

## EFEITO DO ESTRESSE POR CALOR E DIETAS COM SUPLEMENTAÇÃO DE METIONINA SOBRE A EXPRESSÃO DOS GENES: *TNF- $\alpha$* , *IL-1 $\beta$* e *$\gamma^+$ LAT1*

Angela Maria Favaro Elias Pereira (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Eliane Gasparino (Orientadora), Angélica de Souza Khatlab (Participante), e-mail: egasparino@uem.br.

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

Área e subárea do conhecimento conforme tabela do [CNPq/CAPES](#): Zootecnia/Genética e melhoramento dos animais domésticos.

**Palavras-chave:** intestino delgado, sistema imune, temperatura ambiente

### Resumo:

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do estresse por calor e da suplementação de metionina sobre o desempenho e a expressão de genes relacionados à função imune e ao transporte de aminoácidos no jejuno e íleo de frangos de corte com 42 dias de idade. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x2. Aos 41 dias de idade, 60 aves foram submetidas ao estresse por calor (EC) de 38°C por 24 horas, e as outras 60 aves permaneceram em conforto térmico (CT). Aves em EC apresentaram menor consumo de ração, maior perda de peso corporal, e maior expressão do gene fator de necrose tumoral alfa (*TNF- $\alpha$* ) no jejuno e íleo. No íleo maior expressão do gene transportador de aminoácidos neutros e catiônicos 1 ( *$\gamma^+$ LAT1*) foi verificado nos animais em EC e consumindo a dieta suplementada com metionina (DL). No jejuno das aves consumindo a ração DL foi observado maior expressão dos genes *TNF- $\alpha$*  e interleucina 1 $\beta$  (*IL-1 $\beta$* ). Os resultados sugerem que o EC afetou o ambiente intestinal que pode por sua vez ter afetado o processo de absorção de nutrientes com consequência direta sobre o desempenho produtivo dos animais. Adicionalmente, os resultados indicam que a suplementação de metionina em quantidades adequadas pode ajudar o organismo a combater os efeitos nocivos do estresse, por estimular a expressão de genes relacionados com a função imune e com o transporte de aminoácidos.

### Introdução

Quando a temperatura ambiente está acima da zona de conforto térmico, os animais sofrem várias alterações fisiológicas incluindo a ruptura da integridade intestinal que causam alterações na expressão de genes que codificam importantes proteínas transportadoras de nutrientes, ativação do sistema imune, e vários outros distúrbios que resultam no pior desempenho do animal e no aumento da taxa de morbidade e mortalidade (Lara e Rostagno, 2013). A mucosa intestinal dispõe de vários tipos de barreiras, para se proteger de injúrias causadas por diversos fatores incluindo o estresse induzido pelo calor. A manutenção da integridade intestinal é fundamental para que o animal tenha maior eficiência na conversão de alimento em massa muscular. Diferentes estratégias nutricionais têm mostrado ser eficazes na redução dos efeitos do estresse calórico, como as dietas suplementadas com vitaminas, minerais ou aminoácidos específicos. Del Vesco et al. (2015) demonstrou que a suplementação de metionina na dieta de frangos de corte submetidos a

estresse calórico pode atenuar os efeitos negativos do estresse por meio da sua ação antioxidante. Entretanto, ainda não se sabe completamente como a metionina poderia afetar o ambiente intestinal das aves expostas ao estresse por calor. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do estresse por calor de 38°C e da dieta (suplementada ou não com metionina) sobre o desempenho animal e a expressão de genes relacionados com o sistema imune (fator de necrose tumoral alfa e interleucina 1 $\beta$ ) e com o transporte de aminoácidos (transportador de aminoácidos neutros e catiônicos 1) no jejuno e íleo de frangos de corte com 42 dias de idade.

