

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS PÓS-
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

JOSIVANDA SANTOS ALMEIDA

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES RELACIONADOS À
TERMOTOLERÂNCIA EM FRANGOS COMERCIAIS E GALINHAS
CAIPIRAS SUBMETIDOS AO ESTRESSE POR CALOR**

Ilhéus- Bahia

2020

JOSIVANDA SANTOS ALMEIDA

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES RELACIONADOS À
TERMOTOLERÂNCIA EM FRANGOS COMERCIAIS E GALINHAS
CAIPIRAS SUBMETIDOS AO ESTRESSE POR CALOR**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal. Linha de pesquisa: Produção e comportamento animal.

Área de concentração: Ciência Animal

Orientador: Prof. Dr. Amauri Arias Wenceslau

Ilhéus- Bahia

2020

A447

Almeida, Josivanda Santos.

Expressão diferencial de genes relacionados à termotolerância em frangos comerciais e galinhas caipiras submetidos ao estresse por calor / Josivanda Santos Almeida. – Ilhéus, BA: UESC, 2020.

xvi, 135 f.: il.

Orientador: Amauri Arias Wenceslau.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.

Inclui referências.

1. Ave doméstica – Efeito da temperatura. 2. Expressão gênica. 3. Reação em cadeia de polimerase. 4. Homeostase. 5. Apoptose. I. Título.

CDD 636.513

JOSIVANDA SANTOS ALMEIDA

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES RELACIONADOS À
TERMOTOLERÂNCIA EM FRANGOS COMERCIAIS E GALINHAS
CAIPIRAS SUBMETIDOS AO ESTRESSE POR CALOR**

Ilhéus – BA, 18/02/2020

Amauri Arias Wenceslau -DScUESC/ DCAA (Orientador)

Antonio Amandio Pinto Garcia Junior- /DSc UESB/DTRA

Juneo Freitas Silva - DScUESC/DCB

Paula Elisa Brandão Guedes – DScUESC

Paulo Luiz Souza Carneiro - DSc UESB/DCB

ILHÉUS-BAHIA

2020

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, que sempre foi o autor da minha vida e do meu destino. Aos que estiveram ao meu lado nessa jornada e aos que suportaram minha ausência em vários momentos, como meu filho Charles Miller e meu companheiro Charles. Aos sonhadores e a todas as mulheres batalhadoras.

Adaptar-se é preciso!

Nossa mente também nos limita!

*Deixe de lado a ansiedade e comece
enfrentando todos os fantasmas da sua
vida!*

Conselhos

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar à Deus por ter me dado força para superar todas as dificuldades.

Ao meu orientador, o Prof. Dr. Amauri Arias Wenceslau, pela orientação, pela paciência. Um dos melhores orientadores, com ótima personalidade e sempre nos dando autonomia sem as tais cobranças exageradas.

À UESC pela infraestrutura.

A UESB e a todos que trabalham no setor de avicultura, por possibilitar a realização do nosso experimento e, por toda colaboração.

Ao meu co-orientador Paulo Carneiro por sempre acreditar em meu potencial e por toda ajuda com o experimento e projeto.

Aos professores do curso de pós-graduação em Ciência animal e do Hospital Veterinário por compartilharem conhecimentos com a bióloga aqui, possibilitando a visão diferente de pesquisa.

Aos funcionários do Hospital Veterinário da UESC pelo auxílio técnico. E, Aos meus colegas do curso, pela parceria nessa caminhada, sempre preocupados comigo, em especial a minha amiga Piauiense Mirian pela amizade, pelo companheirismo, pelas caminhadas no campo da UESC, pelo cuscuz, pelas Maria Isabel, por tudo. Você suavizou minha estadia no Salobrinho.

A Fapesb pela bolsa.

A Haniel Cedraz por estar sempre paciente disposto a ajudar e por toda colaboração na realização desse trabalho.

À Juliana Gromboni, pela amizade, por me iniciar na genética molecular... E por ser uma pessoa boníssima, sempre disposta a ajudar, mesmo após ter terminado suas atividades na UESC.

Aos grandes parceiros do nosso grupo de pesquisa, cujas adversidades nos uniram: Carolina Barbosa, além de ser amiga, parceira, de estar sempre comigo no laboratório, é colega de ansiedade, das noites mal dormidas, das conversas nas madrugadas; Nathana, outra parceira que veio morar comigo e ajudou muito no tratamento de ansiedade; O professor Pedro Leite por todo companheirismo, ajudas e conselhos. Os ICs Teillor e Iago. Com vocês, a frase a “União faz a força” tem muito mais sentidos. #tamojunto#.

Por último agradeço à todos que me amam e que estiveram o meu lado nessa jornada: Meu filho Charles Miller que teve que se acostumar, aos 04 anos a não ter a mãe todos os dias; meu esposo que sempre me apoiou nas loucuras e aceitou viver essa etapa de andanças comigo. Vocês são tudo na minha vida.

Aos meus pais, por me terem dado educação, valores e por me terem ensinado a andar.

À minha irmã Cilda pela amizade companheirismo, e por me substituir com meu filho em muitos momentos que não pude estar.

A minha cunhada Sarah, por cuidar sempre da minha casa, do meu filho, do tadinho dela e por sempre deixar comidinhas gostosas prontas nos dias que eu chegava de viagem.

A todos os meus familiares, irmãos, enteados, sobrinhos, tias de Charles e sobrinha de Charles. Obrigada à todos!

Portanto, deixo aqui expressos meus sinceros agradecimentos, personificados em nos trechos da música Caminhos do coração – Gonzaguinha:

“E aprendi que se depende sempre
De tanta, muita, diferente gente
É tão bonito quando a gente entende
Que a gente é tanta gente
Onde quer que a gente vá.
É tão bonito quando a gente vai à vida
Nos caminhos onde bate, bem mais forte o coração
É tão bonito quando a gente sente
Que nunca está sozinho
Por mais que pense estar...”

OBRIGADA!

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES RELACIONADOS À
TERMOTOLERÂNCIA EM FRANGOS COMERCIAIS E GALINHAS
CAIPIRAS SUBMETIDOS AO ESTRESSE POR CALOR**

RESUMO

O Brasil detém importância mundial no setor da avicultura fornecendo frangos de alta produtividade e firmando-se como um grande produtor e exportador mundial de carne de frango. Para aperfeiçoar suas características produtivas, o frango de corte passou por intensa seleção genética, bem como a melhorias no manejo, sanidade e controle de temperatura. Entretanto, a alta produtividade resultou na diminuição da capacidade adaptativa dessas aves. Já as galinhas de criação caipira como a Peloco e a Caneluda, são rústicas, estão localmente adaptadas, sendo criadas com pouco controle zootécnico em sistema de avicultura familiar, constituem uma boa alternativa para a região Nordeste do Brasil. Além disso, as aves caipiras possuem combinações alélicas importantes para o futuro das raças comerciais, entretanto muitas raças dessas aves encontram-se ameaçadas de extinção, necessitando de pesquisas que garanta seu uso sustentável e sua conservação. Quando expostos ao calor, os organismos alteram a expressão genes específicos que vão atuar gerando resposta ao estresse por calor, buscando restabelecer a o homeostase corporal do organismo estressado. Para essa pesquisa, objetivou-se avaliar a expressão de genes envolvidos na resposta ao estresse térmico, oxidativo, do retículo endoplasmático e da apoptose. Nos capítulos 01, 02 e 04 utilizamos fragmentos de rim de 36 aves pertencentes a três grupos genéticos (Cobb 500®; e os ecótipos locais Peloco e Caneluda). As análises do capítulo 03 envolveram fragmentos de coração, fígado, músculo e rim de 24 frangos de dois grupos genéticos (Cobb 500®; e o ecótipo local Peloco), sendo utilizados em ambos os trabalhos 12 indivíduos de cada grupo, em que, 06 aves de cada grupo foram submetidos ao tratamento estresse térmico agudo de 39,5°C e as outras 06 foram mantidas em conforto térmico à 23°C. Inicialmente avaliou-se a estabilidade dos genes *ACTB*, *RPL5*, *MRPS27*, *MRPS30*, *TFRC*, *EEF1*, *LDHA*, *HPRT1*, afim estabelecer o gene mais estável a ser utilizado como normalizador para o tecido renal no presente trabalho. As análises foram feitas utilizando a técnica de RT-qPCR e a estabilidade dos genes foi determinada usando 04 algoritmos diferentes. No *ranking* geral, os genes *LDHA*, *HRPT1* e *MRPS30*

foram considerados os mais estáveis. O gene menos estável foi o *ACTB*, não sendo recomendado como normalizador em experimento de condições semelhantes aos aqui estabelecidos. Em seguida, avaliou-se expressão dos seguintes genes alvos: *HSP70*, *HSP90*, *HSF1*, *HSF3*, *CAT*, *SOD1 GPx7* e *CASP6*, no rim e *GRP78*; *EI2F α* ; *IRE1* e *ATF6* em coração, fígado, músculo e rim). O gene *LDHA* foi utilizado como o normalizador dos genes analisados no tecido renal no presente trabalho. Para os outros tecidos, utilizamos normalizadores previamente estabelecidos, o *RPL5*, para fígado e coração e *MRPS27*, para o músculo. Observou-se que o estresse térmico agudo não aumentou a atividade do mRNA de nenhum dos genes relacionados ao estresse térmico, oxidativo, caspase 6 e, da maioria dos genes relacionados ao estresse do Retículo Endoplasmático. Apenas o gene *GRP78* demonstrou diferenças significativas em dois tecidos (coração e rim), sendo que ambos os grupos genéticos (GG) aumentaram a expressão do gene após o estresse térmico agudo. Nas comparações entre os GG, os genes *HSP70* e *HSP90*, apresentaram expressão maior linhagem comercial que nas galinhas caipiras e como esses genes são essenciais na resposta ao estresse térmico, sua maior expressão sugere que as aves comerciais foram mais afetadas pelo estresse térmico agudo. Os genes *HSF1*, *HSF3*, *CAT*, *SOD1 GPx7* e *CASP6* apresentaram menores níveis de expressão na linhagem comercial enquanto que as aves Peloco evidenciaram maior atividade de todos esse genes, exceto para a *CASP6*, onde o ecótipo Caneluda mostrou expressão um pouco maior que os outros grupos genéticos. Em relação estresse do Retículo endoplasmático, diferenças significativas de expressão entre os GG foram observadas nos genes *EI2FA* e *GRP78* fígado, em que linhagem comercial expressou níveis maiores do que o ecótipo Peloco. Nas análises com os genes *ATF6*, *EI2FA* e *IRE1* no rim, a galinha caipira expressou os maiores níveis. No coração não houve diferença na atividade dos genes entre os grupos genéticos. E no tecido muscular nenhum dos tratamentos (GG, AMB e GGXAMB) mostrou diferenças significativas de expressão dos genes. Esses resultados aqui apresentados para ecótipos Peloco e Caneluda mostram que muitas vezes, essas aves já possuem maior expressão no ambiente conforto sugerindo que as mesmas são mais tolerantes ao estresse térmico. Além disso, o presente trabalho traz informações inéditas que poderão ajudar no desenvolvimento de estratégias para seu uso sustentável e conservação.

DIFFERENTIAL EXPRESSION OF GENES RELATED TO THERMOTOLERANCE IN COMMERCIAL CHICKENS AND CAIPIRAS CHICKENS SUBMITTED TO HEAT STRESS

ABSTRACT

Brazil has a worldwide importance in the poultry sector, supplying highly productive chickens and establishing itself as a major world producer and exporter of chicken meat. In order to improve its productive characteristics, the broiler chicken underwent intense genetic selection, as well as improvements in handling, health and temperature control. However, the high productivity resulted in a decrease in the adaptive capacity of these birds. Farmers' hens, like Peloco and Caneluda, are rustic, are locally adapted, raised with little zootechnical control in a family poultry system, and are a good alternative for the Northeast region of Brazil. In addition, free-range birds have allele combinations that are important for the future of commercial breeds, however many breeds of these birds are threatened with extinction, requiring research to ensure their sustainable use and conservation. When exposed to heat, organisms alter the expression of specific genes that will act to generate heat stress response, seeking to restore the body's homeostasis of the stressed organism. For this research, the aim was to evaluate the expression of genes involved in the response to thermal, oxidative stress, endoplasmic reticulum and apoptosis. In chapters 01, 02 and 04 we used kidney fragments from 36 birds belonging to three genetic groups (Cobb 500®; and the local ecotypes Peloco and Caneluda). The analyzes of chapter 03 involved fragments of heart, liver, muscle and kidney from 24 chickens from two genetic groups (Cobb 500®; and the local ecotype Peloco), being used in both works 12 individuals from each group, in which 06 birds in each group were subjected to acute thermal stress treatment of 39.5°C and the other 06 were kept in thermal comfort at 23 ° C. Initially, the stability of the *ACTB*, *RPL5*, *MRPS27*, *MRPS30*, *TFRC*, *EEF1*, *LDHA*, *HPRT1* genes was evaluated, in order to establish the most stable gene to be used as a normalizer for renal tissue in the present study. The analyzes were made using the RT-qPCR technique and the stability of the genes was determined using 04 different algorithms. In the general ranking, the *LDHA*, *HPRT1* and *MRPS30* genes were considered the most stable. The least stable gene was *ACTB*, not being recommended as a normalizer in an experiment with conditions similar

to those established here. Then, expression of the following target genes was evaluated: HSP70, HSP90, *HSF1*, *HSF3*, *CAT*, *SOD1 GPx7* and *CASP6*, in the kidney and *GRP78*; *EI2Fα*; *IRE1* and *ATF6* in heart, liver, muscle and kidney). The *LDHA* gene was used as the normalizer of genes analyzed in renal tissue in the present study. For other tissues, we used previously established normalizers, *RPL5*, for liver and heart and *MRPS27*, for muscle. It was observed that acute thermal stress did not increase the mRNA activity of any of the genes related to thermal, oxidative stress, caspase 6 and, most of the genes related to Endoplasmic Reticulum stress. Only the *GRP78* gene demonstrated significant differences in two tissues (heart and kidney), and both genetic groups (GG) increased the expression of the gene after acute thermal stress. In the comparisons between the GG, the HSP70 and HSP90 genes, showed greater commercial lineage expression than in free-range chickens and as these genes are essential in the response to thermal stress, their greater expression suggests that commercial birds were more affected by acute thermal stress. The *HSF1*, *HSF3*, *CAT*, *SOD1 GPx7* and *CASP6* genes showed lower levels of expression in the commercial line while the Peloco birds showed greater activity of all these genes, except for *CASP6*, where the Caneluda ecotype showed slightly higher expression than the others genetic groups. Regarding the stress of the endoplasmic reticulum, significant differences in expression between the GGs were observed in the *EI2FA* and *GRP78* liver genes, in which the commercial strain expressed higher levels than the Peloco ecotype. In analyzes with the *ATF6*, *EI2FA* and *IRE1* genes in the kidney, the free-range chicken expressed the highest levels. In the heart, there was no difference in gene activity between genetic groups. And in muscle tissue none of the treatments (GG, AMB and GGXAMB) showed significant differences in gene expression. These results presented here for Peloco and Caneluda ecotypes show that often, these birds already have greater expression in the comfort environment, suggesting that they are more tolerant to thermal stress. In addition, the present work brings new information that may help in the development of strategies for its sustainable use and conservation.

