

X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

### Efeitos do estresse térmico agudo e da suplementação de metionina sobre a expressão de mRNA IGF-I e GHR no fígado de codornas de corte<sup>1</sup>

Eliane Gasparino<sup>2</sup>, Ana Paula Del Vesco<sup>3</sup>, Daiane de Oliveira Grieser<sup>3</sup>, Vittor Zancanela<sup>3</sup>, Carlos Souza do Nascimento<sup>4</sup>, Simone Eliza Facioni Guimarães<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Trabalho financiado pelo CNPq

<sup>2</sup>Departamento de Zootecnia – UEM, Maringá. e-mail: [egasparino@uem.br](mailto:egasparino@uem.br)

<sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Zootecnia – UEM, Maringá. e-mail: [apaulavesco@gmail.com](mailto:apaulavesco@gmail.com)

<sup>4</sup>Departamento de Zootecnia – UFV, Viçosa.

**Resumo:** O presente estudo foi realizado para testar a hipótese de que o estresse térmico poderia causar danos ao metabolismo celular, e que a suplementação de metionina poderia minimizar o efeito do estresse térmico sobre a expressão gênica. Para isso, avaliamos a expressão de mRNA IGF-I e GHR no fígado de codornas em conforto ou expostas a estresse térmico, e alimentadas com ou sem suplementação de metionina. Animais alimentados com dieta suplementada de metionina e que permaneceram em conforto térmico apresentaram a maior expressão de mRNA IGF-I; menor expressão desse gene foi observada no fígado de animais alimentados com dieta deficiente em metionina que permaneceram em conforto, seguidos pelos expostos ao estresse térmico. Com reação a dieta, animais alimentados com suplementação de metionina apresentaram maior expressão de GHR; já para ambiente, observa-se que maior expressão ocorre em animais que permaneceram apenas em conforto térmico. Nossos resultados sugerem que estresse térmico de 38°C por 24 horas é capaz de afetar negativamente a expressão de genes relacionados ao crescimento, e que a suplementação de metionina pode ser necessária para manter os níveis de mRNA IGF-I e GHR apropriados para o metabolismo animal.

**Palavras-chave:** eixo somatotrópico, fator de crescimento semelhante a insulina I, receptor do hormônio do crescimento

#### Acute heat stress and dietary methionine effects on IGF-I and GHR mRNA expression in liver of quails

**Abstract:** The present study aimed to evaluate the expression of IGF-I and GHR mRNA in liver of quails in thermal comfort or exposed to heat stress, and fed diets with or without methionine supplementation. For this, meat quails were fed a diet that either met the nutritional demands for methionine or did not meet this demand. The animals were either kept at a thermal comfort temperature or exposed to heat stress. Animals fed diet supplemented with methionine and remaining in the thermal comfort showed the highest expression of IGF-I mRNA; lower expression of this gene has been observed in liver of animals fed a diet deficient in methionine remaining in comfort, followed by animals subjected to heat stress. Regarding diet, animals fed with methionine supplementation showed higher expression of GHR, whereas for the environment, it is observed that increased GHR expression occurs in animals maintained only in thermal comfort. Our results allow us to suggest that heat stress of 38°C for 24 hours was able to negatively affect the expression of genes related to growth, and that methionine supplementation is necessary to maintain the levels of IGF-I and GHR transcripts appropriate for animal metabolism.

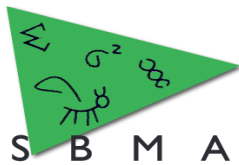
**Keywords:** growth hormone receptor, insulin-like growth factor I, somatotropic axis

#### Introdução

Altas temperaturas reduzem o consumo de ração, a eficiência na utilização dos nutrientes, o ganho de peso, e a eficiência alimentar. Em adição a temperatura, estudos mostram que a expressão de genes relacionados ao crescimento, como o fator de crescimento semelhante a insulina I (IGF-I) e o receptor do hormônio do crescimento (GHR), podem ser influenciados por outros fatores, entre eles a nutrição (GASPARINO et al., 2012). De acordo com KIMBALL & JEFFERSON (2004), aminoácidos podem ter um papel chave na expressão gênica pela modulação do mRNA. Assim, o presente estudo foi realizado para testar a hipótese de que o estresse térmico poderia causar danos ao metabolismo celular, e que a suplementação de metionina poderia minimizar o efeito do estresse térmico sobre a expressão gênica. Para isso, avaliamos a expressão de mRNA IGF-I e GHR no fígado de codornas em conforto ou expostas a estresse térmico, e alimentadas com ou sem suplementação de metionina.

