

EXPRESSÃO DOS GENES β -ACTINA E *GPX3* EM FRANGOS DE CORTE SUBMETIDOS A DIFERENTES PERÍODOS DE JEJUM

Angela Maria Favaro Elias Pereira (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Eliane Gasparino (Orientador), 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: antioxidante, gene endógeno, pcr em tempo real

Resumo:

Este estudo teve como objetivo avaliar se o período jejum sólido (0, 2, 4, 6 e 8 horas) influencia a expressão do gene endógeno (β -actina) e do gene alvo glutathione peroxidase 3 (*GPX3*) no jejuno de frangos de corte com 42 dias de idade. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos referentes ao período de jejum sólido (0, 2, 4, 6 e 8 horas) e três repetições por tratamento. As aves foram criadas de maneira convencional em gaiolas coletivas (4 aves/gaiola), em ambiente com temperatura controlada até os 42 dias de idade, quando então as aves foram submetidas aos períodos de jejum: 0 hora (n=12 aves), 2 horas (n=12), 4 horas (n=12 aves), 6 horas (n=12 aves) e 8 horas (n=12 aves). Após cada período de jejum, seis animais de cada tratamento (n=6), foram abatidos por deslocamento cervical, para a coleta do jejuno. Durante todo o período experimental os animais tiveram livre acesso à água e a ração. A expressão dos genes endógeno (β -actina) ($P=0,4843$) e alvo (*GPX3*) (CT *GPX3*- $P=0,5074$; $\Delta\Delta$ CT *GPX3* - $P=0,1227$) no jejuno de frangos de corte com 42 dias de idade não foi influenciada pelos períodos de jejum avaliados. Esses resultados indicam que o jejum sólido de até oito horas pode ser aplicado nos animais destinados a este tipo de análise quando necessário, sem causar danos celulares no jejuno como, por exemplo, a degradação do tecido e a oxidação de biomoléculas que poderiam interferir na expressão de diferentes genes.

Introdução

O jejum sólido pré-abate é uma prática comum na indústria avícola, sendo realizado com a finalidade principal de esvaziar o trato gastrointestinal das aves com o intuito de evitar a contaminação de carcaças com resíduos alimentares ou intestinais (Ludtke et al., 2001). Segundo Ludtke et al. (2001) quando o jejum é aplicado de maneira correta, não existe interferência negativa do jejum sobre os parâmetros de bem estar animal e qualidade da carne. O período de jejum ideal recomendado por Ludtke et al. (2001) é de oito a dez horas, sendo ressaltado que este período pode se estender até 12 horas, mas não deve ser excedido ao período 12 horas. Para a realização de determinadas análises experimentais é necessário que os frangos antes da coleta das amostras biológicas, sejam submetidos a um determinado período de jejum, a fim de evitar que algumas análises possam ser prejudicadas. Seja pela interação dos nutrientes com os metabólitos sanguíneos, ou pela presença de partículas de ração no lúmen intestinal que pode danificar a estrutura das vilosidades (Zavarize et al., 2012). Além disso, o jejum quando

aplicado por longo período pode causar a ruptura do epitélio intestinal (Gilani et al., 2017), e todos esses fatores podem resultar em medidas incorretas e imprecisas.

Normalmente, devido a sua função regulatória a β -actina tem sido utilizada na análise de expressão gênica, como controle endógeno da reação. Tanto o gene β -actina, como outros genes endógenos, como regra geral devem apresentar nível de expressão estável em diferentes tipos celulares, tecidos, estágios de desenvolvimento, e principalmente não deve sofrer alterações devido aos tratamentos experimentais (Livak e Schmittgen, 2001). Garantindo assim a sua eficiência nos processos de análises de expressão gênica. Ao se estudar a expressão relativa de um gene alvo, como por exemplo, a glutathione peroxidase 3 (GPX3), utiliza-se o controle endógeno para normalizar e assim excluir possíveis erros experimentais oriundos de variações ao longo da análise, o que permite a obtenção de resultados mais confiáveis. A glutathione peroxidase (GPx) faz parte do sistema de defesa antioxidante do organismo, sendo uma relevante enzima frente a substâncias reativas nocivas formadas durante o metabolismo do oxigênio, como peróxidos de hidrogênio e seus derivados. Köhrl et al. (2000) consideraram a GPx uma “enzima emergencial” responsável por prevenir os efeitos do estresse oxidativo.

O jejum é uma prática que pode desencadear diferentes processos metabólicos, assim como interferir na expressão de diferentes genes e proteínas. O estabelecimento de um protocolo adequado com relação ao tempo de aplicação de jejum é fundamental para condução de pesquisas científica em nutrigenômica. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a expressão do gene endógeno β -actina e do gene alvo GPX3 no jejuno de frangos de corte (42 dias) submetidos a diferentes períodos de jejum sólido (0, 2, 4, 6 e 8 horas).

