97, 1996.

SALMANZADEH, M.; SHAHRYAR, H. A. Effects of dietary supplementation with glutamine on growth performance, small intestinal morphology and carcass traits in turkey poults under heat stress. **Revue de Medecine Veterinaire**, v.164, p.476-480, 2013.

SAKAMOTO, M. I.; FARIA, D. E.; NAKAGI, V. S.; NEGRÃO, J. A.; ARAÚJO, R. B.; SOUZA, K. M.; PREVIERO, T. C. Utilização da glutamina, associada ao ácido glutâmico, sobre o desenvolvimento e a atividade enzimática em frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.63, p.962-972, 2011.

SALONEN, A.; DE VOS, W. M. Impact of diet on human intestinal microbiota and health. **Annual Review of Food Science and Technology**, v.5, p.239-262, 2014.

SHAKERI, M.; ZULKIFLI, I.; SOLEIMANI, A. F.; O'REILLY, E. L.; ECKERSALL, P. D.; ANNA, A. A.; KUMARI, S.; ABDULLAH, F. F. J. Response to dietary supplementation of l-glutamine and l-glutamate in broiler chickens reared at different stocking densities under hot, humid tropical conditions. **Poultry Science**. v.93, p.2700-2708, 2014.

SILVA, J. H. V.; JORDÃO FILHO, J.; PERAZZO COSTA, F. G.; LACERDA, P. B. D.; VIEIRA VARGAS, D. G.; LIMA, M. R. Exigências nutricionais de codornas. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.13, p. 775-790, 2012.

SINGH, P.; KARIMI, A.; DEVENDRA, K.; WALDROUP, P. W.; CHO, K. K.; KWON, Y. M. Influence of penicillin on microbial diversity of the cecal microbiota in broiler chickens. **Poultry Science**, v.92, p.272–276, 2013.

SMITH, K.; MCCOY, K. D.; MACPHERSON, A. J. Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. **Seminars in immunology**, v.19, p.59-69, 2007.

SOMMER, F.; BÄCKHED, F. The gut microbiota—masters of host development and physiology. **Nature Reviews Microbiology**, v.11, p.227-238, 2013.

SONG, J.; XIAO, K.; KE, Y. L.; JIAO, L. F.; HU, C. H.; DIAO, Q. Y.; SHI, B.; ZOU, X. T. Effect of a probiotic mixture on intestinal microflora, morphology, and barrier integrity of broilers subjected to heat stress. **Poultry Science**, v.93, p.581-588, 2014.

TAN, G. Y. L.; YANG, L.; FU, Y. Q.; FENG, J. H.; ZHANG, M. H. Effects of different acute high ambient temperatures on function of hepatic mitochondrial respiration, antioxidative enzymes, and oxidative injury in broiler chickens. **Poultry Science**, v.89, p.115-122, 2010.

TAKAHASHI, L. S.; BILLER, J. D.; TAKAHASHI, K. M. Efeito do estresse térmico e termorregulação em aves. In: Takahashi, L. S.; Biller, J. D.; Takahashi, K. M. **Bioclimatologia zootécnica**. Unesp, Jaboticabal. 2009. p.35-39.

TEETER, R. G.; SMITH, M. O.; OWENS, F. N.; ARP, S. C.; SANGIAH, S.; BREAZILE, J. E. Chronic heat stress and respiratory alkalosis: occurrence and treatment in broiler chicks. **Poultry Science**, v.64, p.1060-1064, 1985.

THAISS, C. A.; LEVY, M.; SUEZ, J.; ELINAV, E. The interplay between the innate immune system and the microbiota. **Current Opinion in Immunology**, v.26, p.41-48, 2014.

TREMAROLI, V.; BÄCKHED, F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. **Nature**, v.489, p.242–249, 2012.

TSIOURIS, V.; GEORGOPOULOU, I.; BATZIOS, C.; PAPPAIOANNOU, N.; DUCATELLE, R.; FORTOMARIS, P. The effect of cold stress on the pathogenesis of necrotic enteritis in broiler chicks. **Avian Pathology**, v.44, p.430-435, 2015.

TSUKADA, F.; SAWAMURA, K.; KOHNO, H.; OHKUBO, Y. Mechanism of inhibition of small intestinal motility by restraint stress differs from that with norepinephrine treatment in rats. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. v.25, p.122-124, 2002.

TURINSKY, J. I. R. I.; LONG, C. L. Free amino acids in muscle: effect of muscle fiber population and denervation. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v.258, E485-E491, 1990.

VAN IMMERSEEL, F.; BOYEN, F.; GANTOIS, I.; TIMBERMONT, L.; BOHEZ, L.; PASMANS, F.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R. Supplementation of coated butyric acid in the feed reduces colonization and shedding of Salmonella in poultry. **Poultry Science**, v.84, p.1851-1856, 2005.

VIDENSKA, P.; FALDYNOVA, M.; JURICOVA, H.; BABAK, V.; SISAK, F.; HAVLICKOVA, H. Chicken faecal microbiota and disturbances induced by single or repeated therapy with tetracycline and streptomycin. **BMC Veterinary Research**, v. 9, p.1-9, 2013.

WINTZINGERODE, F. V.; GÖBEL, U. B.; STACKEBRANDT, E. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. **FEMS Microbiology Reviews**, v.21, p.213-229, 1997.

XIANG, R. P.; SUN, W. D.; WANG, J. Y.; WANG, X. L. Effect of vitamin C on pulmonary hypertension and muscularisation of pulmonary arterioles in broilers. **British Poultry Science**, v.43, p.705-712, 2002.

ZAVARIZE, K. C.; SARTORI, J. R.; PEZZATO, A. C.; GARCIA, E. A.; CRUZ, V. C. Glutamina na dieta de poedeiras leves submetidas ao estresse pelo calor e à termoneutralidade. **Ciência Animal Brasileira**, v.12, p.400-406, 2011.

ZHANG, Z. W.; LV, Z. H.; LI, J. L.; LI, S.; XU, S. W.; WANG, X. L. Effects of cold stress on nitric oxide in duodenum of chicks. **Poultry Science**, v.90, p.1555-1561, 2011.

ZHAO, F. Q.; ZHANG, Z. W.; QU, J. P.; YAO, H. D.; LI, M.; LI, S.; XU, S. W. Cold stress induces antioxidants and Hsps in chicken immune organs. **Cell Stress and Chaperones**, v.19, p.635-648, 2014.

ZHOU, J.; LI, Y.; LIU, F.; CAO, Y.; LI, J. Tumor necrosis factor α attenuates glutamine enhanced skeletal muscle protein synthesis in rats. **Nutrition Research**, v.27, p.772-777, 2007.

ZHOU, X.; THOMPSON, J. R. Regulation of protein turnover by glutamine in heatshocked skeletal myotubes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1357, p.234-242, 1997.

CAPÍTULO 2

**Suplementação dietética de glutamina e ácido glutâmico sobre o desempenho,
morfometria intestinal e características de carcaça de codornas de corte**

Suplementação dietética de glutamina e ácido glutâmico sobre o desempenho, morfometria intestinal e características de carcaça de codornas de corte

RESUMO:

Objetivou-se por meio deste estudo avaliar o efeito da suplementação dietética de glutamina e ácido glutâmico (Gln+Glu) sobre o desempenho, morfometria intestinal e características de carcaça de codornas de corte. Para tanto, foram utilizadas 800 aves não sexadas, com um dia de idade, distribuídas em delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos (0,0; 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8% de suplementação de Gln+Glu) e oito repetições com 20 aves por unidade experimental. Na análise dos dados para desempenho, pelo teste de Dunnett, constatou-se redução ($P<0,05$) no consumo de ração das aves aos níveis de 0,6 e 0,8% de Gln+Glu, e menor ganho de peso ($P<0,05$) ao nível 0,8% de Gln+Glu na fase de um a 21 dias, em comparação ao tratamento controle; e, pela análise de regressão, excluindo-se o tratamento controle, houve efeito linear crescente ($P<0,05$) para consumo de ração na fase 22 a 42 dias de idade. Para morfometria intestinal, pelo teste de Dunnett, constatou-se maior profundidade de cripta do duodeno ($P<0,05$) ao nível de 0,6% de Gln+Glu; menor altura de vilos do jejuno ($P<0,05$) aos níveis de 0,4; 0,6 e 0,8% de Gln+Glu; menor profundidade de cripta do jejuno ($P<0,05$) aos níveis de 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8% de Gln+Glu; e maior altura de vilos do íleo ($P<0,05$) aos níveis de 0,2; 0,6 e 0,8% de Gln+Glu, todos quando comparados ao tratamento controle; e, pela análise de regressão, excluindo-se o controle, constatou-se efeito quadrático ($P<0,05$) para a altura de vilos e profundidade de cripta do jejuno e para altura de vilos do íleo, cujos respectivos pontos de mínima estimados foram 0,59; 0,58 e 0,51%. As características de carcaça, de cortes e de vísceras comestíveis de codornas de corte aos 42 dias não foram afetadas ($P>0,05$) pelos níveis de suplementação de Gln+Glu. Conclui-se que a suplementação de glutamina e ácido glutâmico não melhora o desempenho e características de carcaça de codornas de corte, no entanto, a suplementação de 0,2% destes aminoácidos favorece o desenvolvimento morfométrico do íleo aos 21 dias de idade.

Palavras-chave: glutamato, morfofisiologia intestinal, renovação celular.

Dietary supplementation of glutamine and glutamic acid on performance, intestinal morphometry and carcass characteristics of meat type quails

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of dietary supplementation of glutamine and glutamic acid on performance, intestinal morphometry and carcass characteristics of meat type quails. For this, 800 non-sexed quails with one day old, and distributed in a completely randomized design with five treatments (0.0; 1.0; 2.0; 3.0 and 4.0 % of supplementation glutamine and glutamic acid), and eight replicates with 20 quails per experimental unity were used. In the analysis of data for performance, by Dunnett test, there was reduced ($P < 0.05$) in feed intake of the birds at the levels of 0.6 and 0.8% of Gln + Glu, and less weight gain ($P < 0.05$) at the 0.8% Gln + Glu level in the one to 21 day phase, compared to the control treatment; and, by regression analysis, excluding the control treatment, there was an increasing linear effect ($P < 0.05$) for feed intake in stage 22 to 42 days of age. For intestinal morphometry, the Dunnett's test revealed a greater depth of duodenum crypt ($P < 0.05$) at the level of 0.6% Gln + Glu; lower jejunal villus height ($p < 0.05$) levels of 0.4; 0.6 and 0.8% Gln + Glu; lower jejunum crypt depth ($P < 0.05$) levels of 0.2; 0.4; 0.6 and 0.8% Gln + Glu; and higher ileus villus height ($P < 0.05$) at levels of 0.2; 0.6 and 0.8% Gln + Glu, all when compared to the control treatment; by regression analysis, excluding the control, it was observed quadratic effect ($P < 0.05$) for the villus height and jejunum crypt depth and villus height of the ileum, whose respective minimum points were estimated 0 , 59; 0.58 and 0.51%. Carcass characteristics, cuts and edible offal of quails at 42 days were not affected ($P > 0.05$) by Gln + Glu supplementation levels. It is concluded that the supplementation of glutamine and glutamic acid does not improve the performance and carcass characteristics of cut quails, however, the supplementation of 0.2% of these amino acids favors the morphometric development of the ileum at 21 days of age.

Keywords: cell renovation, glutamate, intestinal morphology.

Introdução

A imaturidade do trato digestório nas primeiras semanas pós-eclosão é um fator limitante para o desenvolvimento de aves de produção, porque o aumento da capacidade de secreção de enzimas e o aumento na área de absorção, que ocorre através do crescimento longitudinal do intestino delgado e o aumento na altura das vilosidades, são eventos ainda em andamento (Uni et al., 1998; Murakami et al., 2007). Estudos vêm sendo desenvolvidos com a finalidade de maximização da capacidade funcional do intestino das aves, utilizando nutrientes que possam melhorar o desenvolvimento da mucosa (Dai et al., 2011; Sakamoto et al., 2011), para que haja melhor aproveitamento da dieta.

A glutamina, o ácido glutâmico, a treonina são exemplos nutrientes que têm mostrado importante efeito trófico sobre a mucosa intestinal das aves, atuando sobre seu desenvolvimento e maturação histológica (Bartell & Batal, 2007; Ospina-Rojas et al., 2013). Dentre estes aminoácidos, a glutamina (Gln) e o ácido glutâmico (Glu) têm chamado à atenção pelas suas propriedades funcionais sobre a mucosa intestinal.

A glutamina e o ácido glutâmico são importantes fontes de energia para células de proliferação rápida, como os enterócitos e células de defesa. Como agentes tróficos, contribuem para o desenvolvimento e manutenção da estrutura da mucosa (Yi et al., 2005; Fasina et al., 2010), agindo de forma direta sobre a melhora do desempenho das aves.

Pesquisas com frangos corte e poedeiras têm mostrado resultados satisfatórios quanto ao efeito da suplementação de glutamina e ácido glutâmico sobre o desempenho, digestibilidade e microbiota intestinal de frangos de corte (Avellaneda et al., 2008; Fasina et al., 2010; Sakamoto et al., 2011; Nascimento et al., 2014; Bezerra et al., 2015), todavia, os mesmos estudos tornam-se necessários em codornas de corte, avaliando-se seu efeito sobre o crescimento das aves e aproveitamento dos nutrientes da dieta.

Objetivou-se por meio deste estudo avaliar o efeito da suplementação dietética de glutamina associada ao ácido glutâmico sobre o desempenho, morfometria intestinal e características de carcaça de codornas de corte.

Material e Métodos

Todos os procedimentos deste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (Protocolo nº. 118/2015).

O experimento foi realizado no Setor de Coturnicultura da Universidade Federal de Alagoas. Foram utilizadas 800 codornas de corte não sexadas de um dia de idade, com peso médio de $9,35 \text{ g} \pm 0,10\text{g}$. As aves foram pesadas individualmente, separadas por peso e distribuídas uniformemente por faixa de peso em 40 unidades experimentais.

O delineamento experimental inteiramente ao acaso foi utilizado, com cinco níveis (0,0; 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8%) de suplementação de glutamina associada ao ácido glutâmico, oito repetições e 20 aves por unidade experimental.

As dietas experimentais foram isonutritivas, formuladas à base de milho e farelo de soja e atendendo às exigências nutricionais de codornas de corte de acordo com Silva & Costa (2009) (Tabela 1). A suplementação dietética da glutamina associada ao ácido glutâmico foi feita até 21 dias de idade das aves, sendo que de 22 a 42 dias de idade todas as aves receberam a mesma dieta basal. As aves receberam água e alimento à vontade durante todo o período de criação.

Foram avaliados o ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar das aves nos períodos de um a 21, 22 a 42 e um a 42 dias de idade.

