

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DA METIONINA SOBRE O PERFIL DE EXPRESSÃO DO GENE PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO 70 KDA (*HSP70*) EM DIFERENTES ÓRGÃOS DE FRANGOS DE CORTE COM 42 DIAS DE IDADE, SUBMETIDOS AO ESTRESSE POR CALOR AGUDO

Maria Alice de Oliveira Gonçalves (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Angélica de S. Khatlab, Eliane Gasparino (Orientadora). E-mail: gasparinoeliane@gmail.com

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: Citoproteção; *Heat shock protein*; Hipertermia; Nutrientes funcionais

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da suplementação de metionina nas rações de frangos de corte submetidos ao estresse por calor agudo, sobre o perfil de expressão do gene proteína de choque térmico 70 kDa (*HSP70*) em diferentes órgãos. Um total de 144 frangos de corte com 21 dias de idade foi distribuído em esquema fatorial 2x2 (dieta não suplementada com metionina-DM e dieta suplementada com DL-metionina-SM; e ambiente de conforto térmico-CT e estresse por calor agudo-EC, 38°C por 24 horas, do dia 41 até o dia 42). Aos 42 dias de idade, a temperatura retal e a frequência respiratória das aves foram mensuradas, em seguida as aves foram pesadas e abatidas para a coleta de amostras de fígado, baço, timo, bursa de Fabricius, jejuno e íleo. O EC aumentou a temperatura corporal, a frequência respiratória, reduziu o consumo de ração e aumentou a perda de peso. Os frangos em EC que consumiram a dieta DM apresentaram maior expressão do gene *HSP70* no fígado, no baço, na bursa de Fabricius e no jejuno. No íleo, maior expressão do gene *HSP70* foi observada nos frangos em EC. O estresse por calor agudo prejudicou o desempenho, e o efeito do EC foi exacerbado nos animais que consumiram dieta DM. Nessa condição o perfil de expressão do gene *HSP70* nos diferentes órgãos foi o mesmo. Por outro lado, os animais em EC e que consumiram a dieta SM apresentam melhor capacidade de termotolerância, possivelmente devido a modulação da metionina a nível transcricional e pós-transcricional sobre a *HSP70*.

INTRODUÇÃO

O estresse por calor, um dos principais fatores ambientais prejudiciais a produção animal, induz inúmeras alterações no organismo, as quais são capazes de danificar diferentes órgãos ou tecidos, retardando a correta execução de suas funções (SIDDQUI *et al.*, 2020). Interferindo de forma direta e negativa sobre a função do organismo como um todo, resultando na supressão da saúde dos animais bem como de sua taxa de crescimento (NANTO-HARA *et al.*, 2020). Inúmeras são as formas de determinação de indicadores do estresse por calor em animais de produção, e a avaliação da transcrição e tradução dos genes proteínas de choque

térmico (*HSP*), cuja síntese é aumentada quando os animais são submetidos a uma condição estressante, como o estresse por calor, também é um tipo de indicador de estresse (SIDDQUI *et al.*, 2020). As HSPs estimulam a citoproteção e induzem a tolerância ao calor nas células de vários órgãos, durante o período de estresse por calor, e por isso a aquisição da termotolerância pelos animais, tem sido associada a aumentos nos níveis de algumas HSPs (JIN *et al.*, 2020). A HSP70 desempenha o importante papel de reparação e proteção de biomoléculas, auxiliando no enovelamento, reenovelamento, bem como na degradação das proteínas mal enoveladas, cujos danos não são passíveis de restauração (JIN *et al.*, 2020). Os danos fisiológicos e metabólicos no organismo dos animais causados pelo estresse por calor, podem ser ainda maiores devido às dietas desbalanceadas, já que os nutrientes contribuem para um sistema biológico bem estabelecido. Além dos nutrientes serem essenciais para manter a vida do animal, determinados nutrientes também podem contribuir para a redução nos danos causados pelo estresse por calor. Seja por causarem menor incremento calórico durante a digestão, ou por desempenharem alguma função específica (MOHAMED; LOZOVSKIY; AHMED ALI, 2019). O aminoácido metionina além de sua ação antioxidante conhecida, apresenta efeitos citoprotetores sobre células com danos induzidos por hipertermia, por aumentar a expressão do gene *HSP70* (HAN; UM; YANG, 2015).

Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da suplementação de metionina nas rações de frangos de corte submetidos ao estresse por calor agudo, sobre o desempenho animal e o perfil de expressão do gene proteína de choque térmico 70 kDa (*HSP70*) em diferentes órgãos: fígado, baço, timo, bursa de Fabricius, jejuno e íleo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este experimento foi conduzido de acordo com as especificações do Comitê de Ética no Uso de Animais (nº 4000170615) da Universidade Estadual de Maringá. Foram utilizados 144 frangos de corte machos (Cobb 500) com 21 dias de idade. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x2. O primeiro fator avaliado foi a dieta: dieta não suplementada com metionina (0,54% de metionina+cisteína digestível; DM) e dieta suplementada com DL-metionina (0,88% de metionina+cisteína digestível; SM); e o segundo fator foi o ambiente: ambiente de conforto térmico (CT) e estresse por calor agudo (EC). Dessa forma, o experimento foi composto por quatro tratamentos: CT x DM; CT x SM; EC x DM e EC x SM. Cada tratamento teve seis repetições com seis aves por repetição. Os animais foram criados em gaiolas coletivas, em duas salas diferentes. SALA 1: temperatura de CT (21 a 42 dias de idade, conforme guia Cobb); e SALA 2: temperatura ambiente de EC (38°C, por 24 horas). Os animais da SALA 2 foram criados em temperatura de CT (conforme guia Cobb) até os 40 dias de idade. Aos 41 dias de idade os frangos foram pesados e em seguida foram submetidos ao EC de 38°C por 24 horas. Durante o período de estresse (24 horas, do dia 41 até o dia 42) a temperatura corporal por via retal e a frequência respiratória (movimentos respiratórios por minuto, mrm) das aves criadas em CT e EC foram mensuradas (6 aves/tratamento; n=24). Aos 42 dias de idade, os animais de ambas as salas foram pesados, e em seguida foram abatidos por deslocamento cervical para a coleta de amostras biológicas (fígado, baço, timo, bursa de Fabricius, jejuno e íleo). Durante todo o período experimental os animais tiveram livre acesso à água e a ração.

O ganho de peso (GP) e o consumo de ração (CR) foram calculados considerando o período de 41-42 dias de idade. O GP foi calculado como: peso final_{42dias} - peso inicial_{41dias}. O CR foi calculado como: ração ofertada_{41dias} - sobra de ração_{42dias}. O RNA foi extraído do fígado, do baço, do timo, da bursa de Fabricius, do jejuno e do íleo com o reagente TRizol (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) de acordo com as normas do fabricante. A concentração do RNA foi mensurada via espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific), no comprimento de onda de 260 nm. A integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose a 1%, corado com SYBR Safe DNA Gel Stain e foi visualizado em fotodocumentador sob luz ultravioleta. As amostras de RNA foram tratadas com DNase I (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) conforme as instruções do fabricante. As reações em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) foram realizadas utilizando o composto fluorescente SYBR GREEN PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA), de acordo com as instruções do fabricante. O gene alvo *HSP70* (NM_001006685.1) e o gene endógeno β -actina (L08561.1) foram desenhados com base nas sequências dos genes depositadas em www.ncbi.nlm.nih.gov. O método $2^{-\Delta CT}$ foi utilizado para análise da quantificação relativa da expressão do gene *HSP70*. Os dados foram analisados por meio da ANOVA two-way, que considera no modelo os efeitos principais (dieta e ambiente), bem como a interação entre os fatores (dieta vs. ambiente). Quando houve efeito de interação as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Quando houve efeito somente da dieta e/ou ambiente as médias foram comparadas pelo teste t de Student ($P < 0,05$) (SAS 2002, versão 9.00 - SAS Inst. Inc., Cary, NC).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A temperatura corporal das aves foi de $41,72^{\circ}\text{C} \pm 0,37$ (CT) vs. $42,78^{\circ}\text{C} \pm 0,22$ (EC) ($P = 0,0005$), e a frequência respiratória das aves foi de $46,31 \text{ mrm} \pm 0,23$ (CT) vs. $123,43 \text{ mrm} \pm 0,30$ (EC) ($P < 0,0001$). A dieta não influenciou a temperatura corporal e a frequência respiratória ($P > 0,05$) dos animais. Não houve efeito significativo de interação entre ambiente e dieta sobre o GP ($P = 0,2060$) e o CR ($P = 0,5671$), porém, o ambiente influenciou o GP ($P = 0,0003$) e o CR ($P < 0,0001$). Os animais em EC apresentaram menor CR ($147,48 \text{ g}$ - CT vs. $70,28 \text{ g}$ - EC) e maior perda de peso ($86,91 \text{ g}$ - CT vs. $-246,68 \text{ g}$ - EC) que os animais em CT. Não houve efeito da dieta sobre o GP ($P = 0,1789$) e o CR ($P = 0,0650$). De modo geral, a redução do consumo de ração é vista como um mecanismo adaptativo dos animais em hipertermia para reduzirem a geração de calor metabólico, o que de outra forma exacerbaria os efeitos do estresse térmico. No entanto, a brusca redução do CR causa alterações adicionais incluindo danos à mucosa intestinal, afetando a funcionalidade como um todo do sistema digestivo e absorptivo (NANTO-HARA *et al.*, 2020). Portanto, o menor GP, pode estar relacionado não somente ao menor CR, mas também devido à má funcionalidade do intestino e devido a várias outras alterações fisiológicas e metabólicas.