Keywords: RT-qPCR, Reference Genes, HSPs, HSFs, Antioxidant Enzymes, Peloco, Apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Ilustração publicado no site do The Washington Post mostrando o avanço no peso do frango comercial do final dos anos 50 até o início dos anos 2000.....5
- Figura 2:** Frango de corte da linhagem Cobb 500® (AVIGUIA, 2019).....5
- Figura 3:** Ecótipo Peloco **A**- Peloco na idade jovem, mostrando perfil do ecótipo (empenamento tardio) e **B** – Peloco fêmea na adulta.....7
- Figura 4:** Ecótipo Caneluda.....8

CAPÍTULO I

- Figura 1.** Gel evidenciando a qualidade do RNA.....44
- Figura 2:** Curvas de regressão, amplificação e dissociação do teste de eficiência de oito genes de referência de frangos provenientes das reações de RT-Qpcr.....45
- Figura 3:** Gráfico gerado pelo *Heatmap* comparando os valores de Cts provenientes das reações de RT-qPCR de oito genes candidatos e analisando em função da interação Grupo genéticos.....51

CAPÍTULO II

- Figura 01-** Gráfico gerado pelo *Heatmap* comparando os valores de Cts provenientes das reações de RT-qPCR em fragmentos de rim dos genes *HSF1*, *HSF3*, *HSP70*, *HSP90*; *CAT*, *SOD1* e *GPx7* em três grupos genéticos divergente = Peloco, Cobb 500® e Caneluda.....75

CAPÍTULO III

- Figura 01:** Análise de Componentes Principais (PCA). O PC1 (94,7%) O PC2 que explica 4,35%.....101

Figura 02: Gráfico gerado pelo Heatmap comparando os valores de Cts provenientes das reações de RT-qPCR em fragmentos fígado de quatro genes relacionados ao estresse do retículo endoplasmático analisando em função da interação Grupo genéticos (PC = Peloco Conforto, PE = Peloco Estresse, CC = Cobb 500® Conforto, CE= Cobb 500® Estresse. Os tons mais para verde são os menores valores de expressão e os mais para vermelho, os maiores.....103

CAPÍTULO IV

Figura 01. Curvas de regressão e dissociação do teste de eficiência do gene *CASP6* em reações RT-qPCR.....127

Figura 2. Perfil de expressão do gene *CASPASE6* em fragmentos de rim de frangos de linhagem comercial Cobb 500® e dos ecótipos caneluda e Peloco submetidos ao conforto térmico (23°C) e estresse térmico agudo (39,5°C).....128

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 01: Composição da ração que foi usada para os pintainhos até os 30 dias de idade segundo ROSTAGNO; GOMES (2011).....	40
Tabela 02. Descrição dos genes de referência de <i>Gallus gallus</i> e seus <i>primers</i> específicos utilizados nas análises de RT-qPCR.....	42
Tabela 03: Parâmetros dos <i>primers</i> específicos dos Genes de Referência para frangos obtidos a partir das análises de curva de Eficiência em RT-qPCR.....	45
Tabela 04: Estatísticas descritivas dos níveis de expressão dos genes de referência obtidos pelo BestKeeper, em rim de grupos genéticos diferentes de frangos.....	47
Tabela 05: Estatísticas descritivas dos níveis de expressão dos genes de referência em rim de frangos obtidos pelo BestKeeper (n=36).....	48
Tabela 06. <i>Ranking</i> com os valores de estabilidade de cada fator (raça e ambiente) em rim de frangos, obtidos através da ferramenta BestKeeper.....	49
Tabela 07. <i>Ranking</i> com os valores de estabilidade de cada fator (raça e ambiente) em rim de frangos, obtidos através da ferramenta GeNorm.....	49
Tabela 08. <i>Ranking</i> com os valores de estabilidade de cada fator (raça e ambiente) em rim de frangos, obtidos através da ferramenta NormFinder.....	50
Tabela 09. <i>Ranking</i> geral dos genes de referência em rim de frangos, obtidos com as diferentes ferramentas (Bestkeeper, GeNorm e NormFinder) e ranqueado pelo pacote RankAggreg.....	51

CAPÍTULO II

Tabela 01: Descrição dos genes alvos e do normalizador e seus *primers* específicos utilizados nas análises de RT-qPCR em rim de frangos submetidos ao conforto térmico e estresse térmico agudo.....72

Tabela 02: Médias e desvio padrão para expressão dos genes em rim de frangos geneticamente divergentes após ANOVA.....74

CAPÍTULO III

Tabela 01: Composição da ração que foi usada para os pintainhos até os 30 dias de idade segundo ROSTAGNO; GOMES (2011).....96

Tabela 02: Descrição dos genes relacionados ao estresse do retículo endoplasmático e seus *primers* específicos utilizados nas análises de RT-qPCR em diferentes tecidos de frangos submetidos ao conforto térmico e estresse térmico agudo.....99

Tabela 03. Médias e desvio padrão para expressão dos genes cada tecido após ANOVA.....102

CAPÍTULO IV

Tabela 01: Descrição dos genes alvos e do normalizador e seus *primers* específicos utilizados nas análises de RT-qPCR em rim de frangos submetidos ao conforto térmico e estresse térmico agudo.126

LISTA DE ABREVIATURAS

- μg : micrograma
- μL : microlitro
- cDNA: DNA complementar
- Ct: cycle threshold
- DNA: ácido desoxirribonucleico
- RNA: ácido ribonucleico
- mL: mililitro
- mM: milimolar
- mRNA: RNA mensageiro
- ng: nanograma
- GR: gene de referência
- PCR: reação em cadeia da polimerase
- RT-qPCR: PCR quantitativa em tempo real
- *ACTB*: beta actina
- *HPRT1*: hipoxantina fosforibosiltransferase 1
- *MRPS27*: proteína ribossômica mitocondrial S27
- *TFRC*: receptor de transferrina
- *MRPS30*: proteína ribossômica mitocondrial S30
- *RPL5*: proteína ribossomal L5
- *EEF1*: fator de alongamento de tradução eucariótica alfa1
- *LDHA*: lactato desidrogenase A
- CV: Coeficiente de Variação
- DP: Desvio Padrão
- *HSF1*: fator de choque térmico 1
- *HSF3*: fator de choque térmico 3
- HSP70: proteína de choque térmico 70 KDa
- HSP90: proteína de choque térmico 90 KDa
- *CAT*: CATALASE
- GPX: glutationa peroxidase
- SOD: superóxido dismutase
- UPR: respostas as proteínas mal dobradas
- RE: Retículo endoplasmático
- *GRP78*: glucose-regulated protein78-kDa
- Eif2 α : α -subunit of eukaryotic initiation factor 2
- *IRE1*: Inositol-requiring enzyme 1
- *ATF6*: Activating Transcription Factor 6
- CASP-6: caspase=6

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.	3
2.1. A consolidação da avicultura brasileira.....	3
2.2. Galinhas Nativas.....	6
2.3. Avicultura Familiar.....	9
2.4. Estresse térmico nas aves.....	10
2.5. Genes Relacionados ao Estresse térmico.....	12
2.5.1 As Proteínas de Choque Térmico – HSPs e os Fatores de Transcrição – HSFs.....	12
2.6. Estresse oxidativo	14
2.7. As caspases e a morte celular programada.....	15
2.8. Estresse do retículo endoplasmático.....	16
2.9, Estudo da Expressão gênica.....	17
3. Genes de Referencia.....	18
3.1 Análise de estabilidade dos genes de referência.....	19
4. REFERÊNCIAS.....	21
5. OBJETIVOS.....	34
5.1 Objetivo geral.....	34
5.2 Objetivos específicos	34
6.CAPÍTULO I.....	35
1. INTRODUÇÃO.....	38
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
2.1 Aprovação do CEUA.....	39
2.2 Animais	39
2.3 Estresse térmico	40
2.4 Coleta de tecidos, extração de RNA e quantificação	41
2.5 Transcrição Reversa do mRNA	41
2.5 Expressão gênica: validação dos genes de referência.....	42
2.7 PCR quantitativa em tempo real	43
2.8 Determinação da estabilidade da expressão dos genes de referência.....	43

3. RESULTADOS.....	44
3.1 Eficiência e especificidade dos primers.....	44
3.2 Estatística descritiva dos genes de referência.....	46
3.3 Estabilidade de expressão dos genes de referência.....	48
4. DISCUSSÃO.....	52
5. CONCLUSÃO.....	57
6. REFERÊNCIAS.....	57
7. CAPÍTULO II.....	64
1. INTRODUÇÃO.....	67
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	68
2.1. Animais.....	68
2.2. Estresse térmico.....	69
2.3. Coleta de tecidos, extração de RNA e quantificação.....	70
2.4. Transcrição Reversa do mRNA.....	70
2.5, PCR quantitativa em tempo real.....	71
2.6. Expressão nos Genes Alvos.....	72
2.7 Análises estatísticas.....	73
3. RESULTADOS.....	73
3.1 Eficiência e especificidade dos <i>primers</i>	73
4. DISCUSSÃO.....	75
5. CONCLUSÕES.....	81
6. REFERÊNCIAS	81
8. CAPÍTULO III.....	90
1. INTRODUÇÃO.....	93
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	94
2.1 Animais e Experimento.....	94
2.2 Coleta de tecidos, extração e quantificação.....	96
2.3 Transcrição Reversa do mRNA.....	97
2.4 Eficiência e PCR quantitativa em tempo real	97
2.5 Expressão nos Genes Alvos.....	98
2.6 Análises estatísticas.....	99

3. RESULTADOS.....	100
3.1 Expressão relativa dos genes alvo.....	100
4. DISCUSSÃO.....	103
5. CONCLUSÃO.....	110
6. REFERÊNCIAS	110
9. CAPÍTULO IV.....	118
1. INTRODUÇÃO.....	122
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	123
2.1 Experimento de Estresse térmico.....	123
2.2 Coleta de tecidos, extração, quantificação e transcrição reversa do mRNA.....	124
2.3 Expressão gênica.....	125
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	126
3.1 Eficiência e especificidade dos <i>primers</i>.....	127
3.2 Expressão relativa da <i>CASPASE6</i>.....	127
4. CONCLUSÃO.....	129
5. REFERÊNCIAS.....	130
10. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	134

1. INTRODUÇÃO GERAL

A produção de frangos de corte, nos dias atuais, é uma atividade econômica mundial e uniforme, sem fronteiras geográficas de tecnologia (RODRIGUES et al., 2014). Sua carne é um dos principais alimentos que compõem a dieta humana, sendo o frango, a segunda proteína animal mais consumida no mundo (ARANDA et al., 2017).

No Brasil, a avicultura tem grande impacto econômico, uma vez que o país se destaca tanto como produtor quanto como exportador mundial de carne de aves (ver ABPA, 2019). Essa potencialização do agronegócio de frango de corte no Brasil e no mundo está fundamentada na utilização da genética avançada para selecionar indivíduos mais produtivos e também, na melhora de outros aspectos como nutrição, manejo e sanidade (SCHMIDT; SILVA, 2018). Esses fatores favorecem a expressão do potencial genético selecionado, resultando em um frango de corte precoce e com grande eficiência para converter diferentes alimentos em proteína animal (OLIVEIRA; NÄÄS, 2012; PATRICIO et al., 2012; RODRIGUES et al., 2014; SCHMIDT; SILVA, 2018). Entretanto, as aves selecionadas geneticamente para alto desempenho tem, conseqüentemente, sua capacidade de adaptação diminuída (OLIVEIRA et al., 2019; WANG et al., 2019; SOBREIRA; VIOLA, 2019). De forma geral, sua termorregulação é deficiente para enfrentar condições climáticas de regiões tropicais e isso pode interferir de maneira negativa na produtividade e na qualidade da carne de aves das linhagens comerciais, principalmente pela alta taxa de mortalidade, diminuição da ingestão de água e alimento nessas regiões (WANG et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2019). Além disso, a intensificação do aquecimento global tem aumentado os gastos com refrigeração, tornando o estresse térmico problema sério para a indústria avícola (XIONG et al., 2020).

Os ecótipos de galinhas naturalizadas como a Peloco e a Caneluda, fazem parte da avicultura familiar e, são criadas em sistema caipira, com instalações rústicas, carentes de manejo reprodutivo, nutricional e sanitário e, nesses ambientes, desenvolveram características únicas de tolerância a estresses climáticos (CEDRAZ et al., 2017; SOBREIRA; VIOLA, 2019). Pela sua forma de criação e também pelo fato de possuírem índices de produção bem menores que as comerciais, muitas raças de galinhas locais brasileiras desapareceram ou estão ameaçadas de extinção uma vez estas

foram substituídas pelas linhagens melhoradas geneticamente e com altos índices de produção (ALMEIDA et al., 2019).

As populações de galinhas locais são apontadas como fontes de recursos genéticos e podem servir de reservatórios de alelos, capazes de melhorar a resistência de outras raças por meio de cruzamentos, bem como serem úteis para eventuais mudanças no mercado e/ou no interesse dos consumidores de carne de frango. Nessas circunstâncias, é imprescindível o conhecimento de suas potencialidades, bem como sua variabilidade genética para fins de conservação, desenvolvimento de estratégias de uso sustentável e conservação dessas raças (ALMEIDA et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2014; ALMEIDA, 2016).

Pesquisas atestam que o estresse térmico nas aves pode desencadear alterações metabólicas, enzimáticas e de expressão de genes, os quais geram respostas fisiológicas a fim de manter a homeostase (SEIDL et al., 2009; AL-ZGHOUL et al., 2019). Assim, em resposta às perturbações ocorridas no ambiente, o organismo altera sua atividade gênica demonstrando que há uma regulação seletiva na expressão dos genes que conduz a síntese de proteínas específicas nas células (REGITANO; COUTINHO, 2001).

Dentre esses genes, estão às Proteínas de Choque Térmico (HSPs), também conhecidas como chaperonas. A expressão das HSPs representa um mecanismo universal desenvolvido por todos os organismos para lidar com as alterações adversas do ambiente e essas proteínas desempenham papéis cruciais na proteção de células em condição de estresse (SCHLESINGER, 1986; YELLON; MARBER, 1994; GABRIEL et al., 2002; MURUGESAN et al., 2017; YIN et al., 2018; XU et al., 2019). A regulação e a expressão gênica das HSPs são controladas por fatores de transcrição que podem ser ativados quando o organismo é submetido ao estresse. Esses fatores são conhecidos por Fatores de Transcrição do Choque Térmico (HSFs) (AKERFELT et al., 2010; FUJIMOTO; NAKAI, 2010).

Além dos danos celulares causados pelo estresse térmico, a alta temperatura também pode prejudicar o estado antioxidativo das aves, acumulando radicais livres e levando a queda do desempenho produtivo (AL-ZGHOUL et al., 2019). Nesse sentido, o organismo responde através da expressão de genes que codificam enzimas antioxidantes como a Superóxido Dismutase (SOD), *CATALASE* (*CAT*) e Glutationaperoxidase (GPX), diminuindo os efeitos negativos nas células (MUJAHID et al., 2005).

O estresse térmico também pode levar ao estresse do retículo endoplasmático-RE e até apoptose. Quando isso ocorre há alterações na expressão de genes como o *GRP78*, *IRE1*, *PERK*, *ATF6* e *CASP6*, desencadeando a ativação de vias importantes para reverter o estresse da organela ou conduzir à morte celular programada (SCHRODER; KAUFMAN, 2005; MCILWAIN et al., 2013; ZHANG et al, 2014).

Uma das técnicas mais utilizadas para avaliar esta expressão gênica é a PCR quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR). Ela permite a quantificação da expressão de genes induzidos em resposta a diferentes condições, de forma relativa, isto é, pela comparação da expressão em um grupo exposto a um estímulo e um grupo não exposto, denominado como grupo controle ou de referência. Para quantificar um gene de interesse pela RT-qPCR é necessário à seleção de genes de referência que servirão para a normalização dos dados e permitirá uma correta interpretação dos dados entre as amostras (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; AYANOGLU et al., 2018). O estudo de expressão gênica possibilita fazer também uma análise comparativa de genes específicos de diferentes linhagens para uma determinada característica (LEDUR et al., 2007; RENAUDEAU et al., 2011).

Diante disso, objetivou-se avaliar e comparar a expressão gênica em fragmentos de rim de frangos de corte da linhagem comercial Cobb 500® e dos ecótipos locais Caneluda e Peloco, submetidos ao estresse térmico agudo, utilizando genes das famílias dos Fatores de choque térmico (HSFs), Proteínas de choque térmico (HSPs); genes que codificam as enzimas antioxidantes GPX, SOD e *CAT* e o gene da Caspase-6, relacionado à apoptose; e, em fragmentos de coração, fígado, músculo e rim, analisar genes relacionados ao estresse do retículo endoplasmático (*GRP78*; *EI2F α* ; *IRE1* e *ATF6*).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A consolidação da avicultura brasileira

No Brasil, a avicultura é uma atividade que tem grande relevância no setor de agronegócio, o que reflete positivamente não apenas na economia do país, como também na sociedade como um todo, pois gera renda e melhora o nível social da população, sendo o setor que mais tem se destacado no campo da produção animal (Ver

GARCIA; GOMES, 2019). Ao longo dos anos, o país avançou nesse mercado e conquistou um espaço significativo na produção mundial de carne de frango. No *ranking* mundial de produção o Brasil é o segundo maior produtor, chegando a 13,05 milhões de toneladas em 2017 e o maior exportador desde o ano de 2004, seguido dos Estados Unidos da América (EUA) e da União Européia (EU) (ABPA, 2019).

O sucesso obtido na produção direcionada ao mercado externo é consequência da competitividade do nosso produto. Os países que dominam o mercado de aves investem em melhoramento genético desde o final da segunda Guerra Mundial. A criação de frangos para corte no Brasil começou a se desenvolver com a introdução de linhagens importadas das raças Leghorn e New Hampshire nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro (RODRIGUES et al., 2014).

A partir de 1965, a avicultura brasileira teve um grande crescimento, quando o Governo Federal publicou um Decreto permitindo apenas importação de avós e proibindo a importação de pintos comerciais e matrizes (BOARETTO, 2009). Desde o início, foram estabelecidas metas enfatizando traços de produção para abranger uma gama muito ampla de considerações, incluindo reprodução, saúde animal, qualidade do produto e impacto ambiental (NEETESON-VAN NIEUWENHOVEN et al., 2013). De acordo com Garcia e Gomes, (2019) esse desempenho na cadeia produtiva do setor avícola, só foi possível devido aos avanços tecnológicos no manejo, na nutrição, na sanidade e na genética das aves. Tais medidas possibilitaram muitas conquistas, como a precocidade no abate, a melhora na conversão alimentar, o aumento no peso de abate, o aumento do rendimento de carcaça e de cortes nobres, além de redução nos custos de produção como podemos ver na ilustração da Figura 1.

Porém, os processos seletivos utilizados, que visam parâmetros produtivos, geralmente tornam essas linhagens muito uniformes, reduzindo assim a variabilidade genética populacional, o que pode provocar a diminuição de características relacionadas à resistência a doenças, que, de forma geral, não são consideradas em programas de melhoramento genético animal. Essa redução da variabilidade predispõe a população a se tornar mais susceptível às doenças (FONTEQUE, 2011).

Esse gargalo tem sido fonte de preocupação de pesquisadores e produtores, que buscam alternativas para manter a variabilidade genética das populações locais. Quando se têm aves sensíveis ou pouco resistentes a patógenos, essas podem estar susceptíveis a eventuais pandemias. Como exemplo, em 2005, ocorreu o caso da gripe aviária, e em

consequência das aves infectadas e o risco do contágio humano, optou-se pelo abate de aproximadamente 800 milhões de aves (PADUAN, 2005). Outro fator relevante em relação às linhagens comerciais, é que, por serem selecionadas em ambientes com controle de temperatura e umidade, elas são pouco adaptadas às condições de climas quentes, o que pode interferir diretamente na expressão do potencial genético, na eficiência de utilização de nutrientes e nos aspectos sanitários das aves (BOSCHINI et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2019; WANG et al., 2019; XIONG et al., 2020).

