

VIII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal
João Pessoa, PB – 20 e 22 de junho de 2012.

Expressão de mRNA de COX III em codornas alimentadas dietas com inclusão de glicerol

Stefania Caroline Claudino da Silva², Eliane Gasparino¹, Débora Marques Voltolini², Fernanda Tanamati², Ana Paula Del Vesco², André Luiz Seccatto Garcia⁴.

¹Departamento de Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá – UEM

²Alunas da pós-graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá- UEM.

³Aluna da pós-graduação em Genética e Melhoramento da Universidade Estadual de Maringá- UEM.

⁴Aluno da graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá- UEM.

Resumo: Este estudo foi realizado para avaliar a expressão do RNA mensageiro (mRNA) do gene mitocondrial que codifica a proteína citocromo c oxidase III (COX III) no músculo do peito de codornas japonesas com 28 dias de idade, alimentados com dietas contendo 0, 8 e 12% de glicerol. O RNA total foi extraído (n = 10 por grupo) e o cDNA amplificado usando primers específicos para qRT-PCR. A expressão de mRNA de COX III no músculo do peito foi maior no grupo alimentado com 12% de glicerol (0,863 UA), sem diferenças (P<0,05) entre 0% (0,357 UA) e 8% de glicerol (0,415 UA). Estes resultados indicam que existem diferenças na expressão de mRNA de COX III no músculo do peito de codornas aos 28 dias de idade entre os animais que se alimentaram com diferentes concentrações de glicerol.

Palavras-chave: cadeia transportadora de elétrons, expressão gênica, citocromo c oxidase III

Expression of mRNA COX III in quails fed with diets with inclusion of glycerol

Abstract: This study was conducted to evaluate the expression of messenger RNA (mRNA) of the gene encoding the mitochondrial protein cytochrome c oxidase III (COX III) in breast muscle of Japanese quail with 28 days of age, fed with diets containing 0%, 8% and 12% of glycerol. Total RNA was extracted (n = 10 per group) and the cDNA was amplified using specific primers for qRT-PCR. The mRNA expression of COX III in the breast muscle was higher in the group fed with 12% of glycerol (0.863 AU), no differences (P <0.05) between 0% (0.357 AU) and 8% glycerol (0.415 AU). These results indicate differences in mRNA expression of COX III in quail breast muscle at 28 days of age between the animals which were fed with different concentrations of glycerol.

Keywords: electron transport chain, gene expression, cytochrome c oxidase III

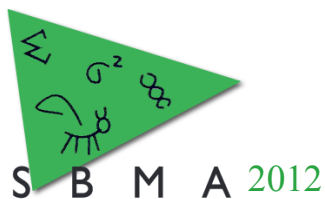
Introdução

A utilização de subprodutos em dieta de animais de interesse zootécnico podem diminuir o custo de produção, e consequentemente aumentar a rentabilidade da atividade. Quando financeiramente rentável, o glicerol, um subproduto da indústria do biodiesel, pode ser usado como um potencial substituto parcial do milho para alimentação animal (Cerrate et al., 2006) por apresentarem valores energéticos semelhantes.

Em codornas e frango de corte, a inclusão de glicerol na dieta pode afetar características de desempenho (Batista, 2010) além de influenciar a expressão do mRNA de alguns genes mitocondriais relacionados eficiência na síntese de ATP e estresse oxidativo, como o gene que codifica a proteína COX III (citocromo c oxidase III) (Gasparino et al., 2012).

Localizada no complexo IV, a COX III é a última proteína da cadeia transportadora de elétrons, e tem como função receber elétrons do citocromo c, transferindo-os para uma molécula de oxigênio e reduzindo-o a água, além promover a translocação de quatro prótons, que ajudam na formação de um potencial quimiosmótico usado pela ATP sintase para a formação de ATP. Desta forma, a COX III interfere em respostas de atividades referentes ao translocamento de prótons e em respostas ao estresse oxidativo (You et al., 2002).

