



PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) E ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM CODORNAS SUBMETIDAS AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO

Bruna Garcia Penha (PIBIC/CNPq/UEM), Angélica Souza Khatlab, Ana Paula Del Vesco, Eliane Gasparino (Orientador), e-mail: egasparino@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Agrárias / Departamento de Zootecnia / Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento conforme tabela do [CNPq/CAPES](#): 50400002/50402005.

Palavras-chave: estresse oxidativo, H₂O₂, sistema antioxidante

Resumo:

Para a execução deste experimento foram alojadas individualmente, em gaiolas metálicas, 40 codornas de uma linhagem de corte de 23 dias de idade. Aos 30 dias de idade, estes animais foram divididos em dois grupos. Um grupo permaneceu em conforto térmico, e outro grupo foi submetido ao estresse térmico de 34°C por 24 horas. Para análise de produção de ROS, foram abatidas quatro codornas de cada tratamento, e, destes animais foram coletados os fígados para isolamento de mitocôndrias e subsequente análise de ROS mitocondrial. Cinco animais de cada tratamento foram abatidos para análise da atividade glutatona peroxidase, que foi determinada utilizando peróxido de hidrogênio (H₂O₂), e baseada na quantidade de NADPH oxidado. Foi observada maior produção de ROS mitocondrial para animais submetidos ao estresse térmico, 0,34 vs 0,22, para reações contendo apenas rotenona, e 0,31 vs 0,23, nas reações com a presença de rotenona mais antimicina. Codornas que permaneceram em ambiente de estresse por 24 horas apresentaram, também significativamente, maior atividade da enzima glutatona peroxidase nos hepatócitos (47,8 vs 39,6). Assim, verifica-se que estresse térmico agudo, de 34°C por 24 horas, é capaz de atuar na produção de ROS mitocondrial e na atividade da enzima glutatona peroxidase no fígado de codornas.

Introdução

Em países onde há ocorrência de altas temperaturas, a produção de aves pode ser grandemente afetada, havendo aumento na idade de abate e aumento no custo de produção (Al-Fataftah & Abu-Dieyeh, 2007). As



alterações observadas no desempenho das aves podem ser devidas, em parte, ao estado de estresse oxidativo que ocorre em animais expostos ao estresse térmico, já que aves submetidas ao estresse por altas temperaturas podem apresentar redução na atividade da cadeia respiratória mitocondrial, seguida por maior produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Yang et al., 2010).

A glutathiona peroxidase (GSH-Px) faz parte do sistema de defesa antioxidante da glutathiona, e assim tem papel fundamental na eliminação do ROS pelo organismo. Entre os diversos fatores que afetam a atividade desta enzima, tem sido mostrada a influência de altas temperaturas. Desta forma, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a influência do estresse térmico sobre a produção de ROS mitocondrial, e sobre a atividade da enzima glutathiona peroxidase no fígado de codornas de corte.

Materiais e métodos

Inicialmente foram alojadas individualmente, em gaiolas metálicas, 40 codornas de uma linhagem de corte de 23 dias de idade. Aos 30 dias de idade estes animais foram divididos em dois grupos, um abatido imediatamente após a divisão dos grupos, sendo pertencente ao tratamento termoneutro. O segundo grupo foi submetido ao estresse térmico de 34°C por 24 horas, umidade relativa de 60%. Ao final do período experimental, as aves foram abatidas por deslocamento cervical, e o fígado foi coletado para as subseqüentes análises de produção de ROS mitocondrial e atividade da enzima glutathiona peroxidase.

Para análise de produção de ROS, foram abatidas quatro codornas de cada tratamento. Destes animais, foram coletados os fígados para isolamento de mitocôndrias e subseqüente análise de ROS mitocondrial. As mitocôndrias foram homogeneizadas no mesmo meio, a uma concentração protéica de 80-100 mg/ml.

O nível de produção de ROS mitocondrial, peróxido de hidrogênio, foi estimado por mensuração do aumento linear de fluorescência. Mitocôndrias intactas foram adicionadas em 2 mL de tampão Manitol 250 mM, HEPES 10 mM, pH 7,2, contendo 1,36 µM de DCFH-DA e succinato (10mM) + rotenona (10µM) ou succinato (10mM) + rotenona + antimicina (15µM). A reação foi iniciada pela adição de 0,4 µM de HRP, e a fluorescência registrada em intervalos de 1 minuto durante 10 minutos. Todo o ensaio ocorreu sob agitação em espectrofluorímetro.

Cinco codornas de cada tratamento foram utilizadas para análise da atividade da enzima glutathiona peroxidase. A atividade da enzima foi determinada de acordo com Paglia & Valentine (1967), utilizando peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

Os resultados foram apresentados como médias e desvios padrões. A análise estatística foi realizada usando o teste t de Students (p<0,05) para



comparação entre o grupo de conforto térmico e o grupo submetido ao estresse térmico agudo (SAS, 2000).

