

Comparação da expressão gênica da UCP em frangos de corte suplementados com diferentes níveis de glicerina

Rayce Dellany dos Santos Alfaia¹, Adriana Costa Oliveira², Fabiana Cristina Belchior de Sousa³, Renan de Sousa Araújo⁴, André Campêlo de Araújo⁵, Katiene Régia Silva Sousa⁶, Leilane Rocha Barros Dourado⁷, Geraldo Fabio Viana Bayão⁸

1 - Universidade Federal do Maranhão

2 - Universidade Federal do Maranhão

3 - Universidade Federal do Piauí

4 - Universidade Federal do Piauí

5 - Universidade Federal do Piauí

6 - Universidade Federal do Maranhão

7 - Universidade Federal do Piauí

8 - Universidade Federal do Piauí

RESUMO - Objetivou-se comparar a expressão gênica da proteína desacopladora (UCP) em frangos de corte suplementados com dietas contendo diferentes níveis de glicerina (0%, 6% e 12%). As amostras de músculo Pectoralis major foram coletadas de seis animais com 42 dias de idade de cada um dos três tratamentos de um delineamento inteiramente casualizado. A expressão relativa do gene UCP foi feita por RT-qPCR usando o sistema de fluorescência SYBR Green e o gene β -actina foi utilizado como controle endógeno. As análises foram feitas pelo proc MIXED do software SAS. O nível de 12% comparado ao de 6% de glicerina alterou a expressão do gene UCP no músculo de frangos de corte aos 42 dias de idade, porém, quando comparado ao controle, não mostrou diferença significativa. Entretanto, é indispensável mais estudos para o melhor entendimento dos mecanismos fisiológicos tanto em nível celular quanto em nível molecular para auxiliar na explicação das diferenças encontradas no desempenho das aves.

Palavras-chave: aves de corte, mRNA, nutrigenômica, síntese de ATP

Comparative gene expression of UCP in broilers supplemented with different levels of glycerin

ABSTRACT - The objective was to compare the gene expression of uncoupling protein (UCP) supplemented with diets containing different levels of glycerin (0%, 6% e 12%) in broiler. The muscle samples were collected from six animals with 42 days old of the three treatments from completely randomized design. The relative gene expression of UCP by RT-qPCR was done using SYBR Green fluorescence and the β -actina gene was used as endogenous control. The analyses were made by proc MIXED of SAS software. The 12% level compared to 6% level altered the UCP gene expression in muscle of broilers of 42 days old, but when compared to control diet did not show significative difference. However, it is necessary more study to better understanding of physiological mechanism in both, cell and molecular levels, for help in explanation of differences on broiler's performance.

Keywords: ATP synthesis, broilers, mRNA, nutragenomics

Introdução

A Nutrigenômica está voltada para o entendimento dos efeitos dos nutrientes sobre os mecanismos envolvidos na expressão gênica e como as mudanças produzidas por essa interação afetam as características de interesse na produção animal (Furlan et al., 2007). A eficiência de um animal em converter alimentos em peso corporal pode estar relacionada com alterações na expressão de genes da cadeia transportadora de elétrons (Bottje; Carstens, 2009), presente nas mitocôndrias. E as proteínas desacopladoras (UCPs) podem causar um vazamento de prótons através da membrana interna das mitocôndrias, por meio da fosforilação de ADP para ATP (Abe et al., 2006). Logo, objetivou-se com este estudo comparar a expressão gênica da UCP em músculo de frangos de corte aos 42 dias de idade suplementados com dietas contendo diferentes níveis de glicerina.

Revisão Bibliográfica

A utilização de subprodutos em dieta de animais de interesse zootécnico pode diminuir o custo de produção e, consequentemente, aumentar a rentabilidade da atividade. A glicerina, um subproduto da indústria do biodiesel, quando financeiramente rentável, pode ser utilizada como substituto parcial do milho por apresentar valores energéticos semelhantes (Silva et al., 2013). Em aves, a inclusão de glicerina na dieta pode afetar características de desempenho assim como influenciar na expressão do RNA mensageiro de alguns genes mitocondriais relacionados à eficiência na síntese de ATP e estresse oxidativo (Gasparino et al., 2012). As mitocôndrias são as organelas encarregadas em transformar a energia química dos metabólitos em energia de fácil acesso à célula, pois são responsáveis em produzir 90% da energia necessária para as células (Schauss et al., 2010). E dentre as proteínas mitocondriais, temos as proteínas desacopladoras (UCPs), que se localizam na membrana interna da organela e têm função de translocação dos prótons e elétrons, desviando a energia de síntese de ATP, para a produção de calor catalisado por um vazamento de prótons. A UCP aviária tem sido o foco de pesquisas em nutrigenômica, pois tem sido descrita como um agente que possibilita a redução da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) protegendo as proteínas celulares e a molécula de DNA, por causar um leve desacoplamento na produção de ATP (Abe et al., 2006). A eficiência na produção de energia está relacionada com a eficiência do animal em transformar alimento em músculo (Bottje; Carstens, 2009). Ojano-Diran et al. (2007) constataram que a expressão do RNAm dessa proteína pode piorar a conversão alimentar, enquanto Evock-Clover et al. (2002) observaram que a expressão da UCP pode estar influenciada pelo estado nutricional do animal, havendo um aumento na expressão da UCP no músculo esquelético de aves em jejum.

