

CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

## **EFEITO DO ESTRESSE POR CALOR SOBRE A EXPRESSÃO DOS GENES *TNF- $\alpha$* E *HSP70* JEJUNO DE FRANGOS SUPLEMENTADOS COM METIONINA**

Matheus Hoffmeister LUZ\*<sup>1</sup>, Ana Paula DEL VESCO<sup>2</sup>, Angélica de Souza  
KHATLAB<sup>1</sup>, Thais Pacheco SANTANA<sup>2</sup>, Eliane GASPARINO<sup>1</sup>

\*autor para correspondência: matheusluzh@gmail.com

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil

<sup>2</sup>Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, Brasil

**Abstract:** This study was made to evaluate the methionine effect on the broiler performance, heat shock protein 70 kDA (*HSP70*) and tumor necrosis factor-alpha (*TNF- $\alpha$* ) gene expression in the jejunum of 42-day-old broilers. Birds were fed with two diets, methionine supplementation (DL-MET) and without methionine supplementation (SM). In addition, birds were kept at two environment conditions, under comfort temperature (CT) and under heat stress (EC) of 38°C for 24 hours. The lowest feed intake and the greatest loss of body weight were observed in the birds submitted to EC. Birds in EC and consuming DL-MET showed higher *TNF- $\alpha$*  gene expression. We observed an environmental temperature x diet interaction effect on *HSP70* gene expression: higher expression of this gene was observed in EC broilers fed the SM diet. The results suggest that methionine supplementation in adequate amounts may support the body in combating the deleterious effects of stress by stimulating the gene expression capable of maintaining intestinal epithelial cell function.

**Keywords:** cytokine, heat shock protein, intestinal integrity

### **Introdução**

O estresse por calor pode causar distúrbios no organismo animal que culminam em queda de desempenho e aumento da taxa de mortalidade. O estresse por calor pode afetar a integridade intestinal devido à hipóxia e pode comprometer a

Promoção e Realização:

Apoio Institucional:

Organização:

CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

integridade promovendo aumento da permeabilidade aos patógenos e o que pode causar inflamação (Dokladny et al., 2016). Apesar dos diversos estudos sobre esse assunto, ainda não é conhecido como a suplementação de metionina poderia influenciar o ambiente intestinal de aves expostas ao estresse por calor. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da suplementação de metionina sobre o desempenho e a expressão dos genes *HSP70* e *TNF- $\alpha$*  no jejuno de frangos de corte de 42 dias submetidos ao estresse por calor.

### Material e Métodos

Este experimento seguiu as diretrizes do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (nº 4000170615). O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x2, sendo o primeiro fator relacionado à temperatura ambiental (temperatura de conforto térmico (CT) vs. estresse por calor (EC) de 38°C). E o segundo fator relacionado à suplementação de metionina (sem suplementação de metionina (SM) vs. suplementação com o nível recomendado de DL-metionina (DL-MET). Para este experimento 120 frangos de corte machos (Cobb 500) foram criados convencionalmente até os 20 dias de idade, recebendo ração balanceada de acordo com as suas necessidades nutricionais (Rostagno et al., 2011). No 21º dia as aves foram distribuídas entre os quatro tratamentos supracitados, com seis repetições por tratamento, e os frangos foram criados em sala climatizada na zona de conforto térmico até os 41 dias de idade. Nesse momento 60 animais (30 de cada dieta) foram submetidos ao estresse por calor de 38°C por 24 horas, e o restante dos animais permaneceram em ambiente de CT. Após 24 horas, os animais do CT e EC foram abatidos por deslocamento cervical aos 42 dias. Durante todo o período experimental, os animais tiveram livre acesso à água e à ração. O consumo de ração em ambos os tratamentos foi calculado como: ração ofertada no 41º dia - sobra de ração no 42º dia. O ganho de peso das aves de ambos os tratamentos foi

Promoção e Realização:



Apoio Institucional:



Organização:



CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

calculado como: peso final (42º dia) - peso inicial (41º dia). O consumo de ração e o ganho de peso foram corrigidos para mortalidade. *Expressão gênica*: amostras de jejuno foram coletadas de cinco animais por tratamento em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80°C até a extração do RNA total, que foi extraído usando Trizol<sup>®</sup>. A concentração total de RNA foi mensurada via espectrofotômetro (260 nm). A integridade do RNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1%. As amostras de RNA foram tratadas com DNase I. O kit SuperScript<sup>™</sup>III First-Strand Synthesis Super Mix foi utilizado para a síntese de cDNA. Para as reações de PCR em tempo real foi utilizado o composto fluorescente SYBR GREEN Master Mix. Os primers *HSP70* (NM\_001006685.1) e *TNF-α* (NM\_204267.1) foram desenhados com base nas sequências dos genes depositadas no [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) usando o site [www.idtdna.com](http://www.idtdna.com). O primer *β-actina* (L08165.1) foi utilizado como controle endógeno. As análises foram realizadas em duplicata. O método  $2^{-\Delta CT}$  foi utilizado para a análise de quantificação relativa da expressão dos genes. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ) (SAS Inst. Inc., Cary, NC).