Aos 21 dias de idade cinco aves por tratamento, com peso médio da unidade experimental ($\pm 5\%$), foram retiradas para avaliação da morfometria intestinal. Após o abate das aves, foi realizada a coleta da região mediana do duodeno, jejuno e íleo para mensuração da altura das vilosidades, profundidade de cripta e relação vilo:cripta. As amostras foram mantidas em solução de formol tamponado a 10% por 24 horas, em seguida foram desidratados em série crescente de álcoois e tratados com xilol, e posteriormente incluídos em parafina. Para montagem das lâminas foram feitos cortes 5 μm de espessura, realizados com auxílio de micrótomo rotativo. Posteriormente, foi feita a desparafinação e hidratação dos cortes, utilizando-se xilol, série de álcoois e água, em seguida foi realizada a coloração das mesmas pelo Método Hematoxilina-Eosina (HE).

Tabela 1. Composição percentual e nutricional das dietas experimentais de um a 21 dias de idade

INGREDIENTES	Tratamentos				
	T1	T2	T3	T4	T5
Glutamina + ácido glutâmico ¹	0,000	0,200	0,400	0,600	0,800
Milho (7,88%)	48,483	49,349	50,212	51,077	51,942
Farelo de soja (45,22%)	45,743	44,106	42,469	40,831	39,194
Oleo de soja	2,258	1,923	1,588	1,253	0,917
Fosfato bicálcico (20%)	0,786	0,802	0,818	0,834	0,850
Calcário calcítico	1,446	1,445	1,445	1,445	1,445
Sal comum	0,381	0,381	0,382	0,382	0,382
DL-Metionina (99%)	0,390	0,407	0,423	0,439	0,456
L-Lisina HCl (78%)	0,130	0,181	0,232	0,284	0,335
L-Treonina (99%)	0,194	0,218	0,241	0,265	0,289
Cloreto de colina (60%)	0,070	0,070	0,070	0,070	0,070
Premix vitamínico ²	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
Premix mineral ³	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050
Antioxidante (BHT)	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010
Promotor de crescimento (Avilamicina)	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015
Anticoccidiano (Monesina)	0,020	0,020	0,020	0,020	0,020
Inerte	0,000	0,800	1,600	2,400	3,200
Total	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000
Proteína bruta, %	25,000	25,000	25,000	25,000	25,000
Energia metetabolizável, Mcal/kg	2,900	2,900	2,900	2,900	2,900
Metionina + cistina dig, %	1,040	1,040	1,040	1,040	1,040
Lisina dig, %	1,370	1,370	1,370	1,370	1,370
Treonina dig, %	1,040	1,040	1,040	1,040	1,040
Triptofano dig, %	0,290	0,281	0,271	0,262	0,253
Cálcio, %	0,850	0,850	0,850	0,850	0,850
Fósforo disponível, %	0,320	0,320	0,320	0,320	0,320
Sódio, %	0,170	0,170	0,170	0,170	0,170

¹Produto comercial composto por 60% de PB e 3.310 kcal/kg, com nível de segurança de 10% de glutamina e 10% de ácido glutâmico.

²Conteúdo/kg: vit. A – 15.000.000 UI; vit. D3 – 1.500.000 UI; vit. E – 15.000 UI; vit. B1 - 2.0 g; vit. B2 - 4.0 g; vit. B6 - 3.0 g; vit. B12 - 0.015 g; ácido nicotínico - 25 g; ácido pantotênico - 10 g; vit. K3 - 3.0 g; ácido fólico - 1.0 g; Se - 250 mg; ³Conteúdo/kg: Mn - 60 g; Fe - 80 g; Zn - 50 g; Cu - 10 g; Co - 2 g; I - 1 g.

A captura de imagens dos cortes histológicos foi realizada utilizando-se um microscópio óptico com lentes de aumento de 4X. As análises morfométricas foram realizadas em analisador de imagens (Motic Images Plus 2.0), realizando 12 medições de altura de vilo e 12 medições para profundidade de cripta por corte histológico, totalizando 60 leituras por variável, por tratamento, para cada segmento intestinal.

Aos 42 dias de idade, 2 aves por unidade experimental, variando até em 5% do peso médio da unidade experimental, foram selecionadas e abatidas para determinação do rendimento de carcaça. Após a depena manual, as carcaças foram evisceradas, lavadas, gotejadas e pesadas. O peso da carcaça limpa em porcentagem do peso vivo da ave após o jejum foi considerado como o rendimento de carcaça. Posteriormente, a carcaça foi espotejada e foram pesados os cortes e as vísceras. O rendimento de pernas, peito, asas, dorso e vísceras comestíveis foram considerados em relação ao peso da carcaça eviscerada e limpa.

Os resultados foram submetidos às análises de variância e de regressão, com auxílio do programa estatístico SAS - Statistical Analysis System 9.0 a 5% de probabilidade.

Resultados

Os níveis de glutamina associada ao ácido glutâmico influenciaram o desempenho das codornas, conforme apresentado na Tabela 2. Na fase de um a 21 dias de idade, houve efeito significativo ($P < 0,05$), pelo teste de Dunnett, da suplementação de Gln+Glu sobre o consumo de ração, que foi inferior nos níveis de 0,6 e 0,8% de Gln+Glu, e sobre o ganho de peso das aves, o qual também reduziu ao nível de 0,8% de suplementação de Gln+Glu, em comparação ao tratamento controle; contudo, a conversão alimentar das aves não foi influenciada ($P > 0,05$) pelos níveis testados. Na análise de regressão, excetuando-se o nível zero de Gln+Glu da análise de variância, o desempenho das aves não foi afetado ($P > 0,05$) pelos níveis de Gln+Glu na dieta.

Na fase de 22 a 42 dias de idade não houve efeito significativo dos tratamentos sobre as variáveis de desempenho pelo teste Dunnett ($P > 0,05$), no entanto, pela análise de regressão, excluindo-se o tratamento controle da análise de variância, apenas o consumo de ração foi afetado, apresentando efeito linear crescente ($P < 0,05$), com média de 527,82 g.

No período total de criação, de um a 42 dias, as variáveis de desempenho não foram influenciadas pelos tratamentos ($P > 0,05$) pelo teste de Dunnett ou pela análise de regressão.

Tabela 2. Consumo de ração (CR, g), ganho de peso (GP, g) e conversão alimentar (CA, g:g) de codornas de corte submetidas a níveis de suplementação de glutamina associada ao ácido glutâmico

Fase	Suplementação (%)	CR (g)	GP (g)	CA (g:g)
01 a 21 dias	0,0	230,36±2,13 ^a	133,98±0,48 ^a	1,72±0,02
	0,2	225,91±3,19 ^a	132,05±1,01 ^a	1,71±0,03
	0,4	221,08±2,99 ^a	131,16±1,21 ^a	1,69±0,02
	0,6	220,83±1,92 ^b	132,37±0,83 ^a	1,67±0,02
	0,8	218,48±2,45 ^b	129,58±0,61 ^b	1,69±0,02
CV (%)		3,27	1,87	3,51
P-linear		0,06	0,12	0,33
P-quadrático		0,63	0,28	0,33
22 a 42 dias	0,0	537,52±4,59	138,87±4,12	3,89±0,10
	0,2	520,07±6,00	134,55±4,18	3,89±0,12
	0,4	523,52±10,35	134,24±3,10	3,91±0,09
	0,6	528,30±4,71	138,91±1,64	3,81±0,08
	0,8	539,37±4,03	140,47±2,06	3,85±0,06
CV (%)		3,40	6,57	6,36
P-linear		0,03 ¹	0,13	0,59
P-quadrático		0,55	0,77	0,91
01 a 42 dias	0,0	767,88±4,53	277,89±4,24	2,77±0,03
	0,2	745,98±7,15	272,20±5,72	2,75±0,05
	0,4	744,60±11,95	260,93±6,74	2,86±0,07
	0,6	749,12±5,97	269,64±3,54	2,78±0,03
	0,8	757,85±3,38	270,71±3,44	2,80±0,03
CV (%)		2,72	5,14	4,43
P-linear		0,22	0,85	0,69
P-quadrático		0,49	0,22	0,29

^{a,b}Médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste Dunnett (P<0,05).

¹Y = 227,21 - 11,27x (R² = 87,08).

O efeito dos níveis de suplementação de glutamina associada ao ácido glutâmico sobre a morfometria intestinal de codornas de corte aos 21 dias de idade é apresentado na Tabela 3. Para morfometria do duodeno, pelo teste de Dunnett, apenas houve efeito significativo (P<0,05) dos níveis de suplementação de Gln+Glu sobre a profundidade de cripta, que foi superior no tratamento de 0,6% de Gln+Glu, em comparação ao tratamento controle; no entanto, a análise de regressão excluindo-se o tratamento sem suplementação de glutamina e ácido glutâmico da análise de variância, não apresentou efeito (P>0,05) dos níveis de Gln+Glu sobre a morfometria do duodeno.

Tabela 3. Efeito da suplementação dietética de glutamina associada ao ácido glutâmico sobre a morfometria intestinal de codornas de corte aos 21 dias de idade

Segmento	Suplementação (%)	Altura de vilo (µm)	Profundidade de cripta (µm)	Relação vilo:cripta (µm)
Duodeno	0,0	1585,40±0,10	74,90±1,27 ^a	21,36±0,36
	0,2	1582,18±38,71	77,20±1,34 ^a	20,62±0,53
	0,4	1531,50±22,31	75,35±1,65 ^a	20,88±0,70
	0,6	1595,68±26,69	79,87±1,66 ^b	20,30±0,52
	0,8	1516,03±25,68	73,20±1,15 ^a	20,22±0,40
CV (%)		11,67	10,52	15,60
P-linear		0,77	0,87	0,63
P-quadrático		0,39	0,24	0,51
Jejuno	0,0	881,43±14,32 ^a	75,18±2,21 ^a	12,11±0,41
	0,2	849,73±17,41 ^a	70,28±2,02 ^b	12,37±0,35
	0,4	668,53±10,69 ^b	56,50±1,36 ^b	12,06±0,32
	0,6	673,08±10,46 ^b	57,55±1,30 ^b	11,88±0,27
	0,8	696,98±15,72 ^b	59,55±1,12 ^b	11,85±0,33
CV (%)		11,61	16,52	17,54
P-linear		<0,01	<0,01	0,14
P-quadrático		<0,01 ¹	<0,01 ²	0,58
Íleo	0,0	588,65±18,46 ^a	54,85±1,42	10,96±0,40
	0,2	650,90±11,56 ^b	58,63±1,74	11,44±0,36
	0,4	606,58±11,90 ^a	57,40±2,17	11,11±0,42
	0,6	628,68±12,21 ^b	58,43±1,87	11,11±0,35
	0,8	640,90±13,80 ^b	59,33±1,97	11,28±0,43
CV (%)		13,51	20,40	22,30
P-linear		0,54	0,87	0,88
P-quadrático		<0,01 ³	0,46	0,40

^{a,b}Médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste Dunnett (P<0,05).

¹Y = 1091,9 - 1508,7x + 1281,9x² (R² = 93,76); ²Y = 88,48 - 114,2x + 98,625x² (R² = 92,0); ³Y = 704,41 - 357,33x + 353,38x² (R² = 73,38).

O jejuno das aves teve sua morfometria afetada (P<0,05) pelos níveis de suplementação de Gln+Glu para altura de vilo e profundidade de cripta, cuja primeira variável foi inferior nos níveis de 0,4; 0,6 e 0,8% de Gln+Glu, e a segunda variável apresentou redução significativa para todos os tratamentos de suplementação de Gln+Glu, quando comparadas ao tratamento controle. A análise de variância pelo teste de regressão, excluindo-se o tratamento controle, apresentou efeito quadrático (P<0,05) para altura de vilo e profundidade de cripta do jejuno, estimando-se, respectivamente, pontos de mínima a 0,59 e 0,58% de suplementação de Gln+Glu, com medidas de 647,99 e 0,55 µm.

A morfometria do íleo apresentou efeito significativo (P<0,05) apenas para a altura de vilo, tanto pelo teste de Dunnett e como pela análise de regressão. O teste de Dunnett mostrou que os níveis de 0,2; 0,6 e 0,8% de Gln+Glu foram superiores ao tratamento controle, enquanto que a análise de regressão, excluindo-se o tratamento

controle, apresentou efeito quadrático, com menor altura de vilo ao nível 0,51% de suplementação de Gln+Glu, estimando-se altura de 614 μm .

A suplementação dietética de glutamina e ácido glutâmico não influenciou ($P>0,05$) as características de carcaça, os cortes e as vísceras comestíveis de codornas de corte aos 42 dias de idade (Tabela 4).

Tabela 4. Pesos absolutos (g) e relativos (%) de carcaça, cortes e vísceras comestíveis de codornas europeias aos 42 dias de idade submetidas a níveis de suplementação da glutamina associada ao ácido glutâmico na dieta

	Nível de suplementação (%) ^{ns}					CV	P - linear	P - quadrático
	0	1	2	3	4			
Peso Absoluto (g)						(%)		
Peso ao abate	285,00±6,53	274,69±8,53	270,94±7,13	276,56±4,55	270,31±4,48	6,76	0,80	0,85
Carcaça	203,74±5,39	199,88±4,48	197,66±2,71	197,60±2,32	200,41±3,01	5,33	0,93	0,51
Peito	85,70±2,30	84,27±2,59	86,12±1,66	85,21±1,10	85,18±2,16	6,73	0,84	0,65
Dorso	62,55±2,81	60,13±1,71	58,73±1,29	56,75±0,57	61,03±1,53	8,24	0,93	0,11
Pernas	40,48±1,27	40,17±1,02	39,94±0,98	41,27±1,78	41,14±0,53	8,29	0,43	0,97
Asas	12,95±0,42	11,67±0,25	12,50±0,28	13,42±0,42	12,05±0,12	8,02	0,96	0,95
Coração	2,15±0,08	2,25±0,05	2,07±0,04	2,27±0,08	2,13±0,08	9,19	0,63	0,83
Fígado	5,13±0,36	4,77±0,53	4,58±0,47	5,52±0,34	4,68±0,42	27,93	0,15	0,51
Moela	4,38±0,15	4,37±0,18	4,17±0,14	4,66±0,13	4,46±0,15	9,57	0,26	0,99
Peso relativo (%)								
Carcaça	71,55±1,42	72,95±1,17	73,16±1,30	71,52±0,96	74,26±1,20	4,74	0,68	0,31
Peito	42,12±0,84	42,13±0,70	43,56±0,40	43,14±0,50	42,46±0,53	4,18	0,83	0,10
Dorso	30,64±0,80	30,08±0,47	29,72±0,59	28,73±0,24	30,47±0,73	5,67	0,95	0,09
Pernas	19,86±0,22	20,10±0,33	20,21±0,43	20,85±0,73	20,55±0,29	6,08	0,32	0,64
Asas	6,38±0,25	5,85±0,12	6,32±0,13	6,79±0,21	6,02±0,10	7,17	0,69	0,46
Coração	1,06±0,04	1,13±0,03	1,05±0,02	1,15±0,04	1,06±0,04	8,95	0,55	0,89
Fígado	2,53±0,19	2,37±0,24	2,31±0,22	2,79±0,17	2,33±0,19	6,54	0,71	0,39
Moela	2,15±0,08	2,18±0,06	2,11±0,6	2,35±0,06	2,22±0,04	8,01	0,20	0,64

ns – Não significativo a 5% de probabilidade pelos testes de Dunnet e regressão.

