

EFEITO DO ESTRESSE POR CALOR SOBRE A INTEGRIDADE INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM METIONINA: EXPRESSÃO DOS GENES *HSP70*, *CLDN1* E *OCN*

Glória Meira Bonfim (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Eliane Gasparino (Orientador), 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: desempenho animal, proteína do choque térmico, temperatura ambiente

Resumo:

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do estresse por calor e da suplementação de metionina sobre o desempenho e a expressão dos genes proteína do choque térmico 70 kDa (*HSP70*), ocludina (*OCN*) e claudina 1 (*CLDN1*) 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 dos genes *HSP70* e *OCN* no jejuno e íleo. No jejuno das aves sob EC consumindo a dieta SM também foi observado maior expressão dos genes *HSP70* e *CLDN1*. E no íleo das aves consumindo a dieta DL observamos maior expressão do gene *CLDN1*. Esses resultados sugerem que tanto o estresse por calor quanto a deficiência de metionina prejudicam a integridade e função intestinal.

Introdução

O estresse térmico agudo ou crônico provoca consideráveis perdas econômicas todos os anos na produção de frangos de corte em todo o mundo. A gravidade e o período de exposição determinam como os animais respondem ao estresse e determinam a severidade do problema. Quando a temperatura está acima da zona de conforto térmico, os animais podem apresentar alterações fisiológicas como por exemplo o estresse oxidativo e a ruptura da integridade intestinal, além de vários outros distúrbios que culminam em perdas de desempenho e aumento das taxas de mortalidade (Gu et al., 2012). A mucosa intestinal (epitélio intestinal e lâmina própria), juntamente com o suporte imunológico, funciona como uma barreira entre o conteúdo luminal e os compartimentos sistêmicos, e também é responsável pela digestão final dos alimentos e a absorção de nutrientes. Assim, a eficiência da conversão do alimento ingerido em massa muscular depende da integridade do epitélio gastrointestinal. Uma vez que, quando expostos a ambiente com alta temperatura, os frangos tendem a promover perda de calor através do aumento do fluxo sanguíneo para regiões periféricas, tem sido demonstrado que o estresse térmico pode afetar a integridade intestinal devido à hipóxia no epitélio intestinal (Leon et al., 2010).

O comprometimento da integridade do epitélio durante o estresse térmico pode causar inflamação intestinal e alteração na microbiota benéfica do intestino, bem como pode aumentar a permeabilidade das células intestinais aos patógenos, que poderia por sua vez favorecer o estabelecimento de enterites. Del Vesco et al. (2014) demonstrou que o estresse por calor por 24 horas pode causar alterações metabólicas relacionadas ao estresse oxidativo, o que resulta em baixo desempenho das aves. Esses autores também têm demonstrado que a metionina pode aliviar os efeitos nocivos do estresse por atuar como um agente antioxidante. Embora muitos estudos tenham sido realizados para investigar as funções da metionina no organismo animal, ainda não se conhece completamente os efeitos da metionina sobre o ambiente intestinal das aves expostas ao estresse por calor. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do estresse por calor e da dieta (suplementada ou não com metionina) sobre o desempenho animal e a expressão de genes relacionados com a proteção (proteína do choque térmico 70 kDA) e integridade (claudina 1 e ocludina) do epitélio do 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. 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 a temperatura ambiental: temperatura de conforto térmico (CT) e estresse por calor (EC) de 38°C por 24 horas. E o segundo fator foi a 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 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® (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™ 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 proteína do choque térmico 70 kDA (*HSP70*), claudina 1 (*CLDN1*) e ocludina (*OCN*) foram desenhados de acordo com as sequências depositadas no site www.ncbi.nlm.nih.gov. O gene β -actina, foi utilizado como controle endógeno. Todas as análises foram realizadas em um volume de 25 μ 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