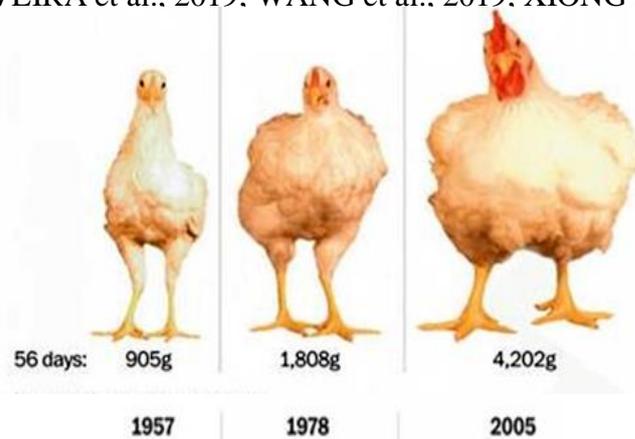


Figura 1: Ilustração publicada no site do The Washington Post mostrando o avanço no peso do frango comercial do final dos anos 50 até o início dos anos 2000.

A linhagem comercial Cobb 500® (Figura 2) é um dos frangos de corte mais eficientes atualmente, pois apresenta bons índices de desempenho e conversão alimentar e excelente taxa de crescimento que proporcionam grande vantagem competitiva (FERNANDES et al., 2019; AVIGUIA, 2020).



Figura 2: Frango de corte da linhagem Cobb 500® (AVIGUIA, 2020)

Porém, a Cobb 500® não está adaptada ao ambiente muito quente e tem dificuldades ao enfrentar condições climáticas de regiões tropicais. Isso interfere de maneira negativa na produtividade, aumentando os custos de produção e interferindo na qualidade de criação, principalmente pela alta taxa de mortalidade, limitando a produção de frangos de corte (RENAUDEAU et al., 2011; BOSCHINI et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2016)

Apesar de todo o sucesso, a criação de frango de corte no país enfrenta constantes desafios, uma vez que a cadeia é muito competitiva e possui uma margem estreita de lucro. Por isso, é preciso alcançar novos e eficientes índices produtivos a todo o momento (RODRIGUES et al., 2014).

2.2. Galinhas Nativas

Acredita-se que a espécie *Gallus gallus* tenha sido domesticada no continente asiático há, aproximadamente, 3.200 anos (AVEWORLD, 2007; MURAD; SILVA, 2014). Após a domesticação na Ásia, a galinha foi introduzida na África e depois Europa. No Brasil, a espécie foi trazida pelos portugueses no período da colonização e durante seis séculos passou por cruzamentos acasalamentos de todas as formas, inclusive consangüíneos resultando em galinhas diferentes conhecidas atualmente como ecótipos naturalizados, galinhas nativas, crioulas ou locais (EGITO et al., 2002; MARIANTE et al., 2009; FONTEQUE et al., 2011; MURAD; SILVA, 2014).

Nesse período, as galinhas locais brasileiras não receberam as práticas de manejo adequadas e desenvolveram características como adaptação às adversidades ambientais, resistência a algumas doenças e rusticidade (BARBOSA et al., 2007; SOBREIRA; VIOLA, 2019). Tais características tornaram essas galinhas únicas, não apenas pela tolerância a estresses climáticos, resistência a doenças e ectoparasitas, mas também em variabilidade a nível genético e em aspecto e sabor diferenciado da carne (CARVALHO et al., 2018; SOBREIRA; VIOLA, 2019).

Essas aves apresentam índices de produção menores, bem como um maior período de criação quando comparados com as linhagens comerciais. Muitas dessas aves localmente adaptadas que já foram economicamente importantes no país, são atualmente raras, estão ameaçadas de extinção e vêm sendo substituídos gradativamente por outras mais produtivas (FONTEQUE et al., 2011; ALMEIDA et al., 2019). De

acordo com a FAO-Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (2015), das 8.774 raças de aves catalogadas, mais de 20% apresenta algum risco de extinção.

No Estado da Bahia há a criação de alguns grupos de galinhas naturalizadas, cuja origem pouco ou nada se sabe. Geralmente, essas aves estão distribuídas em criações caseiras em diversas regiões do Estado. Estudos recentes tem fornecido uma série de informações sobre as aves locais encontradas na Bahia (ALMEIDA et al., 2013; CEDRAZ et al., 2017; ALMEIDA et al., 2019; GROMBONI et al., 2020). Apesar de alguns estudos, estas aves ainda encontram-se subutilizadas na região e suas potencialidades precisam ser avaliadas (ALMEIDA, 2016).

Dentre as galinhas nativas criadas na Bahia podemos citar os ecótipos Peloco e Caneluda. O ecótipo Peloco é composto por aves que se caracterizam pela ausência de penas por um longo período da fase de crescimento, motivo pelo qual também são conhecidas como Pelado em algumas localidades. Na fase adulta, sua plumagem é variada, encontrando-se aves de penas lisas e outras apresentam penas arrepiadas o que lhe atribui aspecto de raça ornamental (Figura 3A e 3B).

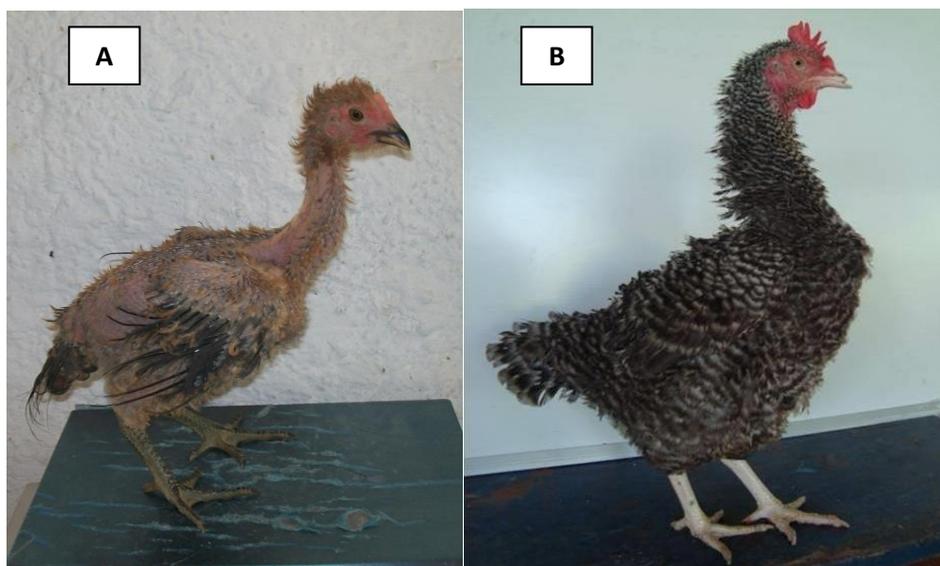


Figura 3:A- Peloco na idade jovem, mostrando perfil do ecótipo (empenamento tardio) e **B** – Peloco fêmea na adulta. (Arquivo pessoal).

É encontrada em pequenas fazendas e criações de quintais na Chapada Diamantina e nas regiões Sul e Extremo Sul da Bahia. Atualmente, existe no Setor de Avicultura da UESB um pequeno núcleo dessas aves e outros são mantidos por produtores na Vila de Banco Central-Ilhéus-BA, Região do Curisco-Uruçuca-BA e

Quilombo em Itacaré-BA (ALMEIDA et al., 2013). Essas aves são predominantemente criadas em sistema extensivo, com pouco investimento tecnológico num sistema conhecido como avicultura familiar (ALMEIDA et al., 2013; ALMEIDA et al., 2019).

As galinhas do ecótipo Caneludo do Catolé (Figura 4) compreendem aves que estão em processo inicial de identificação e caracterização fenotípica. O Caneludo do Catolé é originário da região do sudoeste da Bahia, entre os municípios de Itapetinga, Macarani, Itarantim e Maiquinique. Provém de cruzamentos entre diversas raças de galinhas criadas soltas em pequenas criações. São aves de grande porte apresentando plumagem escura, com variações cinza e vermelha em menor número. Geralmente, esses grupos tendem a um perfil produtivo diferenciado e apresentam porte de aves de corte e para a produção de ovos, quando comparado com outros ecótipos como o Peloco (ALMEIDA, 2016).



Figura 4: Ecótipo Caneluda. (Arquivo pessoal).

Assim, os ecótipos de galinhas naturalizadas ficaram longe do processo de seleção genética, estão mais adaptadas às flutuações do ambiente e configura-se atualmente em um importante recurso para os sistemas de produção animal sustentável, principalmente nos países em desenvolvimento como o Brasil (SOBREIRA; VIOLA, 2019).

Mesmo apresentando índices de produção menores, a evidência de variabilidade genética em galinhas locais é uma maneira de demonstrar a importância da conservação desses animais para a preservação da diversidade de espécies uma vez que elas podem servir de reservatórios de alelos, capazes de melhorar a resistência de outras raças por

meio de cruzamentos, fato importante para a segurança alimentar (FONTEQUE, et al., 2014; CARVALHO et al., 2018). Além disso, essas aves podem fomentar um mercado crescente dentro e fora do Brasil, de produtos orgânicos e das galinhas felizes ou galinhas de quintal, uma vez que, atualmente há muitos consumidores interessados na produção e consumo "éticos" de alimentos, sendo o bem-estar dos animais produtores de alimentos e fibras uma grande preocupação para esses consumidores e, nesse contexto as aves de criadas em fazenda tem recebido atenção significativa (BRAY; ANKENY, 2017).

Vale ressaltar também que as características como rusticidade e tolerância às variações climáticas dessas aves locais tem sido de grande interesse para os programas de melhoramento, justificando mais uma vez a relevância em se buscar estratégias de uso sustentável e conservação dessas raças. De acordo com a FAO (2015), o desenvolvimento de raças capazes de lidar com mudanças ambientais e climáticas se tornarão um foco de muitos programas de reprodução. Para conservar é importante realizar pesquisas que corroborem com a caracterização racial, genética e produtiva desses ecótipos naturalizados (ALMEIDA, 2016).

2.3. Avicultura Familiar

A galinha caipira por ser uma ave rústica e capaz de suportar adversidades climáticas e resistir a algumas doenças, torna-se uma alternativa principalmente para locais com menor infra-estrutura produtiva. Assim, as aves locais tem uma criação, "tipo caipira", nas áreas rurais, por pequenos produtores familiares, com pouca exigência de manejo se comparado com as linhagens comerciais (BARBOSA et al., 2007; CARVALHO 2016; SOBREIRA; VIOLA, 2019).

As aves são criadas em sistema extensivo, com pouco investimento tecnológico, ao qual são bem adaptadas e são úteis para agricultores com poucos recursos, pois podem ter boa produtividade, sem a necessidade de altos investimentos, e requerem menor controle sanitário (YAKUBU; UGBO, 2011), o que contribui para a qualidade de vida das famílias fornecendo segurança alimentar e rendimentos familiares e desempenhando um papel importante em eventos socioculturais (BARBOSA et al., 2007; SOBREIRA; VIOLA, 2019).

Apesar de apresentarem índices produtivos menores que as linhagens comerciais, as galinhas localmente adaptadas fornecem produtos diferenciadas em aspecto, sabor e qualidade da carne, sendo considerada como um dos pratos mais apreciados no Brasil e, quando associados às condições sanitárias e de higiene, as aves podem alcançar alta qualidade e preço diferenciado (BARBOSA et al., 2007; CARVALHO et al., 2018; SOBREIRA; VIOLA, 2019). Assim, avicultura familiar tem apresentado um grande potencial para estruturar o desenvolvimento local. Na Bahia, foram feitos estudos iniciais que visam destacar o potencial dos ecótipos Peloco e Caneluda para a produção de carne e de ovos, entretanto serão necessários novos trabalhos que possam salientar a conservação desses aves, bem como prol do desenvolvimento técnico-científico utilizando as aves locais como recursos genéticos serão de bom uso no futuro da agropecuária nacional (BARBOSA et al., 2007; ALMEIDA et al., 2013).

2.4. Estresse térmico nas aves

As aves são animais homeotermos, ou seja, mantêm sua temperatura corporal relativamente constante. Um ambiente é considerado confortável para elas quando apresenta temperaturas de 18 a 28 °C e umidade relativa do ar de 60 a 70% (ABREU; ABREU, 2011).

Embora muitos fatores possam estar envolvidos, os fatores climáticos estão entre os primeiros e cruciais fatores limitantes do desenvolvimento da produção animal em regiões de clima quente (RENAUDEAU et al., 2011). De acordo com ABREU et al., (2011), quando as condições ambientais não estão dentro da faixa considerada adequada (18 a 28°C), que é caracterizada pela zona termoneutra, o ambiente torna-se desconfortável. Assim, temperaturas abaixo e, principalmente, acima da termoneutralidade podem resultar em alterações metabólicas, com consequente queda do desempenho (LAURENTZ, 2005; OBA, 2012; BOIAGO et al., 2013).

As linhagens de frangos de corte comerciais foram geneticamente melhoradas em países de clima temperado, em ambientes com controle total de temperatura e umidade. Essas linhagens têm dificuldades para tolerar as condições ambientais das regiões tropicais e são muito susceptíveis ao estresse térmico (RENAUDEAU et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2019; WANG et al., 2019; SEIDL et al., 2009; AL-ZGHOUL et al.,

2019). Um exemplo disso é a linhagem comercial Cobb 500®, o frango de corte mais eficiente do mundo, com bons índices de desempenho e conversão alimentar e que possui excelentes cortes de carne, porém não são adaptadas ao ambiente muito quente (AVIGUIA, 2020).

De maneira geral, quando são expostas ao estresse térmico, uma variedade de estruturas celulares e processos metabólicos são danificados exigindo que as aves façam ajustes físicos, comportamentais, fisiológicos, metabólicos, enzimáticos e da expressão gênica, os quais contribuirão para manter a homeostase (RENAUDEAU et al., 2012; MURUGESAN et al., 2017). Assim, em resposta às perturbações ocorridas no ambiente, o organismo altera sua atividade gênica, onde níveis de diferentes membros da família HSP aumentam em quase todos os tecidos demonstrando que há uma regulação seletiva na expressão dos genes que conduzem à síntese de proteínas específicas nas células (PIRKKALA et al., 2001; REGITANO e COUTINHO, 2001; MURUGESAN et al., 2017).

A expressão de genes nos primeiros minutos de exposição ao calor é fundamental para a resistência (CAPALDI et al., 2001; GASCH et al., 2000). O mecanismo molecular envolvido na regulação de genes em situações de estresse por calor é complexo e não é totalmente compreendido. Entretanto, os avanços na biotecnologia molecular têm permitido caracterizar a expressão de genes envolvidos em respostas celulares ao estresse térmico e melhorar a precisão e a eficiência da seleção para tolerância ao calor (RENAUDEAU et al., 2011).

A mudança climática, especialmente o aumento da temperatura média da superfície global representa uma situação desafiadora para a indústria avícola comercial em termos de manutenção da produção e bem-estar animal visto que essas aves são altamente vulneráveis às mudanças climáticas (FAO, 2015; MURUGESAN et al., 2017; XIONG et al., 2020). Nesse contexto, é de fundamental importância que se conduzam estudos em grupos genéticos que possuem tolerância ao estresse térmico como os ecótipos Peloco, visto que, de acordo com a FAO, (2015) há atualmente uma mudança nos objetivos de melhoramento e, as raças capazes de lidar com mudanças ambientais e climáticas estarão no foco de muitos programas de reprodução.

2.5. Genes Relacionados ao Estresse térmico

2.5.1. As Proteínas de Choque Térmico – HSPs e os Fatores de Transcrição – HSFs

Quando aves são expostas ao estresse térmico, ocorre uma resposta rápida e transitória a níveis de transcrição e tradução, levando a considerar que esse é o mecanismo responsável pela sobrevivência celular durante o período estressante (BURDON, 1986).

Essa resposta representa um mecanismo universal, desenvolvido por todos os organismos e envolve a síntese de uma classe de proteínas conhecidas como Proteínas de choque térmico - *Heat Shock Proteins*, HSP (PIRKKALA et al., 2001; MURUGESAN et al., 2017).

As HSPs estão presentes em uma grande variedade de animais são altamente conservadas em estrutura através da evolução e são expressas em todas as células de procariontes e eucariontes em condições normais. Elas se comportam como chaperonas moleculares e desempenham papéis cruciais na proteção de células tanto em condição de hipertermia quanto de demais estados de alteração homeostática (JOLY et al., 2010; MJAHED et al., 2012; MURUGESAN et al., 2017).

Sob estresse, como choque térmico, metais pesados, infecções patogênicas, aumento na concentração de cálcio intracelular, diminuição de glicose, infecções, aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs), ou quase todas as mudanças repentinas que induzem dano protéico no ambiente celular, as HSPs funcionam reparando os danos e restaurando a estrutura das proteínas danificadas e evitando o dobramento incorreto dessas proteínas (SCHLESINGER, 1986; WELCH, 1992; GAO et al., 2007; POWERS et al., 2009; SONG et al., 2017; MURUGESAN et al., 2017; SURAI et al., 2019) As HSPs são famílias gênicas classificadas de acordo com o peso molecular em: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP20, HSP10 entre outras. Dessas, as mais estudadas são as proteínas com pesos moleculares de 60, 70, 90 e 110 Kda, e devido à grande variedade de organismos nos quais elas são encontradas, são chamadas de HSPs principais (KIANG e TSOKOS, 1998; MURUGESAN et al., 2017).