Materiais e Métodos

O experimento foi conduzido no Setor de Avicultura do Colégio Técnico Agrícola da Universidade Federal do Piauí, Campus Profª Cinobelina Elvas (Bom Jesus- PI). O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com três tratamentos (0, 6 e 12% de glicerina) e seis repetições de cinco aves cada. Foi utilizada ração formulada à base de milho e farelo de soja (referência), conforme recomendações nutricionais de Rostagno et al. (2005) e as demais obtidas pela inclusão da glicerina à referência. Seis aves de cada tratamento foram abatidas por deslocamento cervical ao final dos 42 dias e coletaram-se amostras de músculo Pectoralis major, que foram armazenadas em microtubos de 2mL contendo RNA Holder® (BioAgency Biotecnologia, Brasil), e posteriormente, armazenadas em freezer -80°C até a extração do RNA. No laboratório de Biotecnologia Animal (Labtec) (UFV-MG), o RNA total foi extraído de 100 mg do fígado com uso do reagente Trizol® (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) de acordo com as normas do fabricante. Para confecção do cDNA, foi utilizado o kit ProtoScript M-MuLV First Strand cDNA Synthesis (New England, BioLabs Inc., Ipswich, Massachusetts, USA), de acordo com as normas do fabricante. Para as reações de PCR em tempo real, foi utilizado o sistema de detecção de fluorescência GoTaq®qPCR Master Mix (Promega Corporation, Madison, WI, USA). Os primers utilizados nas reações para a amplificação do UCP e do controle endógeno β -actina foram desenhados por meio do programa Primer Quest (www.idtdna.com/Scitools/Applications/PrimerQuest) fornecido pela Integrated DNA Technologies Inc (Coralville, IA) a partir de sequências de nucleotídeos obtidas do banco de dados do GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Os resultados obtidos em C_t foram analisados com proc MIXED do software SAS (versão 9.0), as médias dos contrastes foram comparadas pelo teste t de Student e a expressão relativa está apresentada em $2^{-\Delta C_t}$ (Livak; Schmittgen, 2001).

Resultados e Discussão

Na figura 1 pode-se observar as diferenças significativas para a expressão do RNAm no músculo do peito das aves em função da suplementação com glicerina. Os animais que consumiram dietas contendo 12% de glicerina tiveram aumento de 3,22 vezes na expressão gênica da UCP no músculo do peito quando comparado com aqueles das dietas de 6%, todavia quando comparado ao grupo controle não se observou diferença significativa. Entretanto, Silva et al. (2012) ao estudarem a UCP em codornas, concluíram que a inclusão de 12% de glicerol na dieta diminui a expressão gênica dessa proteína nesses animais. Liu et al. (2007) afirmaram que o gene da UCP pode ser candidato ou estar ligado a um gene principal que afeta o metabolismo do músculo e gordura em aves, possivelmente aqueles que regulam a oxidação de ácidos graxos; sobretudo durante o estresse metabólico, através do transporte de prótons desses ácidos para fora da mitocôndria. O aumento percebido na expressão de UCP nas aves suplementadas com 12 % de glicerina pode ter ocorrido para minimizar a síntese de radicais livres excedentes; uma vez que esta proteína aumenta a dissipação de energia pela oxidação na mitocôndria, como meio de manter a produção de ATP, pois sua diminuição pode conduzir a aumento de catabolismo dos nutrientes. Além disso, as alterações celulares e fisiológicas induzidas pela suplementação de glicerina sobre a função mitocondrial pode depender de uma variedade de fatores, incluindo, a quantidade de glicerol existente nela, a amostra de tecido estudada, espécies animais e níveis de concentração da glicerina avaliados (Gasparino et al., 2012). Mas, vale ressaltar que são necessários estudos relacionados com genes de ação na síntese de ATP para melhor entendimento das interações entre os genes e a influência deles na UCP.