Observamos que os animais submetidos ao EC apresentaram menor consumo de ração (CR) (70,28 g e 147,47 g, respectivamente), e maior perda de peso corporal (-246,68 g e 86,91 g, respectivamente), quando comparado com os animais que permaneceram no ambiente de CT. Não houve efeito da dieta sobre o CR e GP. O EC provoca redução no desempenho animal, por meio de várias alterações fisiológicas e metabólicas, incluindo a redução da energia disponível para a renovação das células intestinais que prejudica o processo de absorção, com prejuízos diretos sobre o desenvolvimento dos músculos e ossos (Gu et al., 2012; Porto et al., 2015). Com relação à expressão gênica no jejuno, observamos que os animais sob condição de EC consumindo a dieta SM, apresentaram maior expressão dos genes *HSP70* (0,070 UA) e *CLDN1* (0,012 UA). Também observamos que no jejuno dos animais submetidos ao EC, houve maior expressão do gene *OCN* (0,215 UA). Não foi observado efeito da dieta sobre a expressão do gene *OCN* no jejuno. No íleo verificamos que os animais sob condição de EC apresentaram maior expressão dos genes *HSP70* (0,044 e 0,020 UA, respectivamente) e *OCN* (0,566 e 0,240 UA, respectivamente) do que os animais sob condição de CT. A expressão do gene *CLDN1* no íleo foi influenciada somente pela dieta, sendo observado que os animais que consumiram a dieta SM apresentaram menor expressão desse gene, quando comparados com os animais consumindo a dieta DL (0,008 UA e 0,028 UA, respectivamente). Não houve efeito da temperatura ambiental sobre a expressão do gene *CLDN1* e da dieta sobre a expressão dos genes *HSP70* e *OCN*.

Assim como em outras espécies, as aves dissipam calor através do aumento do fluxo sanguíneo para a parte periférica do corpo, resultando em suprimento de sangue e oxigênio inadequado para o intestino (Leon et al., 2010). A isquemia intestinal e o estresse oxidativo são fatores importantes que podem causar disfunção das proteínas do tipo tight junctions (TJ) do intestino e assim, causar prejuízos na integridade da barreira celular (Leon et al., 2010). As proteínas da família claudina e ocludina são caracterizadas como TJ sendo fundamentais para manter o epitélio intestinal íntegro e regular a permeabilidade da barreira intestinal, impedindo a difusão de microrganismos e antígenos. Em nosso trabalho, a maior expressão dos

genes *OCN* e *CLDN1* no jejuno e íleo das aves expostas ao estresse induzido pelo calor, pode ter ocorrido como uma resposta compensatória contra a ruptura da barreira intestinal ocasionada pelo efeito do estresse térmico, na tentativa de manter a integridade do epitélio intestinal, evitando assim o aumento da permeabilidade intestinal a substâncias nocivas, e contribuindo dessa forma para minimizar os prejuízos do estresse sobre o processo absorptivo dos nutrientes. Também observamos neste estudo que no jejuno das aves expostas ao EC e que consumiram a dieta SM, a expressão do gene *CLDN1* foi maior. Isto sugere que em condição de estresse, quando os animais ingerem uma quantidade inadequada de metionina, pode ocorrer uma redução na função da barreira epitelial. Isso porque, a metionina estimula o processo de transmetilação e a síntese de poliaminas no intestino delgado e outros tecidos, e assim, estimula a proliferação de células epiteliais intestinais e a manutenção da integridade da mucosa (Chen et al., 2014). Também observamos maior expressão do gene *HSP70* no intestino de aves expostas ao EC. De acordo com Gu et al. (2012) a *HSP70* é capaz de proteger a mucosa intestinal de lesões causadas pelo estresse por calor, melhorando a capacidade antioxidante de frangos de corte e inibindo a peroxidação lipídica.

Conclusões

Os resultados mostram a nível transcricional que o intestino delgado dos frangos de corte é responsivo a hipertermia induzida pelo estresse por calor e a deficiência de metionina. E para se proteger a fim de assegurar a absorção de nutrientes durante condições adversas, esse órgão estimula a expressão de genes que codificam proteínas capazes de manter a saúde e a integridade intestinal. Além disso, a suplementação de metionina em quantidades adequadas pode atenuar os efeitos deletérios do estresse, através do estímulo da expressão de genes capazes de manter a integridade do epitélio intestinal.

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

- CHEN, Y. et al. L-methionine supplementation maintains the integrity and barrier function of the small-intestinal mucosa in post-weaning piglets. **Amino Acids**, v. 46, n. 4, p. 1131-1142, 2014.
- DEL VESCO, A.P. et al. Effects of methionine supplementation on the redox state of acute heat stress-exposed quails. **Journal of Animal Science**, v. 92, n. 2, p. 806-815, 2014.
- GU, X.H.; HAO, Y.; WANG, X.L. Overexpression of heat shock protein 70 and its relationship to intestine under acute heat stress in broilers: 2. Intestinal oxidative stress. **Poultry Science**, v. 91, n. 4, p. 790-799, 2012.
- LEON, L.R.; HELWIG, B.G. Heat stroke: Role of the systemic inflammatory response. **Journal of Applied Physiology**, v. 109, n. 6, p. 1980-1988, 2010.
- 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.