A expressão dos genes HSP70 e HSP90 podem ser detectadas em níveis significativos em células não estressadas e aumentando sua abundância quando

submetidas a estímulos de temperaturas (JOLLY; MORIMOTO, 2000; MORIMOTO et al., 1997; MURUGESAN et al., 2017; YIN et al., 2018; XU et al., 2019). Elas atuam no dobramento de outras proteínas possibilitando que as células sobrevivam a condições potencialmente letais. As funções citoprotetoras das HSPs podem ser amplamente explicadas por suas propriedades anti-apoptóticas. As HSP70 e HSP90 podem interagir diretamente com diferentes proteínas da maquinaria de morte celular programada rigidamente regulada e, assim, bloquear o processo apoptótico em pontos-chave distintos (LINDQUIST, 1986; LINDQUIST e CRAIG, 1988; VIÉRLING, 1991; PLESOFISKY-VIG e BRAMBL, 1993; JOLLY et al., 2010)

A HSP70 é altamente conservada, está presentes em quase todas as espécies e são uma das mais abundantes da família de HSPs e também, são onipresentemente expressas (TAVARIA et al., 1996; KRENEK et al., 2013; LIU et al., 2014; XU et al., 2019)

A ativação transcricional dos genes HSPs é mediada por outros genes chamados de Fatores de Transcrição do Choque Térmico (HSFs), os quais podem ser ativados quando o organismo é submetido ao estresse e induzir expressão gênica das HSPs.

Quatro tipos de HSFs são conhecidos (*HSF1*, *HSF2*, *HSF3* E *HSF4*), porém apenas o *HSF1* e *HSF3* estão envolvidos na regulação das HSPs de resposta às condições estressantes (AKERFELT et al., 2010; FUJIMOTO e NAKAI, 2010; XU et al., 2019). O *HSF1* e *HSF3* possuem características semelhantes e são ativados, principalmente, em altas temperaturas e condições de estresse severo, aumentando assim a habilidade celular de regular a resposta ao choque térmico (AKERFELT et al., 2010). Entretanto, de acordo com AKERFELT et al. (2010) o *HSF1* é o principal regulador em vertebrados.

Na ausência de estresse, esses fatores se encontram como monômeros, porém quando submetidos à alta temperatura, sua forma se converte em trímeros se ligando a região de controle do gene, conhecida como Elemento de Resposta ao Choque Térmico (Heat Shock Elemento-HSE), resultando na indução da rápida expressão das HSPs (GUO et al., 2008; NETO, 2012).

O estresse térmico é tão prejudicial para as aves, que pode desencadear uma série de transtornos metabólicos. Dentre eles destaca-se o estresse oxidativo. Vários estudos sugerem que a exposição ao calor pode resultar em estresse oxidativo, que por sua vez

pode levar à citotoxicidade (ANDO et al., 1997; BERNABUCCI et al., 2002; MAINI et al., 2007; AKBARIAN et al., 2016; ZABOLI et al., 2018).

2.6. O estresse oxidativo

O estresse oxidativo é causado por desequilíbrio entre a produção de compostos oxidantes e a atuação de sistemas antioxidantes. Os radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (EROs), que levam a esse tipo de estresse, são provenientes do metabolismo de oxigênio. Seu excesso pode causar danos moleculares no DNA, proteínas, lipídios e outras moléculas biológicas, levando ao comprometimento da imunidade e fisiopatologias (BARBOSA, et al., 2010; AL-ZGHOUL et al., 2019; SURAI et al., 2019).

Em geral, os organismos possuem defesas antioxidantes. Entretanto, quando a capacidade antioxidante é excedida, ocorre queda na produtividade animal, além da deterioração da qualidade da carne de frango (LANARI et al., 2004; MAINI et al., 2007; SURAI et al., 2019).

Os efeitos biológicos das EROS são controlados *in vivo* por mecanismos de defesa que visam diminuir os danos causados. Esses mecanismos incluem algumas enzimas antioxidantes, entre elas a *CATALASE* (*CAT*), a superóxido dismutase (*SOD*) e a glutationaperoxidase (*GPx*). A *CAT* tem a função de catalisar a degradação de peróxido de hidrogênio para água e oxigênio, a *SOD* catalisa a dismutação de radicais superóxido para peróxido de hidrogênio e oxigênio e a *GPx* decompõe peróxidos através de outros mecanismos.

A enzima *SOD* atua convertendo o superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. Durante o estresse térmico, a superoxidase dismutase (*SOD*) é um antioxidante importante, pois é responsável pela catálise de O_2^- no oxigênio molecular simples ou no peróxido de hidrogênio do composto prejudicial (H_2O_2) (SURAI, 2015; IGHODARO; AKINLOYE, 2017; SURAI et al., 2019). A enzima *CATALASE* encontra-se em peroxissomos celulares, principalmente do fígado e rim, atua na decomposição de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, proveniente da dismutação do ânion radical superóxido (WASSMANN et al., 2004; SURAI et al., 2019). A glutationa peroxidase é uma enzima decompõe peróxidos de hidrogênio (H_2O_2) e desempenha também um papel

crucial na inibição do processo de peroxidação lipídica e, portanto, protege as células do estresse oxidativo (GÓTH et al., 2004; GILL; TUTEJA, 2010).

Quando o estresse por calor elevado provoca o estresse oxidativo em frangos, há um aumento compensatório na atividade dessas enzimas antioxidantes em diferentes tecidos, na tentativa de diminuir os danos causados nas células por esse tipo de estresse (ALTAN et al., 2003; MAINI et al., 2007; HUANG et al., 2015; RIMOLDI et al., 2015; SURAI et al., 2019).

Estudos atestam que, em caso de estresse térmico, as aves alteram sua atividade gênica, regulando a síntese de proteínas que possam proteger o organismo, contra aquelas alterações ocorridas no ambiente. Entretanto, o mecanismo molecular exato da regulação e expressão desses genes não é totalmente conhecido. Por isso, pesquisas são necessárias a fim de localizar genes associados com a tolerância ao estresse pelo calor. Além disso, o estudo de expressão gênica possibilita fazer uma análise comparativa de genes específicos de diferentes linhagens para uma determinada característica (LEDUR et al., 2007; RENAUDEAU et al., 2011).

2.7 As Caspases e a Morte Celular Programada

Se o estresse for muito severo, um sinal que leva à morte celular programada, a apoptose, é ativado, proporcionando um equilíbrio bem ajustado entre sobrevivência e morte (PIRKKALA et al., 2001).

As caspases são proteases que desempenham um papel fundamental no controle e regulação da inflamação e da morte celular programada (apoptose), sendo assim muito importantes para manter a homeostase (MCILWAIN et al., 2013). Há diferentes tipos de caspases e, de acordo com as funções que elas estão envolvidas, as caspases são classificadas em apoptóticas (caspases-2, -3, -6, -7, -8, -9 e -10) e inflamatórias (caspases -1, -4, -5, -11, -12 e -13). Por sua vez, as apoptóticas podem ser classificadas em dois grupos: caspases iniciadoras (-2, -8, -9 e -10) e caspases executoras (-3, -6 e -7) (LAVRIK et al., 2005; FERNÁNDEZ; LAMKANFI, 2015).

Normalmente, as caspases estão no seu estado inativo e necessitam de uma modificação bioquímica para se tornarem ativas e capazes de desempenhar suas funções. Assim, as caspases são sintetizadas e armazenadas e, durante a apoptose, sinais extrínsecos ou intrínsecos ativam os zimógenos procaspase -8 ou -9. Após a ativação, os

executores diméricos recrutam e processam os principais substratos envolvidos na homeostase celular, na transcrição gênica e na estrutura celular (MACPHERSON et al 2019).

O processo de apoptose ou morte celular programada envolve o dismantelamento controlado dos componentes intracelulares, evitando a inflamação e os danos às células circundantes. As caspases iniciadoras ativam caspases executoras que posteriormente coordenam suas atividades para demolir as principais proteínas estruturais e ativar outras enzimas (MCILWAIN et al., 2013).

Diferentes tipos de estresses celulares, incluindo a privação do fator de crescimento, a interrupção do citoesqueleto, o dano ao DNA, o acúmulo de proteínas mal dobradas, hipóxia e muitos outros podem ativar a apoptose (MCILWAIN et al., 2013). Pela sua importância, é fundamental que se busque compreender a dinâmica e o funcionamento de todas as caspases (MACPHERSON et al., 2019)

2.8 Estresse do retículo endoplasmático

O retículo endoplasmático (ER) é uma organela intracelular dinâmica com múltiplas funções essenciais para a homeostase celular, desenvolvimento e capacidade de resposta ao estresse (BRAVO et al., 2013; REID; NICCHITTA, 2015; SCHWARZ; BLOWER, 2016). Desempenha papéis críticos em uma ampla gama de processos, incluindo (a) síntese, dobragem, modificação e transporte de proteínas; (b) síntese e distribuição de fosfolipídios e esteróides; (c) armazenamento de íons cálcio dentro de seu lúmen e sua liberação regulada no citoplasma (SCHRODER, 2008; HOTAMISLIGIL, 2010; BRAVO et al., 2013; XIONG et al., 2020).

Perturbações em qualquer uma dessas funções pode afetar o dobramento de proteínas levando ao acúmulo de proteínas mal dobradas que resultam no estresse do RE. Em resposta ao estresse celular, é ativada uma cascata de sinalização conhecida que é como Resposta das Proteínas mal dobradas (UPR) (MAA; HENDERSHOT 2004; BRAVO et al., 2013; GUO et al., 2020).

A UPR é um mecanismo adaptativo que tenta restaurar o equilíbrio entre proteínas mal enoveladas recentemente sintetizadas e capacidade de dobragem. Até o momento, sabe-se que há três vias de UPR: PERK (fator de iniciação eucariótica do tipo PKR 2 α quinase), IRE1 (inositol que requer a enzima 1) e ATF6 (ativação do fator de

transcrição 6). Em situações normais, essas três proteínas transmembranares estão inativas pela ligação das mesmas com a chaperona BiP / *GRP78* (BERTOLOTTI et al., 2000 ; SHEN et al., 2002; HOTAMISLIGIL, 2010; BRAVO et al., 2013)

Em situações de estresse térmico do retículo endoplasmático-RE a Bip se dissocia de *IRE1*, PERK, e *ATF6*, ativando-as e desencadeando a ativação das vias para reverter o estresse do RE (SCHRODER; KAUFMAN, 2005; ZHANG et al, 2014).

Finalmente, se as condições de estresse do ER não puderem ser aliviadas, a fim de proteger o organismo é ativada uma via apoptótica, que envolve a proteína caspase-12 localizada no ER (NAKAGAWA et al., 2000; XIONG et al., 2020).

2.9. O Estudo de Expressão Gênica

Simplificadamente, a informação que está contida nos genes (DNA) é transcrita em RNA e esse é traduzido em proteínas. As células apresentam variações das quantidades de transcritos (informação contida no RNA) e do conteúdo de proteínas (BUTTOW; BONOW, 2013). Dessa maneira, indivíduos de uma espécie, porém com características fenotípicas distintas, podem apresentar padrões diferentes de expressão, devido ao seu genoma e sua interação com o meio (ALMEIDA, 2007).

Os avanços na genética molecular incluindo clonagem, sequenciamento de DNA e transgênese têm aberto novas perspectivas para elucidar a relação entre os genes e seus fenótipos correspondentes (ALMEIDA, 2007; REGITANO; COUTINHO, 2001). Essas tecnologias podem ser utilizadas para o estudo dos mecanismos moleculares envolvidos em processos biológicos importantes como a identificação e caracterização de genes.

A pesquisa em expressão gênica visa descobrir quando e quantos genes, contidos no DNA, são expressos ao longo do desenvolvimento e em resposta a estresses bióticos e/ou abióticos em indivíduos de mesma espécie. Para analisar determinadas características, como por exemplo, a resistência de aves ao calor elevado, é importante traçar um perfil de expressão de genes específicos em grupos genéticos diferentes (LEDUR et al., 2007).

Uma das técnicas mais utilizadas para avaliar a expressão de genes em vertebrados é a PCR quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR). Por ser uma técnica que possibilita uma análise simultânea em diferentes tecidos, o resultado é visualizado

imediatamente, dispensando a eletroforese. Além disso, permite avaliar amostras com baixas concentrações de RNA (VANDESOMPELE et al., 2002).

3. Genes de Referência

Um gene de referência é definido como um gene que mantém sua expressão estável, independente das variações do experimento. Este gene atua como um controle interno da reação, e sua função é assegurar que qualquer variação no material genético se relacione na mesma medida entre o objeto de pesquisa e o controle (KOZERA; RAPACZ, 2013; GROMBONI et al., 2020).

A quantificação do gene de interesse pela RT-qPCR requer a normalização dos dados com o nível de expressão de genes de referência (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), para uma correta interpretação dos dados entre amostras. Até pouco tempo, a estratégia de normalização que era utilizada envolvia padronização para um único gene. No entanto, nos últimos anos, tornou-se claro que nenhum gene isolado é constitutivamente expresso em todos os tipos de células e em todas as condições experimentais, implicando que a estabilidade da expressão do gene de controle pretendido deve ser verificada antes de cada experimento (ANDERSEN et al., 2004).

A escolha desse gene deve ser feita com muito cuidado, levando em consideração toda a especificidade do experimento e os genes mais comumente testados são o GAPDH, ACTB, MRPS27, MRPS30, entre outros.

O objetivo da normalização é remover a variação não biológica tanto quanto possível. Várias estratégias de normalização têm sido propostas, mas o uso de um ou mais genes de referência é atualmente o meio preferido de normalização (AYANOGLU et al., 2018).

Para a normalização dos dados, geralmente é utilizado o método de quantificação relativa, conhecido como “dois elevado a menos Delta Delta Ct” ($2^{-\Delta\Delta CT}$), onde é aplicada uma fórmula em que a razão de expressão relativa do gene alvo é normalizada pelo gene de referência (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; PFAFFL, 2004). Para tanto é realizado um cálculo fazendo a comparação direta entre o Ct do gene de interesse com o Ct do gene normalizador, no tratamento controle e no tratamento analisado, seguindo a seguinte equação: $2^{-\Delta\Delta CT} = (Ct, \text{ gene alvo} - Ct, \text{ gene normalizador}) \text{ Tratamento} - (Ct, \text{ gene alvo} - Ct, \text{ gene normalizador}) \text{ Controle}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), e dessa

forma é possível comparar os níveis de expressão de diferentes tecidos em espécies geneticamente divergentes.

Assim, para evitar viés, pesquisas desse tipo devem incluir genes de referência, cuja expressão seja estável nas mesmas condições experimentais para normalização da reação (BUSTIN et al., 2009; GUÉNIN et al., 2009).

3.1 Análise de estabilidade dos genes de referência

A estabilidade de expressão dos genes de referência pode ser analisada de diversas maneiras. Atualmente há programas e software específicos para isso. Dentre os mais utilizados, podemos citar o BestKeeper (PFAFFL et al., 2004), o GeNorm (VANDESOMPELE et al., 2002) e o NormFinder (ANDERSEN et al., 2004).

GeNorm é uma ferramenta que pode identificar o gene de referência expresso de forma mais estável em um conjunto de amostras. Para a análise da estabilidade, o algoritmo GeNorm classifica os genes a partir da sua estabilidade de expressão média (M). De acordo com o proposto por Vandesompele et al. (2002), o valor de M é a média da variação de pares (de um gene endógeno em particular com todos os genes controles testados), onde se obtém um desvio padrão para cada par de genes controles. O gene testado na combinação que apresentar menor média é tido como o mais estável, sendo que esse valor deve situar-se abaixo de 1,5 para que o gene seja considerado estável.

O Bestkeeper é um software que analisa a estabilidade de expressão empregando a análise de correlação de pares de todos os genes candidatos e calcula a média geométrica dos "mais adequados". O índice ponderado é correlacionado com até dez genes alvo usando a mesma análise de correlação de pares a fim de decidir se os genes de referência testados são expressos diferencialmente sob um tratamento aplicado. Essa ferramenta baseia-se no desvio padrão que deve ser menor ou igual a um (≤ 1). Assim, o software calcula a variação para todos os genes de referência baseadas na média geométrica do valor de Ct (PFAFFL et al., 2004).

O software **NormFinder** também pode ser aplicado para avaliar a adequação de qualquer candidato a gene de normalização em qualquer tipo de delineamento experimental. Permite estimar não apenas a variação geral dos genes de normalização candidatos, mas também a variação entre subgrupos de amostras do conjunto de amostras (ANDERSEN et al., 2004). Além disso, segundo o mesmo autor, essa

ferramenta permite ao pesquisador avaliar o erro sistemático introduzido ao usar o gene, o que preconiza que os genes que mostram uma alta variação entre as amostras analisadas devem ser evitados. O NormFinder propõe então avaliar a estabilidade dentro e entre grupos a princípio, e a determinação final da estabilidade do gene combina os dois valores de estabilidade (inter e intragrupos), adicionando as duas fontes de variação ocorrentes. Isso representa uma medida prática de erro sistemático que será introduzida quando se utiliza o gene investigado (ANDERSEN et al., 2004).

