

## EXPRESSÃO GÊNICA DA *HSP27* EM DIFERENTES TECIDOS DE FRANGOS DE CORTE SUBMETIDOS AO ESTRESSE TÉRMICO

Matheus Hoffmeister Luz (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Eliane Gasparino (Orientadora), e-mail: gasparinoeliane@gmail.com.

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

**Área e subárea do conhecimento:** Ciências Agrárias, Zootecnia.

**Palavras-chave:** desempenho animal, proteínas do choque térmico, temperatura ambiente.

### Resumo:

O objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho e a expressão do gene proteína do choque térmico 27 kDa (*HSP27*) em diferentes órgãos (fígado, baço, bursa de Fabrícus e timo) de frangos de corte com 42 dias de idade. O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado (conforto térmico vs estresse por calor) e quatro repetições por tratamento. Para isto, 80 frangos de corte machos, de 21 dias de idade, foram divididos em dois ambientes: conforto térmico (CT) e estresse por calor (EC). Aos 41 dias de idade, 40 aves foram submetidas ao EC de 38°C por 24 horas, e o restante dos animais permaneceram em CT. Após esse período todos os animais foram abatidos por deslocamento cervical, e então os órgãos foram coletados em nitrogênio líquido e em seguida armazenados em freezer -80°C até o momento das análises. Observamos efeito do ambiente sobre o CR ( $p=0,0104$ ) e GP ( $p<0,0001$ ). Os animais submetidos ao ambiente de EC apresentaram menor CR e perda de peso corporal. Com relação à expressão do mRNA *HSP27* não observamos efeito significativo do ambiente sobre a expressão desse mRNA ( $p>0,05$ ). Esses resultados sugerem que o estresse por calor prejudica o desempenho dos animais, e que provavelmente nessa situação a via transcricional mais ativada não seja a do gene *HSP27*, mas de outros, como o gene *HSP70*.

### Introdução

O estresse por calor em aves é umas das principais preocupações da indústria avícola, uma vez que causa alta mortalidade e/ou baixa produtividade, especialmente durante as estações mais quentes do ano (Mazzi et al., 2003). Em todos os tecidos biológicos dos animais vivos são sintetizados um grupo de proteínas que possuem funções específicas no crescimento celular, na reversão ou prevenção de danos causados por uma situação de estresse. Essas proteínas, cuja síntese é aumentada quando a célula é submetida a uma condição estressante, são denominadas proteína do choque térmico (heat shock protein - *HSP*) (Hernandes et al., 2002). A aquisição de termotolerância pode estar relacionada com aumentos nos

níveis de algumas *HSPs*. Em frangos de corte muitos são os trabalhos tentando relacionar os níveis de expressão dos genes *HSPs* com a tolerância ao calor, entretanto esse mecanismo ainda não é bem compreendido. O presente estudo foi desenvolvido para testar a hipótese de que o estresse por calor pode afetar o desempenho animal e a expressão do gene da proteína do choque térmico 27 kDA (*HSP27*) em diferentes órgãos de frangos de corte, na tentativa de proteger as células contra danos oxidativos induzidos pelo estresse por calor.

### **Materiais e métodos**

O experimento foi conduzido na Fazenda Experimental de Iguatemi da Universidade Estadual de Maringá, em um delineamento inteiramente casualizado com dois tratamentos referentes ao ambiente de conforto térmico (CT) e ambiente de estresse por calor (EC), e quatro repetições por tratamento. Para a realização desse experimento que foi devidamente avaliado e aprovado pelo comitê de ética no uso de animais (CEUA nº 4000170615), 80 frangos de corte machos (Cobb 500) de 21 dias de idade foram divididos em dois grupos experimentais: ambiente de CT e ambiente de EC. As aves foram criadas em gaiolas coletivas (10 aves por gaiola), em salas climatizadas em ambiente de CT até os 41 dias de idade, quando então 40 aves foram submetidas ao EC de 38°C por 24 horas, e o restante dos animais permaneceram em CT. Todos os animais foram abatidos por deslocamento cervical aos 42 dias de idade. A dieta foi formulada para atender suas exigências nutricionais (Rostagno et al., 2011), e foi feita com milho e farelo de soja contendo em sua composição 19,70% de proteína bruta e 3170 kcal/kg de energia metabolizável aparente.

Para calcular o desempenho dos animais em ambos os tratamentos a gaiola com 10 aves foi considerada como uma unidade experimental (n=4). Para calcular o ganho de peso (GP) dos animais presentes no ambiente de EC às aves foram pesadas no início (41 dias) e no final do período de estresse (42 dias), e o consumo de ração (CR) foi calculado como a diferença entre a quantidade de ração oferecida no início (41 dias) e as sobras ao final do período experimental (42 dias). O GP dos animais presentes no ambiente de CT foi obtido a partir do peso das aves no início (21 dias) e no final (42 dias) do período experimental, sendo calculado como peso final – peso inicial/21. O CR desse grupo experimental foi calculado como a quantidade de ração ofertada aos 21 dias – sobras de ração no final do período experimental (42 dias)/21. O GP e o CR foram corrigidos para a mortalidade.