Materiais e métodos

O experimento foi conduzido na Fazenda Experimental de Iguatemi, pertencente à Universidade Estadual de Maringá. Um total de 60 frangos de corte machos (Cobb 500) de um dia de idade foram utilizados. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos referentes ao período de jejum (0, 2, 4, 6 e 8 horas) e três repetições por tratamento. As aves foram criadas de maneira convencional em gaiolas coletivas (4 aves/gaiola), em ambiente com temperatura controlada de acordo com o manual da Cobb até os 42 dias de idade, quando então as aves foram submetidas aos períodos de jejum de 0 hora (n=12 aves), 2 horas (n=12), 4 horas (n=12 aves), 6 horas (n=12 aves) e 8 horas (n=12 aves). Após cada período de jejum, seis animais de cada tratamento (n=6) escolhidos com base no peso médio da gaiola, foram abatidos por deslocamento cervical aos 42 dias de idade, para a coleta do jejuno. As amostras do jejuno foram coletadas, abertas longitudinalmente e lavadas com soro fisiológico estéril gelado (4°C), e em seguida foram conservadas em nitrogênio líquido e posteriormente foram armazenadas em freezer a -80°C até o momento da extração do RNA total. Durante todo o período experimental os animais tiveram livre acesso à água e a ração, que foi formulada para atender suas exigências nutricionais.

O RNA total foi extraído do jejuno utilizando o reagente TRIzol™ (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. Após o isolamento do RNA total, a sua concentração foi mensurada via espectrofotômetro NanoDrop™ 2000-c (ThermoFisher Scientific™) no comprimento de onda de 260 nm. A pureza do RNA total de cada amostra foi determinada através das razões 260/280 nm e 260/230 nm obtidas no espectrofotômetro NanoDrop™ 2000-c (ThermoFisher Scientific™) que ficaram entre 2,0 e 2,1. Em seguida, 1 µg do RNA

total foi tratado com DNase I amplification grade (Invitrogen, Carlsbad CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante, para remoção de possível contaminação com DNA genômico. Logo após, o RNA tratado foi utilizado para realizar a síntese do DNA complementar (cDNA) utilizando o kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen Corporation, Brazil), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de cDNA foram armazenadas em freezer a -20°C até o momento das reações de amplificação. As reações em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) foram realizadas com o composto fluorescente PowerUp™ SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems™, USA), no termociclador StepOne™ Real Time PCR System versão 2.3 (Applied Biosystems™). Os genes endógeno β -actina (nº de acesso: L08165.1) e alvo glutationa peroxidase 3 (GPX3) (nº de acesso: NM_001163232.2) específicos para a espécie *Gallus gallus*, foram desenhados com base nas sequências depositadas no National Center for Biotechnology Information - www.ncbi.nlm.nih.gov, usando o site www.idtdna.com. As análises foram realizadas em um volume de 20 μL e em duplicatas. O método $2^{-\Delta\text{CT}}$ (Livak e Schmittgen, 2001) foi utilizado para quantificação relativa da expressão gênica. Os resultados estão expressos como unidade arbitrária (UA).

Para verificar a normalidade dos dados foi aplicado o teste Shapiro-Wilk. Os resultados da análise de expressão gênica foram analisados por meio da ANOVA da regressão ($P < 0,05$) (SAS versão 9.00, 2002; SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA) e apresentados por média \pm desvio padrão no caso de efeito não significativo da regressão.

Resultados e Discussão

Na Figura 1, pode-se observar que as amostras de jejuno coletadas apresentaram-se integras e livre de contaminantes, isso pode ser confirmado pelo pico da absorbância a 260 nm e pela razão 260/280 que obteve valor médio igual a 2. A obtenção do RNA total íntegro e puro, conseqüentemente proporcionou a síntese do cDNA de alta qualidade para ser utilizado nas análises de expressão gênica.

