

IX Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal



João Pessoa – PB, 20 a 22 de Junho de 2012

Expressão de mRNA UCP em codornas de diferentes idades

Ana Paula Del Vesco¹, Eliane Gasparino¹, Débora Marques Voltolini¹, Carlos Souza do Nascimento², Stefania Caroline Claudino da Silva¹, Eliany Batista¹

¹Departamento de Zootecnia- Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5.790, Maringá, Paraná, Brasil. apaulavesco@gmail.com

²Departamento de Zootecnia- Universidade Federal de Viçosa, Avenida Peter Henry Rolfs s/n - Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Resumo: O presente trabalho foi desenvolvido com objetivo de avaliar a expressão de mRNA da proteína desacopladora (UCP) em codornas de sete, 14, 21 e 28 dias. Foram utilizadas 144 codornas de corte de um dia de idade, distribuídas em delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos (sete, 14, 21 e 28 dias de idade). Ao final de cada período seis aves de cada tratamento foram abatidas de acordo com o peso médio, e o músculo do peito foi coletado para extração do RNA total. O cDNA foi amplificado usando primers específicos para os genes analisados na qRT-PCR. Com o passar da idade foi observado redução na expressão de mRNA UCP, a maior redução foi observada quando comparado aves de 7 e 28 dias, redução de 67%. A redução na expressão deste gene foi acompanhada pela piora na eficiência alimentar das aves. O avanço da idade neste estudo influenciou a expressão de mRNA UCP, mostrando que existe influência da idade das aves sobre a expressão de genes da cadeia transportadora de elétrons, responsáveis pela produção de energia corporal.

Palavras-chave: expressão gênica, estresse oxidativo, fosforilação oxidativa, ROS

UCP mRNA expression in quail of different ages

Abstract: The main objective of this paper was to evaluate the mRNA expression of uncoupling protein (UCP) of quails, on seven, 14, 21 and 28 days. For the experiment 144 broiler quails of one day old were distributed in a completely randomized design with four treatments (seven, 14, 21 and 28 days old). At the end of each period, six birds from each treatment were chosen according to the average group's weight and slaughtered so breast muscle could be collected for total RNA extraction. The cDNA was amplified using specific primers for the genes analyzed in qRT-PCR. Over age was observed reduction in mRNA expression of UCP, the greatest reduction was observed when comparing birds from 7 and 28 days old (67% reduction). The reduction in expression of this gene was accompanied by deterioration in the efficiency of poultry feed. This study shown that the increase of age influences mRNA UCP expression, showing that there is a correlation of the age of the birds on the expression of genes in the electron transport chain, responsible for the production of body energy.

Keywords: gene expression, oxidative phosphorylation, oxidative stress, ROS

Introdução

O aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) mitocondrial, que ocorre com o avanço da idade está ligado a maiores danos oxidativos nas macromoléculas, bem como deficiência na maquinaria de produção de energia. Aves com menor produção de ATP em função de menor eficiência mitocondrial de produzir ATP a partir de substratos apresentam pior eficiência ou conversão alimentar.

Diversos estudos têm sido realizados com a finalidade de relacionar a função e bioquímica mitocondrial como, produção de ROS, expressão de genes mitocondriais envolvidos no metabolismo energético, expressão de proteínas dos complexos da cadeia respiratória com a eficiência alimentar dos animais (Zhang et al., 2010). Sabe-se que radicais livres, que tendem a acumular durante o envelhecimento, podem estar relacionados à expressão de genes mitocondriais atuantes no metabolismo energético mitocondrial, afetando assim o desempenho das aves (Ojano-Dirain et al., 2007). Desta forma o presente trabalho foi desenvolvido com objetivo de avaliar a expressão de mRNA da proteína desacopladora (UCP) em codornas de sete, 14, 21 e 28 dias.

Material e Métodos

Foram utilizadas 144 codornas de corte de um dia de idade, distribuídas em delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos (sete, 14, 21 e 28 dias de idade). Foi utilizada ração formuladas à base de milho e farelo de soja, conforme recomendações nutricionais de Rostagno et al. (2005). As codornas foram pesadas ao final de cada período experimental, sete, 14, 21 e 28 dias, para determinação do ganho de peso corporal. A ração experimental e as sobras foram pesadas para cálculo do consumo de ração. A conversão alimentar foi calculada como a relação entre o ganho de peso e o consumo de ração. A mortalidade foi considerada para o cálculo da conversão alimentar. Ao final de cada período seis aves de cada tratamento foram abatidas por deslocamento cervical. Uma amostra do músculo peitoral (*Pectoralis superficialis*) destas aves foi coletada, acondicionada adequadamente em RNA Holder® (*BioAgency Biotecnologia*, Brasil) à -20°C até o momento da extração de RNA.