Para as análises de expressão gênica ao final do período experimental proposto, os frangos foram eutanaseados por deslocamento cervical, e as amostras de fígado, baço, bursa de Fabricius e timo foram coletadas de seis frangos (n=6) de cada tratamento. Essas amostras foram coletadas em nitrogênio líquido, e subsequentemente armazenadas em freezer a -80°C até o momento das análises. O RNA total foi extraído com uso do reagente TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) de acordo com as normas do fabricante. Para evitar possível contaminação das amostras com DNA genômico, o RNA total foi tratado com o kit DNase I amplification grade

(Invitrogen, Carlsbad CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA complementar (cDNA), foi sintetizado utilizando o kit SuperScript™ III First-Strand Syntesis 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 Master Mix - Applied Biosystems, USA). O primer para amplificação do gene da *HSP27* foi desenhado de acordo com a sequência depositada no site [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) com o número de acesso NM\_205290.1, através do site [www.idtdna.com](http://www.idtdna.com). O gene  $\beta$ -actina (número de acesso L08165.1), foi utilizado como controle endógeno. Todas as análises foram realizadas em um volume de 25  $\mu$ L e em duplicatas.

O método  $2^{-\Delta CT}$  foi utilizado para as análises de expressão relativa da expressão do gene da *HSP27*, e os resultados foram expressos como unidade arbitrária (UA). O procedimento UNIVARIATE foi aplicado para verificar a normalidade dos dados. No modelo foi considerado o efeito do ambiente. Os dados foram avaliados pela ANOVA e as médias foram comparadas utilizando o teste de F ( $p < 0,05$ ) (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA).

## Resultados e Discussão

Na tabela 1 são apresentados os resultados de desempenho animal (CR e GP). Observamos efeito do ambiente sobre o CR ( $p = 0,0104$ ) e GP ( $p < 0,0001$ ). Os animais submetidos ao ambiente de EC apresentaram menor CR, e também significativa perda de peso corporal, quando comparado com os animais que permaneceram no ambiente de CT. Este resultado pode estar relacionado como o efeito anorexígeno que o estresse por calor promove através do aumento na expressão do gene da grelina no proventrículo e jejuno das aves (Song et al., 2012), e a redução da energia disponível para a renovação das células intestinal que prejudica o processo de absorção, com prejuízos diretos sobre o desenvolvimento dos músculos e ossos.

Tabela 1. Consumo de ração (CR) e ganho de peso (GP) de frangos de corte machos com 42 dias de idade

	Ambiente				Valor de p
	Conforto térmico		Estresse por calor		
	Média	DP	Média	DP	
CR (kg)	0,122 <sup>a</sup>	0,017	0,083 <sup>b</sup>	0,020	0,0104
GP (kg)	0,077 <sup>a</sup>	0,014	-0,034 <sup>b</sup>	0,023	<0,0001

<sup>a,b</sup>Valores médios na mesma linha com letras diferentes sobrescritas são significativamente diferentes pelo teste de F ( $p < 0,05$ ). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.

Não foi observado efeito significativo do ambiente sobre a expressão do gene da *HSP27* em nenhum dos órgãos avaliados ( $p > 0,05$ ) (Figura 1), o que indica que nessas situações de estresse por calor, provavelmente o gene da *HSP27* não seja o mais eficiente em ativar mecanismos de defesa

contra os efeitos deletérios do estresse, e que outros genes como, por exemplo, o gene da *HSP70* pode ser o mais eficiente e ágil na resposta ao estresse por calor.

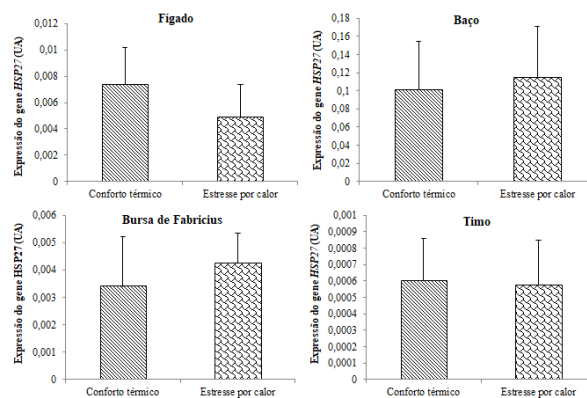


Figura 1. Expressão da proteína do choque térmico 27 kDa (*HSP27*) no fígado, baço, bursa de Fabricius e timo de frangos de corte machos com 42 dias de idade. Os resultados são expressos como unidade arbitrária (UA), e são apresentados como a média e o desvio padrão representados pelas barras verticais.

## Conclusões

Esses resultados sugerem que o estresse por calor prejudica o desempenho dos animais, e que provavelmente nessa situação a via transcricional mais ativada não seja a do gene da *HSP27*, mas de outros genes como, por exemplo, o gene *HSP70*.

## Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq pelo auxílio financeiro e a Universidade Estadual de Maringá.

## Referências

- HERNANDES, R. et al. Resistência à síndrome ascítica, competência homeotérmica e níveis de *HSP70* no coração e pulmão de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, p.1442-1450, 2002.
- MAZZI, C.M. et al. Polymorphism analysis of the *HSP70* stress gene in broiler chickens (*Gallus gallus*) of different breeds. **Genetics and Molecular Biology**, v.26, p.275-282, 2003.
- 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.
- SONG, Z. et al. Effect of heat exposure on gene expression of feed intake regulatory peptides in laying hens. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, ID. 484869, p. 1-8, 2012.