4. REFERÊNCIAS

ABPA. **Relatório Anual**. 2019. Disponível em: <<http://www.abpa-br.org>>. Acesso em: 16Mar. 2020.

ABREU, V. M. N.; ABREU, P. G. Os desafios da ambiência sobre os sistemas de aves no Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 2, p. 1-14, 2011.

AKBARIAN, A.; et al. Association between heat stress and oxidative stress in poultry; mitochondrial dysfunction and dietary interventions with phytochemicals. **Journal of Animal Science and Biotechnology**. 7:37. doi:10.1186/s40104-016-0097-5. 2016.

AKERFELT, M.; MORIMOTO, R. I.; SISTONEN, L. Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v.11, n.8, p.545–55. 2010.

ALMEIDA, E. A. **Influência do estresse pré-abate na expressão gênica e qualidade da carne de frango (*Gallus gallus*)**.. Dissertação. Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, São Paulo. 2007.

ALMEIDA E. C. J.; et al. Incubabilidade e Coloração da Casca dos Ovos de Reprodutoras Peloco (*Gallus gallus domesticus*). **Actas Iberoamericanas de Conservación Animal** 2, 99 99-102. 2012.

ALMEIDA E. C. J. et al., Características de carcaça de galinha naturalizada Peloco comparada a linhagens de frango caipira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.48, n.11, p.1517-1523. 2013.

ALMEIDA, E. C. D. J. **Caracterização Fenotípica E Produtiva De Galinhas E Patos No Estado Da Bahia**. Tese. Universidade Federal da, Bahia. 2016.

ALMEIDA, E. C. J. et al., Características físicas de ovos de galinhas nativas comparadas a linhagem de postura. **Archivos de Zootecnia**. 68, 26, 82-87. 2019.

ALTAN, O.; et al. Effect of heat stress on oxidative stress, lipid peroxidation and some stress parameters in broilers. **British poultry science**. 44. 545-50. 10.1080/00071660310001618334. 2003.

AL-ZGHOUL, M. B.; SUKKER, H.; ABABNEH, M. M. Effect of thermal manipulation of broilers embryos on the response to heat-induced oxidative stress. **Poultry Science**. 2019.

ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ORNTOFT, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**. 2004.

ANDO, Y.; SUHR, O.; EI-SALHY, M. Oxidative stress and amyloidosis. **Histology and Histopathology**.13: 845-850. 1998.

ARANDA, M.; et al. Panorama da avicultura: Balanço do comércio brasileiro e internacional. **Revista Espacios**, 38, 21, 1-8. 2017.

AVEWORLD. **Aves: Origem e raça**. 2007. Disponível em: <https://www.portalsuinoeaves.com.br/aves-origem-e-raca/>. Acesso em: 16.fev .2020.

AVIGUIA. **AviGuia - O Guia da Avicultura na Internet**. 2019. Disponível em: <http://www.aviguia.com.br/produtos/subdefault.asp?codgrupo=0301> . Acesso em 05 17.02. 2020.

AYANOGLU, F. B.; ELÇIN, A. E.; ELÇIN, Y. M. Selection of Suitable Reference Genes for Quantitative Real-Time PCR Normalization in Human Stem Cell Research. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. 1119:151–168. 2018.

BARBOSA, F. J. V.; et al. **Sistema alternativo de criação de galinhas caipiras resina**. Embrapa Meio-Norte, 2007.

BARBOSA, K. B. F.; et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, 23(4), 629–643. doi:10.1590/s1415-52732010000400013. 2010.

BERNABUCCI, U.; et al. Markers of oxidative status in plasma and erythrocytes of transition dairy cows during hot season. **Journal of Dairy Science**. v.85, p.2173-2179. 2002.

BERTOLOTI, A.; et al. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. **Nature Cell Biology** 2, 326-332. 2000.

BOARETTO, N. T. Melhoramento genético de frangos de corte. **Revista Formação e Informação em Zootecnia**, v. 1, n. 1, p. 1-16. 2009.

BOIAGO, M.M. et al. Desempenho de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes fontes de selênio, zinco e manganês, criados sob condições de estresse térmico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootecnia**, v.65, n.1, p.241-247, 2013.

BOSCHINI, C.; et al. Relação entre a proteína de choque térmico e o estresse térmico em frango de corte. **Archivos de Zootecnia**. 60, 63-77. 2011.

BRAVO, R. et al. Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration. **International Review of Cell and Molecular Biology**. v. 301, p. 215-290, 2013.

BRAY, H. J.; ANKENY, R. A. Happy Chickens Lay Tastier Eggs: Motivations for Buying Free-range Eggs in Australia. **Anthrozoös**, 30 (2), 213–226. doi:10.1080/08927936.2017.1310986. 2017.

BURDON, R.H. Heat shock and the heat shock proteins. **Biochemistry Journal**, v.240, p.313-324. 1986.

BUSTIN, S. A.; et al. The MIQE guidelines: Minimum Information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v.55, n.4, p.611–622. 2009.

BUTTOW, M. V.; BONOW, S. **Estudos de expressão gênica e possibilidades de aplicação no melhoramento genético de pessegueiro [*Prunus persica* (L.) Batsch]**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 27 p. 2013.

CAPALDI, A. P.; et al. Structure and function of a transcriptional network activated by the MAPK Hog1. **Nature Genetics**, v.40, n.11, p.1300–6. 2008.

CARVALHO, D. A.; et al. Variabilidade genética de 12 loci de microssatélites em galinhas crioulas Canela-Preta. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.70, n.4, p.1275-1281, 2018.

CEDRAZ, H. et al., Heat stress induces expression of HSP genes in genetically divergent chickens. **Plos One** v.12 n.10, 2017.

EGITO, A.A.; MARIANTE, A.S.; ALBUQUERQUE, M. S. M. Programa brasileiro de conservação de recursos genéticos animais. **Archivos de Zootecnia**. v.51, p.39-52, 2002.

FAO. **The Second Report on the State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture**, edited by B.D. Scherf & D. Pilling. FAO Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture Assessments. 2015.

FERNANDES, F. A. et al. Ajuste de modelos de crescimento para frangos machos. **Sigmae**, Alfenas, v.8, n.2, p. 788-795. 2019.

FERNÁNDEZ, D.; LAMKANFI, M. Inflammatory caspases: key regulators of inflammation and cell death. **Biological Chemistry**, 396: 193-203. 2015.

FONTEQUE, G. V. et al. Genetic polymorphism of fifteen microsatellite loci in Brazilian (blue-egg Caipira) chickens. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 34(1):98-102, 2014

FUJIMOTO, M.; NAKAI, A. The heat shock factor family and adaptation to proteotoxic stress. **FEBS Journal**, v.277, n.20, p.4112–4125. 2010.

GABRIEL J. E.; et al. Effect of moderate and severe heat stress on avian embryonic hsp70 gene expression. **Growth, Development & Aging**, v. 66, p. 27-33. 2002.

GARCIA, D. A.; GOMES, D. E. A. Avicultura Brasileira e os Avanços Nutricionais. **Revista Científica**, 1(1). 2019.

GASCH, A P. et al. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. **Molecular Biology of the Cell**, v.11, n.12, p.4241–4257. 2000.

GAO, H. et al. Systematic review and evaluation of physiological track and trigger warning systems for identifying at-risk patients on the ward. **Intensive Care Medicine**, 33(4), 667–679. doi:10.1007/s00134-007-0532-3. 2007.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**. 48:909–930. 2010.

GÓTH, L.; RASS, P.; PÁY, A. *CATALASE* enzyme mutations and their association with diseases. **The Journal of Molecular Diagnostics**. 8:141–149. 2004.

GROMBONI, J. G. G. et al. Influence of heat stress on reference genes stability in heart and liver of two chickens genotypes. **PLoS ONE** 15(2):e0228314. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228314>. 2020.

GUÉNIN, S. et al. Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. **Journal of Experimental Botany**, v.60, n.2, p. 487–93. 2009.

GUO, J.; et al. Genome-wide analysis of heat shock transcription factor families in rice and *Arabidopsis*. **Journal of Genetics and Genomics**. 35(2), 105–118. doi:10.1016/s1673-8527(08)60016-8. 2008.

GUO, J. et al. Copper Induces Apoptosis Through Endoplasmic Reticulum Stress in Skeletal Muscle of Broilers. **Biological Trace Element Research**. <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02076-0>. 2020.

HOTAMISLIGIL, G. S. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. **Cell**. 140:900–917. 2010.

HUANG, S-C. et al. Histopathological and biochemical evaluations of the kidney in broiler chickens under acute heat stress conditions. **Indian Journal of Animal Research**. 52. 637-639. 10.18805/ijar.v0iOF.7652. 2018.

IGHODARO, O. M.; AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), *CATALASE* (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal of Medicine**.54:4,287-293,DOI:[10.1016/j.ajme.2017.09.001](https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001). 2018.

JOLLY, C.; MORIMOTO, R. I. Role of the Heat Shock Response and Molecular Chaperones in Oncogenesis and Cell Death. **Journal of the National Cancer Institute**, v.92, n.19, p.1564–1572. 2000.

JOLY, N-L. et al. Papel Duplo de Proteínas de Choque Térmico como Reguladores de Apoptose e Imunidade Inata. **Journal of Innate Immunity**. ;2:238–247 DOI: 10.1159/000296508. 2010.

KIANG, J.G.; TSOKOS, G.C. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. **Pharmacology and Therapeutics**, v.80, p.183-201. 1998.

KOZERA, B.; RAPACZ, M. Reference genes in real-time PCR. **Journal of Applied Genetics**. v.54, n.4, p.391 – 406. 2013.

KRENEK, S.; SCHLEGEL, M.; BERENDONK, T. U. Convergent evolution of heat-inducibility during subfunctionalization of the Hsp70 gene family. **BMC Evolutionary Biology**. 13(1), 49. doi:10.1186/1471-2148-13-49. 2013.

LANARI, M.; et al. Effect of dietary tocopherols and tocotrienols on the antioxidant status and lipid stability of chicken. **Meat Science**, 68(2), 155–162. doi:10.1016/j.meatsci.2003.12.004. 2004.

LAVRIK, I.; GOLKS, A.; KRAMMER P. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. **The Journal of Clinical Investigation**, 115: 2665-2672. 2005.

LAURENTZ, A.C. **Manejo nutricional das dietas de frangos de corte na tentativa de reduzir a excreção de alguns minerais de importância ambiental**. 131f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2005.

LEDUR, M. C. et al. O uso de marcadores na produção de aves. In: BRIDI, A. M. et al. (Ed.) **A zootecnia frente a novos desafios**. Londrina: UEL, p.457-82. 2007.

LINDQUIST, S. The heat shock response. **Annual Review of Biochemistry**. 55:1151-1191.1986.

LINDQUIST, S.; CRAIG, E.A. The heat shock proteins. **Annual Review of Genetics**, 22:631-677. 1988.

LIU, H.; H.E., J.; CHI, C.; SHAO, J. Differential HSP70 expression in *Mytilus coruscus* under various stressors. **Gene**, 543(1), 166–173. doi:10.1016/j.gene.2014.04.008. 2014.

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**. 25(4), 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262. 2001.

MA, Y; HENDERSHOT, L.M. ER chaperone functions during normal and stress conditions. **Nournal of Chemical Neuroanatomy**. 28(1-2):51–65. doi:10.1016/j.jchemneu.2003.08.007. 2004.

MACPHERSON, D. J.; et al. Tri-arginine exosite patch of caspase-6 recruits substrates for hydrolysis First. **The Journal of Biological Chemistry**. 294, 71-88. doi: 10.1074/jbc.RA118.005914. 2019.

MAINI, S.; et al. Evaluation of Oxidative Stress and its Amelioration through Certain Antioxidants in Broilers during Summer. **The Journal of Poultry Science**. 44(3), 339–347. doi:10.2141/jpsa.44.339. 2007.

MARIANTE, A. S.; ALBUQUERQUE, M. S. M.; RAMOS, A. F. Criopreservação de recursos genéticos animais brasileiros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, v. 35, n. 2, p. 64 - 68. 2011.

MCILWAIN, D. R.; BERGER, T.; MAK, T. W. Caspase functions in cell death and disease [published correction appears. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**. 2013.

MJAHED, H.; et al. Heat shock proteins in hematopoietic malignancies. **Experimental Cell Research**, 318(15), 1946–1958. doi:10.1016/j.yexcr.2012.05.012. 2012.

MORIMOTO, R. I. et al. The heat-shock response: regulation and function of heatshock proteins and molecular chaperones. **Essays in Biochemistry**. v.32, p.17–29. 1997.

MUJAHID, A. et al. Superoxide radical production in chicken skeletal muscle induced by acute heat stress. **Poultry. Science.** v. 84, p.307–314. 2005.

MURAD, J. C. B.; SILVA, B. C. **Avicultura** 1. ed. – Brasília: NT Editora, 242 p. 2014.

MURUGESAN, S.; ULLENGAL, A. R.; AMIRTHALINGAM, V. **Proteína de choque térmico e estresse térmico em frangos.** Em: ASEA A.; KAUR P. (eds) Proteínas de Choque Térmico em Medicina Veterinária e Ciências. Proteínas de Choque Térmico, vol 12. Springer. 2017.

NAKAGAWA, T. et al. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. **Nature.** 403(6765):98–103. doi:10.1038/47513. 2000.

NEETESON-VAN NIEUWENHOVEN, A.M.; KNAP, P.; AVENDAÑO, S. The role of sustainable commercial pig and poultry breeding for food security. **Animal Frontiers.** 3(1), 52–57. doi:10.2527/af.2013-0008. 2013.

NETO, J. M. F. A Proteínas de estresse ‘HSPs’ como complemento do sistema de defesa antioxidante. **EFDeportes.com, Revista Digital.** 17, 167. 2012.

OBA, A. et al. Características produtivas e imunológicas de frangos de corte submetidos a dietas suplementadas com cromo, criados sob diferentes condições de ambiente. **Revista Brasileira de Zootecnia.**v.41, p.1186-1192. 2012.

OLIVEIRA, G. S.; et al. Protótipo para o Estudo do Comportamento e da Zona de Conforto Térmico de Frangos de Corte. **Revista Eixo.** 8, 1, 2019.

OLIVEIRA, P. M.; FARIA JÚNIOR, M. J. A.; GARCIA NETO, M. Estratégias para minimizar os efeitos de um ambiente térmico adverso para frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.** 68(3), 739-747. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-8690>. 2016.

OLIVEIRA C. G. et al. Marcadores Microsatélites para a Linhagem Brasileira de Galinha Caipira Peloco. **Actas Iberoamericanas de Conservación Animal**. 4, 120-122. 2014.

OLIVEIRA, D.R.M.S.; NÄÄS, I.A. Issues of sustainability on the Brazilian broiler meat production chain. In: **INTERNATIONAL CONFERENCE ADVANCES IN PRODUCTION MANAGEMENT SYSTEMS**, Rhodes. Anais Competitive Manufacturing for Innovative Products and Services: proceedings, Greece: Internacional Federation for Information Processing. 2012,

PADUAN, R. 800 bilhões de dólares: De acordo com o Banco Mundial, essa é a estimativa de prejuízos que uma pandemia de gripe aviária pode causar à economia global. **Revista Exame**. 2005.

PATRICIO I.; MENDES A.; RAMOS A.; PEREIRA D.. Overview on the performance of Brazilian broilers (1990 to 2009). **Revista Brasileira de Ciência Avícola**. 14:233-238. 2012.

PFÄFFL, M. W. et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pairwise correlations. **Biotechnology Letters**, 26(6), 509–515. doi:10.1023/b:bile.0000019559.84305.47. 2004.

PIRKKALA, L.; NYKÄNEN, P.; SISTONEN, L. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. **FASEB Journal**. 15 (7):1118–1131. doi:10.1096/fj00-0294rev. 2001.

PLESOFSKY-VIG, N.; BRAMBL, R. Heat shock proteins in fungi. In: JENNINGS D.H., ed. **Stress tolerance of fungi**. New York, Marcel Dekker. p.45-68. 1993.

POWERS, E. T.; et al. Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. **The Annual Review of Biochemistry**. 78, 959–991. 2009.

REGITANO, L. C. A.; COUTINHO, L. L. **Biologia molecular aplicada à produção animal**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 215 p. 2001.

REID, D.; NICCHITTA, C. Diversity and selectivity in mRNA translation on the endoplasmic reticulum. **Nature reviews. Neuroscience**. 16. 10.1038/nrm3958. 2015.

RENAUDEAU, D. et al. Adaptation to hot climate and strategies to alleviate heat stress in livestock production Animal. **The Animal Consortium**, 6:5, pp 707–728, 2011.

RIMOLDI, S. et al. Expression profile of six stress-related genes and productive performances of fast and slow growing broiler strains reared under heat stress conditions. **Meta Gene**. 6:17–25. 2015.

RODRIGUES, W. O. P.; et al. **Evolução da avicultura de corte no Brasil**. **Enciclopédia Biosfera**. Goiânia, v. 10, n. 18, p. 1666-1864. Disponível em: <<http://www.conhecer.org.br/enciclop/2014a/AGRARIAS/EVOLUCAO.pdf>>. 2014.

SCHLESINGER, M.J.. Heat shock proteins: the search for functions. **Journal Cell Biology**.103: 321-325. 1986.

SCHMIDT, N. S.; SILVA, C.L. Pesquisa e Desenvolvimento na Cadeia Produtiva de Frangos de Corte no Brasil. **Economia e Sociologia Rural**, 56, 03, 467-482. 2018.

