

IX Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal



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

Expressão de mRNA GHR em resposta a suplementação de metionina na dieta de frangos de corte¹

Ana Paula Del Vesco², Eliane Gasparino², Adhemar Rodrigues de Oliveira Neto³, Débora Marques Voltolini², Simone Eliza Facioni Gimarães³, Simara Márcia Marcato²

¹Parte da dissertação de mestrado do primeiro autor, financiada pela Capes

²Departamento de Zootecnia- Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5.790, Maringá, Paraná, Brasil. apaulavesco@gmail.com

³Departamento de Zootecnia- Universidade Federal de Viçosa, Avenida Peter Henry Rolfs s/n - Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Resumo: Este trabalho teve como objetivo avaliar o ganho de peso e a expressão gênica do mRNA GHR (receptor do hormônio do crescimento) no fígado e músculo do peito de frangos de corte alimentados com dietas contendo duas fontes de suplementação de metionina. Foram utilizados frangos de corte de 22 a 42 dias de idade, distribuídos em três tratamentos. Ao final do período experimental, as aves foram abatidas por deslocamento cervical, e o fígado e o músculo do peito foram coletados para extração do RNA total. O cDNA foi amplificado usando primers específicos para os genes analisados na qRT-PCR. A suplementação de DL-metionina proporcionou significativamente maior expressão de GHR no fígado das aves. Sendo este tratamento responsável também pelo melhor ganho de peso observado. A expressão do gene GHR no fígado é influenciada pela adição de metionina, sendo a maior quantidade de mRNA GHR e melhor resultado de ganho de peso observados nos animais que receberam suplementação de DL-metionina na dieta.

Palavras-chave: DL- metionina, hormônio do crescimento, MHA, mRNA

mRNA GHR expression in response to methionine supplementation in broilers diets

Abstract: The objective of this work was to evaluate weight gain and gene expression of GHR (growth hormone receptor) in the liver and breast muscle of broilers fed diets containing two sources of methionine supplementation. Broilers from 22-42 days old were divided into three groups. At the end of the experiment, chicks were killed by cervical dislocation, and liver and breast muscle were collected for total RNA extraction. The cDNA was amplified using specific primers for the genes analyzed in qRT-PCR. The DL-methionine supplementation provided significantly higher expression of GHR in the liver of the poultry, and also better weight gain was observed. The GHR gene expression in liver was influenced by the addition of methionine. Also higher quantities of GHR mRNA and much better results on weight gain were observed in animals treated with diets supplemented with DL-methionine.

Keywords: DL-methionine, growth hormone, MHA, mRNA

Introdução

Características produtivas importantes para o sucesso na produção de aves são influenciadas por diversos mecanismos biológicos. Entre estes, estão os hormônios relacionados ao crescimento e à dieta disponibilizada para os animais. O GH (hormônio do crescimento) é um importante regulador do crescimento e da composição corporal. Seus efeitos são promovidos principalmente através da estimulação da síntese e liberação do IGF-I (Fator de crescimento semelhante à insulina I), por intermédio do receptor do hormônio do crescimento (GHR) (Kita et al., 2005).

Em função da exigência em metionina, a suplementação de fontes industriais dessa substância na dieta de aves é importante para se alcançar o desempenho adequado. Apesar dos relatos na literatura referentes à influência da suplementação de metionina sobre o desempenho de frangos de corte, há poucos estudos realizados mostrando essa influência ou de outros nutrientes sobre a expressão gênica. Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar o ganho de peso e a expressão gênica do GHR no fígado e músculo do peito de frangos de corte alimentados com dietas contendo duas fontes de suplementação de metionina.

IX Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal



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

Material e Métodos

Frangos de corte machos de 22 dias de idade foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado, com três tratamentos (Tabela 1), com cinco repetições e 30 aves por box, totalizando 350 aves. As rações experimentais foram formuladas a base de milho, sorgo, farelo de soja e farinha de carne e vísceras, segundo recomendação de Rostagno et al. (2005). Em todo período experimental, os animais tiveram livre acesso à água e ração.