Conclusões

A inclusão de 12% de glicerina na suplementação de frangos de corte altera a expressão do gene UCP, entretanto, há a necessidade de mais estudos sobre a expressão deste gene para um maior entendimento dos mecanismos genéticos, moleculares e fisiológicos para direcionar a seleção genética para melhor resposta efetiva a nutrição.

Gráficos e Tabelas

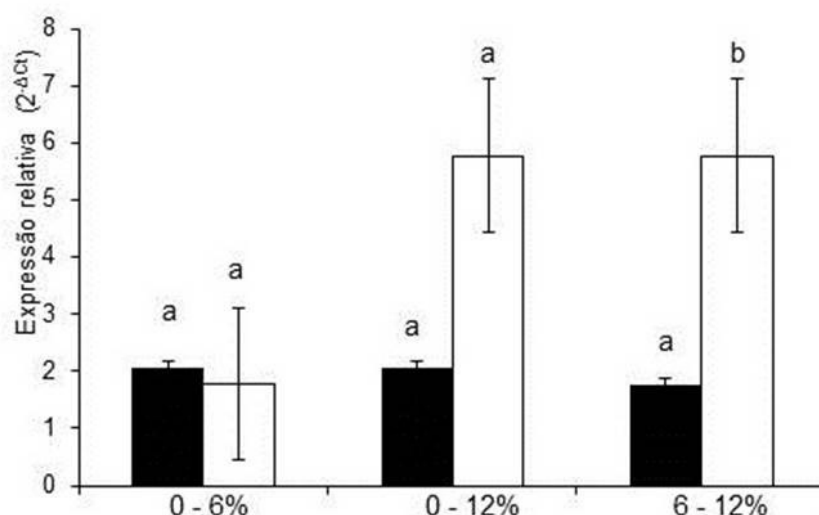


Figura 1. Expressão relativa ($2^{-\Delta Ct}$) da proteína desacopladora (UCP) no músculo *Pectoralis major* de frangos de corte aos 42 dias de idade suplementados com diferentes níveis de glicerina (0%, 6% e 12%). Diferentes letras indicam diferença estatística significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos.

(<http://cdn5.abz.org.br/wp-content/uploads/2017/03/figura-UCP-revisada.jpg>)

Referências

ABE, T.; MUJAHID, A.; SATO, K. 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. BOTTJE, W.G.; CARSTENS, G.E. Association of mitochondrial function and feed efficiency in poultry and livestock species. *Journal of Animal Science*, v.87, p.E48-E63, 2009. EVOCK-CLOVER, C.M.; POCH, S.M.; RICHARDS, M.P. et al. Expression of an uncoupling protein gene homologue in chickens. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A- Molecular & Integrative Physiology*, v.133, p.345-358, 2002. FURLAN, L. R., FERRAZ, A.L.J., BORTOLOSSI, J. C. A genômica funcional no âmbito da produção animal: estado da arte e perspectivas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.36, supl especial, p.331-341, 2007. GASPARINO, E.; GUIMARÃES, S.E.F.; MARTINS, E.N. Effect of glycerol on mRNA expression of growth hormone, insulin-like growth factor, and mitochondrial breast muscle genes of Japanese quails. *Poultry Science*, v. 53 (4), p. 497-507, 2012. LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, v.25, p.402-408, 2001. LIU, S., WANG, S.Z., LI, H.Z., LI, H. Association of single nucleotide polymorphism of chicken uncoupling protein gene with muscle and fatness traits. *Journal Animal Breeding and Genetics* 124, p.230-235, 2007. 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.; DONZELE, J.L.; GOMES, P.C.; OLIVEIRA, R.T.; LOPES, D.C.; EUCLIDES, R.F. Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos. Composição de Alimentos e Exigências Nutricionais. 3.Ed. Viçosa, MG: UFV, p.254, 2005. SCHAUSS, A.C.; HUANG, H.; CHOI, S.Y. et al. A novel cell-free mitochondrial fusion assay amenable for high-throughput screenings of fusion modulators. *BMC Biology*, v.8, p.100, 2010. SILVA, S. C. C. da; GASPARINO, E.; VOLTOLINI, O.M. Expressão de mRNA de genes mitocondriais e desempenho produtivo de codornas alimentadas com glicerol. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.48, n.2, p.228-233, 2013.