Verifica-se a necessidade de realizar estudos sobre o efeito de nutrientes e seus níveis sobre a expressão de genes relacionados com a cadeia transportadora de elétrons, em especial o COX II, na tentativa de entender melhor a influência dos nutrientes sobre a fosforilação oxidativa. Desta forma, o



VIII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

João Pessoa, PB – 20 e 22 de junho de 2012.

presente trabalho foi desenvolvido com objetivo de avaliar o efeito da inclusão de glicerol sobre a expressão de mRNA do gene que codifica a proteína COX III em codornas aos 28 dias de idade.

Material e Métodos

O trabalho foi realizado na Fazenda Experimental e no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Estadual de Maringá. Foram utilizadas 450 codornas de corte de um dia de idade, distribuídas em delineamento inteiramente casualizado com três tratamentos (sem glicerol, inclusão de 8% e 12% de glicerol na ração), cinco repetições e 30 codornas por unidade experimental. Os animais foram alojados em galpão convencional, em boxes de 2,5m², os quais foram forrados por cama de casca de arroz. O programa de iluminação utilizado foi o contínuo durante todo o período experimental.

Foram utilizadas três dietas experimentais, sendo uma ração controle (sem glicerol), e outras duas com a inclusão 8% e 12% de glicerol, todas formuladas à base de milho e farelo de soja, conforme recomendações nutricionais de Rostagno et al., (2005), exceto a inclusão de glicerol. Dez codornas de cada tratamento foram abatidas por deslocamento cervical aos 28 dias de idade. Uma amostra do músculo peitoral (*Pectoralis superficialis*) destas aves foi coletada, acondicionada adequadamente em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C até o momento da extração de RNA.

O RNA total foi extraído com uso do reagente Trizol® (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) na proporção de 1mL para cada 100mg de tecido, seguindo o protocolo indicado pelo fabricante. A concentração do RNA total foi avaliada por meio de espectrofotômetro, em comprimento de onda de 260nm. A integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose 1% e este, visualizado em luz ultravioleta. Para confecção do cDNA foi utilizado o kit SuperScript™ III First-Strand Syntesis Super Mix (Invitrogen Corporation, Brasil), e ao fim deste processo as amostras foram armazenadas a -20°C até o momento das análises subsequentes. Para as reações de PCR em tempo real foi utilizado o composto fluorescente SYBR GREEN (SYBR® GREEN PCR Máster Mix (Applied Biosystems, USA). Foram usados primers específicos do gene COX III (NP_006921) obtidos de Ojano-Dirain et al (2007), e primers do gene da β -actina como controle endógeno da reação. Todas as análises foram realizadas em um volume final de 25 μ L e em duplicatas.

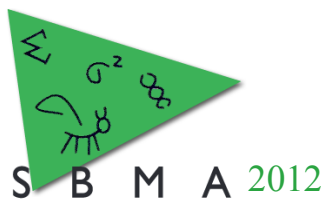
Os dados foram analisados utilizando-se o procedimento GLM do SAS (2000). O procedimento UNIVARIATE foi utilizado para verificar a normalidade dos resíduos da expressão dos genes em estudo (expressos com $2^{-\Delta Ct}$) e dados de produção. Foi utilizado ANOVA com três tratamentos e dez repetições por tratamento (dietas sem, com 8% e com 12% de inclusão de glicerol). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Resultados e Discussão

A suplementação com 12% de glicerol na ração das codornas promoveu 91% e 68% de aumento de expressão de mRNA de COX III em relação àquelas que receberam 0% e 8% de glicerol respectivamente, demonstrando o provável potencial do glicerol em aumentar a expressão de COX III (Figura 1), e a provável saturação que este nível de inclusão de glicerol pode ter causado, excedendo possivelmente a capacidade da enzima glicerol quinase, limitando a absorção. Apesar disso, a literatura recomenda inclusão máxima de glicerol em dietas de codornas de corte até 14 dias de idade de 10%, e de 15% em codornas com 15 a 35 dias de idade (Pasqueti, 2011), demonstrando a necessidade de novos estudos para determinar a inclusão máxima de glicerol na faixa de 15 a 35 dias de idade em codornas de corte.