Tabela 1- Tratamentos experimentais

Tratamento	Fonte	Níveis de suplementação (%)	Quantidade de metionina na ração (%)
1	-	-	0,52
2	DL-metionina	0,24	0,75
3	Metionina hidroxí análoga (MHA)	0,33	0,75

Ao final do período experimental proposto (42 dias de idade), seis animais de cada tratamento foram eutanaseados por deslocamento cervical e os tecidos do fígado e peito (*Pectoralis superficialis*) foram coletados e armazenados 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 armazenadas 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 Master 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 a sequência do gene GHR depositada no site www.ncbi.nlm.nih.gov (nº de acesso- NM001001293), usando o site www.idtdna.com. 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). 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. A análise estatística foi realizada por metodologia de Inferência Bayesiana. Foi considerado que a resistência (Y_i) segue distribuição de Normal. Para cada μ_i e σ_i^2 foram consideradas *a priori* distribuições não-informativas. Foram realizadas comparações múltiplas entre as distribuições *a posteriori* das médias. A obtenção das distribuições marginais *a posteriori* para todos os parâmetros foi por meio do pacote BRugs do programa R (*R Development Core Team*, 2011). A convergência das cadeias foi verificada por meio do pacote CODA do programa R.

Resultados e Discussão

Quando comparado a expressão de mRNA GHR no fígado e no músculo, pode-se observar que ocorre maior expressão no fígado independente da dieta oferecida. A expressão deste gene no músculo não foi influenciada pela suplementação de metionina. Entretanto, no fígado, foi observada diferença significativa entre os tratamentos basal e segundo nível de DL-metionina, sendo observada maior expressão nos animais que consumiram dieta com a adição deste aminoácido (Figura 1).

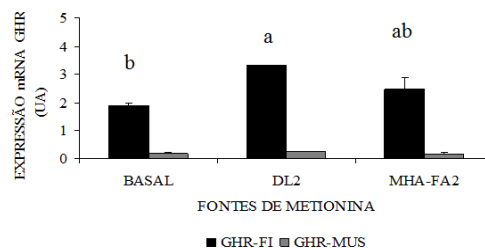


Figura 1- Expressão de mRNA GHR no fígado e músculo de frangos de corte. Os resultados são apresentados como médias *a posteriori* e seus desvios padrões representados pelas barras verticais. Letras diferentes representam diferenças estatísticas pelo intervalo de 95% de credibilidade.

O crescimento é devido em grande parte à deposição protéica, esta por sua vez, é dada por um balanço entre a síntese e a degradação de proteína pelo metabolismo animal. Autores afirmam que estes dois caminhos distintos são produtos da mesma rota biológica (Sacheck et al., 2004), e que a concentração hormonal e a dieta são fatores que podem determinar qual destes irá prevalecer. Neste estudo, foi observado que a suplementação de qualquer uma das duas fontes de metionina levou a melhor ganho de peso (Figura 2), quando comparado a animais que receberam dieta basal, isso se deve em parte, ao fato de que a metionina participa não apenas na síntese protéica, mas também em outras reações metabólicas importantes, para manter o desempenho adequado.

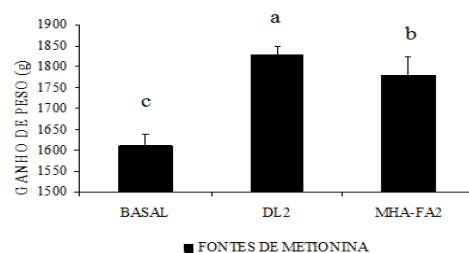


Figura 2- Ganho de peso dos frangos de corte. Os resultados são apresentados como médias *a posteriori* e seus desvios padrões representados pelas barras verticais. Letras diferentes representam diferenças estatísticas pelo intervalo de 95% de credibilidade.

Conclusões

A expressão do gene GHR no fígado é influenciada pela suplementação de metionina, sendo, a maior quantidade mRNA GHR e melhor resultado de ganho de peso observados nos animais que receberam suplementação de DL-metionina na dieta.

Literatura citada

- KITA, K.; NAGAO, K.; OKUMURA, J. Nutritional and tissue Specificity of IGF-I and IGFBP-2 Gene Expression in Growing Chickens- A Review. **Asian - Australasian Journal of Animal Sciences**, v.18, n.5, p.747-754, 2005.
- 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.
- SACHECK, J.M.; OHTSUKA, A.; MCLARY, S.C. et al. IGF-I stimulates muscle growth by suppressing protein breakdown and expression of atrophy-related ubiquitin ligases, atrogin-1 and MuRF1. **American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism**, v.287, p.E591-E601, 2004.