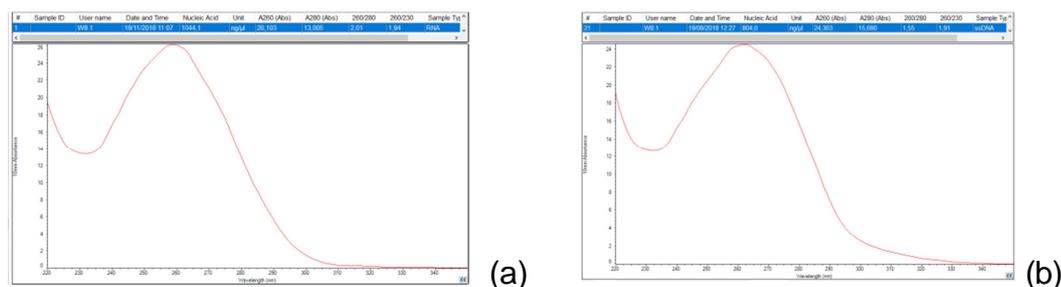


Figura 1 - (a) Análise de integridade e pureza do RNA total e (b) do cDNA do jejuno de frangos de corte com 42 dias de idade submetidos a diferentes períodos de jejum (leituras realizadas no espectrofotômetro NanoDrop™ 2000-c).

Os resultados de expressão dos genes endógeno (β -actina) e alvo (GPX3) no jejuno de frangos de corte com 42 dias de idade submetidos a diferentes períodos de jejum são apresentados na Tabela 1. Não houve diferença significativa dos períodos de jejum sólido sobre a expressão dos genes endógeno ($P=0,4843$) e alvo ($\text{CT GPX3} - P=0,5074$; $\Delta\Delta\text{CT GPX3} - P=0,1227$). Esses resultados sugerem que os períodos de jejum sólido avaliados não interferiram na análise de expressão gênica, o que pode ser observado por meio da alta qualidade do material genético extraído, e pela expressão dos genes endógeno e alvo que não apresentou variação entre os tratamentos. Ou seja, os períodos de jejum sólido (0-8 horas) podem ser aplicados nos animais (caso

necessário) sem causar danos celulares no jejuno como, por exemplo, a degradação do tecido e a oxidação de biomoléculas que poderiam interferir na expressão de diferentes genes. Este resultado assume importância quando temos em mente que o jejum é uma prática comum e pode se tornar uma fonte de estresse quando utilizado por períodos prolongados, resultando no desencadeamento de diferentes processos metabólicos (Zavarige et al., 2012; Gilani et al., 2017). Assim a definição de um período adequado de jejum, é fundamental para condução de pesquisas que abordam os mais diferentes assuntos, incluindo aqueles relacionados com a nutrigenômica.

Tabela 1 - Efeito do período de jejum sólido sobre a expressão dos genes endógeno (β -actina) e alvo (GPX3) no jejuno de frangos de corte com 42 dias de idade

	CT β -actina ¹	CT GPX3 ²	$\Delta\Delta$ CT GPX3 (UA) ³
<i>Período de jejum (horas)</i>			
0	21,22 \pm 0,47	24,54 \pm 0,10	0,11 \pm 0,04
2	21,36 \pm 0,97	24,77 \pm 1,00	0,11 \pm 0,06
4	21,43 \pm 0,56	24,98 \pm 0,99	0,10 \pm 0,05
6	21,61 \pm 0,98	24,82 \pm 1,39	0,11 \pm 0,04
8	20,68 \pm 0,40	25,67 \pm 0,47	0,03 \pm 0,01
<i>Valor de P</i>	0,4843	0,1227	0,1227

¹CT: ciclo de threshold; ²GPX3: gene alvo glutationa peroxidase. ³Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão e estão expressos em unidade arbitrária (UA).

Conclusões

Pode-se concluir que o jejum sólido de até oito horas pode ser aplicado nos animais destinados à análise de expressão gênica quando necessário, sem causar danos celulares no jejuno que poderiam interferir na expressão de diferentes genes.

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

- GILANI, S.; HOWARTH, G. S.; NATTRASS, G.; KITESSA, S. M.; BAREKATAIN, R.; FORDER, R. E. A.; TRAN, C. D.; HUGHES, R. J. Gene expression and morphological changes in the intestinal mucosa associated with increased permeability induced by short-term fasting in chickens. **Journal of Animal Physiology Animal Nutrition**, v. 102, n. 2, p. e653-e661, 2018.
- KÖHRL, J.; BRIGELIUS-FLOHÉ, R; BÖCK, A.; GÄRTNER, R.; MEYER, O.; FLOHÉ, L. Selenium in biology: facts and medical perspectives. **Biology Chemistry**, v. 381, n. 9-10, p. 849-864, 2000.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.
- LUDTKE, C. B.; CIOCCA, J. R. P.; DANDIN, T.; BARBALHO, P. C.; VILELA, J. A. **Abate humanitário de aves**. 1. ed. Rio de Janeiro: WSPA, 2010.
- ZAVARIZE, K. C.; SARTORI, J. R.; GONZALES, E.; PEZZATO, A. C. Morphological changes of the intestinal mucosa of broilers and layers as affected by fasting before sample collection. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.14, n.1, p.21-25, 2012.