No complexo IV, uma porcentagem do oxigênio consumido é convertido em espécies reativas de oxigênio (ROS) no lugar da água, aumentando o estresse oxidativo e podendo causar danos ao DNA mitocondrial. Este complexo é formado por três grandes subunidades, COX I, II, e III, codificadas por DNA mitocondrial e sintetizadas na mitocôndria, além de outras subunidades menores não consideradas mitocondriais.

O COX III possui grande relevância na eficiência energética mitocondrial e uma menor expressão deste gene pode ocorrer devido à menor eficiência celular, ou maior dano oxidativo devido à produção de ROS. De acordo com Iqbal et al. (2004), embora o mecanismo exato ainda não esteja determinado, a



maior expressão de COX III em aves poderia representar uma resposta compensatória ao estresse oxidativo por aumentar a oxidação de proteínas.

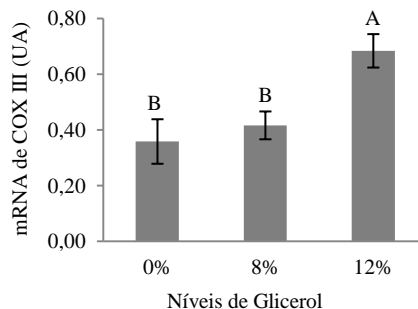


Figura 1. Expressão do RNA mensageiro da adenina citocromo c oxidase. Letras sobre as barras representam a comparação entre as médias de expressão dos mRNAs. Letras diferentes representam diferença estatística ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

O aumento na expressão de COX III nos animais alimentados com 12% de glicerol é um forte indício do provável aumento de ROS provocado pela dieta, uma vez que a função de COX III está mais intimamente ligada a respostas ao estresse oxidativo enquanto que COX I e II estariam mais ligados a atividades referentes ao translocamento de prótons (You et al., 2002).

Além disso, com base na expressão de COX III, é possível inferir que a inclusão de 8% de glicerol não interfere na expressão gênica desta proteína, e que provavelmente não altere a produção de ROS. Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam que embora as rações sejam isoenergéticas, a fonte, além dos níveis desta fonte de energia, utilizada influencia a expressão gênica da COX III, o que consequentemente influenciou a eficiência mitocondrial das codornas de um a 28 dias de idade.

Conclusões

A inclusão de glicerol na dieta de codornas de corte até 28 dias de idade promove alterações sobre a expressão de mRNA de COX III no músculo do peito.

Literatura citada

- ROSTAGNO, H.S., ALBINO, L.F.T., DONZELE, J.L., et al. **Brazilian tables for poultry and swine: composition of feedstuffs and nutritional requirements**. 2 ed. Department of Animal Science. Viçosa Federal University, Viçosa, Minas Gerais, Brazil. 2005.
- OJANO-DIRAIN, C.; TOYOMIZU, M.; WING, T.; et al. Gene expression in breast muscle and duodenum from low and high feed efficient broilers. **Poult. Sci.**, 86:372-381. 2007.
- YOU, K.R.; WEN, J.; LEE, S.T.; et al. Cytochrome c oxidase subunit III: a molecular marker for N-(4-hydroxyphenyl)retinamide-induced oxidative stress in hepatoma cells. **J Biol Chem** 277: 3870-3877, 2002.
- IQBAL, M; PUMFORD, N.R.; TANG, Z.X.; et al. Low feed efficient broilers within a single genetic line exhibit higher oxidative stress and protein expression in breast muscle with lower mitochondrial complex activity. **Poult. Sci.**, 83:474-484. 2004.
- GASPARINO, E. ; GUIMARÃES, S.E. F. ; MARTINS, E.N.; et al. Effect of glycerol on mRNA expression of growth hormone, insulin-like growth factor, and mitochondrial breast muscle genes of Japanese quails. **Poult. Sci.** (Print), 2012. (no prelo).
- BATISTA, E. **Avaliação nutricional do glicerol para codornas de corte**. 2010. 69f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Estadual de Maringá/ Centro de Ciências agrárias, Maringá, Paraná, 2010.