Houve efeito de interação entre ambiente e dieta sobre a expressão do gene *HSP70* no fígado ($P = 0,0015$), no baço ($P = 0,0449$), na bursa de Fabricius ($P = 0,0022$) e no jejuno ($P < 0,0001$). Os animais submetidos ao ambiente EC e que consumiram a dieta DM, apresentaram a maior expressão desse gene. O ambiente influenciou a

expressão do gene *HSP70* no íleo dos animais ($P=0,0008$), sendo que a maior expressão desse gene foi verificada nos animais em EC. Não houve efeito significativo do ambiente sobre expressão do gene *HSP70* no timo dos frangos ($P>0,05$). Não houve efeito da dieta sobre a expressão do gene *HSP70* no timo e no íleo dos frangos ($P>0,05$). Esses resultados indicam que os animais estavam em estado de estresse o qual foi induzido pelo calor (38°C) e pela deficiência nutricional de metionina, e que o perfil de expressão desse gene na tentativa de proteger e restaurar a homeostase dos órgãos ocorre de maneira similar nos diferentes órgãos avaliados. Sendo importante observar que quando as aves foram expostas ao EC e foram alimentadas com a dieta SM, a expressão do gene *HSP70* manteve-se semelhante à expressão observada nas aves em CT. Esse resultado sugere que as células dos animais em estresse por calor e quando suplementados com metionina tornam-se mais termotolerantes evidenciando os efeitos citoprotetores da metionina.

CONCLUSÕES

O estresse por calor agudo causou hipertermia, taquipneia e pior desempenho animal. Além disso, verifica-se a nível molecular que o efeito do EC foi exacerbado pela deficiência nutricional de metionina, e nessa condição o perfil de expressão do gene *HSP70* nos diferentes órgãos foi o mesmo. Por outro lado, quando os animais submetidos ao EC consomem dieta suplementada com metionina, os mesmos apresentam melhor capacidade de resposta termotolerante, possivelmente devido a modulação da metionina a nível transcricional e pós-transcricional sobre a *HSP70*.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual de Maringá, ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Departamento de Zootecnia.

REFERÊNCIAS

HAN, Z-Y.; MU, T.; YANG, Z. Methionine protects against hyperthermia-induced cell injury in cultured bovine mammary epithelial cells. **Cell Stress and Chaperones**, v. 20, n. 1, p. 109-120, 2015.

JIN, J. *et al.* Induced thermotolerance and expression of three key Hsp genes (*Hsp70*, *Hsp21*, and *sHsp21*) and their roles in the high temperature tolerance of *Agasicles hygrophila*. **Frontiers in Physiology**, v. 10, p. 1593, 2020.

MOHAMED, A. S. A.; LOZOVSKIY, A. R.; AHMED ALI, A. M. Nutritional strategies to alleviate heat stress effects through feed restrictions and feed additives (vitamins and minerals) in broilers under summer conditions. **Journal of Animal Behaviour Biometeorology**, v. 7, n. 3, p. 123-131, 2019.

NANTO-HARA, F. *et al.* Heat stress directly affects intestinal integrity in broiler chickens. **The Journal of Poultry Science**, v. 57, n. 4, p. 284–290, 2020.

SIDDIQUI, S. H. *et al.* Acute heat stress induces the differential expression of heat shock proteins in different sections of the small intestine of chickens based on exposure duration. **Animals**, v. 10, n. 7, p. 1234, 2020.