Discussão

Os resultados de desempenho do presente estudo indicam que a suplementação de Gln+Glu partir de 0,6% nas três primeiras semanas de vida das codornas aciona mecanismos de saciedade, que podem refletir em menor ganho de peso a partir 0,8% de suplementação dietética. Esta resposta no desempenho pode ser explicada pela teoria aminostática, em que o aumento da disponibilidade de glutamina e ácido glutâmico no organismo ocasiona desbalanço aminoacídico em relação às reais necessidades dos animais, resultando em redução do consumo de ração pela excitação de áreas hipotalâmicas controladoras (Gleaves, 1989; Gonzales, 2008). Por outro lado, o aumento da disponibilidade de glutamina e ácido glutâmico na fase inicial parece condicionar gradativamente o organismo à maior capacidade de metabolização aminoacídica, proposição esta que justifica o maior consumo de ração na segunda fase de criação, quando suspensa a suplementação destes aminoácidos na dieta.

Estudos com frangos de corte têm apresentado melhores respostas produtivas das aves mediante a suplementação dietética de glutamina, no entanto, existem limites que, se ultrapassados, comprometem o desempenho produtivo. Por exemplo, Soltan (2009) obteve maior consumo de ração e ganho de peso das aves suplementadas com 1% de glutamina, no entanto, ao elevar-se o nível para 1,5 e 2,0% o autor constatou piora destas variáveis e justificou que níveis elevados de glutamina podem resultar menor ingestão de ração, menor ganho de peso e até ocasionar toxidez em frangos de corte. Semelhantemente, Bartell & Batal (2007) relataram melhora no ganho de peso de pintos de corte suplementados com 1% de glutamina na dieta durante as três primeiras semanas de vida, porém o peso das aves diminuiu quando se elevou o nível para 4% de suplementação.

Assim, os resultados de desempenho vistos no presente estudo mostram particularidades de codornas de corte na resposta à suplementação de glutamina e ácido glutâmico, diferente daquilo que fora descrito na maior parte dos estudos feitos com outras aves de produção (Yi et al., 2005; Sakamoto et al., 2006, 2011; Dai et al., 2009; Fasina et al., 2010; Dai et al., 2011; Bezerra et al., 2015; Figueiredo et al., 2015). Autores como Sakamoto et al. (2006) e Figueiredo et al. (2015) não encontraram diferença significativa no desempenho de frangos que receberam suplementação de

glutamina em 1% e 0,5 a 1,5%, respectivamente, na ração. Também Shakeri et al. (2014) não relataram melhoria no desempenho produtivo de frangos de corte submetidos a diferentes densidades e alimentados com 0,5% de glutamina e ácido glutâmico na dieta.

Os resultados morfométricos do intestino justificam o desempenho das aves em suas três primeiras semanas de vida; o jejuno, principal sítio de absorção da maior parte dos nutrientes, apresentou redução da altura de vilos pela suplementação de níveis maiores que 0,2%, e isto provavelmente prejudicou o aproveitamento dos nutrientes. Por outro lado, o maior desenvolvimento do íleo em resposta aos níveis de suplementação pode ser compreendido pela menor quantidade de Gln+Glu que chegaram a esse segmento, quando comparado ao jejuno; enquanto que os níveis acima de 0,2% foram elevados para o desenvolvimento do jejuno, o restante dos aminoácidos suplementados que chegaram ao íleo foi quantitativamente suficiente para favorecer o desenvolvimento da mucosa deste segmento.

A relação entre a glutamina o aumento do comprimento das vilosidades intestinais em frangos de corte tem sido descrita por outros autores (Yi et al., 2005; Bartell & Batal, 2007; Soltan, 2009). No entanto, nem sempre o aumento do tamanho dos vilos e menor desgaste da mucosa intestinal estão associados a melhores respostas no crescimento das aves (Sakamoto et al., 2006; Figueiredo et al., 2015; Pelícia et al., 2013). Embora o desenvolvimento precoce da mucosa intestinal seja importante para o desempenho do animal, quanto maior a altura e densidade de vilos, maior será o custo energético de manutenção (Reisinger et al., 2011). Em frangos de corte, Shakeri et al. (2014) e Maiorka et al. (2000) não encontraram diferenças significativas na morfometria intestinal de frangos que receberam suplementação de glutamina, quando comparados com o grupo controle.

Os dados obtidos para as variáveis de carcaça e órgãos internos estão coerentes com o desempenho, pelo fato do ganho de peso e a conversão alimentar das aves não terem variado entre os tratamentos durante o período de um a 42 dias. Corroborando esta proposição, Nascimento et al. (2014) e Figueiredo et al. (2015) não encontraram variação das características de carcaça de frangos de corte suplementados com glutamina.

Conclusões

A suplementação de glutamina e ácido glutâmico não melhora o desempenho e características de carcaça de codornas de corte, no entanto, a suplementação de 0,2% destes aminoácidos favorece o desenvolvimento morfométrico do íleo aos 21 dias de idade.

Referências Bibliográficas

- AVELLANEDA, Y.; HERNANDEZ QUINTERO, J. M.; ARIZA NIETO, C.; TELLEZ, G. A. Efecto de la suplementación de l-glutamina y L-glutamato (aminogut®) sobre el crecimiento temprano de pollos de engorde. **Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia**. v.55, p.77-90, 2008.
- BARTELL, S. M.; BATAL, A. B. The effect of supplemental glutamine on growth performance, development of the gastrointestinal tract, and humoral immune response of broilers. **Poultry Science**. v.86, p.940-1947, 2007.
- BEZERRA, R. M., COSTA, F. G. P., GIVISIEZ, P. E. N., GOULART, C. D. C., SANTOS, R. A. D., & LIMA, M. R. D. Glutamic acid supplementation on low protein diets for laying hens. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v.37, p.129-134, 2015.
- DAI, S. F.; WANG, L. K.; WEN, A. Y.; WANG, L. X.; JIN, G. M. Dietary glutamine supplementation improves growth performance, meat quality and colour stability of broilers under heat stress. **British Poultry Science**. v.5, p.333-340, 2009.
- DAI, S. F.; GAO, F.; ZHANG, W. H.; SONG, S. X.; XU, X. L. ZHOU, G. H. Effects of dietary glutamine and gamma-aminobutyric acid on performance, carcass characteristics and serum parameters in broilers under circular heat stress. **Animal Feed Science. Tech**. v.168, p.51-60, 2011.

FASINA, Y. O.; BOWERS, J. B.; HESS, J. B.; MCKEE, S. R. Effect of dietary glutamine supplementation on Salmonella colonization in the ceca of young broiler chicks. **Poultry Science**. v.89, p.1042-1048, 2010.

FIGUEIREDO, É. M. DE; DE OLIVEIRA DONZELE, R. F. M.; DONZELE, J. L.; SOUSA, K. R. S.; CARDOSO, E. F.; SÉLOS, A. N.; SILVA, A. D.; JACOB, R. F. Glutamina para frangos de corte mantidos em termoneutralidade dos 21 aos 42 dias. **Semina: Ciências Agrárias**. v.36, p.1633-1642, 2015.

GONZALES E. Ingestão de alimentos: mecanismos regulatórios. In: MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2002. Cap.15, p.187-197.

GLEAVES, E. W. Application of feed intake principles to poultry care and management. **Poultry Science**, v.68, p.958-969, 1989.

MAIORKA, A.; SILVA, A. V.; SANTIN, E.; BORGES, S. A.; BOLELI, I. C.; MACARI, M. Influência da suplementação de glutamina sobre o desempenho e o desenvolvimento de vilos e criptas do intestino delgado de frangos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, p.487-490, 2000.

MURAKAMI, A. E., SAKAMOTO, M. I.; NATALI, L. M.G.; SOUZA, M. R. M.; FRANCO, J. R. G. Supplementation of glutamine and vitamin E on the morphometry of intestinal mucosa embroiler chickens. **Poultry Science**. v.86, p.488-495, 2007.

NASCIMENTO, G. M.; LEANDRO, N. S. M.; CAFÉ, M. B.; STRINGHINI, J. H.; ANDRADE, M. A.; MARTINEZ, K. L. D. A.; MELLO, H. H. C.; MASCARENHAS, A. G. Performance and intestinal characteristics of broiler chicken fed diet with glutamine in the diet without anticoccidials agents. **Revista Brasileira Saúde e Produção Animal**. v.15, p.637-648, 2014.

OSPINA-ROJAS, I. C.; MURAKAMI, A. E.; OLIVEIRA, C. A. L.; GUERRA A. F. Q. G. Supplemental glycine and threonine effects on performance, intestinal mucosa development, and nutrient utilization of growing broiler chickens. **Poultry Science**. v.92, p.2724-2731, 2013.

PELÍCIA, V. C.; STRADIOTTI, A. C.; ARAUJO, P. C.; MARUNO, M. K.; CARVALHO, F. B.; PEZZATO, A. C.; SARTORI, J. R. Phytogenic additives and glutamine plus glutamic acid in broiler diets. **Revista Brasileira Ciência Avícola**. v.15, p.295-300, 2013.

REISINGER, N.; STEINER, T.; NITSCH, S.; SCHATZMAYR, G.; APPELEGATE, T. J. Effects of a blend of essential oils on broiler performance and intestinal morphology during coccidial vaccine exposure. **The Journal of Applied Poultry Research**. v.20, p.272-283, 2011.

SAKAMOTO, M. I.; MURAKAMI, A. E.; SILVEIRA, T. G. V.; FERNANDES, J. I. M.; OLIVEIRA, C. A. L. Influence of glutamine and vitamin E on the performance and the immune responses of broiler chickens. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**. v.8, p.243-249, 2006.

SAKAMOTO, M. I.; FARIA, D. E.; NAKAGI, V. S.; NEGRÃO, J. A.; ARAÚJO, R. B.; SOUZA, K. M.; PREVIERO, T. C. Utilização da glutamina, associada ao ácido glutâmico, sobre o desenvolvimento e a atividade enzimática em frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.63, p.962-972, 2011.

SAS Institute. **SAS/STAT User's Guide**. Cary, NC: SAS Institute Inc.; 2002.

SHAKERI, M.; ZULKIFLI, I.; SOLEIMANI, A. F.; O'REILLY, E. L.; ECKERSALL, P. D.; ANNA, A. A.; KUMARI, S.; ABDULLAH, F. F. J. Response to dietary supplementation of l-glutamine and l-glutamate in broiler chickens reared at different stocking densities under hot, humid tropical conditions. **Poultry Science**. v.93, p.2700-2708, 2014.

SILVA, J. H. V.; COSTA, F. G. P. **Tabela para codornas japonesas e européias**. 2th ed. FUNEP, 2009, Jaboticabal, SP.

SOLTAN, M. A. Influence of dietary glutamine supplementation on growth performance, small intestinal morphology, immune response and some blood parameters of broiler chickens. **International Journal of Poultry Science**. v.8, p.60-68, 2009.

UNI, Z. E. H. A. V. A.; GANOT, S. A. H. A. R.; SKLAN, D. A. V. I. D. Post-hatch development of mucosal function in the broiler small intestine. **Poultry Science**. v.77, p.75-82, 1998.

YI, G. F.; ALLEE, G. L.; KNIGHT, C. D.; DIBNER, J. J. Impact of glutamine and oasis hatchling supplement on growth performance, small intestinal morphology, and immune response of broilers vaccinated and challenged with *Eimeria maxima*. **Poultry Science**. v.84, p.283-293, 2005.

CAPÍTULO 3

Caraterização da diversidade microbiana cecal de codornas de corte submetidas a estresse térmico crônico e suplementadas com glutamina associada ao ácido glutâmico

Caraterização da diversidade microbiana cecal de codornas de corte submetidas a estresse térmico crônico e suplementadas com glutamina associada ao ácido glutâmico

RESUMO

Objetivou-se por meio deste estudo caracterizar a microbiota cecal de codornas de corte e elucidar o efeito do estresse térmico crônico e da suplementação dietética de glutamina (Gln) associada ao ácido glutâmico (Glu) sobre a diversidade microbiana. Foram conduzidos dois experimentos, cada um com 320 codornas de corte, distribuídas em delineamento inteiramente ao acaso, com duas condições térmicas em cada experimento [conforto e frio (experimento 1); conforto e calor (experimento 2)] e duas dietas (dieta basal e dieta suplementada com 0,2% de Gln+Glu), com oito repetições e dez aves por unidade experimental. Aos 21 e aos 42 dias de idade seis aves de cada tratamento dos experimentos 1 e 2, respectivamente, foram abatidas, colhidos os cecos e congelados a -80°C ; posteriormente procedeu-se à extração de DNA, sequenciamento e processamento das sequências geradas. Por meio da identificação das sequências geradas, constatou-se em ambas as idades maior abundância dos filos *Firmicutes*, seguido de *Bacteroidetes*, os quais foram constituídos majoritariamente pelo gêneros *Megamonas* e *Bacteroides*, respectivamente. *Proteobacteria* foi o terceiro maior filo aos 21 dias de idade das aves, no entanto, aos 42 dias teve sua abundância reduzida e foi sucedido pelo filo *Fusiobacteria*. A análise estatística não encontrou efeito ($P>0,05$) dos tratamentos térmicos e dietéticos sobre a diversidade da microbiota cecal das codornas. Conclui-se que a microbiota cecal de codornas de corte aos 21 e aos 42 dias de idade é composta predominantemente pelo filo *Firmicutes*, seguido de *Bacteroidetes*; e a família mais abundante nos cecos de codornas de corte é *Veillonellaceae*, cujo gênero *Megamonas* representa mais de 1/3 do total de bactérias colonizadoras. O estresse térmico crônico e a suplementação dietética de 0,2% Gln+Glu não alteram a diversidade da microbiota dos cecos de codornas de corte.

Palavras-chave: *Coturnix*, estresse térmico, glutamato, *Megamonas*, microbiota intestinal.

Characterization of the cecal microbial diversity in meat type quails submitted to chronic thermal stress and supplemented with glutamine and glutamic acid

ABSTRACT

The objective of this study was to characterize the cecal microbiota of meat type quails and elucidate the effect of chronic heat stress and dietary glutamine (Gln) supplementation on glutamic acid (Glu) on microbial diversity. Two experiments, each with 320 cutting quails, were conducted in a completely randomized design with two thermal conditions in each experiment (comfort and cold (experiment 1); Comfort and heat (experiment 2)] and two diets (basal diet and diet supplemented with 0.2% Gln + Glu), with eight replicates and ten birds per experimental unit. At 21 and 42 days of age, six birds from each treatment of experiments 1 and 2, respectively, were slaughtered, collected and frozen at -80 ° C; Afterwards DNA extraction, sequencing and processing of the generated sequences were carried out. By means of the identification of the generated sequences, it was observed in both ages greater abundance of the *Firmicutes* phyla, followed by *Bacteroidetes*, which were constituted mainly by the genus *Megamonas* and *Bacteroides*, respectively. *Proteobacteria* was the third largest phylum at 21 days of age of the birds, however, at 42 days its abundance was reduced and it was succeeded by the phylum *Fusobacteria*. The statistical analysis did not find an effect ($P > 0.05$) of the thermal and dietary treatments on the diversity of the cecal microbiota of the quails. It is concluded that the cecal microbiota of meat type quails at 21 and 42 days of age is predominantly composed of *Firmicutes*, followed by *Bacteroidetes*; The most abundant family in the quails cecum is *Veillonellaceae*, whose genus *Megamonas* represents more than 1/3 of the total colonizing bacteria. Chronic thermal stress and dietary supplementation of 0.2% Gln + Glu do not alter the microbiota diversity of cut quails ceca.

