



EFEITO DO ESTRESSE TÉRMICO E DA SUPLEMENTAÇÃO DE METIONINA SOBRE O DESEMPENHO E EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EM FRANGOS DE CORTE DE 22-42 DIAS DE IDADE

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

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

Área e sub-área do conhecimento conforme tabela do CNPq: Zootecnia/
Genética e Melhoramento dos Animais Domésticos

Palavras-chave: estresse térmico, metionina, sistema antioxidante

Resumo:

Nosso objetivo com este trabalho foi avaliar o desempenho e a expressão dos genes proteína desacopladora (*UCP*), glutathione sintetase (*GSS*) e glutathione peroxidase 7 (*GPx 7*) no músculo de frangos de corte expostos ao estresse térmico (38°C por 24 horas), e alimentados com dietas com ou sem suplementação de metionina. Para isto, com 21 dias de idade as aves foram divididas em três grupos referentes à suplementação de metionina na dieta: sem suplementação de metionina (SM); suplementação do nível recomendado de metionina (DL1); e suplementação de metionina em excesso (DL2). Aos 41 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 38°C por 24 horas. Aves mantidas em ambiente de conforto térmico apresentaram maior consumo de ração e ganho de peso do que as aves expostas ao estresse por calor. Aves alimentadas com DL2 apresentaram menor consumo de ração e maior ganho de peso. Maior expressão dos genes *GSS* e *GPx 7* foi observada em aves estressadas pelo calor e recebendo dietas DL1 e DL2. Menor expressão de mRNA *UCP* foi observada em aves recebendo dieta SM e em aves submetidas ao estresse por calor. Nossos resultados sugerem que em condição de estresse por calor a suplementação de metionina é capaz de atenuar os efeitos do estresse térmico.

Introdução

A produção avícola pode ser prejudicada pela alta temperatura ambiental, que levam os animais ao estresse térmico, este por sua vez, tem sido associado a alterações metabólicas que envolvem o estresse oxidativo





(Mujahid et al., 2009). A menor expressão de proteínas desacopladoras (UCP) que ocorre em aves expostas ao estresse térmico pode ser um dos mecanismos envolvidos na maior produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Sack, 2006). Por outro lado, a defesa do organismo contra o ROS pode ser mediada por antioxidantes enzimáticos, como o sistema de defesa da glutathione, que é composto, além da glutathione (GSH), pelas enzimas glutathione oxidase, glutathione peroxidase (GPx) e pela glutathione redutase (GR). A biossíntese da GSH ocorre na maioria dos tecidos a partir de três aminoácidos precursores. Entre estes está a cisteína que pode ser sintetizada a partir da metionina através da rota de transsulfuração da homocisteína (Shoveller et al., 2005). Assim, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o desempenho e a expressão dos mRNA *UCP*, *GSS*, e *GPx* 7 no músculo de frangos de corte expostos ao estresse térmico (38°C por 24 horas), e alimentados com dietas com ou sem suplementação de metionina.

Materiais e métodos

Para a realização do experimento foram utilizados 180 frangos de corte machos (Cobb 500). As aves foram criadas convencionalmente até os 21 dias de idade, quando então foram divididas em três grupos referentes à suplementação de metionina na dieta: sem suplementação de metionina (SM, n=60); suplementação do nível recomendado de metionina (DL1, n=60) (Rostagno et al., 2011); e suplementação de metionina em excesso (DL2, n=60). As 180 aves foram criadas em temperatura de conforto térmico até os 41 dias de idade, quando 90 aves (30 de cada dieta) foram submetidas ao estresse térmico de 38°C por 24 horas. Aos 42 dias de idade todas as aves de ambos os grupos (conforto e estresse térmico) foram abatidas por deslocamento cervical. Para calcular o ganho de peso as aves foram pesadas no início e no fim do período experimental em ambos os ambientes. O consumo de ração foi calculado como a diferença entre a quantidade oferecida e a quantidade residual no fim do período experimental em ambos os ambientes. Para as análises de expressão gênica, ao final do período experimental proposto, dez animais de cada tratamento foram eutanaseados por deslocamento cervical e os tecidos do músculo do peito foram coletados e armazenados em RNA Holder® (BioAgency Biotecnologia, Brasil) à -20°C até o momento da extração de RNA. O RNA total foi extraído com uso do reagente Trizol® (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) de acordo com as normas do fabricante. Para a confecção do DNA complementar (cDNA), foi utilizado o kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis Super Mix (Invitrogen Corporation, Brasil) de acordo com as normas do fabricante. Para as reações de PCR (Polymerase Chain Reaction) em tempo real foi utilizado o composto fluorescente SYBR GREEN (SYBR® GREEN PCR Máster Mix (Applied Biosystems, USA)). Os primers para amplificação dos genes da





UCP, GSS e GPx 7 utilizados foram desenhados de acordo com suas sequências depositadas no site www.ncbi.nlm.nih.gov (número de acesso AF433170.2, NM_001163245.1, e XM_425692.3, respectivamente) usando o site www.idtdna.com. O gene da β -actina (número de acesso L08165) foi utilizado como controle endógeno.