#### Material e Métodos

Aos 35 dias de idade 64 codornas de corte foram divididas em quatro grupos e transferidas para sala com temperatura controlada. Um grupo recebeu dieta com suplementação de metionina de acordo com ROSTAGNO



## X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

et al. (2005), e o outro grupo recebeu uma dieta sem suplementação de metionina. Os animais dos dois grupos referentes a suplementação, ou foram mantidos em temperatura de conforto térmico ( $25 \pm 0.9^\circ\text{C}$  com  $60 \pm 1.2\%$  UR) por sete dias, ou foram mantidos em conforto térmico por seis dias, sendo estes, ao final do sexto dia, submetidos ao estresse térmico agudo de  $38^\circ\text{C}$  por 24 horas.

Todos os animais foram abatidos no final do sétimo dia, e o fígado foi coletado para as subseqüentes análises da expressão dos genes IGF-I e GHR. O fígado de seis animais de cada tratamento foi coletado e armazenado em RNA Holder® (BioAgency Biotecnologia, Brasil) à  $-20^\circ\text{C}$  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 1 mL para cada 100 mg de tecido. Para confecção do cDNA, foi utilizado o kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis Super Mix (Invitrogen Corporation, Brasil) de acordo com as normas do fabricante. Para as reações de PCR em tempo real, foi utilizado o corante fluorescente SYBR GREEN (SYBR® GREEN PCR Máster Mix (Applied Biosystems, USA). Os primers utilizados nas reações para a amplificação do GHR e IGF-I foram desenhados a partir das sequências depositadas no Genbank (access nº - NM001001293.1, FJ977570.1, respectivamente). O gene da  $\beta$ -actina (nº de acesso - L08165) foi utilizado como controle endógeno. Todas as análises foram realizadas em um volume de 25  $\mu\text{L}$  e em duplicatas.

Os resultados foram apresentados como médias e desvios padrões. O procedimento UNIVARIATE foi aplicado para verificar a normalidade de todos os dados, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ) (SAS, 2000).

### Resultados e Discussão

Pode-se observar efeito da interação entre dieta e temperatura sobre a expressão de mRNA IGF-I. Animais alimentados com dieta com suplementação de metionina e que permaneceram em conforto térmico apresentaram a maior expressão de mRNA IGF-I (0,56 UA); menor expressão desse gene foi observada no fígado de animais alimentados com dieta deficiente em metionina que permaneceram em conforto, seguidos pelos expostos ao estresse térmico (Tabela 1).

Tabela 1 - Expressão de mRNA IGF-I e GHR no fígado de codornas de corte

		IGF-I		GHR	
		Média	DP	Média	DP
SM <sup>1</sup>	Conforto	0.56a	0.06	314.71	44.66
	Estresse	0.47b	0.03	305.14	34.43
DM	Conforto	0.19c	0.02	304.73	41.99
	Estresse	0.24c	0.03	217.89	32.01
Efeitos principais					
Dieta	SM	0.51	0.06	309.93a	37.27
	DM	0.21	0.04	261.31b	57.88
Ambiente	Conforto	0.37	0.002	309.72a	40.47
	Estresse	0.35	0.001	261.52b	55.88
Probabilidades					
	Dieta	<0.0001		0.0271	
	Ambiente	0.3841		0.0281	
	Interação	0.0036		0.0686	

<sup>1</sup>SM, suplementação de metionina; DM, deficiência de metionina

<sup>a, b, c</sup> Letras idênticas na mesma coluna indicam que não há diferença significativa pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

A expressão de mRNA GHR foi influenciada por ambos os fatores avaliados neste trabalho. Com reação a dieta, animais alimentados com suplementação de metionina apresentaram maior expressão que os animais alimentados com dieta deficiente neste aminoácido; já para ambiente, observa-se que maior expressão ocorre em animais que permaneceram apenas em conforto térmico (Tabela 1).

Esses resultados positivos da suplementação de metionina podem estar associados a relatos da literatura que mostram que menor expressão de IGF-I em animais que sofrem restrição alimentar ou privação de um nutriente pode estar associada a reduzida capacidade de ligação GH/GHR, ou mesmo menores níveis de GHR

no fígado (LOUVEAU & LE DIVIDICH, 2002). Sendo assim, manter a nutrição adequada é necessária para correto funcionamento do eixo GH/IGF-I.