Keywords: *Coturnix*, glutamate, intestinal microbiota, *Megamonas*, thermal stress.

Introdução

Os cecos desempenham importante papel na nutrição, fisiologia e saúde sistêmica e intestinal das aves (Stanley et al., 2012a e 2013). Nas aves de produção, eles são o principal sítio de atividade microbiana, comportando um complexo ecossistema de contínua simbiose do animal com a microbiota residente, interferindo diretamente nos processos digestivos e absorptivos e, por conseguinte, na produtividade (Looft et al., 2014; Tremaroli e Bäckhed, 2012; Stanley et al., 2015).

Alguns fatores inerentes ao ambiente térmico e a nutrição parecem interferir no perfil de colonização microbiana no intestino das aves (Oviedo-Rondón, 2009). A exposição dos animais a baixas temperaturas nos primeiros dias de vida, por exemplo, torna-os susceptíveis a desajustes fisiológicos e digestivos que podem promover modificações no ambiente intestinal e, consequentemente, favorecer determinados grupos microbianos. Somado a isso, há indícios que a suplementação de glutamina e/ou ácido glutâmico, que favorece o desenvolvimento da mucosa intestinal e minimiza desgaste sistêmico do organismo ocasionado pelo estresse (Dai et al., 2011; Hao et al., 2012), pode interferir na diversidade microbiana intestinal, visto que determinados grupos microbianos apresentam especificidade na utilização de aminoácidos (Dai et al., 2010; Davila et al., 2013).

O sequenciamento metagenômico do gene 16S RNAr permite identificação e quantificação os grupos microbianos cultiváveis e não cultiváveis presentes em determinada amostra, revelando-se uma importante ferramenta para avaliar a influência de fatores diversos no perfil de colonização na microbiota intestinal. Para tanto, a caracterização completa da microbiota cecal das aves em condições normais de saúde e manejo é o primeiro passo a ser dado para compreensão das relações simbióticas no meio intestinal e estudo do impacto das alterações na microbiota sobre a produção animal.

Nesse contexto, o presente estudo propôs-se a caracterizar a microbiota cecal de codornas europeias e elucidar o efeito da exposição das aves ao estresse térmico crônico e a suplementação dietética de glutamina associada ao ácido glutâmico sobre a diversidade microbiana.

Material e Métodos

Todos os procedimentos deste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (Protocolo nº. 118/2015).

Local

Foram realizados dois experimentos, os quais foram conduzidos no Setor de Avicultura da Universidade Federal da Paraíba – Campus III e as análises laboratoriais realizadas no Laboratório de Fisiologia Animal e Biologia Molecular - CCA/UFPB. O sequenciamento foi realizado no Roy J. Carver Biotechnology Center, na Universidade de Illinois em Urbana-Champaign, EUA.

Animais e delineamento experimental

No primeiro experimento (experimento 1) foram utilizadas 320 codornas de corte de um dia de idade, distribuídas em delineamento inteiramente ao acaso, em esquema fatorial 2 x 2, sendo duas condições térmicas (conforto e frio) e duas dietas (dieta basal e dieta suplementada com 0,2% de gln+glu), com oito repetições e 10 aves por unidade experimental. Para o segundo experimento (experimento 2), utilizaram-se 320 codornas de corte de 22 dias de idade, distribuídas em delineamento inteiramente ao acaso, em esquema fatorial 2 x 2, sendo duas condições térmicas (conforto e calor) e duas dietas (dieta basal e dieta suplementada com 0,2% de gln+glu), com oito repetições e 10 aves por unidade experimental.

Tratamentos e dietas experimentais

No primeiro experimento, as aves foram alojadas em salas de ambiente controlado, cuja temperatura de conforto térmico na primeira semana foi de 37,5°C, decrescendo para 28,5°C na segunda semana e 24°C na terceira semana. A temperatura de estresse por frio foi ajustada para 5°C abaixo desses valores, que, segundo Sousa et al. (2014b), configuram respectivos estados de conforto térmico e de estresse por frio aos animais. No segundo experimento, durante o período de um a 21 dias todas as aves foram mantidas em temperatura termoneutra recomendada (Sousa et al., 2014b) e alimentadas com dieta basal; somente aos 22 dias foram distribuídas em duas salas de

ambiente controlado, mantidas em temperaturas de conforto preconizado (25°C) e calor (32°C), respectivamente (Sousa et al., 2014a). O estado de conforto ou estresse térmico em ambos experimentos foi confirmado pela observação comportamental e pelo desempenho das aves (dados não mostrados).

Os tratamentos testados no primeiro experimento foram: tratamento 1: temperatura termoneutra e dieta basal; tratamento 2: temperatura termoneutra e dieta com 0,2% de suplementação de gln+glu; tratamento 3: temperatura de estresse por frio e dieta basal; e tratamento 4: temperatura de estresse por frio e alimentados com 0,2% de suplementação de gln+glu. No segundo experimento os tratamentos foram: tratamento 1: temperatura termoneutra e dieta basal; tratamento 2: temperatura termoneutra e dieta com 0,2% de suplementação de gln+glu; tratamento 3: temperatura de estresse por calor e dieta basal; e tratamento 4: temperatura de estresse por calor e alimentados com 0,2% de suplementação de gln+glu.

Em ambos os experimentos as dietas experimentais foram isoprotéicas e isoenergéticas, formuladas à base de milho e farelo de soja, atendendo às exigências nutricionais de codornas de corte de acordo com as recomendações de Silva & Costa (2009): 2.900 kcal de energia metabolizável, 25,00% de proteína bruta, 1,37% de lisina digestível, 1,04% de metionina+cistina digestível, 1,04% de treonina digestível, 0,85% de cálcio, 0,32% de fósforo disponível e 0,17% de sódio. O fornecimento de ração e água foi feito à vontade durante todo o período experimental.

Colheita dos cecos e extração do DNA total

Aos 21 e 42 dias de idade seis aves de cada tratamento dos experimentos 1 e 2, respectivamente, foram abatidas e procedeu-se à colheita dos cecos e posterior armazenamento a -80°C até o isolamento do DNA. Para extração do DNA de cada amostra, foram utilizados entre 80 e 100 mg de raspado de mucosa e conteúdo cecal e realizada com kit comercial (Powersoil™ DNA Isolation, MoBio Laboratories Inc, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A concentração e a qualidade do DNA foram avaliadas visualmente em de gel de agarose e estimadas através do espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE), através da absorbância a 260/280 e 260/230. Para envio do DNA extraído, foram aplicados 70µg (30-228ng de DNA) no tubo fornecido com o kit Gentegra DNA

(Gentegra, Pleasanton), segundo instruções do fabricante, procedendo-se então à secagem por 5 horas em dessecador acoplado em bomba de vácuo.

Amplificação do gene 16S RNAr e sequenciamento

As amostras para sequenciamento por 16S foram quantificadas através de método fluorométrico (Qubit 2.0, Life Technologies) para garantir a integridade e, na sequência, foram preparadas as bibliotecas do 16S RNAr e sequenciamento junto à Unidade de Sequenciamento de Larga Escala [High-Throughput Sequencing and Genotyping Unit] do Centro de Biotecnologia Roy J. Carver da Universidade de Illinois at Urbana-Champaign (UIUC), EUA. Foi realizada amplificação dos segmentos V3-V5 hipervariáveis do gene RNAr 16S utilizando-se os iniciadores V3 F357 (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG) e V5 R926 (5'-CCGTCAATTCMTTTRAGT), utilizando-se o sistema IFC Access array (Fluidigm, South San Francisco, CA, USA). A reação de amplificação foi realizada no sistema FC1 Cyler (Fluidigm). A Figura 1 apresenta o esquema do construto final, contendo as sequências de ligação (linkers) CS1 (5'-ACACTGACGACATGGTTCTACA) e Cs2 (5'-TACGGTAGCAGAGACTTGGTCT) do Fluidigm e o par de adaptadores Illumina i5 (5'- AATGATACGGCGACCACCGAGATCT) e i7 contendo o index (barcode) de identificação das amostras (5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT-XXXXXXXXXX).

As bibliotecas foram purificadas utilizando-se kit comercial (AMPure XP beads, Illumina, San Diego, CA, EUA), quantificadas por qPCR e sua qualidade avaliada com o kit High density DNA Assay no equipamento Fragment Analyzer (Advanced Analytical Technologies Inc, Ankeny, Iowa, USA). O sequenciamento foi realizado em uma flowcell de MiSeq para 251 ciclos de cada extremidade dos fragmentos, utilizando-se um kit de sequenciamento de 500 ciclos para MiSeq V2 (Illumina), de acordo com recomendações do fabricante. O DNA de PhiX foi utilizado como controle para as corridas MiSeq (kit PhiX, Illumina), na concentração mínima de 5%.

Os dados foram depositados no servidor Biocluster do Instituto de Biologia Genômica da Universidade de Illinois em Urbana-Champaign (<http://biocluster.igb.illinois.edu/>), divididos em 4 arquivos compactados, após retiradas as sequências controle PhiX. O primeiro arquivo, “dados não ordenados” (Unsorted

data), compreende o total de sequências produzidas na corrida, sem nenhum tipo de processamento como limpeza, ordenação e demultiplexação. O arquivo “dados demultiplexados” (demultiplexed data) inclui as sequências ordenadas por index (barcode/identificador da amostra), mas nenhum outro tipo de processamento. Essa métrica permite identificar se alguma amostra não produziu sequências, o que é bastante útil quando diversos pares de primers são utilizados. O arquivo “dados ordenados por primer” (primer sorted data) apresenta as sequências ordenadas de acordo com os diversos primers utilizados (Archaea, V3-V5, V4, etc). Ele permite visualizar quantas sequências foram produzidas por todas as amostras quando cada primer foi utilizado na amplificação. O arquivo “dados primer-ordenados e demultiplexados” (primer sorted and demultiplexed data) é organizado de acordo com a amostra e o par de primer utilizado. Ele contém vários arquivos menores com a extensão fastq, apresentando dois arquivos fastq por par de primers e por amostra - read 1 (sequência 5’) e read 2 (sequência 3’).

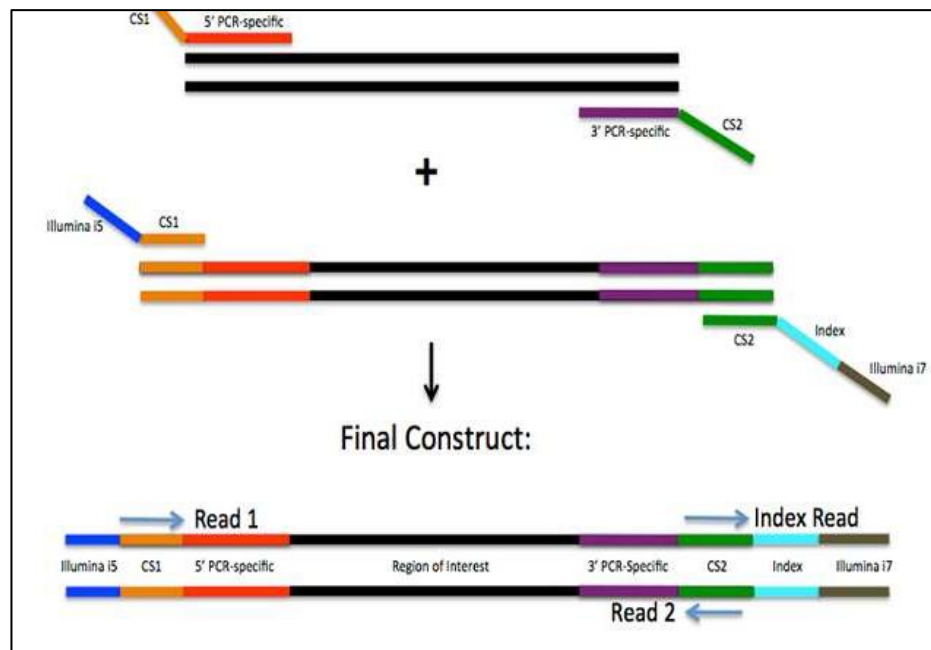


Figura 1. Construto final para sequenciamento em plataforma Illumina, incluindo os iniciadores específicos para as regiões hipervariáveis do gene 16S RNAr (primers 5’ e 3’ específicos), as sequências de ligação CS1 e CS2 do sistema Fluidigm e os adaptadores Illumina i5 e i7

Análise de dados e processamento das sequências

O processamento dos dados foi realizado utilizando-se o Biocluster da Universidade de Illinois at Champaign-Urbana. O primeiro passo realizado foi a retirada

da sequência específica do primer utilizado na PCR. Para tanto, as sequências demultiplexadas foram filtradas utilizando-se o software Trimmomatic (Bolger et al., 2014), utilizando-se o parâmetro HEADCROP:17 e HEADCROP:18 para R1 e R2, respectivamente.

A classificação taxonômica das sequências foi realizada por meio da pipeline Illinois Mayo Taxon Organization from RNA Dataset Operations (IM-TORNADO, Jeraldo et al., 2014), disponível no Biocluster da UIUC, utilizando-se paired-end reads não sobrepostas (Cole et al., 2013) e os parâmetros descritos no ANEXO I. Para alinhamento das sequências, foi utilizada a versão 14 (release 11) da base de dados Ribosomal Database Project (RDP) (<https://rdp.cme.msu.edu/>). As OTUs representativas foram mapeadas usando USEARCH a 97% de identidade e foi gerada uma tabela no format BIOM (McDonald et al., 2012) contendo o número de contagens para cada OTU por amostra, a informação taxonômica e outros metadados.

O processamento exploratório dos dados, as análises de alfa e beta diversidade e as matrizes de dissimilaridade foram realizadas com o software Qiime (Caporaso et al., 2010). Para tanto, a tabela Biom gerada pelo IM-Tornado (Jeraldo et al., 2014) foi filtrada para separar amostras com baixo número de sequências e eliminar OTUs que não possuíam sequências. Foram então realizadas curvas de rarefação para quantificar a cobertura proporcionada pelo sequenciamento e sua adequação em evidenciar a diversidade presente nas amostras. A alfa diversidade da comunidade foi estimada pelos índices de Shannon e Chao1. Foram gerados gráficos de barra e área de acordo com a abundância relativa das OTUs encontradas (`summarize_taxa_through_plots.py`). As amostras foram agrupadas de acordo com os experimentos e tratamentos. O método da distância Unifrac ponderada e não ponderada (Lozupone e Knight, 2005) foi utilizado na análise de coordenadas principais (PCoA) para avaliação da beta diversidade. Foram confeccionados gráficos Emperor plots (Vazques-Baez et al., 2013), que permitem visualizar gráficos PCoA tridimensionais (`beta_diversity_through_plots.py`).