O método $2^{-\Delta CT}$ foi utilizado para análise da quantificação relativa. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 3 com dois ambientes (conforto e estresse térmico) e três dietas (SM, DL1 e DL2). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Resultados e Discussão

Aves mantidas em ambiente de conforto térmico, apresentaram significativamente maior consumo de ração (0,141 vs 0,067 Kg, $P < 0,0001$) e ganho de peso (0,087 vs - 0,199 Kg; $P < 0,0001$) em relação as aves expostas ao estresse por calor. Observamos que as aves recebendo a dieta DL2 apresentaram menor consumo de ração (0,094 Kg) e maior ganho de peso. A expressão dos genes GSS e GPx7 foram influenciadas pela interação entre a temperatura ambiental e a suplementação de metionina na dieta (Tabela 1).

Tabela 1- Expressão dos genes proteína desacopladora (UCP), glutathione sintetase (GSS) e glutathione peroxidase 7 (GPx7) no músculo do peito de frangos de corte de 22-42 dias de idade

		UCP		GSS		GPx7 ²	
		Média	DP	Média	DP	Média	DP
Conforto	SM	0,78	0,33	0,70 ^b	0,30	1,20 ^c	0,46
	DL1	0,37	0,19	1,24 ^b	0,45	1,95 ^c	0,20
	DL2	0,36	0,18	1,22 ^b	0,32	1,54 ^c	0,36
Estresse	SM	0,31	0,11	0,97 ^b	0,19	3,79 ^b	1,53
	DL1	0,25	0,12	2,75 ^a	1,20	5,03 ^a	1,17
	DL2	0,25	0,09	3,25 ^a	0,52	6,02 ^a	0,76
Efeitos Principais							
Ambiente	Conforto	0,50 ^a	0,30	1,05	0,42	1,57	0,46
	Estresse	0,27 ^b	0,10	2,33	1,23	4,95	1,46
Dieta	SM	0,54 ^a	0,34	0,84	0,27	2,49	1,73
	DL1	0,31 ^b	0,16	1,99	1,17	3,49	1,79
	DL2	0,30 ^b	0,14	2,23	1,03	3,79	1,41
Probabilidade							
Ambiente		0,0010		<0,0001		<0,0001	
Dieta		0,0063		<0,0001		0,0032	
Interação		NS		0,0036		0,0375	

^{a,b,c} Médias em uma mesma coluna com letras sobrescritas diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

¹SM, sem suplementação de metionina; DL1, nível recomendado de metionina; DL2, excesso de metionina.

²Expresso como unidade arbitrária (UA).





Maior expressão dos genes *GSS* e *GPx 7* foi observada em aves estressadas pelo calor e recebendo dietas DL1 e DL2. A principal função da glutathiona é a defesa orgânica contra os radicais livres. Nossos resultados sugerem que as aves submetidas ao estresse por calor tentam controlar os danos causados por ROS, aumentando a expressão dos genes que fazem parte e contribuem com o sistema de defesa antioxidante da glutathiona. Já que, níveis adequados de metionina são necessários para a maior eficiência do sistema antioxidante, melhores resultados foram observados nas aves que receberam dietas DL1 e DL2. Foi observada maior expressão do mRNA *UCP* em aves do conforto térmico, e em aves que foram alimentadas com dieta SM. A menor expressão de *UCP* que ocorre em aves expostas ao estresse térmico pode ser um dos mecanismos envolvidos na maior produção de ROS, já que proteínas como *UCP* podem despolarizar a membrana interna das mitocôndrias, representando com os demais fatores um controle fisiológico da fosforilação oxidativa (Sack, 2006).

Conclusões

Nossos resultados sugerem que em condição de estresse por calor a suplementação de metionina é capaz de atenuar os efeitos do estresse térmico, já que estimula a deposição de proteína corporal e contribui para maior expressão de genes relacionados com a atividade antioxidante.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq pelo auxílio financeiro.

Referências

MUJAHID, A.; AKIBA, Y.; TOYOMIZU, M. Olive oil-supplemented diet alleviates acute heat stress-induced mitochondrial ROS production in chicken skeletal muscle. **Ajp: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 297, n. 3, p. 690-698, 2009.

ROSTAGNO, H. S et al. **Brazilian tables for birds and pigs: composition of foods and nutritional requirements**. 3. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2011, 251 p.

SACK, M. Mitochondrial depolarization and the role of uncoupling proteins in ischemia tolerance. **Cardiovascular Research**, v. 72, n. 2, p. 210-219, 2006.

SHOVELLER, A. K. et al. Nutritional and Functional Importance of Intestinal Sulfur Amino Acid Metabolism. **The Journal Of Nutrition**, v. 135, n. 7, p.1609-1612, 2005.