SCHRODER, M. Endoplasmic reticulum stress responses. **Cellular and Molecular Life Sciences**. 65(6):862–894. doi:10.1007/s00018-007-7383-5. 2008.

SEIDL, V.; et al., Transcriptomic response of the mycoparasitic fungus *Trichoderma atroviride* to the presence of a fungal prey. **BMC Genomics**. 10, 567, <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-567>. 2009.

SHEN, J. et al. ER stress regulation of *ATF6* localization by dissociation of BiP/*GRP78* binding and unmasking of Golgi localization signals. **Developmental Cell**. 3(1):99–111. doi:10.1016/s1534-5807(02)00203-4. 2002.

SOBREIRA, R. dos S.; VIOLA, T. H. Criação de galinhas comuns localmente adaptadas. In: MELO, R. F. de; VOLTOLINI, T. V. (Ed.). **Agricultura familiar dependente de chuva no Semiárido**. Brasília, DF, Embrapa, cap. 9, 303-332.

Biblioteca(s): Embrapa Semiárido. 2019.

SONG, Z.; et al. Dietary supplementation of enzymatically treated *Artemisia annua* could alleviate the intestinal inflammatory response in heat stressed broilers. **Journal Thermal Biology**, v.69, p.184–190. 2017.

SURAI, P. Antioxidant systems in poultry biology: superoxide dismutase. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**. 1:1–18, 2015.

SURAI, P. F.; et al. Antioxidant Defence Systems and Oxidative Stress in Poultry Biology: An Update. **Antioxidants (Basel)**. 22; 8 (7):235. doi: 10.3390/antiox8070235. 2019.

SCHWARZ, D.S.; BLOWER, M.D. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. **Cellular and Molecular Life Sciences**.73(1):79–94. doi:10.1007/s00018-015-2052-6, 2016.

TAVARIA, M.; et al. A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family. **Cell Stress Chaperones**. 1(1):23-8. 1996.

VIERLING, E. Roles of heat shock proteins in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. 42:579-620. 1991.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology** 3(7). 2002.

WANG, J. et al. Effects of duration of thermal stress on growth performance, serum oxidative stress indices, the expression and localization of ABCG2 and mitochondria

ROS production of skeletal muscle, small intestine and immune organs in broilers. **Journal of Thermal Biology**, 85. 2019.

WASSMANN, S.; WASSMANN, K.; NICKENIG, G. Modulation of Oxidant and Antioxidant Enzyme Expression and Function in Vascular Cells Modulation. **Hypertension**, v.44, p.381-386, 2004.

WELCH, W.J. Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. **Physiological Reviews** 72: 1063-1081. 1992.

XIONG, Y.; YIN, Q.; LI, J.; HE, S. Oxidative Stress and Endoplasmic Reticulum Stress Are Involved in the Protective Effect of Alpha Lipoic Acid Against Heat Damage in Chicken Testes. **Animals** 10, 384. 2020.

XU J., et al. Co-enzyme Q10 protects chicken hearts from in vivo heat stress via inducing *HSF1* binding activity and Hsp70 expression. **Poultry Science**.98(2):1002–1011. doi:10.3382/ps/pey498. 2019.

YELLON, D.M.; MARBER, M.S. Hsp70 in myocardial ischaemia. **Experimentia** 50: 1075-1083. 1994.

YIN, B. et al. Vitamin C and sodium bicarbonate enhance the antioxidant ability of H9C2 cells and induce HSPs to relieve heat stress. **Cell Stress Chaperones**. 23(4):735–748. 2018.

ZHANG, X. et al. 2,4-Dichlorophenol induces ER stressmediated apoptosis via eIF2alpha dephosphorylation in vitro. **Environmental Toxicology**. 2014.

ZABOLI, G.; et al. How can heat stress affect chicken meat quality? – a review. **Poultry Science**. 98. 10.3382/ps/pey399. 201

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GERAL

Analisar e comparar a expressão gênica relativa em fragmentos de rim dos ecótipos Peloco e Caneluda e frangos de corte de linhagem comercial (Cobb500®), submetidas ao estresse térmico agudo utilizando sequências de genes das famílias das HSPs (HSP70 e HSP90), HSFs (*HSF1* e *HSF3*), genes relacionados ao estresse oxidativo (*CATALASE*, *SOD* e *GPX*), à apoptose (Caspase-6). Adicionalmente, avaliou-seem fragmentos de rim, músculo, fígado e coração de genes de estresse do reticulo endoplasmático (*ATF6*, *EI2F α* , *IRE1* e *GRP78*) de *Gallus gallus*.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Identificar genes de referência estáveis para a normalização da expressão relativa dos genes alvo em fragmentos de rim em aves geneticamente divergentes sobre efeito de conforto térmico e estresse térmico agudo;
- Quantificar e comparar o nível de expressão de genes alvo para estresse térmico (*HSF1*, *HSF3*, *HSP70*, *HSP90*) e de genes alvo para estresse oxidativo (*SOD*, *CAT* e *GPX*) no rim de frangos geneticamente divergentes submetidos aos ambientes de conforto e estresse térmico agudo;
- Quantificar e comparar o nível de expressão de genes alvo para estresse do retículo endoplasmático (*ATF6*, *EI2F α* , *IRE1* e *GRP78*) em diferentes tecidos de frangos geneticamente divergentes submetidos aos ambientes de conforto e estresse térmico agudo.
- Quantificar e comparar o nível de expressão de gene alvo Caspase-6, no rim de frangos geneticamente divergentes submetidos aos ambientes de conforto e estresse térmico agudo;

6. CAPÍTULO I

EXPRESSÃO DE GENES DE REFERÊNCIA EM RIM DE DIFERENTES DE FRANGOS COMERCIAIS E FRANGOS LOCAIS CAIPIRAS DO BRASIL SUBMETIDOS A ESTRESSE TÉRMICO AGUDO

EXPRESSÃO DE GENES DE REFERÊNCIA EM RIM DE DIFERENTES DE FRANGOS COMERCIAIS E FRANGOS LOCAIS CAIPIRAS DO BRASIL SUBMETIDOS A ESTRESSE TÉRMICO AGUDO

RESUMO

A PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR) é muito utilizada para avaliar a expressão gênica mas, para obter resultados confiáveis deve-se normalizar a reação, geralmente, selecionando genes de referência cuja expressão permanece estável em todas as amostras nos diferentes tratamentos. Objetivou-se avaliar a estabilidade dos genes *ACTB*, *RPL5*, *MRPS27*, *MRPS30*, *TFRC*, *EEF1*, *LDHA*, *HPRT1* e recomendar genes estáveis para normalização de genes alvos no tecido renal de diferentes frangos, submetidos ao estresse térmico agudo. O experimento foi conduzido com 36 frangos de três grupos genéticos (Cobb 500®; e os ecótipos locais Peloco e Caneluda), sendo 12 indivíduos de cada grupo, onde, seis aves de cada grupo foram submetidas ao ambiente de conforto térmico, à 23°C e seis, ao ambiente de estresse térmico agudo, a temperatura de 39,5°C por uma hora. A estabilidade dos genes foi determinada usando os algoritmos: BestKeeper, GeNorm, NormFinder, RankAggreg e, heatmap. Dados da estatística descritiva evidenciou variabilidade na expressão dos genes. No ecótipo Peloco os genes *ACTB*, *EEF1* e *MRPS27*, e na linhagem Cobb 500®, o *ACTB* foram considerados não estáveis, enquanto que no ecótipo Caneluda apenas os genes *MRPS30* e *LDHA* mostraram estabilidade. Em relação o fator ambiente, os genes mais estáveis foram *HRPT1* (conforto) e o *EEF1* (estresse térmico agudo). Ao analisarmos todas as amostras (grupo genético e ambiente), os genes *LDHA* e *HPTR1* foram os melhores classificados pelos algoritmos BestKeeper e NormFinder, o *MRPS30* e *HRPT1* pelo GeNorm. Entretanto, no *ranking* geral, os genes *LDHA*, *HRPT1* e *MRPS30* foram os mais estáveis e devem ser utilizados como controle endógeno em rim de frangos para os fatores aqui analisados. Esses resultados foram confirmados pelo gráfico heatmap. Já gene *ACTB* revelou-se como o menos estável na maioria das análises e não deve ser usado como normalizador nesse experimento.

Palavras chave: BestKeeper, Caneluda, Cobb, Controle endógeno, GeNorm, NormFinder, Peloco, RT-qPCR.

EXPRESSION OF REFERENCE GENES IN THE KIDNEY OF DIFFERENTS FROM COMMERCIAL CHICKENS AND LOCAL CHICKENS IN BRAZIL SUBJECTED TO ACUTE THERMAL STRESS

ABSTRACT

Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) is widely used to assess gene expression, but to obtain reliable results, the reaction should be normalized, usually by selecting reference genes whose expression remains stable in all samples in the different treatments. The objective was to evaluate the stability of the *ACTB*, *RPL5*, *MRPS27*, *MRPS30*, *TFRC*, *EEF1*, *LDHA*, *HPRT1* genes and to recommend stable genes for normalization of target genes in the renal tissue of different chickens submitted to acute thermal stress. The experiment was conducted with one hundred and thirty-six chickens from three genetic groups (Cobb 500®; and the local ecotypes Peloco and Caneluda), with 12 individuals from each group, where 06 birds from each group were subjected to the thermal comfort environment, at 23 ° C and 06, in an environment of acute thermal stress, at a temperature of 39.5 ° C. The stability of the genes was determined using the algorithms: BestKeeper, GeNorm, NormFind, RankAggreg and, heatmap. Descriptive statistics data showed variability in gene expression. In the Peloco ecotype the *ACTB*, *EEF1* and *MRPS27* genes, and in the Cobb 500® strain, the *ACTB* were considered to be non-stable, whereas in the Caneluda ecotype only the *MRPS30* and *LDHA* genes showed stability. Regarding the environment factor, the most stable genes were *HRPT1* (comfort) and *EEF1* (acute thermal stress). When analyzing all samples (genetic group and environment), the *LDHA* and *HPTR1* genes were the best classified by the BestKeeper and NormFinder algorithms, the *MRPS30* and *HRPT1* by GeNorm. However, in the general ranking, the *LDHA*, *HRPT1* and *MRPS30* genes were the most stable and should be used as an endogenous control in chicken kidney for the factors analyzed here. These results were confirmed by the heatmap graph. The *ACTB* gene was found to be the least stable in most analyzes and should not be used as a normalizer in this experiment.

Keywords: BestKeeper, Caneluda, Cobb, Endogenous control, GeNorm, NormFinder, Peloco, RT-qPCR.

1. Introdução

Estudos envolvendo expressão e funções dos genes são cada vez mais importantes na pesquisa biológica e, hoje constituem um importante campo de estudo da biologia celular e molecular (VANDESOMPELE et al., 2002; BUSTIN; NOLAN, 2009; AYANOĞLU et al., 2018). A PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR) é uma das técnicas mais utilizadas para avaliar a expressão de genes em vertebrados por ser uma técnica que possibilita uma análise simultânea em diferentes tecidos, com o resultado podendo ser visualizado imediatamente. Além disso, permite avaliar amostras com baixas concentrações de RNA e fornece resultados reproduzíveis e verificáveis (ARYA et al., 2005; WONG; MEDRANO, 2005; NOLAN et al., 2006; PAOLACCI et al., 2009; AYANOĞLU et al., 2018).

Todos os ensaios de qRT-PCR são caracterizados por variação biológica, principalmente a variabilidade inerente dos níveis de mRNA em diferentes tecidos e indivíduos, mas também variações analíticas caracterizadas por diferenças na qualidade do RNA, variabilidade nos protocolos de extração, eficiências de RT e PCR que podem levar a erros e resultados confusos (HUGGETT et al., 2005; BUSTIN; NOLAN, 2009). Para obter resultados precisos e confiáveis em um experimento que vise quantificar a expressão gênica, é de extrema importância normalizar a reação buscando remover a variação não biológica tanto quanto possível. Várias estratégias de normalização têm sido propostas até o momento, mas o uso de um ou mais genes de referência tem sido o meio preferido para normalizar os genes alvos em estudos de expressão gênica (GUTIERREZ et al., 2008; AYANOGLU et al., 2018).

Os genes de referências são genes cuja expressão permanece constante entre as células em diferentes condições experimentais ou fisiológicas por serem expressos a todo o momento em determinadas células, apresentando pequena ou nenhuma variação entre diferentes idades e tecidos (KOZERA; RAPACZ, 2013). No entanto, nenhum gene isolado é constitutivamente expresso em todos os tipos de células e em todas as condições experimentais, implicando que a estabilidade da expressão do gene de controle pretendido deve ser verificada antes de cada experimento (ANDERSEN et al., 2004). Além disso, o uso de genes instáveis como normalizadores pode comprometer a

confiabilidade dos dados uma vez que esses atuam como um controle interno da reação e sua função é assegurar que qualquer variação no material genético se relacione na mesma medida entre o objeto de pesquisa e o controle (KOZERA; RAPACZ, 2013; JULIAN et al., 2015).

Assim, a escolha do gene de referência é de vital importância e deve ser feita com muito cuidado, levando em consideração toda a especificidade do seu experimento, havendo sempre a obrigatoriedade de um estudo inicial da estabilidade de expressão desses genes, para posteriormente utilizar o mais adequado como controle endógeno do experimento. Os genes que mais cumprem esse requisito são os chamados metabólicos básicos, ou genes de manutenção (THELLIN et al., 1999; MACÁRIO, 2016).

2. Materiais e Métodos

2.1 Aprovação do CEUA

Todo o experimento teve aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/UESB, Protocolo 109/2015.

2.2 Animais

O experimento foi realizado no Setor de Avicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), no município de Itapetinga, BA, localizado a 293 metros de altitude, situado ente coordenadas geográficas: Latitude: 15° 15' 23" Sul e Longitude: 40° 15' 27" Oeste. Foram utilizadas 36 aves, machos e fêmeas: 12 pintos da linhagem comercial Cobb 500®, 12 pintos do ecótipo Peloco e 12 pintos do ecótipo Caneluda. As aves locais foram provenientes de ovos de galinhas dos ecótipos Peloco e Caneludo do Catolé do Setor de Avicultura da UESB, campus Itapetinga. Em relação às aves comerciais, foram adquiridos pintos de um dia da linhagem Cobb 500®, os quais chegaram, uma semana após o nascimento das aves caipiras e logo foram criadas sob as mesmas condições ambientais sob temperatura média local de 26,5°C. Foi utilizado galpão aberto, forrado com maravalha e, as aves foram alimentadas atendendo as exigências das respectivas fases de criação seguindo a dieta nutricional de ROSTAGNO; GOMES, (2011), sendo produzida no Setor de Avicultura da UESB, Itapetinga, BA (Tabela 1).

Vale ressaltar que a região de Itapetinga é caracterizada por possuir clima semiárido e por oscilações de temperatura, com o verão longo e quente, e temperaturas oscilando entre 17°C e 32°C. Durante o dia a temperatura é bem alta e à noite diminui. O mês mais seco é agosto e tem, em média, 30 mm de precipitação e o mês de dezembro é o mês de maior precipitação com uma média de 140 mm, sendo que 857 mm é o valor da pluviosidade média anual (CLIMA TEMPO, 2020; CLIMATE-DATA, 2020).

Tabela 1: Composição da ração que foi usada para os pintainhos até os 30 dias de idade segundo ROSTAGNO; GOMES (2011).

Milho	61,1%
Farelo de soja	35,0%
Fosfato bi cálcico	2,00%
Calcário	1,10%
NaCl	0,30%
Suplemento vitamínico e mineral	0,40%
Níveis nutricionais	
Pb	21,2%
Em	2,89%
Ca	1,01%
P disponível	0,49%
Sódio	1,63%
Lisina	1,10%
Met + cis	0,74%

2.3 Estresse térmico

O estresse por alta temperatura foi realizado em dois momentos, para que as aves fossem abatidas com a mesma idade, com 30 dias de vida. No dia 02/12/2015 seis aves do ecótipo Peloco e seis aves da raça ecótipo foram submetidas ao estresse térmico por calor sob temperatura média de 39,5°C e umidade relativa ambiental de 60%. Uma semana depois, seis aves da linhagem Cobb 500 foram submetidas ao estresse térmico com as mesmas condições de temperatura e umidade.

Durante o período em que as aves estavam submetidas ao calor dos aquecedores, elas foram monitoradas, ficando sob observação constante quanto às mudanças de

comportamento, afim de evitar que os animais experimentais viessem a óbito por excesso de temperatura e para determinar o tempo em que cada grupo genético suportaria a alta temperatura. Quando os animais se mostraram prostrados e com a frequência cardíaca aumentada, o período de estresse por calor foi finalizado e, imediatamente, as aves foram abatidas por deslocamento cervical. As aves controles (6 de cada grupo genético) foram abatidas no início da manhã (4:00 h, horário local) para garantir temperatura de conforto térmico (23°C).

2.4 Coleta de tecidos, extração e quantificação

Após o abate, foram coletados fragmentos de rim, que foram armazenados em tubos criogênicos, identificados e, imediatamente, congelados em nitrogênio líquido. Após a coleta, as amostras foram encaminhadas ao laboratório de Genética Veterinária Animal da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus, Bahia e armazenadas em ultrafreezer -80°C. Inicialmente foi realizada a extração do RNA total das amostras selecionadas com Trizol® - Invitrogen, seguindo o protocolo do fabricante. As concentrações dos RNA's extraídos foram verificadas através de espectrofotômetro NanoDrop 2000® e a qualidade desses RNAs através de eletroforese em gel de agarose à 1% corados com brometo de etídio e visualizados em luz ultravioleta.