Resultados

Sequenciamento dos metagenomas

A preparação das amostras pelo sistema IFC Access Array gerou bibliotecas de excelente qualidade, como pode ser visualizado pelo perfil eletroforético obtido no Fragment Analyzer (Figura 2). O sequenciamento das bibliotecas metagenômicas da região V3 do 16S RNAr da microbiota cecal de ambos experimentos gerou o total de, aproximadamente, 6 milhões de sequências pareadas (após remoção das sequências controle PhiX). A avaliação inicial de qualidade pelo trimomatic resultou na utilização de 1.571.012 sequências para as amostras do primeiro experimento e 1.304.210 sequências para as amostras do segundo experimento, as quais na tabela Biom identificaram 1050 OTUs, cada. Após nova filtragem de OTUs com baixa representação foram detectadas 308 OTUs a partir de 1.561.097 sequências (99,4%) nas amostras do primeiro experimento e 413 OTUs a partir de 1.294.022 sequências (99,2%) nas amostras do segundo experimento. Esse passo é necessário para descartar sequências de baixíssima representação, que podem causar viés na análise posterior dos dados.

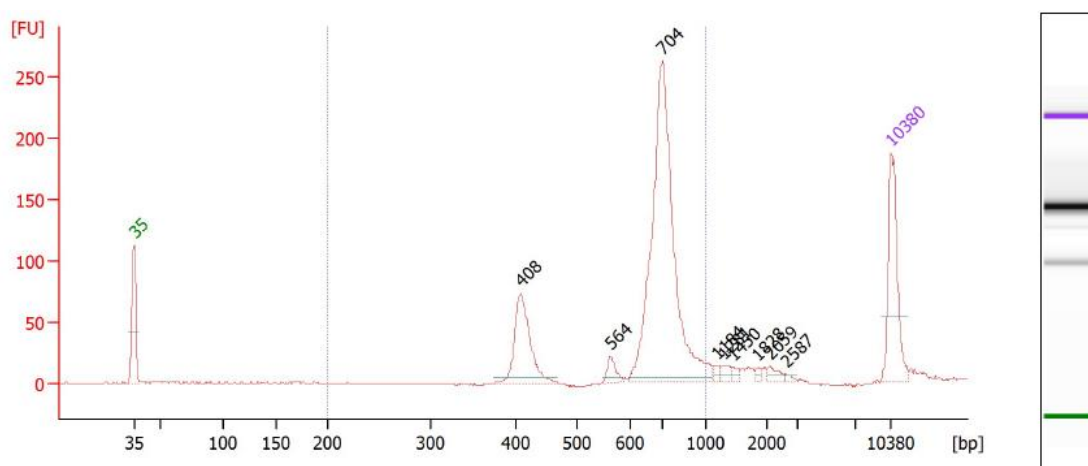


Figura 2. Perfil eletroforético de pool de amplificadores (bibliotecas), indicando pico de leitura dos contrutos.

Perfil taxonômico dos metagenomas

As sequências geradas de ambos os experimentos foram classificadas por filo, classe, ordem, família e gênero. O perfil taxonômico total do metagenoma cecal de codornas de corte aos 21 e 42 dias de idade são apresentados, respectivamente, nas Figuras 4 e 5. Aos 21 dias de idade foram identificados cinco filos diferentes, nos quais

havia 10 classes, 11 ordens, 16 famílias e 25 gêneros (Apêndice B); e aos 42 dias de idade, o quantitativo taxonômico foi de seis filós, 12 classes, 13 ordens, 23 famílias e 52 gêneros (Apêndice C).



Figura 3. Gráfico de Krona do perfil taxonômico total do metagenoma cecal de codornas de corte aos 21 dias de idade (são ilustrados apenas gêneros com abundância $\geq 0,1\%$).

Os filós que compuseram a comunidade microbiana cecal de codornas de corte aos 21 e 42 dias de idade foram: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Actinobacteria* e *Tenericutes*. Considerando-se a abundância relativa no total de sequências geradas, constatou-se que *Firmicutes* foi filo mais abundante nos cecos das aves, compondo 64,4 e 91,5% das sequências aos 21 e 42 dias de idade,

respectivamente, cujas principais famílias que o constituiui foram *Veillonellaceae* (36,0% aos 21 dias / 41,5% aos 42 dias), *Ruminococcaceae* (17,0% aos 21 dias / 16,8% aos 42 dias) e *Lachnospiraceae* (7,6% aos 21 dias / 28,6% aos 42 dias). *Bacteroidetes* foi o segundo maior filo (31,10% aos 21 dias / 7,6% aos 42 dias), representado pelas famílias *Bacteroidaceae* (17,9% aos 21 dias / 2,6% aos 42 dias) e *Porphyromonadaceae* (12,8% aos 21 dias / 0,4% aos 42 dias). Os filios *Proteobacteria*, *Actinobacteria* e *Tenericutes* juntos corresponderam a 4,6 e a 0,6% das sequências aos 21 e 42 dias de idade, respectivamente. O filo *Fusobacteria* somente foi encontrado nas amostras cecais aos 42 dias de idade, compondo 0,3% das sequências geradas.

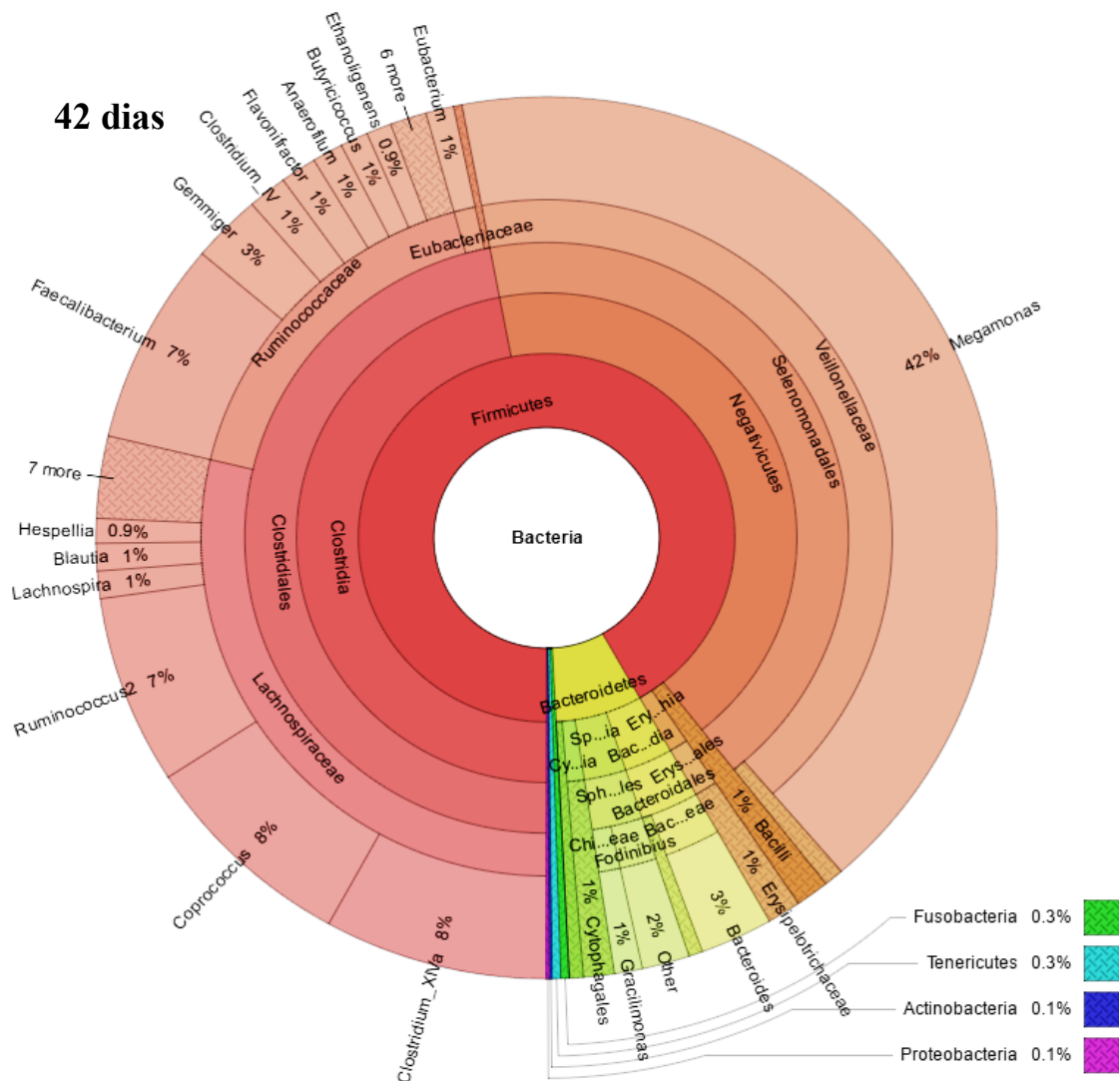


Figura 4. Gráfico de Krona do perfil taxonômico total do metagenoma cecal de codornas de corte aos 42 dias de idade (são ilustrados apenas gêneros com abundância $\geq 0,1\%$).

Ao nível de gênero, o total de sequências geradas apresentou predominância de *Megamonas* (36,9% aos 21 dias / 41,5% aos 42 dias), seguida de *Bacteroides* (17,9% aos 21 dias / 2,6% aos 42 dias). Outros gêneros abundantes foram *Parabacteroides* (12,8% aos 21 dias / 0,4% aos 42 dias), *Clostridium_XIVa* (3,6% aos 21 dias / 8,0% aos 42 dias), *Escherichia/Shigella* (4,4% aos 21 dias / 0,1% aos 42 dias), *Coprococcus* (0,5% aos 21 dias / 7,8% aos 42 dias) e *Ruminococcus2* (1,7% aos 21 dias / 6,9% aos 42 dias). Os demais gêneros em menor proporção somaram 22,0 e 32,3% do total de sequências do metagenoma cecal de codornas de corte aos 21 e 42 dias, respectivamente.

Análise de diversidade microbiana nos tratamentos testados

Experimento 1

O percentual dos filos bacterianos presentes nos cecos de codornas de corte submetidas aos tratamentos térmicos e dietéticos testados são apresentados na Figura 5.

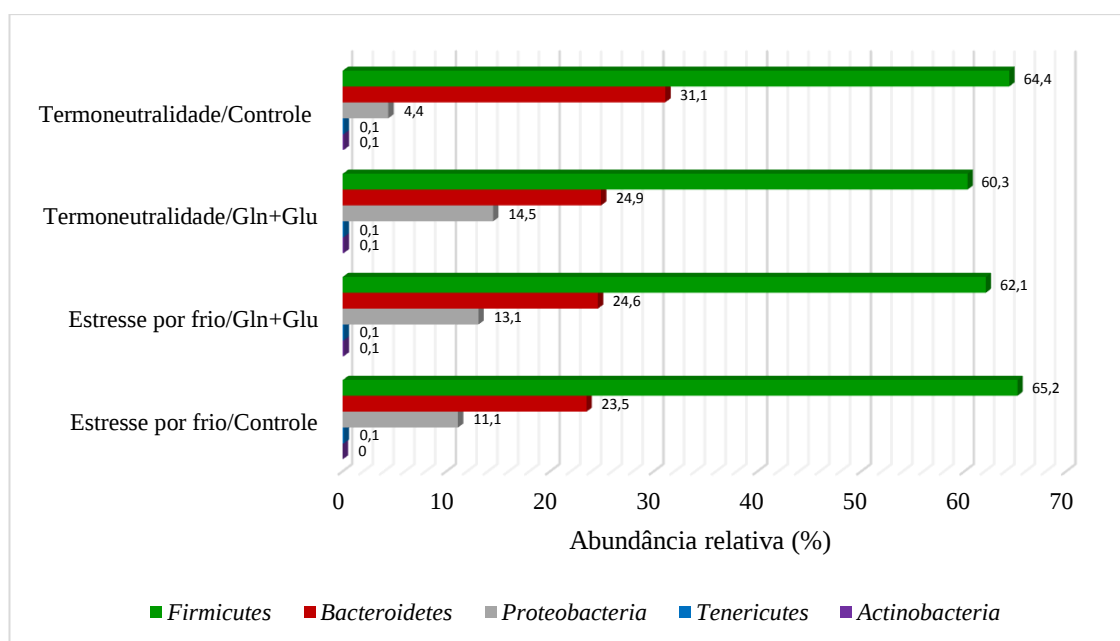


Figura 5. Percentual dos filos bacterianos presentes nos cecos de codornas de corte aos 21 dias de idade, submetidas aos tratamentos térmicos e dietéticos.

Assim como no total das amostras, nos tratamentos testados do primeiro experimento o filo *Firmicutes* apresentou maior abundância relativa, seguido dos filos *Bacteroidetes* e *Proteobacteria*, consecutivamente. Os filos *Tenericutes* e

Actinobacteria apresentaram-se como grupos bacterianos raros em codornas de corte aos 21 dias de idade, correspondendo cada um a 0,1% das sequências classificadas em quase todos os tratamentos, exceto nas amostras do tratamento de estresse por frio e dieta basal, nas quais não foram encontrados.

Dentre os gêneros identificados, *Megamonas* foi o grupo bacteriano mais abundante em todos os tratamentos, seguido de *Bacteroides* (Figura 6). *Escherichia/Shigella* foi o terceiro gênero mais abundante em quase todos os tratamentos, exceto no tratamento de termoneutralidade e dieta basal, no qual o terceiro maior gênero foi *Parabacteroides*.

