

**Expressão gênica da proteína de choque térmico (HSP70) no fígado de frangos de corte submetidos ou não a estresse térmico agudo**

Claudia Luiza Paes Barreto Villaça<sup>1</sup>, Margareth Evangelista Botelho<sup>1</sup>, Jane de Oliveira Peixoto<sup>2</sup>, Mônica Corrêa Ledur<sup>2</sup>, Simone Eliza Facioni Guimaraes<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Viçosa, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Viçosa, MG, Brazil.

<sup>2</sup>Embrapa Suíno e Aves, Concórdia, Rio Grande do Sul.

<sup>3</sup>Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Zootecnia, Viçosa, MG, Brazil.

Autor correspondente: villaca.zootecnista@yahoo.com.br

**Resumo:** Avaliou-se a expressão do gene hsp70 no fígado de frangos de corte Cobb machos submetidos ou não ao estresse térmico no final das fases de crescimento (21 dias) e final (42 dias). O estudo consistiu de duas experiências: a primeira envolveu 60 frangos de corte mantidos a 27°C durante 20 dias, em seguida 30 frangos de corte foram submetidos a 38°C durante 24 horas; O segundo envolveu 60 frangos de corte mantidos a 27°C por 20 dias, depois transferidos para 19°C até completarem 41 dias de idade e em seguida 30 frangos de corte foram expostos a 38°C por 24 horas. Os frangos de corte tiveram a melhor eficiência homeotérmica aos 21 dias de idade, pois somente aos 42 dias o frango aumentou significativamente a expressão de hsp70. Os dados sugerem que frangos de corte mais jovens possuem mecanismos de tolerância, demonstrando a adaptação ao ambiente quando submetidos a estresse.

**Palavras-chave:** Frango de corte, Expressão Gênica, Proteína do choque térmico.

**Gene expression of heat shock protein (HSP70) in the liver of broiler chickens subjected to or not to acute thermal stress**

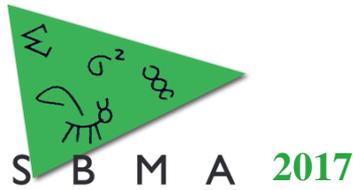
**Abstract:** We evaluated the expression of the hsp70 gene in the liver of male Cobb broilers submitted or not to heat stress at the end of the starter (21 days) and finisher (42 days) growth phases. The study consisted of two experiments: the first involved 60 broilers kept at 27°C for 20 days and then 30 broilers were subjected to 38°C for 24 hours; the second involved 60 broilers maintained for kept at 27°C for 20 days 20 days, then transferred to 19°C until they completed 41 days of age, after which 30 broilers were exposed to 38°C for 24 hours. Broilers had the best homeothermic capacity efficiency at 21 days of age since only at 42 days the broiler significantly increased the expression of hsp70. The data suggest that young broiler breeders have tolerance mechanisms, demonstrating their adaptation to the environment when subjected to stress.

**Keywords:** Broilers, Gene expression, Heat shock protein.

**Introdução**

Como organismos vivos, os frangos têm mecanismos defensivos contra os desafios ambientais. Um dos mais importantes envolve proteínas de choque térmico (HSPs), um grupo de proteínas evolutivamente conservadas que são induzidas para proteger as células do estresse oxidativo causado pela exposição ao calor e outras lesões (Boschini et al, 2011).

A pesquisa sugere que existe uma forte relação entre a oxidação e a síntese de HSP70 (Liu et al 2014). O fígado desempenha um papel importante na homeostase metabólica do corpo como um todo e durante o estresse por calor ele mobiliza lipídios e carboidratos para energia atenuando os efeitos negativos causados por desafios térmicos (Manoli et al., 2007). Portanto, o presente estudo avaliou os níveis de expressão gênica da hsp70 no fígado de frangos de corte submetidos a estresse térmico e Conforto térmico (CT) no final das fases de crescimento (21 dias) e final (42 dias).