## Materiais e métodos

Este trabalho foi conduzido de acordo com as especificações do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA nº 4000170615) da Universidade Estadual de Maringá. Um total de 120 frangos de corte machos (Cobb 500) (*Gallus gallus*) de 21 dias de idade foram utilizados. O experimento foi realizado na Fazenda Experimental de Iguatemi da Universidade Estadual de Maringá, em um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x2, com seis repetições por tratamento, e cinco aves por repetição. O primeiro fator avaliado foi à temperatura ambiental: temperatura de conforto térmico (CT) e estresse por calor (EC) de 38°C por 24 horas. E o segundo fator foi à dieta suplementada ou não com metionina: dieta não suplementada com metionina (SM) e dieta suplementada com o nível recomendado de DL-metionina (DL). As aves foram criadas em salas climatizadas em ambiente de conforto térmico até os 41 dias de idade, quando então 60 aves (30 de cada dieta) foram submetidas ao estresse térmico 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. As dietas foram feitas com milho e farelo de soja contendo em sua composição 19,70% de proteína bruta e 3170 kcal/kg de energia metabolizável aparente. Os animais tiveram livre acesso à água e a ração durante todo o período experimental. Para calcular o desempenho dos animais a gaiola com cinco aves foi considerada como uma unidade experimental. O consumo de ração (CR) e o ganho de peso (GP) foram calculados no período experimental de 24 horas. O 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). E o GP foi calculado da seguinte forma: peso final (42 dias) – peso inicial (41 dias).

Para a análise de expressão gênica a ave foi considerada como uma unidade experimental. Ao final do período experimental proposto, cinco frangos de cada tratamento foram eutanaseados por deslocamento cervical, e as amostras de jejuno e íleo foram coletadas, abertas longitudinalmente e lavadas com soro fisiológico estéril gelado (4°C). Em seguida as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido, e subsequentemente armazenadas em freezer a -80°C. O RNA total foi extraído do jejuno e íleo com o reagente TRIzol<sup>®</sup> (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) de acordo com as normas do fabricante. A concentração e pureza do RNA total extraído, foi mensurada via espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Thermo Fischer Scientific) no comprimento de onda de 260 nm. O RNA total foi tratado com o kit DNase I amplification grade (Invitrogen, Carlsbad CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida o RNA tratado com DNase I, foi utilizado na síntese do DNA complementar (cDNA), utilizando o kit SuperScript<sup>™</sup> III First-Strand Syntesis Super Mix (Invitrogen Corporation, Brasil) de acordo com as normas do fabricante. As reações em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR) foi

realizada com o composto fluorescente SYBR Green (SYBR® Green PCR Master Mix - Applied Biosystems, USA). Os primers para amplificação dos genes fator de necrose tumoral alfa ( $TNF-\alpha$ ), interleucina 1 $\beta$  ( $IL-1\beta$ ) e transportador de aminoácidos neutros e catiônicos 1 ( $y^+LAT1$ ) foram desenhados de acordo com as sequências depositadas no site [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov). O gene  $\beta$ -actina, 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 gênica relativa e os resultados estão expressos como unidade arbitrária (UA). O procedimento UNIVARIATE foi aplicado para verificar a normalidade dos dados, que foram avaliados pela ANOVA. Quando necessário às médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ) (SAS versão 9.0, Inst. Inc., Cary, NC, USA).

## Resultados e Discussão

Os animais submetidos ao EC apresentaram menor consumo de CR do que os animais em CT (70,28 g e 147,47 g, respectivamente). Também observamos perda de peso corporal nos animais em EC, quando comparado com os animais que permaneceram no ambiente de CT (-246,68 g e 86,91 g, respectivamente). Não houve efeito da dieta sobre o CR e GP ( $P > 0,05$ ). O EC causa redução no desempenho animal, por meio de diversas alterações fisiológicas e metabólicas, incluindo a maior expressão do gene grelina que tem efeito anorexígeno (Song et al., 2012) causando menor CR e conseqüentemente reduzindo a quantidade de energia e nutrientes disponíveis para o organismo animal, resultando em prejuízos diretos sobre o desenvolvimento de importantes tecidos biológicos como os músculos e ossos (Lara e Rostagno, 2013; Porto et al., 2015).

No jejuno de frangos submetidos ao EC, nós observamos maior expressão do gene  $TNF-\alpha$  e menor expressão do gene  $y^+LAT1$  (Tabela 1). Também observamos que os animais consumindo a dieta DL apresentaram maior expressão dos genes  $TNF-\alpha$  e  $IL-1\beta$  (Tabela 1).