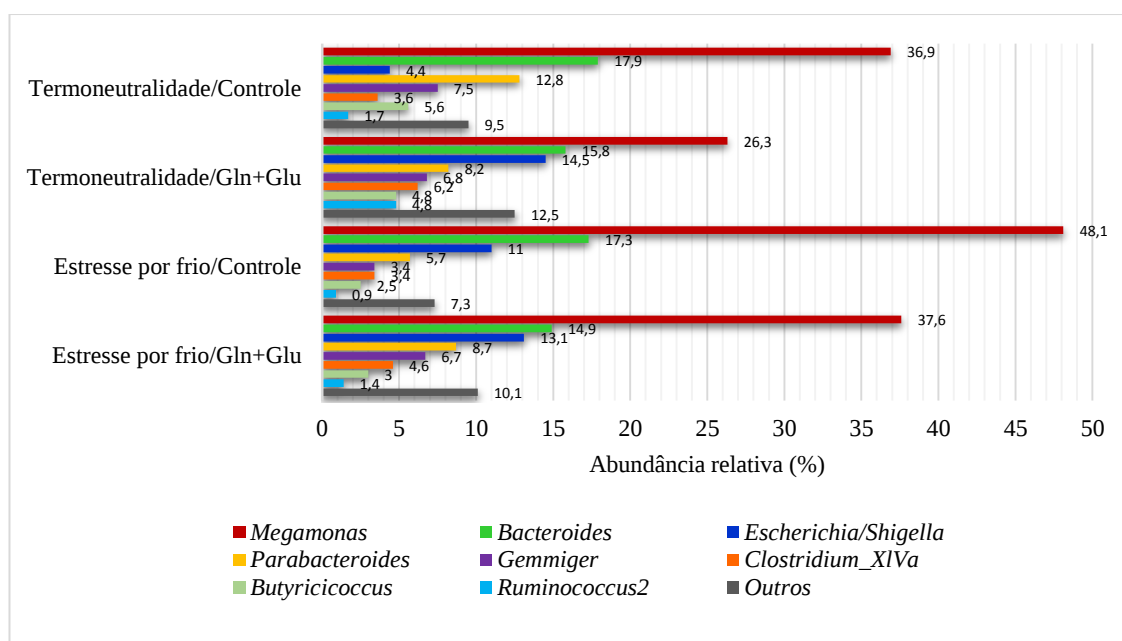


Figura 6. Percentual dos gêneros bacterianos presentes nos cecos de codornas de corte aos 21 dias de idade, submetidas aos tratamentos térmicos e dietéticos.

Experimento 2

A abundância relativa das sequências nos tratamentos do segundo experimento também apresentou percentual semelhante ao total de sequências geradas, tanto ao nível de filo como ao nível de gênero (Figura 7 e 8). *Firmicutes* foi o filo mais abundante em todos os tratamentos, sendo expressivamente representado pelo gênero *Megamonas*. O filo *Bacteroidetes* foi o segundo maior filo, cujo gênero mais abundante foi *Bacteroides*. *Fusobacteria* apresentou a terceira maior abundância de sequências identificadas entre os tratamentos, representado pelos gêneros *Fusobacterium* e *Streptobacillus*. Os filot *Tenericutes* e *Actinobacteria* apresentaram abundância relativa de $\leq 0,3\%$ das sequências

geradas e foram representados pelos gêneros *Anaeroplasma* (Tenericutes), *Enteractinococcus* (Actinobacteria) e *Collinsella* (Actinobacteria).

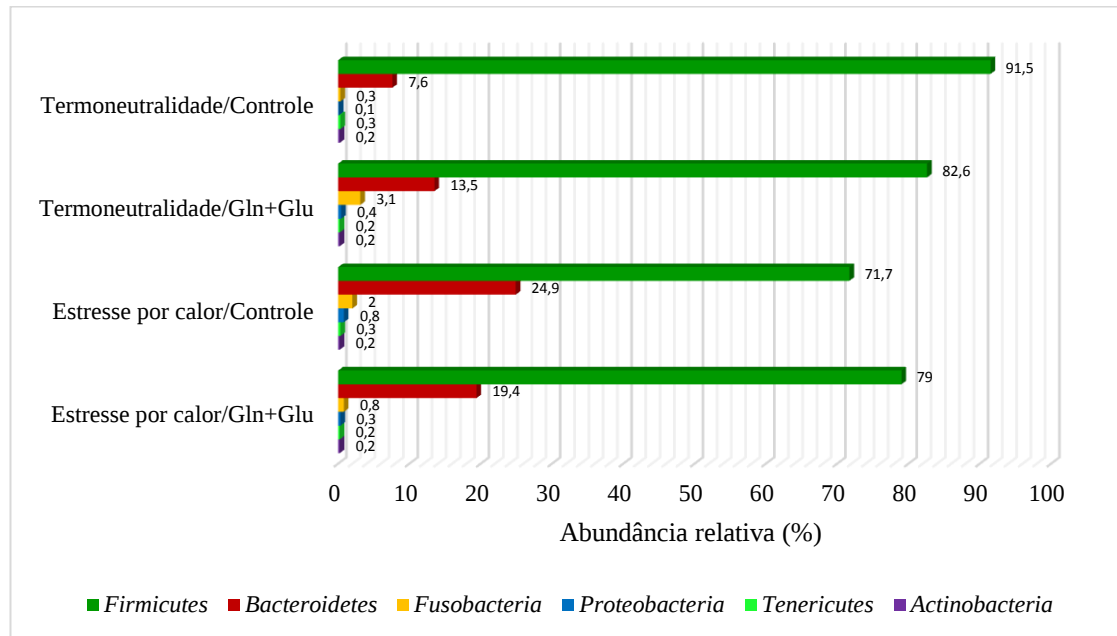


Figura 7. Percentual dos filos bacterianos presentes nos cecos de codornas de corte aos 42 dias de idade, submetidas aos tratamentos térmicos e dietéticos.

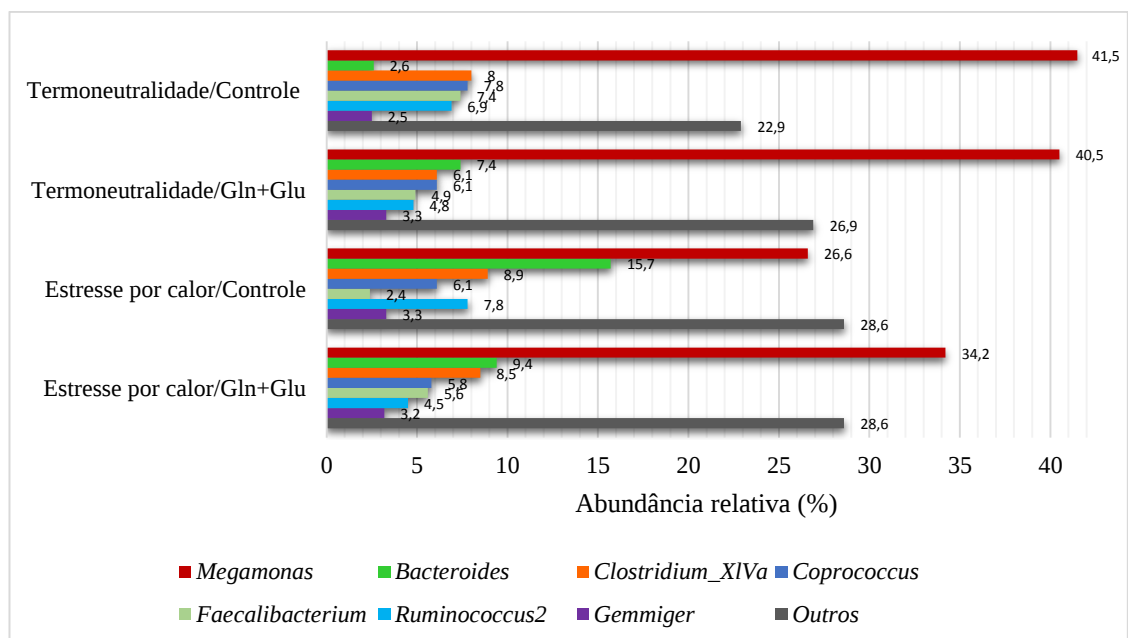


Figura 8. Percentual dos gêneros bacterianos presentes nos cecos de codornas de corte aos 42 dias de idade, submetidas aos tratamentos térmicos e dietéticos.

Análise Estatística

Experimentos 1 e 2

As curvas de rarefação geradas sugerem que a cobertura de amostragem foi alcançada em todos os tratamentos de ambos os experimentos e que amostragens superiores a ~9.000 sequências apresentam ganhos irrisórios na diversidade, como demonstrado pelos índices de Shannon e Chao1 (Figura 9). A análise estatística das sequências não encontrou efeito significativo dos tratamentos ($P>0,05$) sobre a diversidade microbiana.

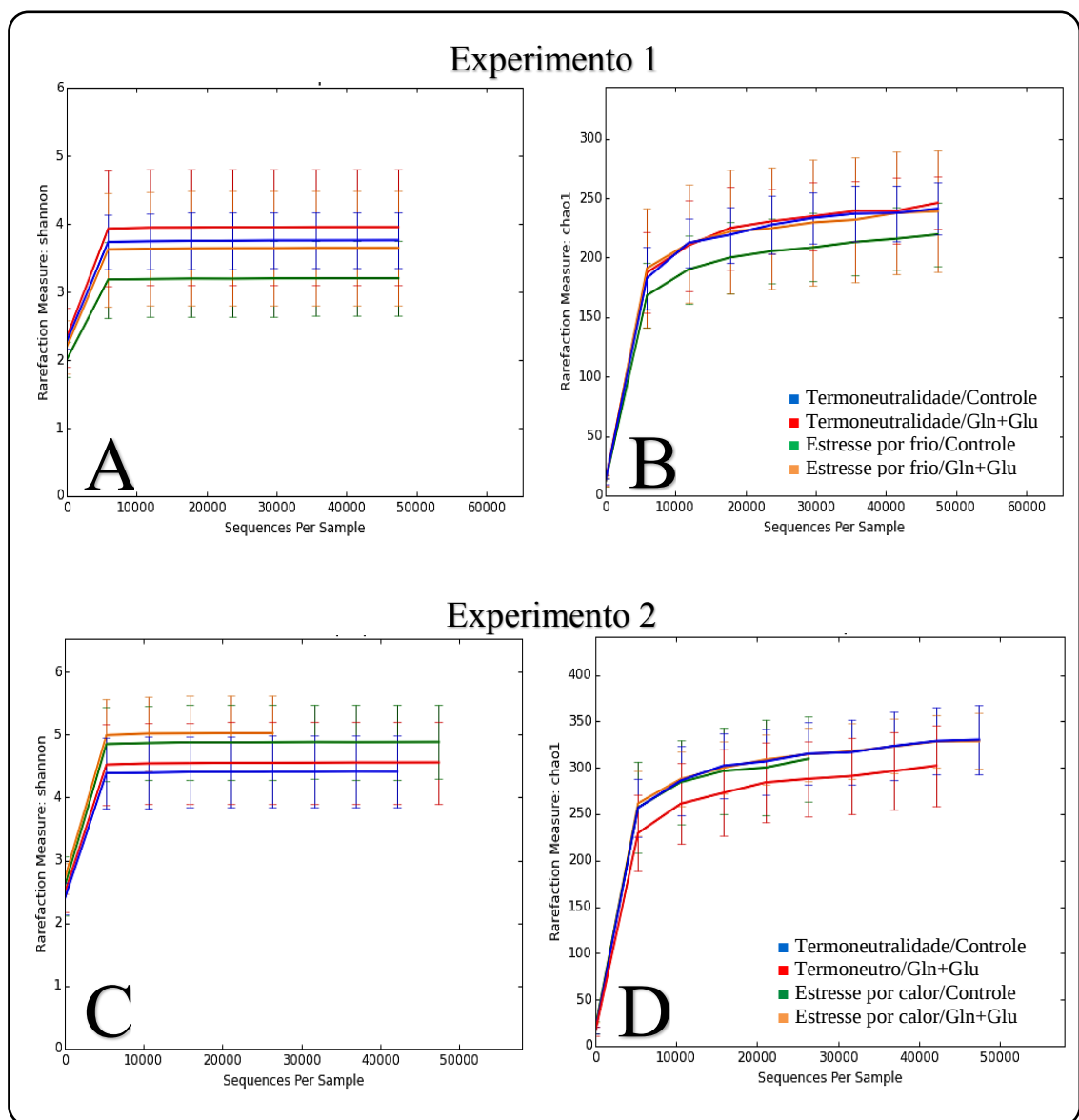


Figura 9. Índices de Shannon (A e C) e Chao1 (B e D) em função do número de sequências por amostra dos cecos de codornas de corte submetidas aos tratamentos térmicos e dietéticos testados.

A análise de similaridade com base na ordenação da matriz de distância gerada pelo índice UniFrac não encontrou agrupamento das amostras entre os tratamentos testados, conforme ilustrado pelo gráfico de Análise de Coordenadas Principais (PCoA) (Figura 10).

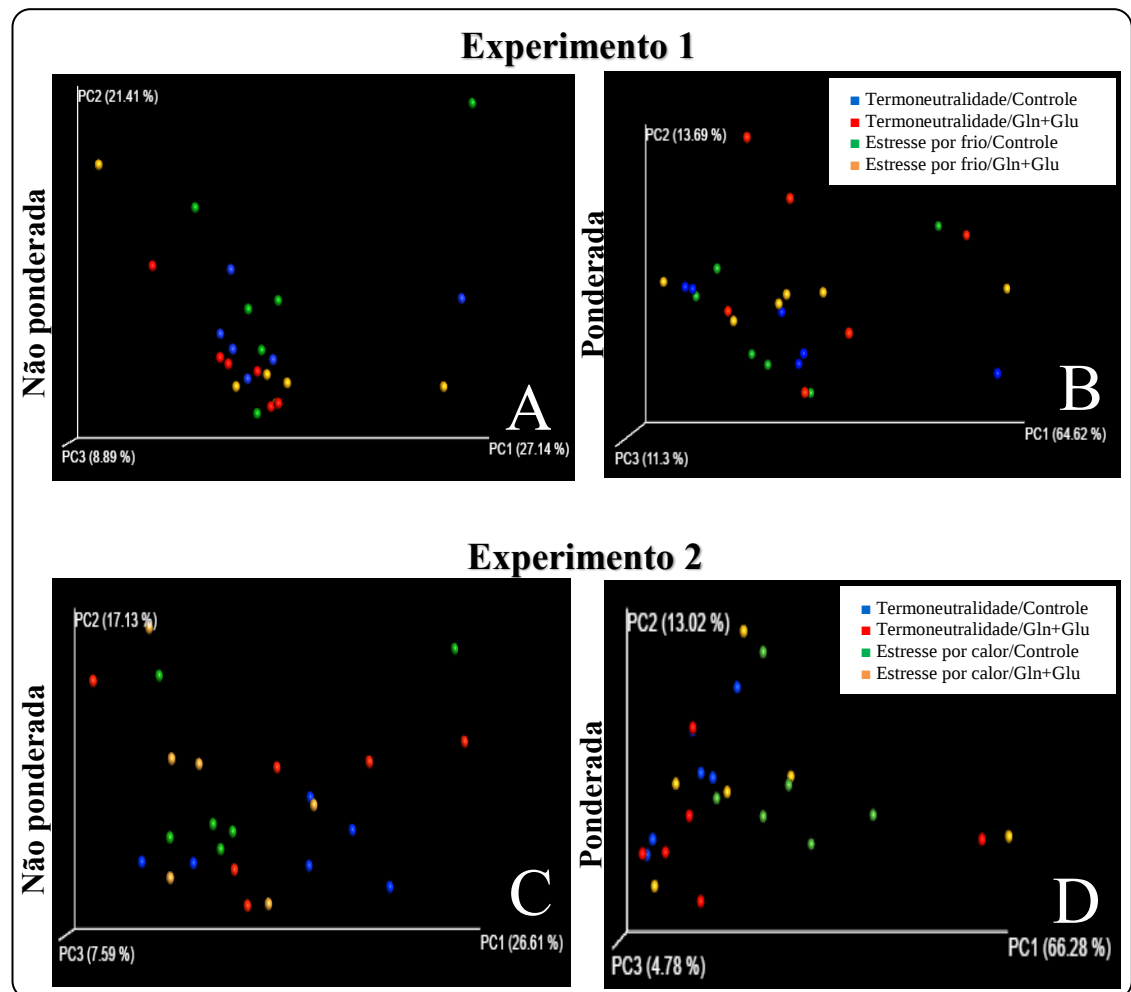


Figura 10. Análise de Coordenadas Principais (PCoA) UniFrac não ponderada (A e C) e ponderada (B e D) das sequências do gene do 16S RNAr de amostras dos cecos de codornas de corte submetidas aos tratamentos térmicos e dietéticos testados.