2.5 Transcrição Reversa do mRNA

A transcrição Reversa foi realizada com o kit comercial GoScript™ Reverse Transcription System (Promega Corporation, Madison, EUA). Foram utilizados, 4 µl de RNA obtidos a partir do tecido e padronizados para 500ng, acrescidos de 1 µl de Oligodt e 15 µl de um mix contendo enzima Transcriptase Reversa, inibidor de ribonuclease recombinante RNase OUT, RT buffer, dNTP e água ultrapura, em um volume final de 20 µl. As amostras foram incubadas em termociclador a 50°C por 50 min, 85°C por 5 min e refrigeradas em gelo. O cDNA foi acondicionado em freezer -20°C para posterior utilização nos experimentos de expressão gênica.

2.6. Expressão gênica: validação dos genes de referência

A avaliação da expressão gênica utilizando o cDNA obtido a partir de RNA extraído das amostras de interesse foram realizadas em duplicatas. Inicialmente, o melhor controle endógeno para normalização dos dados foi determinado por meio da análise de 8 genes constitutivos (tabela 2), cujos *primers* foram desenhados por Nascimento et al. (2015).

Tabela 2. Descrição dos genes de referência de *Gallus gallus* e seus *primers* específicos utilizados nas análises de RT-qPCR.

GENE	ID GENE	SEQUÊNCIA 5' - 3'
<i>ACTB</i>	M11100.1	F:CACCCTGTCTGACTACAACATC R:CAAGACTGCTGACAACAATA
<i>LDHA</i>	ENSGALE000 00067556	F:CTATGTGGCCTGGAAGATCAG R:GCAGCTCAGAGGATGGATG
<i>TFRC</i>	ENSGALE000 00080099	F:CTCCTTTGAGGCTGGTGAG R:CGTCCACACTTTATCCAAGAAG
<i>MRPS30</i>	NM_204939.1	F:CCTGAATCCCGAGGTTAACTATT R:GAGGTGCGGCTTATCATCTATC
<i>RPL5</i>	NM_204581.4	F:ATATAACGCCTGATGGGATGG R:TTGACTTCTCTCTTGGGTTTCT
<i>MRPS27</i>	XM_424803	F:GCTCCCAGCTCTATGGTTATG R:ATCACCTGCAAGGCTCTATTT
<i>HPRT1</i>	AJ132697	F:GCACTATGACTCTACCGACTATT R:CAGTTCTGGGTTGATGAGGTT
<i>EEF1</i>	NM_204157.2	F:GCCCCGAAGTTCCTGAAATCT R:AACGACCCAGAGGAGGATA

Para a construção da curva padrão foi utilizado um *pool* de cDNA, de todos os tratamentos e tecidos, visando calcular a eficiência da PCR, através de uma diluição seriada (nas concentrações de 5, 15, 45 e 135ng/μl com três concentrações de *primers*: 200, 400 e 800 mM).

Para a comparação dos Cts, as amostras dos tecidos foram destinadas à amplificação em PCR em tempo real. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador, no ensaio ddCt (*Relative Quantification*). As condições da reação de qPCR foram definidas com desnaturação inicial a 95°C durante dois minutos e 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos. A temperatura de extensão foi padronizada individualmente para cada par de *primers* durante 60 segundos. Ao final da reação de amplificação foi incluído um passo adicional com elevação gradual de temperatura de

60°C a 95°C para obter a curva de dissociação. A amplificação de todos os genes foi realizada na plataforma Real Time PCR 7500 Fast (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e os resultados foram obtidos com o programa Sequence Detection Systems (V. 2.0.6) (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) que gerou o parâmetro cycle threshold (Cts). Os valores de Cts das duplicatas foram obtidos diretamente pelo programa acima citado e usados para calcular o Ct médio e o desvio-padrão. A eficiência da amplificação da PCR foi calculada para cada gene de referência usando a fórmula $E = (10^{(-1/\text{coeficiente angular})} - 1) \times 100$ (PFAFFL, 2001). Posteriormente, as curvas de dissociação foram avaliadas quanto à amplificação e à especificidade. Após a análise de eficiência, a temperatura de anelamento e a concentração dos *primers* mais adequada foram empregadas nas reações de RTqPCR.

2.7. PCR quantitativa em tempo real

Após calcular os valores de eficiência e escolher os melhores parâmetros (T° de anelamento, concentração de *primers* e cDNA), as amostras foram submetidas à amplificação por PCR em tempo real, seguindo as mesmas condições de reação e termociclagem do teste de eficiência. Todas as amostras foram realizadas em duplicatas.

2.8. Determinação da estabilidade da expressão dos genes de referência

Para determinar a estabilidade dos genes de referência foram utilizados os valores médios de Ct, que foram usados como arquivo de entrada, de acordo com cada algoritmo. Foram aplicados três algoritmos estatísticos diferentes, o BestKeeper (PFAFFL et al., 2004), GeNorm (VANDESOMPELE 2002) e NormFinder (ANDERSEN et al., 2004). Foi gerado também, um ranking geral dos genes de referência empregando as três ferramentas através do algoritmo RankAgreeg (PIHUR, et al., 2007).

Fizemos um gráfico Heatmap por meio dos pacotes pheatmap v. 1.0.12 (KOLDE, 2019) e pvclust v.2.2 (SUZUKI et al., 2019). Para o agrupamento utilizou-se a distância Euclidiana, com valor de bootstrap de 10.000 iterações e todas as análises foram realizadas utilizando os softwares R v. 3.6.3 (R CORE TEAM, 2020) e R Studio v. 1.

2.1335 (RSTUDIO TEAM, 2018) e, para cada ferramenta foi obtido um ranking de estabilidade.

3. RESULTADOS

3.1 Eficiência e especificidade dos *primers*

Para o trabalho em questão, foram selecionados para validação os seguintes genes candidatos, diferencialmente expresso (*ACTB*, *LDHA*, *HPRT1*, *MRPS27*, *EEF1*, *RPS30*, *RPL5* e *TFRC*). Inicialmente, para a otimização das reações de RTq-PCR, foi realizado o teste de eficiência nos oito genes candidatos para verificar as principais características dos *primers* usando cDNA extraído de fragmentos de rim das linhagens de frangos: comercial Cobb 500® e os ecótipos naturalizados Caneluda e Peloco. Amostras do RNA foram visualizadas em gel de agarose para autenticar a preservação da qualidade do material utilizado (Figura 01).

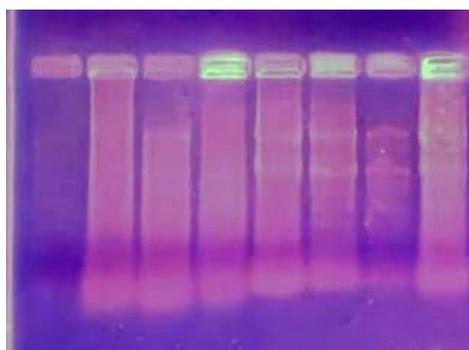


Figura 1. Gel evidenciando a qualidade do RNA.

Após o teste de eficiência, foi estabelecida como ótima uma temperatura de anelamento dos *primers* de 60 °C. A concentração de cDNA de 45ng/μl foi considerada a melhor. E, as concentrações dos *primers* foram escolhidas de acordo com a eficiência de cada *primer* variando entre 200, 400 e 800mM. A eficiência de amplificação mostrou-se aceitável, com uma faixa de porcentagem variando entre 90% a 107, com a inclinação da reta entre -3,59 a -3,16, indicando boa correlação linear (Tabela 03 e Figura 02).

Tabela 03: Parâmetros dos *primers* específicos dos Genes de Referência para frangos obtidos a partir das análises de curva de Eficiência em RT-qPCR

GENE	TA (°C)	cDNA	PRIMER	EFICIENCIA (%)	RR ²	SLOPE
<i>ACTB</i>	60	45ng/μl	800mM	95	0,997	-3,456
<i>HPRT1</i>	60	45ng/μl	800mM	91	0,999	-3,517
<i>LDHA</i>	60	45ng/μl	400mM	96	0,999	-3,413
<i>EEF1</i>	60	45ng/μl	200mM	94	0,995	-3,467
<i>MRPS27</i>	60	45ng/μl	400mM	90	0,999	-3,598
<i>MRPS30</i>	60	45ng/μl	800mM	104	1	-3,225
<i>RPL5</i>	60	45ng/μl	800mM	107	0,993	-3,160
<i>TFRC</i>	60	45ng/μl	200mM	104	0,999	-3,2211

TA = Temperatura de anelamento; *SLOPE* = Inclinação da Reta; R² = Coeficiente de Determinação; [CDNA] = Concentração de cDNA; [*PRIMER*] = Concentração de *primer*

Os valores de coeficiente de determinação (R²) foram maiores que 0,99. A especificidade dos *primers* foi avaliada por meio da curva de dissociação, e também das curvas de fusão, as quais mostraram um pico específico, não sendo observados dímeros indicando um desempenho ideal dos iniciadores (Figura 02).

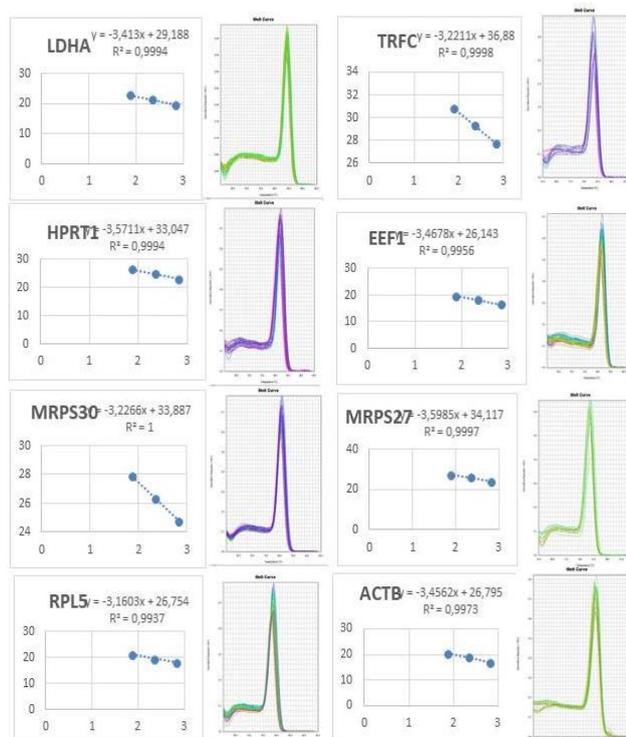


Figura 2: Curvas de regressão, amplificação e dissociação do teste de eficiência de oito genes de referência de frangos provenientes das reações de RT-qPCR.

3.2 Estatística descritiva dos genes de referência

Observaram-se resultados discrepantes na expressão dos oito genes quando analisamos separadamente os grupos genéticos de frango (GG) e o ambiente (AMB) empregando a ferramenta BestKeeper (Tabelas 04 e 05). Essa expressão foi agrupada em duas categorias (forte e moderada), de acordo como os valores de média aritmética dos CTs encontrados em todas as nossas análises.

Assim, na linhagem Cobb 500®, os genes analisados pelo algoritmo BestKeeper apresentaram níveis de expressão com valores médios Ct bem próximos, com 07 genes considerados como genes de alta expressão por possuir valores médios de Ct menores que 25 ciclos e o *TFRC*, que teve uma expressão moderada com média de 27.12 ciclos. O coeficiente de variação no gene *TFRC*, em fragmentos de rim da linhagem Cobb 500®, apresentou um valor mais baixo (Coeficiente de Variação-CV = 2.607%) e o *ACTB*, o valor mais alto (CV = 5.27%). Essa linhagem de frangos apresentou os valores mais baixos em relação aos outros grupos genéticos aqui analisados. Quanto ao desvio padrão, sete dos oito genes podem ser considerados estáveis no rim da linhagem Cobb 500® por apresentarem valores menores que 1, sendo que apenas o *ACTB* apresentou valor superior a 1 (ver Tabela 04).

No ecótipo Caneluda, usando o mesmo *software* de análise, apenas os genes *EEF1* e *RPL5* evidenciaram alta expressão. Os outros seis genes tiveram uma expressão considerada moderada e apresentaram Ct variando de 26 a 28 ciclos. Foi observado também um alto coeficiente de variação nas análises desse grupo genético, cujo valor mais baixo foi do gene *LDHA* (CV = 3.602%) e o mais alto *EEF1* (CV = 11.305%). Quanto ao desvio padrão, dois dos genes (*MRPS30* e *LDHA*) apresentaram valores inferiores a um e todos os outros revelaram valores de DP superiores a um, sendo assim considerados não estáveis, diferente do que foi observado no mesmo tecido da linhagem Cobb500® (Tabela 04).

No grupo genético Peloco, assim como em Caneluda apenas os genes *EEF1* e *RPL5* evidenciaram alta expressão com valores de Ct de 18.19 e 18.652, respectivamente. Os outros seis genes tiveram uma expressão moderada Ct entre 25.96 e 28.39.

Em relação ao coeficiente de variação ecótipo Peloco apresentou resultados que podem ser considerados como intermediário, com valores mais altos que Cobb500® e mais baixos que Caneluda. Assim, em Peloco, o valor mais baixo foi do gene *TFRC*

(CV = 1.963) e o mais alto *EEF1* (CV = 7.212%). Cinco genes tiveram valores de desvio padrão inferiores a um e os outros três (*ACTB*, *EEF1* e *MRPS27*) foram considerados não estáveis (Tabela 04).

Tabela 04: Estatísticas descritivas dos níveis de expressão dos genes de referência obtidos pelo BestKeeper, em rim de grupos genéticos diferentes de frangos

n=12	<i>ACTB</i>	<i>LDHA</i>	<i>HPRT1</i>	<i>MRPS27</i>	<i>EEF1</i>	<i>MRPS30</i>	<i>RPL5</i>	<i>TFRC</i>
COBB500®								
Média geométrica [Cq]	22.91	24.38	25.15	23.92	18.16	25.027	18.64	27.11
Média aritmética [Cq]	22.96	24.40	25.16	23.94	18.19	25.044	18.65	27.12
Min [Cq]	20.9	23.15	23.55	22.69	17.27	23.93	17.92	25.90
Max [Cq]	26.19	26.05	26.80	26.07	20.35	26.89	19.95	28.27
Desvio padrão [± Cq]	1.21	0.818	0.743	0.762	0.671	0.706	0.524	0.707
Coef. Variaç. [% Cq]	5.27	3.352	2.953	3.181	3.688	2.817	2.811	2.607
Coef. Corr. [r]	0.475	0.841	0.819	0.792	0.95	0.846	-0.065	0.748
CANELUDA								
Média geométrica [Cq]	25.55	25.67	26.32	27.14	21.16	26.17	21.51	28.19
Média aritmética [Cq]	25.67	25.70	26.47	27.32	21.34	26.21	21.66	28.24
Min [Cq]	22.72	22.83	22.35	22.23	17.27	22.98	17.63	26.09
Max [Cq]	30.97	27.33	31.43	33.72	26.69	27.91	26.32	31.29
Desvio padrão [± Cq]	2.26	0.926	2.509	2.651	2.413	0.972	2.138	1.390
Coef. Variaç. [% Cq]	8.81	3.602	9.478	9.701	11.35	3.707	9.871	4.921
Coef. Corr. [r]	0.93	0.837	0.94	0.984	0.98	0.716	0.832	0.687
PELOCO								
Média geométrica [Cq]	26.95	25.95	26.15	27.29	20.11	26.04	20.09	28.38
Média aritmética [Cq]	27.03	25.96	26.17	27.34	20.19	26.06	20.11	28.39
Min [Cq]	23.64	24.96	24.47	24.86	18.12	24.06	18.84	27.43
Max [Cq]	30.14	27.53	27.86	29.81	24.84	27.95	21.66	29.48
Desvio padrão [± Cq]	1.835	0.614	0.88	1.474	1.456	0.905	0.78	0.557
Coef. Variaç. [% Cq]	6.786	2.366	3.362	5.39	7.212	3.473	3.878	1.963
Coef. Corr. [r]	0.59	0.794	0.954	0.917	0.63	0.88	0.477	0.357

Foi realizada também uma análise unindo todos os grupos genéticos e tratamentos e, a partir da ferramenta Bestkeeper, a expressão dos oito genes foi agrupada também em duas categorias (forte e moderada). Os genes *EEF1* e *RPL5* apresentaram expressão de mRNA forte, com valores de Ct ≤ 25 ciclos e, seis genes (*RPL5*, *MRPS30*, *EEF1*, *HPRT1*, *ACTB*, *LDHA*) tiveram expressão moderada variando entre as médias 25 e 27 ciclos. Observou-se um alto coeficiente de variação entre todos os genes, sendo, o mais alto em *EEF1* (CV = 9.57%) e o mais baixo foi do gene *TFRC* (CV = 3.42%). Quanto ao desvio padrão, dois dos oito genes (*TFRC* e *LDHA*) podem ser considerados estáveis para todos os fatores analisados no rim da linhagem Cobb 500® e dos ecótipos

Caneluda e Peloco, por apresentarem valores menores que todos os outros genes apresentaram valores superiores a um (Tabela 05).