Resultados e Discussão

A produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi maior nas mitocôndrias das aves submetidas ao estresse por calor. Este resultado foi observado quando foi avaliada a produção de ROS apenas com Rotenona (0,34 vs 0,22), e também quando a produção foi avaliada na presença de Rotenona mais Antimicina (0,31 vs 0,23) (Figura 1). Possíveis mecanismos envolvidos no aumento da produção de ROS em situações de estresse térmico podem estar associados com vazamento de elétrons na cadeia mitocondrial, oxidação das proteínas dos complexos da cadeia, redução na atividade dos complexos da cadeia, ou outras formas de danos ocorridos nas mitocôndrias. Estes danos podem estar envolvidos com a temperatura corporal, desde que é observado aumento na produção de ROS, seguido pela redução no ganho de peso, em aves que apresentam maior temperatura corporal (Mujahid et al., 2005).

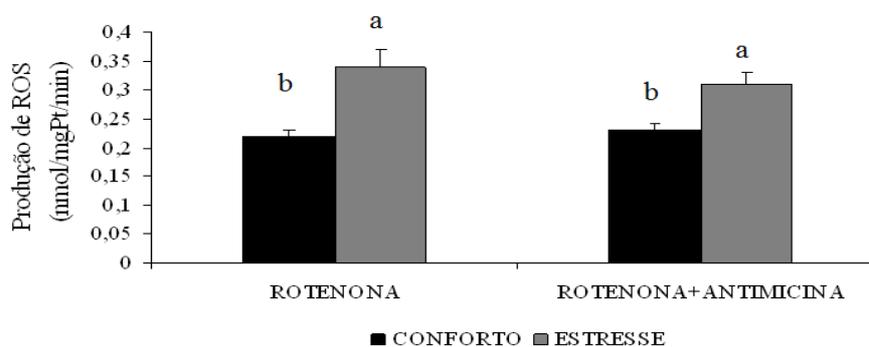


Figura 1- Produção de ROS mitocondrial no fígado de codornas submetidas a ambiente termoneutro e a estresse térmico agudo, em reação contendo apenas rotenona e em reação contendo rotenona mais antimicina. Os resultados são médias com seus desvios padrões representados pela barra vertical. Letras diferentes entre os tratamentos representam diferenças estatísticas $p < 0,05$.

A atividade da enzima glutationa peroxidase, parece estar relacionada diretamente com o balanço entre a produção de ROS e sua eliminação do organismo. Entre os diversos fatores que afetam a atividade da GSH-Px, autores têm mostrado a influência do estresse térmico. Neste estudo, foi observado que codornas mantidas em estresse térmico agudo apresentaram maior atividade desta enzima em hepatócitos (Figura 3).

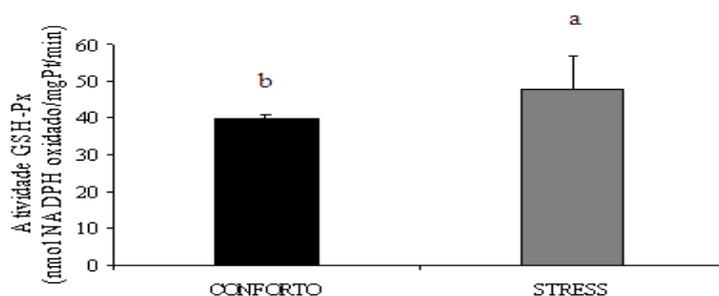


Figura 3 - Atividade da glutathiona peroxidase no fígado de codornas submetidas à ambiente termoneutro e a estresse térmico agudo, dada em nmol de NADPH oxidado por mg de proteína por minuto. Os resultados são médias com seus desvios padrões representados pela barra vertical. Letras diferentes entre os tratamentos representam diferenças estatísticas $p < 0,05$.

Conclusões

Estresse térmico agudo, de 34°C por 24 horas, é capaz de atuar sobre a produção de ROS mitocondrial e sobre a atividade da enzima glutathiona peroxidase no fígado de codornas de corte.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq pelo auxílio financeiro.

Referências

- AL-FATAFTAH, A. R. A.; ABU-DIEYEH, Z. H. M. Effect of Chronic Heat Stress on Broiler Performance in Jordan. **International Journal of Poultry Science**, v. 6, n. 1, p. 64-70, 2007.
- YANG, L.; TAN, G. Y.; FU, Y. Q.; FENG, J. H.; ZHANG, M. H. Effects of acute heat stress and subsequent stress removal on function of hepatic mitochondrial respiration, ros production and lipid peroxidation in broiler chickens. **Comparative biochemistry and physiology part C: toxicology & pharmacology**, v. 151, n. 2, p. 204-208, 2010.
- PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocytes glutathione peroxidase. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 70, p. 158-169, 1967.
- STATISCAL ANALYSES SYSTEM - SAS. **SAS/STAT 2000: version 8**. Cary: 2000.
- MUJAHID, A.; YOSHIKI, Y.; AKIBA, Y.; TOYOMIZU, M. Super-oxide radical production in chicken skeletal muscle induced by acute heat stress. **Poultry Science**, v. 84, p. 307-314, 2005.