Discussão

Em aves de produção, os cecos são o principal sítio de atividade microbiana, comportando um complexo ecossistema de contínua simbiose do animal com a microbiota residente, interferindo diretamente nos processos digestivos e absorptivos e, por conseguinte, na produtividade (Looft et al., 2014; Tremaroli e Bäckhed, 2012; Stanley et al., 2015), tais fatos embasam a relevância de investigações da caracterização estrutural e funcional da comunidade microbiana colonizadora deste órgão. Este é o primeiro estudo que caracteriza a microbiota cecal de codornas de corte por meio de método independente de cultivo. Também não há relatos na literatura do efeito da suplementação dietética de glutamina e ácido glutâmico ou do ambiente térmico sobre a microbiota intestinal destes animais.

A predominância de *Firmicutes* seguida de *Bacteroidetes*, descrita em nossos resultados na caracterização da microbiota cecal de codornas de corte, também é relatada em frangos de corte (Oakley et al., 2014), poedeiras de oito a 16 semanas de idade (Videnska et al., 2014), perus (Wei et al., 2013) e codornas japonesas (Wilkinson et al., 2014); contudo, um distintivo registrado ao nível de filo foi a colonização e sucessão de *Fusobacteria* sobre o filo *Proteobacteria* de 21 para 42 dias, ocupando a terceira maior abundância relativa de filos. Outra particularidade constatada na composição da microbiota cecal de codornas de corte foi o domínio de colonização da família *Veillonellaceae* em ambas as idades, representada unicamente pelo gênero *Megamonas*. Tal perfil de colonização diferencia-se até mesmo de codornas japonesas, cuja descrição das principais famílias colonizadoras dos cecos, em ordem de abundância, foi: *Bacteroidaceae*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae* e *Enterobacteriaceae*; e cujos principais gêneros descritos foram: *Ruminococcus*, *Faecalibacterium*, *Enterococcus* e *Clostridium*, não sendo relatada a presença do gênero *Megamonas* ou de outro representante da família *Veillonellaceae* (Wilkinson et al., 2014).

A dominância de *Megamonas*, constatada em todas as amostras analisadas, também não foi relatada em outras aves domésticas, ainda que este gênero seja comumente encontrado no intestino de aves adultas (Scupham et al., 2008; Wei et al., 2013; Sergeant et al., 2014; Videnska et al., 2014). O gênero *Megamonas* é constituído

por bactérias gram-negativas, anaeróbias obrigatórias que possuem alta capacidade de degradação de carboidratos não-amiláceos, utilização de hidrogênio e síntese de propionato e acetato (Shah & Collins, 1982; Sergeant et al., 2014). Existem evidências que a presença de *Megamonas hypermegale* no intestino de frangos pode inibir a colonização intestinal por *Salmonella*, por meio da síntese de ácidos graxos de cadeia curta (Salanitro et al., 1974; Barnes et al., 1979). Beloshapka et al. (2013) também relataram que o aumento da proporção de *Megamonas* foi acompanhado da redução de *Escherichia* em fezes de cães que receberam adição de inulina na dieta, inferindo haver uma relação benéfica da atividade do gênero com saúde gastrointestinal dos animais.

A estabilidade no perfil de colonização da microbiota intestinal de codornas de corte mediante ao estresse térmico revelou algo pouco esperado, pois, apesar de não haver na literatura descrições do efeito do estresse térmico sobre a fisiologia dos cecos e/ou a sobre microbiota cecal de codornas, em frangos, sabe-se que a exposição das aves às temperaturas fora da faixa de conforto térmico ocasiona várias alterações no ambiente intestinal, quanto ao fluxo de digesta, desgaste da mucosa, pH do meio intestinal, presença e a atividade de leucócitos intra-epiteliais, quantidade de células caliciformes e síntese de mucina (Furlan & Macari, 2002; Hassan et al., 2009; Ashraf et al., 2013; Song et al., 2014). Entretanto, segundo Silva et al. (2012), codornas e frangos apresentam semelhanças e discrepâncias entre as especificações nutricionais e respostas fisiológicas frente ao estresse térmico. Dessa forma, os resultados do presente estudo levam-nos a inferir que, caso o estresse térmico tenha promovido alterações no ambiente cecal, essas mudanças não foram capazes de modificar a microbiota residente, ou ainda, que tais modificações no ambiente e/ou na comunidade bacteriana foram perdidas ao longo do período experimental, devido a contínua exposição das aves às temperaturas, resultado de uma possível aclimação (Osman & Tanios, 1983; Gonzalez-Esquerre & Leeson 2005; Tsiouris et al., 2015). Todavia, independentemente dos eventos que antecederam o período colheita das amostras, a manutenção da diversidade microbiana cecal mostra-se uma boa resposta para as aves, pois é um indício de inalteração da atividade simbiótica microbiana.

A suplementação de 0,2% de glutamina e ácido glutâmico também não afetou a diversidade da microbiota dos cecos de codornas. Embora estudos *in vitro* demonstrem que a disponibilidade de glutamina no meio microbiótico regule a utilização de outros

aminoácidos pelas bactérias intestinais (Dai et al., 2013), e que determinados grupos microbianos têm preferência na utilização de aminoácidos específicos (Dai et al., 2010, 2011 e 2012), faz sentido ressaltar que os aminoácidos industriais utilizados são livres, estando prontamente disponíveis para absorção pelas células intestinais, evento que ocorre quase totalmente no intestino delgado e cuja maior parte da glutamina absorvida é utilizada pela própria mucosa intestinal (Arnaud et al., 2004). Dessa forma, embora a taxa de absorção dos aminoácidos não tenha sido medida no presente estudo, é coerente inferir que as poucas moléculas não absorvidas pelo intestino delgado foram quantitativamente insuficientes para promoverem alterações significativas no ambiente e/ou na microbiota cecal das aves.

Conclusões

A microbiota cecal de codornas de corte aos 21 e 42 dias de idade é composta predominantemente pelo filo *Firmicutes*, seguido de *Bacteroidetes*. O filo *Proteobacteria* é o terceiro maior filo aos 21 dias de idade, no entanto, aos 42 dias esse grupo bacteriano tem sua abundância reduzida e é sucedido pelo filo *Fusobacteria*. A família mais abundante nos cecos de codornas de corte é *Veillonellaceae*, cujo gênero *Megamonas* representa mais de 1/3 do total de bactérias colonizadoras.

O estresse térmico crônico e a suplementação dietética de 0,2% glutamina e ácido glutâmico não alteram a diversidade da microbiota dos cecos de codornas de corte, o que pode indicar inalteração da atividade microbiana, no entanto, estudos que investiguem e descrevam o metagenoma funcional são sugeridos para confirmação desta proposição.

Sugere-se ainda que estudos futuros investiguem o efeito de mudanças bruscas e rápidas do ambiente térmico sobre a diversidade microbiana intestinal.

Referências Bibliográficas

- ARNAUD, A.; RAMÍREZ, M.; BAXTER, J. H.; ANGULO, A. J. Absorption of enterally administered N-acetyl-L-glutamine versus glutamine in pigs. **Clinical Nutrition**, v.23, p.1303-1312, 2004.
- ASHRAF, S.; ZANEB, H.; YOUSAF, M. S.; IJAZ, A.; SOHAIL, M. U.; MUTI, S.; USMAN, M. M.; IJAZ, S.; REHMAN, H. Effect of dietary supplementation of prebiotics and probiotics on intestinal microarchitecture in broilers reared under cyclic heat stress. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.97, p.68-73, 2013.
- BARNES, E. M.; IMPEY, C. S.; STEVENS, B. J. H. Factors affecting the incidence and anti-salmonella activity of the anaerobic caecal flora of the young chick. **Journal of Hygiene**, v.82, p.263-283, 1979.
- BELOSHAPKA, A. N.; DOWD, S. E.; SUCHODOLSKI, J. S.; STEINER, J. M.; DUCLOS, L.; SWANSON, K. S. Fecal microbial communities of healthy adult dogs fed raw meat-based diets with or without inulin or yeast cell wall extracts as assessed by 454 pyrosequencing. **FEMS Microbiology Ecology**, v.84, p.532-541, 2013.
- BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, p.btu170, 2014.
- CAPORASO, J. G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K.; BUSHMAN F. D.; COSTELLO, E. K.; FIERER, N.; GONZALEZ PENA, A.; GOODRICH, J. K.; GORDON, J. I.; HUTTLEY, G. A.; KELLEY, S. T.; KNIGHTS, D.; KOENIG, J. E.; LEY, R. E.; LOZUPONE, C. A.; MCDONALD, D.; MUEGGE, B. D.; PIRRUNG, M.; REEDER, J.; SEVINSKY, J. R.; TURNBAUGH, P. J.; WALTERS, W. A.; WIDMANN, J.; YATSUNENKO, T.; ZANEVELD, J.; KNIGHT, R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**, v.7, p. 335-336, 2010.

COLE, J. R.; WANG, Q.; FISH, J. A.; CHAI, B.; MCGARRELL, D. M.; SUN, Y.; BROWN, C. T.; PORRAS-ALFARO, A.; KUSKE, C. R.; TIEDJE, J. M. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, p.gkt1244, 2013.

DAI, Z. L.; WU, G.; ZHU, W. Y. Amino acid metabolism in intestinal bacteria: links between gut ecology and host health. **Frontiers in Bioscience**, v.16, p.1768-1786, 2011.

DAI, Z. L.; LI, X. L.; XI, P. B.; ZHANG, J.; WU, G.; ZHU, W. Y. L-Glutamine regulates amino acid utilization by intestinal bacteria. **Amino Acids**, v.45, p.501-512, 2013.

DAI, Z. L.; LI, X. L.; XI, P. B.; ZHANG, J.; WU, G.; ZHU, W. Y. Metabolism of select amino acids in bacteria from the pig small intestine. **Amino Acids**, v.42, p.1597-1608, 2012.

DAI, Z. L.; ZHANG, J.; WU, G.; ZHU, W. Y. Utilization of amino acids by bacteria from the pig small intestine. **Amino Acids**, v.39, p.1201-1215, 2010.

DAVILA, A. M.; BLACHIER, F.; GOTTELAND, M.; ANDRIAMIHAJA, M.; BENETTI, P. H.; SANZ, Y.; TOMÉ, D. Intestinal luminal nitrogen metabolism: role of the gut microbiota and consequences for the host. **Pharmacological Research**, v.68, p.95-107, 2013.

FURLAN, R. L.; MACARI, M. Termorregulação. In: MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2002. Cap.17, p. 209-228.

GONZALEZ-ESQUERRA, R.; LEESON, S. Effects of acute versus chronic heat stress on broiler response to dietary protein. **Poultry Science**, v.84, p.1562-1569, 2005.

HAO, Y.; GU, X. H.; WANG, X. L. Overexpression of heat shock protein 70 and its relationship to intestine under acute heat stress in broilers: 1. Intestinal structure and digestive function. **Poultry Science**, v.91, p.781-789, 2012.

HASSAN, A. M.; ABDELAZEEM, H. M.; REDDY, P. G. Effect of some water supplements on the performance and immune system of chronically heatstressed broiler chicks. **International Journal of Poultry Science**, v.8, p.432-436, 2009.

JERALDO, P.; KALARI, K.; CHEN, X.; BHAVSAR, J.; MANGALAM, A.; WHITE, B. NELSON, H.; KOCHER, J. P.; CHIA, N. IM-TORNADO: A tool for comparison of 16s reads from paired-end libraries. **PLoS One**, v.9, p.e114804, 2014.

LOOFT, T.; ALLEN, H. K.; CANTAREL, B. L.; LEVINE, U. Y.; BAYLES, D. O.; ALT, D. P.; HENRISSAT, B.; STANTON, T. B. Bacteria, phages and pigs: the effects of in-feed antibiotics on the microbiome at different gut locations. **The ISME Journal**, v.8, p.1566-1576, 2014.

LOZUPONE, C.; KNIGHT, R. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.8228-8235, 2005.

MCDONALD, D., CLEMENTE, J. C., KUCZYNSKI, J., RIDEOUT, J. R., STOMBAUGH, J., WENDEL, D., WILKE, A.; HUSE, S.; HUFNAGLE, J.; MEYER, F.; KNIGHT, R.; CAPORASO, J. G. The Biological Observation Matrix (BIOM) format or: how I learned to stop worrying and love the ome-ome. **GigaScience**, v.1, p.1, 2012.

MACARI, M.; FURLAN, R.L.; MAIORKA, A. Aspectos fisiológicos e de manejo para manutenção da homeostase térmica e controle de síndromes metabólicas. In: MENDES, A. A.; NAAS, I.A.; MACARI, M. **Produção de frangos de corte**. Campinas: Facta, 2004. p.137-156.

OAKLEY, B. B.; LILLEHOJ, H. S.; KOGUT, M. H.; KIM, W. K.; MAURER, J. J.; PEDROSO, A.; LEE, M. D.; COLLETT, S. R.; JOHNSON, T. J.; COX, N. A. The chicken gastrointestinal microbiome. **Federation of European Microbiological Societies - Microbiology Letters**, v.360, p.100-112, 2014.

OSMAN, A. M.; TANIOS, N. I. The effect of heat on the intestinal and pancreatic levels of amylase and maltase of laying hens and broilers. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v.75, p.563-567, 1983.

OVIEDO-RONDÓN, E. O. Molecular methods to evaluate effects of feed additives and nutrients in poultry gut microflora. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.209-225, 2009.

SALANITRO, J. P.; BLAKE, I. G.; MUIRHEAD, P. A. Studies on the cecal microflora of commercial broiler chickens. **Applied Microbiology**, v.28, p.439-447, 1974.

SCUPHAM, A. J.; PATTON, T. G.; BENT, E.; BAYLES, D. O. Comparison of the cecal microbiota of domestic and wild turkeys. **Microbial Ecology**, v.56, p.322-331, 2008.

SERGEANT, M. J.; CONSTANTINIDOU, C.; COGAN, T. A.; BEDFORD, M. R.; PENN, C. W.; PALLEN, M. J. Extensive microbial and functional diversity within the chicken cecal microbiome. **PloS One**, v.9, p.e91941, 2014.