O RNA total foi extraído com uso do reagente Trizol® (*Invitrogen, Carlsbad CA, USA*) de acordo com as normas do fabricante, na proporção de 1mL para cada 100 mg de tecido. A concentração total de RNA foi mensurada usando espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm. A integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio 10% e visualizado em luz ultravioleta. Para confecção do cDNA, foi utilizado o kit SuperScript™ III First-Strand Syntesis Super Mix (*Invitrogen Corporation*, Brasil), de acordo com as normas do fabricante. As amostras de cDNA foram armazenada a -20°C até o momento do uso. Para as reações de PCR em tempo real, foi utilizado o corante fluorescente SYBR GREEN (*SYBR® GREEN PCR Máster Mix (Applied Biosystems, USA)*). As análises de PCR em tempo real foram realizadas no aparelho StepOnePlus v.2.2 (*Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA*). Os primers utilizados nas reações foram desenhados de acordo com Ojano-Dirain et al. (2007). O gene da β -actina foi utilizado como controle endógeno. Os primers para β -actina foram desenhados de acordo com a sequência depositada no GeneBank (no. Acesso L08165) utilizando-se o site www.idtdna.com. Todas as análises foram realizadas em um volume de 25 μ L e em duplicatas.

O método $2^{-\Delta CT}$ foi utilizado para as análises de quantificação relativa. Os dados foram analisados utilizando-se o procedimento GLM do SAS. As médias foram analisadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Os resultados são expressos como médias \pm DP. O título deste tópico deve estar em negrito e centralizado. Não deixar linha separando o título do texto. Iniciar o texto deixando recuo de 1,0 cm da margem esquerda.

Resultados e Discussão

Com o passar da idade foi observado redução significativa na expressão de mRNA UCP no músculo peitoral das codornas. A expressão foi reduzida em 39% aos 14 dias, 54% aos 21 dias e 67% aos 28 dias quando comparados à expressão da proteína desacopladora em aves de sete dias de idade (Figura 1).

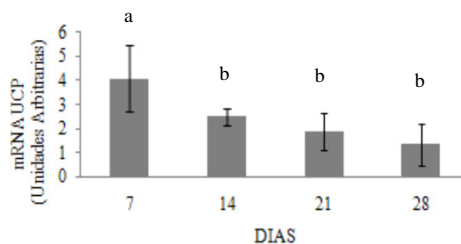


Figura 1- Expressão de mRNA UCP no músculo de codornas de diferentes idades. Os resultados são expressos como médias \pm DP. Letras diferentes entre os períodos representam diferença estatística significante ($p < 0,05$).

As proteínas de desacoplamento (UCPs) são transportadores presentes na membrana interna da mitocôndria que desviam a energia de síntese de ATP, para a produção de calor catalisado por um vazamento de prótons através do interior da membrana (Ledesma et al., 2002). A UCP tem sido descrita como um agente que possibilita a redução da produção de ROS, por causar um leve desacoplamento na

IX Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal



João Pessoa – PB, 20 a 22 de Junho de 2012

produção de ATP (Abe et al., 2006). Observamos uma diminuição gradativa no mRNA da UCP com o passar da idade das codornas. Essa redução foi acompanhada por aumento no ganho de peso, entretanto as aves se tornaram menos eficientes na utilização dos nutrientes (Tabela 1).

Tabela 1. Ganho de peso e conversão alimentar nos diferentes períodos

Idade	GP (g)	CA (kg/kg)
1-7 dias	25,17	1,40
8-14 dias	44,23	1,72
15-21 dias	50,10	2,40
22-28 dias	56,68	2,62

A alteração na expressão do gene avaliado neste estudo, acompanhada pela piora na eficiência alimentar das codornas, indica que manter os níveis de transcritos pode ser fundamental para a capacidade oxidativa mitocondrial e manutenção da eficiência na utilização dos nutrientes.

Conclusões

O avanço da idade neste estudo influenciou a expressão de mRNA UCP, mostrando que existe influência da idade das aves sobre a expressão de genes da cadeia transportadora de elétrons, responsáveis pela produção de energia corporal.

Literatura citada

- ABE, T.; MUJAHID, A.; SATO, K. et al. Possible role of avian uncoupling protein in down-regulating mitochondrial superoxide production in skeletal muscle of fasted chickens. **FEBS Letters**, v.580, p.4815-4822, 2006.
- LEDESMA, A.; LACOPA, M.G.; RIAL, E. The mitochondrial uncoupling proteins. **Genome Biology**, v.3, p.3015.1-3015.9, 2002.
- OJANO-DIRAIN, C.; TOYOMIZU, M.; WING, T. et al. Gene expression in breast muscle and duodenum from low and high feed efficient broilers. **Poultry Science**, v.86, p.372-381, 2007.
- ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L. et al. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 2. ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2005. 186p.
- ZHANG, L.; YUE, H.Y.; Wu, S.G. et al. Transport stress in broilers. II. Superoxide production, adenosine phosphate concentrations, and mRNA levels of avian uncoupling protein, avian adenine nucleotide translocator, and avian peroxisome proliferator-activated receptor- coactivator-1 α in skeletal muscles. **Poultry Science**, v. 89, p.393-400, 2010.