## XII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal Ribeirão Preto, SP – 12 e 13 de junho de 2017

### Material e Métodos

A abordagem experimental foi aprovada pelo Comitê de Ética em Uso Animal da Universidade Estadual de Maringá (CEUA-UEM), protocolo nº105 / 2012 e da Comissão de Ética em Uso e Produção Animal da Universidade Federal de Viçosa, Brasil (CEUAP-UFV), protocolo n ° 60/2016. O estudo envolveu 120 frangos machos Cobb 500 (*Gallus gallus*) mantidos em galpões com acesso livre a alimentos e água. A dieta à base de milho e farinha de soja continham 22,11% de proteína bruta (PB) e 2,960 kcal de energia metabolizável (EM) para a fase inicial (1 a 21 dias) e 19,7% PB e 3,150 Kcal EM para a fase final (Rostagno et al. 2005). O primeiro experimento consistiu de 60 frangos de corte machos que foram mantidos à temperatura de CT de 27°C por 20 dias. Em seguida, 30 frangos foram separados do grupo e submetidos a uma temperatura aguda de ET de 38°C durante 24 horas. Todos os frangos de corte utilizados nesta experiência foram eutanasiados aos 21 dias de idade por deslocação cervical. O segundo experimento consistiu em 60 frangos de corte machos mantidos a 27°C por 20 dias, sendo então submetidos a uma temperatura de CT de 19°C até o 41º dia de idade. Em seguida, 30 animais deste grupo permaneceram em CT enquanto as outras foram submetidas a uma temperatura aguda de ET de 38°C durante 24 horas. Todos os frangos de corte utilizados neste experimento foram eutanasiados por deslocamento cervical aos 42 dias de idade. As duas temperaturas ambientes representadas por CT estão de acordo com o Manual Cobb (2012).

Amostras de tecido hepático foram coletadas de quatro animais por grupo, preservadas em RNA Holder® (BioAgency Biotechnology, São Paulo, Brasil) e armazenadas a -20°C até o isolamento de RNA total ser realizado para análise de expressão gênica no Laboratório de Biotecnologia Animal da Universidade Federal de Viçosa, Brasil. Os iniciadores foram concebidos utilizando PrimerQuest (<http://www.idtdna.com/primerquest/Home/Index>, Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, IA) de seqüências de genes HSP obtidas de GenBank para *Gallus gallus* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). O gene de  $\beta$ -actina endógena (Huggett et al., 2005) estava entre os mais estáveis testados e foi, portanto, escolhido como o controle. Utilizaram-se quatro amostras de tecido do fígado por tratamento realizado para extração de RNA total, que foi realizado com Trizol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante (1 ml por 100 mg de tecido). Todos os materiais utilizados foram pré-tratados com inibidor de RNAase - AWAY® RNAase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

A concentração total de RNA foi determinada utilizando o espectrofotômetro NanoVurPlus (GE Healthcare, Alemanha) a um comprimento de onda de 280 nm. Utilizou-se um sistema de transcrição reversa GoScript™ (Promega) para síntese de cDNA de acordo com as instruções do fabricante. As reações foram realizadas num termociclador ABI Prism 7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA) utilizando GoTaq qPCR Master Mix (Promega Corporation, Madison, WI).

### Resultados e Discussão

Em aves, a faixa de tolerância à temperatura, conhecida como zona termo neutra, muda com a sua composição genética, idade, sexo, tamanho corporal, peso, dieta, estado fisiológico, exposição prévia ao calor (aclimatação), variações de temperatura ambiente, radiação, umidade e velocidade do ar (Cassuce, 2011). Durante o estresse térmico o fígado mobiliza lipídios e carboidratos para energia, reduzindo assim os danos causados pelo desafio térmico (Manoli et al., 2007).