### Resultados e Discussão

Observamos que frangos submetidos ao EC apresentaram menor consumo de ração do que os frangos no CT (70,28 g vs. 147,47 g, respectivamente), e isso pode ter ocorrido na tentativa de minimizar o incremento calórico resultante dos processos da digestão (Porto et al., 2015). Também observamos maior perda de peso corporal em frangos de corte submetidos ao EC em relação aos frangos no CT (86,91 g vs. -246,68 g, respectivamente). Esse resultado pode ser explicado por inúmeros fatores, entre estes, devido à redução na energia disponível para processos fisiológicos, como o turnover da mucosa intestinal e o desenvolvimento dos tecidos muscular e ósseo (Porto et al., 2015). O estresse por calor também causa o comprometimento da integridade do epitélio intestinal, isso porque, para perder calor corporal os animais aumentam o fluxo sanguíneo para a parte periférica

CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

do corpo, resultando em um suprimento inadequado de sangue e oxigênio para o intestino (Dokladny et al., 2016). Isso pode facilitar a difusão de substâncias nocivas como os microrganismos para a corrente sanguínea, o que pode desencadear a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- $\alpha$ , com consequente ativação da resposta imune. Nesse estudo, observamos que o EC aumentou a expressão do gene *TNF- $\alpha$*  (Figura 1A). Este resultado pode estar relacionado à maior produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que ocorre durante o estresse, já que estudos mostram que o  $H_2O_2$  induz a produção de TNF- $\alpha$  por meio da ativação de vias de sinalização como a p38 e SAPK/JNK, vias estas relacionadas ao estresse oxidativo (Nakao et al., 2008). Em relação à suplementação de metionina, maior expressão do gene *TNF- $\alpha$*  foi observada nas aves consumindo ração DL-MET (Figura 1A), sugerindo que a metionina pode contribuir para a produção de citocinas pró-inflamatórias, na tentativa de minimizar os danos causados pelo EC. A maior expressão do gene *HSP70* foi observada nas aves expostas ao EC recebendo ração SM (Figura 1B).

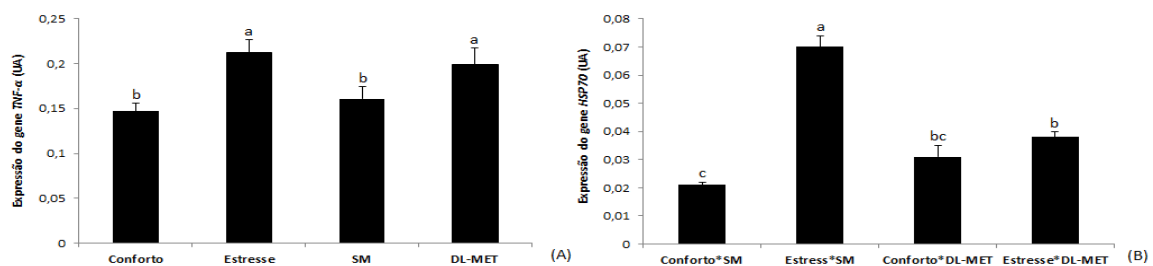


Figura 1- Expressão dos genes *TNF- $\alpha$*  (A) e *HSP70* (B) no jejuno de frangos de corte com 42 dias de idade. Os resultados são apresentados com médias e erro padrão. Os resultados são expressos como unidade arbitrária (UA). <sup>abc</sup>Letras diferentes entre os tratamentos representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ).

SM = sem suplementação de metionina; DL-MET = suplementação de metionina.

Esse resultado pode estar relacionado com a capacidade da HSP70 em proteger a mucosa intestinal de lesões causadas pelo EC, melhorando a capacidade antioxidante dos animais e inibindo a peroxidação lipídica (Gu et al., 2012). É

CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

importante notar que nas aves submetidas ao EC e recebendo ração DL-MET, a expressão do gene *HSP70* foi semelhante à expressão observada em aves do CT (Figura 1B). Isso indica que a metionina contribuiu para minimizar os danos causados pelo EC possivelmente por meio do seu efeito antioxidante direto em virtude da sua capacidade de reagir com ROS através da ação do sistema da tioredoxina (Luo e Levine, 2009).

### Conclusão

Nossos resultados indicam que a suplementação de metionina pode ajudar o jejuno das aves a combater os efeitos deletérios do estresse por calor, através de um mecanismo de proteção altamente regulado, através do aumento da expressão de genes que codificam substâncias com função imune e citoprotetoras.

### Referências

- Dokladny, K.; Zuhl, M. N. e Moseley, P. L. 2016. Intestinal epithelial barrier function and tight junction proteins with heat and exercise. *Journal of applied physiology* 120:692-701.
- Gu, X. H.; Hao, Y. e Wang, X. L. 2012. Overexpression of heat shock protein 70 and its relationship to intestine under acute heat stress in broilers: 2. Intestinal oxidative stress. *Poultry Science* 91:790-799.
- Luo, S. e Levine, R. L. 2009. Methionine in proteins defends against oxidative stress. *Journal Federation of American Societies for Experimental Biology* 23:464-472.
- Nakao, N.; Kurokawa, T.; Nonami, T.; Tumurkhuu, G.; Koide, N. e Yokochi, T. 2008. Hydrogen peroxide induces the production of tumor necrosis factor- $\alpha$  in RAW 264.7 macrophage cells via activation of p38 and stress-activated protein kinase. *Innate immunity* 14:190-196.
- Porto, M. L.; Givisiez, P. E. N.; Saraiva, E. P.; Costa, F. G. P.; Filho, M. A. L. B. e Andrade, M. F. S.; Brandão, P. A. e Guerra, R. R. 2015. Glutamic acid improves body weight gain and intestinal morphology of broiler chickens submitted to heat stress. *Revista Brasileira de Ciência Avícola* 17:355-362.
- Rostagno, H. S.; Albino, L. F. T.; Donzele, J. L.; Gomes, P. C.; Oliveira, R. F.; Lopes, D. C.; Ferreira, A. S.; Barreto, S. L. T. e Euclides, R. F. 2011. Brazilian tables for poultry and swine: composition of feedstuffs and nutritional requirements. 3rd ed. UFV, Viçosa.