SHAH, H. N.; COLLINS, M. D. Reclassification of *Bacteroides hypermegas* (Harrison and Hansen) in a new genus *Megamonas*, as *Megamonas hypermegas* comb. nov. **Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene: I. Abt. Originale C: Allgemeine, Angewandte und ökologische Mikrobiologie**, v.3, p.394-398, 1982.

SILVA, J. H. V.; COSTA, F. G. P. **Tabela para codornas japonesas e européias**. 2th ed. FUNEP, 2009. Jaboticabal, SP.

SILVA, J. H. V.; JORDÃO FILHO, J.; PERAZZO COSTA, F. G.; LACERDA, P. B. D.; VIEIRA VARGAS, D. G.; LIMA, M. R. Exigências nutricionais de codornas. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.13, 2012.

SONG, J.; XIAO, K.; KE, Y. L.; JIAO, L. F.; HU, C. H.; DIAO, Q. Y.; SHI, B.; ZOU, X. T. Effect of a probiotic mixture on intestinal microflora, morphology, and barrier integrity of broilers subjected to heat stress. **Poultry Science**, v.93, p.581-588, 2014.

SOUSA, M. S.; FERREIRA TINÔCO, I. D. F.; BARRETO, S. L. D. T.; AMARAL, A. G. D.; PIRES, L. C.; FERREIRA, A. S. Determinação de limites superiores da zona de conforto térmico para codornas de corte aclimatizadas no Brasil de 22 a 35 dias de idade. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.15, p.350-360, 2014a.

SOUSA, M. S.; TINÔCO, I. D. F.; AMARAL, A. G.; INOUE, K. R. A.; BARRETO, S. L.; SAVASTANO, J. R. H.; SOUZA, C. F.; PAULA, M. O. Thermal comfort zones for starter meat-type quails. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.16, p.265-272, 2014b.

STANLEY, D.; DENMAN, S. E.; HUGHES, R. J.; GEIER, M. S.; CROWLEY, T. M.; CHEN, H.; HARING, V. R.; MOORE, R. J. Intestinal microbiota associated with differential feed conversion efficiency in chickens. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.96, p.1361–1369, 2012a.

STANLEY, D.; GEIER, M. S.; CHEN, H.; HUGHES, R. J.; MOORE, R. J. Comparison of fecal and cecal microbiotas reveals qualitative similarities but quantitative differences. **BMC Microbiology**, v.15, p.1, 2015.

STANLEY, D.; GEIER, M. S.; DENMAN, S. E.; HARING, V. R.; CROWLEY, T. M.; HUGHES, R. J.; MOORE, R. J. Identification of chicken intestinal microbiota correlated with the efficiency of energy extraction from feed. **Veterinary Microbiology**, v.164, p.85-92, 2013.

TREMAROLI, V.; BÄCKHED, F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. **Nature**, v.489, p.242–249, 2012.

TSIOURIS, V.; GEORGOPOULOU, I.; BATZIOS, C.; PAPPAIOANNOU, N.; DUCATELLE, R.; FORTOMARIS, P. The effect of cold stress on the pathogenesis of necrotic enteritis in broiler chicks. **Avian Pathology**, v.44, p.430-435, 2015.

TSIOURIS, V.; GEORGOPOULOU, I.; BATZIOS, C.; PAPPAIOANNOU, N.; DUCATELLE, R.; FORTOMARIS, P. The effect of cold stress on the pathogenesis of necrotic enteritis in broiler chicks. **Avian Pathology**, v.44, p.430-435, 2015.

VÁZQUEZ-BAEZA, Y.; PIRRUNG, M.; GONZALEZ, A.; KNIGHT, R. EMPeror: a tool for visualizing high-throughput microbial community data. **Gigascience**, v.2, 2013.

VIDENSKA, P.; SEDLAR, K.; LUKAC, M.; FALDYNOVA, M.; GERZOVA, L.; CEJKOVA, D.; SISAK, F.; RYCHLIK, I. Succession and replacement of bacterial populations in the caecum of egg laying hens over their whole life. **PloS One**, v.9, p.e115142, 2014.

WEI, S.; MORRISON, M.; YU, Z. Bacterial census of poultry intestinal microbiome. **Poultry Science**, v.92, p.671–683, 2013.

WILKINSON, N.; HUGHES, R. J.; ASPDEN, W. J.; CHAPMAN, J.; MOORE, R. J.; STANLEY, D. The gastrointestinal tract microbiota of the Japanese quail, *Coturnix japonica*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.100, p.4201–4209, 2016.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo puderam-se constatar particularidades na resposta de codornas de corte à suplementação de glutamina e ácido glutâmico se comparadas a frangos de corte, por exemplo, levando-se a concluir que a suplementação destes aminoácidos não contribui na melhora produtiva de codornas de corte no período de 1 a 21 dias de idade em condições de termoneutralidade.

Essa pesquisa também contribui com informações relevantes sobre a caracterização da microbiota dos cecos de codornas de corte, a qual era desconhecida até então. Esse registro constitui o primeiro passo para futuras investigações que abordem as particularidades da interação de estes microrganismos com as aves.

Por fim, este estudo mostrou que o estresse térmico crônico e/ou a suplementação de glutamina e ácido glutâmico não alteram o perfil de colonização da microbiota cecal de codornas de corte, sendo esta uma boa resposta para as aves, pois se deduz que inalteração da microbiota cecal resultou em manutenção das atividades funcionais dos microrganismos.

Todos achados deste estudo também reforçaram a proposição de que codornas apresentam características funcionais sistêmicas e intestinais peculiares, o que lhes conferem exigências nutricionais e respostas produtivas específicas.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Parâmetros utilizados no IM-TORNADO

IM-TORNADO parameters. REVIEW BEFORE RUNNING THE PIPELINE.

module load usearch/7.0.1090

module load mothur

module load fasttree

module load infernal/1.1

module load trimmomatic/0.33

module load python/2.7.3

module load genomertools

module unload openmpi

#Prefix for the output files.

PREFIX=quail

#Name of the mapping file

MAPPING=test.map

#Model for alignment of reads. Allowed values are 'bacteria.cm' and 'archaea.cm'

#Custom models allowed if placed in the DATA directory (see end of configuration file)

#An example custom model would be a model for ITS

MODEL=bacteria.cm

#Minimum length of reads to keep after quality filtering.

#Suggested: 75% of sequence length (112 for 150bp reads, 187 for 250 bp reads)

#Not used for merging pipeline

MINIMUM_LENGTH=150

#Taxonomy database to use.

#Currently we provide 'rdp9' (RDP database, training set 9)

#Assignments are not reliable below genus level.

#For other taxonomies, download them from the mothur website.

#See the INSTALL.md document for instructions.

#Name files as TAXONOMY.fna and TAXONOMY.taxonomy,

#where TAXONOMY is defined below

TAXONOMY=rdp14

#Trimming length for OTU steps... YMMV here. These are suggestions

#for 500 cycle Illumina kits.

#Not used for merging pipeline

R1_TRIM=150

R2_TRIM=150

#Set this to 1 if you wish to run consensus taxonomy

```

#instead of taxonomy of the OTU representative.
#Not tested extensively.
#This will take significantly longer, and will use considerable more resources.
#Otherwise, leave as 0.
CONSENSUS_TAXONOMY=0

#Directory for files created during the pipeline run
WORKSPACE=workspace/

#Directory to place resulting files.
RESULTS=results/

#Maximum number of processors to be requested. biocluster has a maximum of 8.
NPROC=8

#Spacer for the sample name in the sample file.
#Common spacers are '.' and '_'
#Example: SAMPLE1.FC000_R1_L001.fastq ( '.' spacer)
#Example: SAMPLE1_FC000_R1_L001.fastq ( '_' spacer)
SPACER='_'

#Clean up the workspace?
#all' => deletes everything in the workspace after completion
#no' => do not delete anything, useful for debugging
#normal' => delete everything but the grouped fasta files after cleanup (useful for, e.g.,
           picrust)
CLEAN=normal

#Name of the usearch version 7 binary. Could be the actual name,
#or some other name. It needs to be in the PATH
USEARCH7=usearch
#(OPTIONAL) If you have VSEARCH, enter the name of the VSEARCH binary or a
           64-bit USEARCH.
#Otherwise, leave empty.
#If you use the 64-bit USEARCH, enter the same as above.
#Using VSEARCH or the 64-bit version of USEARCH 7 can simplify and speed up
#some steps when dealing with large number of reads, without running into the memory
#limitations of 32-bit USEARCH.
#USE VSEARCH_OPTS to enter any VSEARCH-specific options for the
           usearch_global step
#e.g. VSEARCH_OPTS=--output_no_hits
VSEARCH=
VSEARCH_OPTS=

#Name of the Fast Tree executable
FASTTREE=FastTreeMP

#PATH to Trimmomatic jar file

```

TRIMMOMATIC=/home/apps/trimmomatic/trimmomatic-0.33/trimmomatic-0.33.jar

#Name of the GZip executable. If you have pigz (parallel gzip), enter it here.

#For example: GZIP="pigz -p \$NPROC"

GZIP=gzip

#Advanced settings. Do not modify unless you know what you are doing.

TORNADO2=/home/a-m/givisiez/IM-TORNADO-2.0.3.2

DATA=\$TORNADO2/data

APÊNDICE B - Perfil taxonômico total do metagenoma cecal de codornas de corte aos 21 dias de idade*

FILO	CLASSE	ORDEM	FAMÍLIA	GÊNERO
<i>Firmicutes</i> (64,4%)	<i>Negativicutes</i> (36,9%)	<i>Selenomonadales</i> (36,9%)	<i>Veillonellaceae</i> (36,0%)	1
		<i>Clostridia</i> (26,0%)	<i>Ruminococcaceae</i> (17,0%)	9
			<i>Lachnospiraceae</i> (7,9%)	11
			<i>Eubacteriaceae</i> (1,1%)	1
			<i>Clostridiaceae_1</i> (0,3%)	1
			<i>Peptostreptococcaceae</i> (0,1%)	1
	<i>Erysipelotrichia</i> (0,8%)	<i>Erysipelotrichales</i> (0,8)	<i>Erysipelotrichaceae</i> (0,8%)	2
	<i>Bacilli</i> (0,5%)	<i>Bacillales</i> (0,4%)	<i>Bacillaceae_2</i> (0,4%)	1
		<i>Lactobacillales</i> (0,1%)	<i>Enterococcaceae</i> (0,1%)	1
	<i>Bacteroidetes</i> (31,1%)	<i>Bacteroidia</i> (30,7%)	<i>Bacteroidales</i> (30,7%)	1
			<i>Porphyromonadaceae</i> (12,8%)	1
	<i>Sphingobacteriia</i> (0,3%)	<i>Sphingobacteriales</i> (0,3%)	<i>Chitinophagaceae</i> (0,3%)	1
	<i>Cytophagia</i> (0,1%)	<i>Cytophagales</i> (0,1%)	<i>Flammeovirgaceae</i> (0,1%)	1
<i>Proteobacteria</i> (4,4%)	<i>Gammaproteobacteria</i> (4,4%)	<i>Enterobacteriales</i> (4,4%)	<i>Enterobacteriaceae</i> (4,4%)	1
<i>Actinobacteria</i> (0,1%)	<i>Actinobacteria</i> (0,1%)	<i>Actinomycetales</i> (0,1%)	<i>Micrococcaceae</i> (0,1%)	1
<i>Tenericutes</i> (0,1%)	<i>Mollicutes</i> (0,1%)	<i>Anaeroplasmatales</i> (0,1%)	<i>Anaeroplasmataceae</i> (0,1%)	1

*São descritos apenas táxons com abundânciarelativa $\geq 0,1\%$ do metagenoma cecal de codornas de corte aos 21 dias de idade.

APÊNDICE C - Perfil taxonômico total do metagenoma cecal de codornas de corte aos 42 dias de idade*

FILO	CLASSE	ORDEM	FAMÍLIA	GÊNERO
<i>Firmicutes</i> (91,5%)	<i>Clostridia</i> (46,8%)	<i>Clostridiales</i> (46,8%)	<i>Lachnospiraceae</i> (28,6%)	13
			<i>Ruminococcaceae</i> (16,8%)	13
			<i>Eubacteriaceae</i> (1,0%)	1
			<i>Clostridiaceae_1</i> (0,2%)	2
			<i>Clostridiales_Incertae_Sedis_IV</i> (0,1%)	1
	<i>Negativicutes</i> (42,3%)	<i>Selenomonadales</i> (42,3%)	<i>Veillonellaceae</i> (41,5%)	1
			<i>Acidaminococcaceae</i> (0,8%)	2
	<i>Bacilli</i> (1,3%)	<i>Lactobacillales</i> (0,8%)	<i>Streptococcaceae</i> (0,7%)	1
		<i>Bacillales</i> (0,5%)	<i>Bacillaceae_2</i> (0,3%)	1
			<i>Bacillales_incertae_sedis</i> (0,2%)	1
	<i>Erysipelotrichia</i> (1,1%)	<i>Erysipelotrichales</i> (1,1%)	<i>Erysipelotrichaceae</i> (1,1%)	4
<i>Bacteroidetes</i> (7,6%)	<i>Bacteroidia</i> (3,2%)	<i>Bacteroidales</i> (3,2%)	<i>Bacteroidaceae</i> (2,6%)	1
			<i>Porphyromonadaceae</i> (0,4%)	1
			<i>Rikenellaceae</i> (0,1%)	1
	<i>Sphingobacteriia</i> (2,8%)	<i>Sphingobacteriales</i> (2,8%)	<i>Fodinibius</i> (1,7%)	1
			<i>Chitinophagaceae</i> (1,0%)	1
	<i>Cytophagia</i> (1,1%)	<i>Cytophagales</i> (1,1%)	<i>Flammeovirgaceae</i> (0,7%)	1
			<i>Cytophagaceae</i> (0,4%)	1
	<i>Flavobacteriia</i> (0,5%)	<i>Flavobacteriales</i> (0,5%)	<i>Flavobacteriaceae</i> (0,5%)	1
<i>Fusobacteria</i> (0,3%)	<i>Fusobacteria</i> (0,3%)	<i>Fusobacteriales</i> (0,3%)	<i>Fusobacteriaceae</i> (0,3%)	1
<i>Proteobacteria</i> (0,1%)	<i>Gammaproteobacteria</i> (0,1%)	<i>Enterobacteriales</i> (0,1%)	<i>Enterobacteriaceae</i> (0,1%)	1
<i>Actinobacteria</i> (0,2%)	<i>Actinobacteria</i> (0,2%)	<i>Actinomycetales</i> (0,1%)	<i>Micrococcaceae</i> (0,1%)	1
<i>Tenericutes</i> (0,3%)	<i>Mollicutes</i> (0,3%)	<i>Anaeroplasmatales</i> (0,3%)	<i>Anaeroplasmataceae</i> (0,3%)	1

*São descritos apenas táxons com abundânciarelativa $\geq 0,1\%$ do metagenoma cecal de codornas de corte aos 42 dias de idade.