**Tabela 1** – Expressão dos genes  $TNF-\alpha$ ,  $IL-1\beta$  e  $y^+LAT1$  no jejuno de frangos de corte com 42 dias de idade

		$TNF-\alpha$ (UA)		$IL-1\beta$ (UA)		$y^+LAT1$ (UA) <sup>1</sup>	
		Média	EP	Média	EP	Média	EP
TA <sup>2</sup>	CT <sup>3</sup>	0,1480 <sup>b</sup>	0,0069	0,0006	0,00007	0,0034 <sup>a</sup>	0,0021
	EC <sup>4</sup>	0,2129 <sup>a</sup>	0,0107	0,0005	0,00013	0,0016 <sup>b</sup>	0,0005
Dieta	SM <sup>5</sup>	0,1611 <sup>b</sup>	0,0096	0,0004 <sup>b</sup>	0,00005	0,0026	0,0021
	DL <sup>6</sup>	0,1998 <sup>a</sup>	0,0139	0,0007 <sup>a</sup>	0,00012	0,0024	0,0014
<b>Valor de P</b>							
TA		<0,0001		0,3843		0,0148	
Dieta		0,0007		0,0220		0,7690	

<sup>a,b</sup>Valores médios dentro da mesma coluna com letras diferentes sobrescritas representam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Os resultados são expressos como unidade arbitrária (UA), e estão representados como média e erro padrão (EP). <sup>1</sup> $TNF-\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa;  $IL-1\beta$ : interleucina 1 $\beta$ ;  $y^+LAT1$ : transportador de aminoácidos neutros e catiônicos 1. <sup>2</sup>TA: temperatura ambiental; <sup>3</sup>CT: conforto térmico; <sup>4</sup>EC: estresse por calor; <sup>5</sup>SM: dieta não suplementada com metionina; <sup>6</sup>DL: dieta suplementada com DL-metionina.

No íleo, observamos que entre os animais em EC, aqueles consumindo a dieta DL apresentaram maior expressão do gene  $y^+LAT1$  do que os animais consumindo a dieta SM (0,0159 UA e 0,0064 UA, respectivamente). Os frangos em EC apresentaram maior expressão do gene  $TNF-\alpha$  do que os frangos em CT (0,1972 UA

e 0,1373 UA, respectivamente). Não foi observado efeito dos tratamentos sobre a expressão do *IL-1 $\beta$* .

A maior expressão dos genes *TNF- $\alpha$*  e *IL-1 $\beta$*  observada neste estudo pode ter ocorrido possivelmente como consequência do estresse oxidativo induzido pelo calor (Del Vesco et al., 2015), que promove aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias, criando um efeito inflamatório na mucosa intestinal (Berkes et al., 2003). Por outro lado, a expressão do gene *y<sup>+</sup>LAT1* foi menor no jejuno dos animais em EC, e isso provavelmente pode ter ocorrido como um efeito da inflamação no jejuno, causando ruptura da integridade do seu epitélio e afetando assim a expressão desse gene. A maior expressão do gene *y<sup>+</sup>LAT1* no íleo dos animais submetidos ao EC e consumindo a dieta DL, sugere a ocorrência de um mecanismo transitório de adaptação do animal, para que os aminoácidos proteínogênicos e com função antioxidante, sejam absorvidos corretamente a fim de atenuar alguns dos efeitos do estresse térmico. Este resultado também sugere que a metionina pode ter estimulado a expressão do gene *y<sup>+</sup>LAT1*, na tentativa de manter os níveis adequados de nutrientes para as funções vitais dos animais em condição de estresse.

## Conclusões

Os resultados mostraram que o EC prejudicou o desempenho animal. Adicionalmente, os resultados sugerem que o intestino delgado responde ao estresse induzido pelo calor, aumentando a expressão de genes envolvidos na resposta imune, na tentativa de manter a integridade do epitélio intestinal. Os resultados sugerem ainda que a metionina em quantidade adequada pode ajudar o organismo a combater os efeitos do estresse, por estimular a expressão de genes relacionados com a função imune e com o transporte de aminoácidos na tentativa de manter o aporte de nutrientes para os animais mesmo em condições adversas.

## Agradecimentos

Os autores agradecem a Universidade Estadual de Maringá, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

## Referências

- BERKES, J. et al. Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation. **Gut**, v. 52, n. 3, p. 439-451, 2003.
- DEL VESCO, A. P. et al. Effects of methionine supplementation on the expression of protein deposition-related genes in acute heat stress-exposed broilers. **PLoS One**, v. 10, n.2, p. 1-11, 2015.
- LARA, L. J.; ROSTAGNO, M. H. Impact of heat stress on poultry production. **Animals (Basel)**, v. 3, n. 2, p. 356-369, 2013.
- PORTO, M. L. et al. Glutamic acid improves body weight gain and intestinal morphology of broiler chickens submitted to heat stress. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 17, n. 3, p. 355-362, 2015.
- 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, n. 484869, p. 1-8, 2012.