A Tabela 2 mostra os efeitos de estresse e do conforto térmico na expressão gênica da HSP70 aos 21 dias de idade. Os frangos de corte submetidos a condições de calor estressantes apresentaram eficiência de capacidade homeotérmica aos 21 dias de idade onde a expressão não foi significativamente aumentada para o gene avaliado, demonstrando a eficiência da capacidade homeotérmica nesta fase.

Quando submetidos a frangos de corte ao estresse térmico aos 42 dias de idade houve aumento significativo da expressão de hsp70 ( $p < 0,05$ ). De acordo com Macari et al. (1994), a idade dos frangos de corte é um fator importante na expressão de HSPs, com os pintos sendo mais resistentes ao estresse térmico agudo do que as aves adultas. Os efeitos do estresse e conforto térmico sobre a expressão da HSP70 em frangos de corte a 42 dias de idade estão mostrados na Tabela 3. Os dados demonstram que a idade está relacionada à capacidade homeotérmica dos frangos de corte.

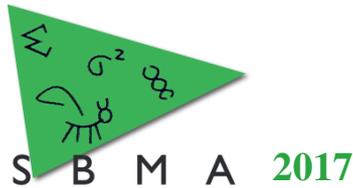


Tabela 2- Fold Change (FC) do gene hsp70 (proteína de choque térmico) na interação do conforto térmico (CT) e do estresse térmico (ET) avaliados nos fígados de frangos de corte machos aos 21 dias de idade.

Gene	Contraste (idade)	Interação	FC	Erro padrão	P-valor
hsp70	21	CTXET	-3.5475	2.1830	0.4175

Valores negativos FC: número de vezes que cada gene de hsp foi expresso em relação ao seu contrastes. CT refere-se à temperatura de 27oC. \* Diferença significativa em P<0,05.

Tabela 3 – Fold Change (FC) do gene hsp70 (proteína de choque térmico) na interação de conforto térmico (CT) e do estresse térmico (ET) avaliados nos fígados de frangos de corte Cobb machos aos 42 dias de idade.

Gene	Contrast(age)	Interaction	FC	Standard Error	P-value
hsp70	42	CTXET	-28.0572	2.1830	0.0458*

Valores negativos de FC: número de vezes que cada gene de hsp foi expresso em relação ao seu contraste. CT refere-se à temperatura de 19oC. \* Diferença significativa em P <0,05.

### Conclusão

Os resultados indicam o efeito crucial da HSP70 sobre a capacidade de manutenção homeotérmica de frangos de corte mais jovens, indicando que concordaram que a idade dos animais tem os mecanismos de tolerância, demonstraram a adaptação ao ambiente quando submetidos a estresse, conforme demonstrado nos resultados 21 dias, não havendo expressão gênica significativa dos gene avaliado para esta idade.

### Literatura citada

- BOSCHINI, C.; GONÇALVES, F.M.; CATALAN, A.A.S.; BAVARESCO, C.; GENTILINI, F.P.; ANCIUTI, M.A.; DIONELLO, N.J.L. Relação entre a proteína de choque térmico e o estresse térmico em frango de corte. *Arquivo de Zootecnia*. v.60, p.63-77, 2011.
- CASSUCE, D.C. Determinação das faixas de conforto térmico para frangos de corte de diferentes idades criados no Brasil. 2011. 91f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil, 2011.
- LIU, H.; HE, J.; CHI, C.; SHAO, J. Differential HSP70 expression in *Mytiluscoriscus* under various stressors. *Gene*. v. 543, p.166-173, 2014.
- MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E. *Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte*. Jaboticabal: FUNEP, 1994, 296p.
- MANOLI, I.; ALESCI, S.; BLACKMAN, M.R.; SU, Y.A.; RENNERT, O.M.; CHROUSOS, G.P. Mitochondria as key components of the stress response. *Trends Endocrinology & Metabolism*. v. 18, p.190–198, 2007.
- ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L.; et al. 2005. *Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais*. 2. ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa. 2005. 186p.