Em relação ao estresse térmico, pode-se observar que este fator não só influenciou a expressão de genes do crescimento, mas também reduziu o ganho de peso diário (1,63g vs 0,04g) e o consumo de ração, e aumentou o consumo de água (Figura 1). WILLEMSSEN et al. (2011) observaram menor nível sanguíneo de IGF-I em frangos submetidos a estresse térmico, os quais também apresentaram maiores níveis de T3, T4 e corticosterona, bem como maiores concentrações de TBARS. Estes autores sugerem que o estresse térmico podem induzir o estresse oxidativo, portanto contribuindo para a redução da taxa metabólica.

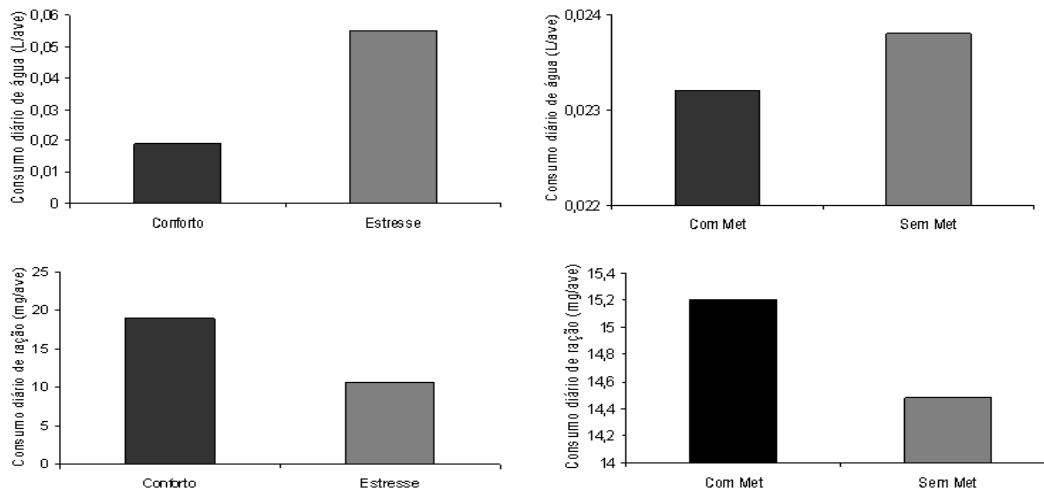


Figura 1- Consumo de ração e água em animais do conforto ou estresse térmico, e alimentados com ou sem suplementação de metionina.

### Conclusões

Nossos resultados sugerem que estresse térmico de 38°C por 24 horas é capaz de afetar negativamente a expressão de genes relacionados ao crescimento, e que a suplementação de metionina pode ser necessária para manter os níveis de mRNA IGF-I e GHR apropriados para o metabolismo animal.

### Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq e a CAPES pelos auxilio financeiro.

### Literatura citada

- GASPARINO, E.; GUIMARÃES, S.E.F.; OLIVEIRA NETO, A.R. et al. The effect of glycerol on mRNA expression of growth hormone, insulin-like growth factor, and mitochondrial breast muscle genes of Japanese quail. **British Poultry Science**, v.53, p.497-507, 2012.
- KIMBALL, S.R.; JEFFERSON, L.S. Signaling pathways and molecular mechanisms through which branched-chain amino acids mediate translational control of protein synthesis. **Journal of Nutrition**, v.136, p.227-231, 2004.
- LOUVEAU, I.; LE DIVIDICH, J. GH and IGF-I binding in adipose tissue, liver, and skeletal muscle in response to milk intake level in piglets. **Gen Comp Endocr.**, v.126, p.310–317, 2002.
- ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L. Brazilian tables for birds and pigs: composition of foods and nutritional requirements. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2005.
- WILLMSSEN, H.; SWENNEN, Q.; EVERAERT, N. et al. Effects of dietary supplementation of methionine and its hydroxy analog DL-2-hydroxy-4-methylthiobutanoic acid on growth performance, plasm hormone levels, and the redox status of broiler chickens expose to high temperatures. **Poultry Science**, v.90, p.2311-2320, 2011.