Tabela 05: Estatísticas descritivas dos níveis de expressão dos genes de referência em rim de frangos obtidos pelo BestKeeper (n=36)

n=36	<i>ACTB</i>	<i>LDHA</i>	<i>HPRT1</i>	<i>MRPS27</i>	<i>EEF1</i>	<i>MRPS30</i>	<i>RPL5</i>	<i>TFRC</i>
Média geométrica [Cq]	25.08	25.33	25.87	26.07	19.77	25.74	20.04	27.89
Média aritmética [Cq]	25.23	25.36	25.94	26.20	19.91	25.77	20.14	27.92
Min [Cq]	20.9	22.83	22.35	22.23	17.27	22.98	17.63	25.9
Max [Cq]	30.9	27.53	31.43	33.72	26.69	27.95	26.32	31.29
Desvio padrão [± Cq]	2.35	0.967	1.472	2.205	1.905	1.062	1.588	0.956
Coef. de Variaç. [% Cq]	9.315	3.815	5.676	8.416	9.571	4.121	7.882	3.423
Coef. de corr. [r]	0.816	0.846	0.889	0.969	0.912	0.782	0.792	0.724

3.3 Estabilidade de expressão dos genes de referência

Usando três ferramentas estatísticas: BestKeeper, GeNnorm e NormFinder foi possível ainda estabelecer uma classificação de estabilidade dos genes, de acordo com o fator analisado (grupo genético: Peloco, Caneluda e Cobb 500® e tratamento: ambiente com conforto térmico e ambiente com estresse térmico agudo), para cada ferramenta utilizada. Para a ferramenta BestKeeper, considerando apenas o grupo genético, os melhores genes de referência foram o *MRPS30* (0.706), *TFRC* (0.557) e *LDHA* (0.926), respectivamente. Considerando-se o ambiente, por sua vez, os melhores genes foram o *TFRC* (1.015) para o ambiente conforto e o *LDHA* (0.825) para o estresse por calor agudo. O gene *ACTB* foi considerado menos estável nos grupos genéticos Cobb 500® e Peloco, no ambiente estresse. Em Caneluda no ambiente conforto o gene menos estável foram o *HPRT1* e o *MRPS27* no ambiente estresse térmico. No ranking geral do BestKeeper, envolvendo os grupos genéticos e as duas condições ambientais, o gene *LDHA* e o *HPRT1* foram considerados os mais estáveis e, o menos estável foi o *ACTB* (Tabela 06).

A partir do uso da ferramenta GeNnorm verificou-se que dois genes foram semelhantes quanto a estabilidade nos grupos genéticos Cobb 500 e Peloco (*MRPS30*-0.034 e *HPRT1*- 0.027) e, igualmente semelhantes, para os genes *LDHA* e *RPL5* (0.167) no grupo Caneluda. Quando analisamos o fator ambiente, no estresse térmico, o *HPRT1* (0.078) foi mais estável e no ambiente conforto foi verificado novamente que os genes *MRPS30* e *HPRT1* (0.080) mostraram-se com maior estabilidade.

Em relação ao gene menos estável, pela ferramenta GeNorm, o *ACTB* também mostrou menor estabilidade tanto nos grupos genéticos quanto em relação aos tratamentos. No *ranking* geral para o algoritmo, os genes *MRPS30* e *HRPT1*, foram os mais estáveis e o *ACTB* o menos estável (Tabela 07).

Tabela 06. *Ranking* com os valores de estabilidade de cada fator (raça e ambiente) em rim de frangos, obtidos através da ferramenta BestKeeper.

GENE	Geral (n=36)	Cobb (n=12)	Peloco (n=12)	Caneluda (n=12)	Conforto (n=18)	Estresse (n=18)	Rank Geral
<i>LDHA</i>	0.967(2)	0.818 (5)	0.614 (2)	0.926 (1)	1.12 (2)	0.825 (1)	1
<i>HPRT1</i>	1.472(4)	0.743 (2)	0.88 (4)	2.509 (8)	1.757 (5)	1.19 (4)	2
<i>MRPS30</i>	1.062(3)	0.706 (1)	0.905 (5)	0.972 (3)	1.203 (3)	0.894 (3)	3
<i>TFRC</i>	0.956(1)	0.707 (6)	0.557 (1)	1.39 (4)	1.015 (1)	0.879 (2)	4
<i>RPL5</i>	1.588(5)	0.524 (3)	0.78 (3)	2.138 (2)	1.678 (4)	1.511 (5)	5
<i>MRPS27</i>	2.205(6)	0.762 (7)	1.474 (7)	2.651 (7)	2.511 (8)	1.836 (6)	6
<i>EEF1</i>	1.905(6)	0.671 (4)	1.456 (6)	2.413 (6)	1.903 (6)	1.908 (7)	7
<i>ACTB</i>	2.35(8)	1.21 (8)	1.835 (8)	2.264 (5)	2.051 (7)	2.648 (8)	8

Após utilizar a ferramenta NormFinder, os genes mais estáveis, considerando o grupo genético, foram o *EEF1* (0,25 e 0,45) para a linhagem Cobb 500® e o ecótipo Caneluda, respectivamente. Já o gene *HPRT1* (0,21) mostrou-se mais estável para o ecótipo Peloco. Em relação ao ambiente, os genes mais estáveis foram o *HRPT1* (0,56) para o conforto térmico e o *EEF1* (0,83) para o estresse térmico agudo. No *ranking* geral obtido através da ferramenta NormFinder, o gene *LDHA* foi o mais estável, enquanto que o *ACTB* foi o menos estável (Tabela 08).

Tabela 07. *Ranking* com os valores de estabilidade de cada fator (raça e ambiente) em rim de frangos, obtidos através da ferramenta GeNorm.

	Geral (n=36)	Cobb (n=12)	Peloco (n=12)	Canelud a (n=12)	Conforto (n=18)	Estresse (n=18)	Rank Gera l
<i>MRPS30</i>	0.078(1)	0.034 (1)	0.027(1)	0.233 (5)	0.080 (1)	0.078(2)	1
<i>HPRT1</i>	0.078(1)	0.034(1)	0.027(1)	0.257(6)	0.080 (1)	0.078(1)	2
<i>LDHA</i>	0.129(3)	0.077 (4)	0.079 (3)	0.167(1)	0.147 (3)	0.111 (3)	3
<i>RPL5</i>	0.158(4)	0.054(3)	0.088 (4)	0.167 (1)	0.183(5)	0.133 (4)	4
<i>TFRC</i>	0.173(5)	0.102 (6)	0.098 (5)	0.198(3)	0.197(5)	0.149(5)	5
<i>MRPS27</i>	0.195(6)	0.093 (5)	0.124 (6)	0.211 (4)	0.220 (6)	0.169 (6)	6
<i>ACTB</i>	0.269(8)	0.131 (8)	0.156 (7)	0.286 (7)	0.252 (7)	0.252 (8)	7
<i>EEF1</i>	0.234(7)	0.112 (7)	0.197(8)	0.323 (8)	0.289 (8)	0.208 (7)	8

Os resultados gerados pelas três ferramentas (BestKeeper, GeNorm, NormFinder) possibilitaram a determinação de um ranking geral dos genes mais estáveis para os menos estáveis no tecido rim de frangos de diferentes grupos genéticos. Esses dados estão disponíveis na tabela 09 onde, além da classificação geral estabelecida por meio do uso do pacote RanKAggreg, há também uma síntese de estabilidade gênica determinado por cada um dos softwares utilizados inicialmente. Assim, quando desconsideramos todos os fatores, cada ferramenta forneceu uma classificação de estabilidade dos genes em tecidos de rim, onde os genes *TRFC*, *LDHA* e *MRPS30* foram os melhores classificados pelos algoritmos BestKeeper, *MRPS30*, *HRPT1* e *LDHA* pelo GeNorm e *LDHA*, *HPTR1* e *MRPS30* pelo NormFinder.

Tabela 08. Ranking com os valores de estabilidade de cada fator (raça e ambiente) em rim de frangos, obtidos através da ferramenta NormFinder.

GENE	Geral (n=36)	Cobb (n=12)	Peloco (n=12)	Caneluda (n=12)	Conforto (n=18)	Estresse (n=18)	Rank Geral
<i>LDHA</i>	0.68(1)	0.48 (4)	0.46 (2)	0.59 (3)	0.58 (2)	0.68 (2)	1
<i>HPRT1</i>	0.7(2)	0.5 (6)	0.21 (1)	0.61 (4)	0.56 (1)	0.86 (3)	2
<i>MRPS30</i>	0.78(3)	0.37 (3)	0.48 (3)	0.77 (8)	0.6 (3)	1.01 (7)	3
<i>EEF1</i>	0.84(5)	0.25 (1)	0.96 (7)	0.45 (1)	0.87 (4)	0.83 (1)	4
<i>RPL5</i>	0.83(4)	0.51 (7)	0.71 (5)	0.62 (5)	1.15 (7)	0.55 (1)	5
<i>TFRC</i>	0.85(6)	0.45 (3)	0.65 (4)	0.76 (7)	0.81 (4)	0.96 (6)	6
<i>MRPS27</i>	1.02(7)	0.49 (5)	0.91 (6)	0.66 (6)	1.16 (8)	0.89 (5)	7
<i>ACTB</i>	1.09(8)	0.89 (8)	1.13 (8)	0.52 (2)	0.85 (6)	1.55 (8)	8

Na classificação pelo pacote RanKAggreg os genes de referência mais estáveis para o tecido rim foram o *LDHA*, *HRPT1* e *MRPS30* (1º, 2º e 3º lugar, respectivamente), este resultado corrobora com os obtidos pelo algoritmo NormFinder. Sendo assim, no presente trabalho, esses genes mantiveram níveis de expressão com menor variabilidade e são indicados como normalizadores de genes alvos para o experimento realizado.

Os genes *ACTB* em maior grau e *MRPS27* em menor apresentaram variações de expressão entre os fatores analisados e por isso, foram considerados os menos estáveis, não sendo recomendado seu uso como controle endógeno em rim de frangos (Tabela 09).

O heatmap (Figura 03) gerado a partir dos valores de Cts dos oito genes constitutivos para os grupos genéticos de frango Peloco, Caneluda e Cobb 500 sob

conforto e estresse térmico demonstrou uma maior estabilidade para os genes *HRPT1*, *MRPS30* e *LDHA*. Em contrapartida, o gene *ACTB* apresentou os valores mais discrepantes de Cts, indicando que este não é um gene estável, de modo que não é adequado como controle endógeno considerando-se as condições experimentais do presente estudo. Esses resultados corroboram com os obtidos por meio do software Rankaggreg.

Tabela 09. Ranking geral dos genes de referência em rim de frangos, obtidos com as diferentes

GENE	Rank BestKeeper	Rank GeNorm	Rank NormFinder	Rank Aggreg
<i>LDHA</i>	2	3	1	1
<i>HRPT1</i>	5	2	2	2
<i>MRPS30</i>	3	1	3	3
<i>RPL5</i>	4	4	5	4
<i>TRFC</i>	1	5	6	5
<i>EEF1</i>	6	8	4	6
<i>MRPS27</i>	7	6	7	7
<i>ACTB</i>	8	7	8	8

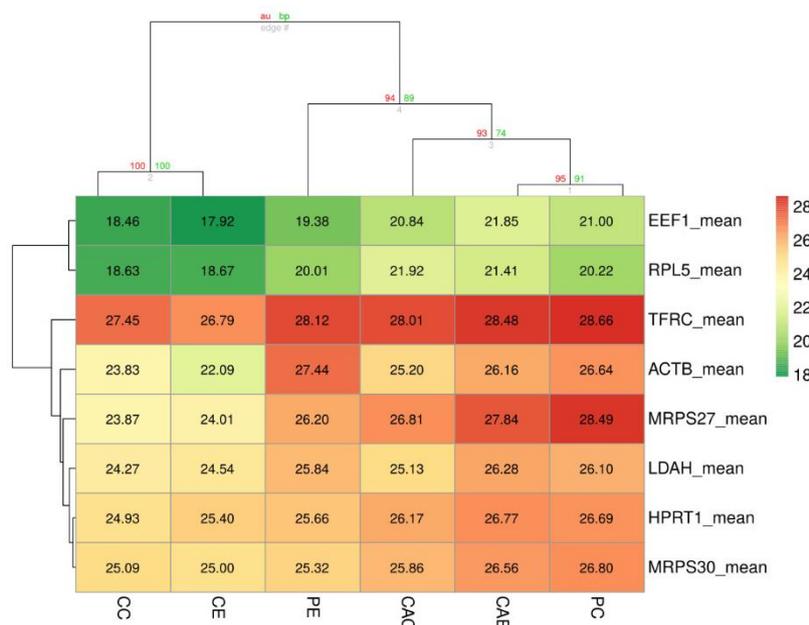


Figura 3: Gráfico gerado pelo *Heatmap* comparando os valores de Cts provenientes das reações de RT-qPCR de oito genes candidatos e analisando em função da interação Grupo genéticos (PC = Peloco Conforto, PE = Peloco Estresse, CC = Cobb Conforto, CE= COBB Estresse, CAC = Caneluda Conforto, CAE = Caneluda Estresse). Os tons mais para verde são os menores valores de expressão e os mais para vermelho, os maiores.

Foi possível verificar também pelo Heatmap, que houve diferenças nos níveis de expressão dos genes (forte ou moderada), de acordo como os valores médios dos CTs. Os genes *EEF1* e *RPL5* apresentaram níveis de expressão mais altos com valores de $Ct < 25$ para todos os grupos genéticos em ambos os tratamentos. O gene *TRFC*, por sua vez, foi expresso em um nível moderado em todos os grupos sob conforto e estresse térmico.

4. DISCUSSÃO

Devido à sua eficiência, a RT-qPCR tornou-se rapidamente uma técnica amplamente utilizada para a quantificação dos níveis de mRNA (BUSTIN; NOLAN, 2009). Para que os dados fornecidos pela RT-qPCR sejam confiáveis em análises de perfis de expressão gênica é necessário que se estabeleça um controle endógeno que venha a ser utilizado para normalizar as reações (OLIAS et al., 2014). Esse controle atualmente é estabelecido a partir de seleção de um ou mais genes que presumivelmente mantém uma expressão estável durante o experimento, denominado genes de referência (THELLIN et al., 1999; VANDESOMPELE, et al., 2002; WONG; MEDRANO, 2005; PAOLACCI et al., 2009; NAJAFPANAH, et al., 2013; AYANOGLU et al., 2018).

Neste trabalho, visando selecionar os genes com maior estabilidade para o tecido renal de frangos, dentro de uma condição experimental que envolveu os fatores: grupo genético (frangos caipiras Peloco e Caneluda e, linhagem comercial Cobb 500®) e ambiente (conforto térmico e estresse térmico agudo) foi escolhido oito genes candidatos, usados como normalizadores provenientes de diferentes vias metabólicas e genéticas. De acordo com Coutinho et al., (2010) os genes candidatos devem ser previamente identificados e, geralmente estão envolvidos com características de desenvolvimento, metabólicas e da biologia do animal.

Os valores de eficiência e temperatura (60°C) estabelecidos em nosso estudo em fragmentos de rim divergem daqueles ajustados por Cedraz et al., (2017) e Gromboni et al., (2020), ao utilizarem os mesmos pares de *primers* aqui analisados à partir de experimento também envolvendo o estresse térmico em grupos genéticos diferentes de aves. Nesse contexto, a temperatura variou de 60 a 64°C, com eficiência entre 94 e 109% no estudo realizado por Cedraz et al., (2017) em músculo de frangos e, de 60 a 62°C com eficiência entre 95% a 102% no estudo conduzido por Gromboni et al.,

(2020), em fígado e coração. Esses dados demonstram o grau de importância da realização do teste de eficiência dos *primers* para cada tecido utilizado em estudos de expressão gênica. Apesar das variações, nossos resultados estão de acordo com a literatura, encontrando-se dentro de uma faixa de porcentagem aceitável de eficiência RT-qPCR, sendo, portanto considerado preciso e confiável para este tipo de estudo (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001, STAINES et al., 2016; ZHANG et al., 2018).

Após determinar as condições adequadas para uma reação de RT-qPCR, buscamos rastrear os genes de referência ideais para normalizar a expressão de genes de interesse nas condições experimentais desse estudo. Para tal, empregamos ferramentas de análises amplamente difundidas para este tipo de pesquisa.

Diversos algoritmos já foram propostos para determinar a estabilidade dos genes de controle endógeno, e o BestKeeper é um dos mais adotados para este tipo de estudo (AZARPEYKAN; DITTMER; 2016; STAINES et al., 2016).

Nossos resultados com o uso do BestKeeper demonstrou uma grande variabilidade de expressão entre os diferentes genes de referência (tabela 04) para os fatores aqui analisados e os resultados da estatística descritiva dos genes obtido à partir ferramenta apontaram que a maior estabilidade de um gene está relacionada a um valor menor de coeficiente de variação e, valores de desvio padrão inferiores a um. De fato, o BestKeeper é um software que classifica a estabilidade de expressão dos genes de referência correlacionando os desvios padrão (DP) e os coeficientes de variância (CV) de seus valores de Ct em que, geralmente a maior estabilidade de um gene está relacionada a um valor menor de CV e valores de desvio padrão que deve ser menor ou igual a um (≤ 1) (PFAFFL et al., 2004; NAJAFPANAH et al., 2013; QU et al., 2019). Em outros trabalhos de validação dos genes de referência, também ficaram evidentes que a maior estabilidade está relacionada a esses critérios (NAJAFPANAH et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2015; CEDRAZ et al., 2017; QU et al., 2019).

As diferenças observadas entre os grupos genéticos para o mesmo tecido podem ser atribuídas às características próprias de cada grupo (CEDRAZ et al., 2017). Essas aves, apesar de pertencerem à mesma espécie (*G. gallus*), passaram por processos seletivos diferentes durante a evolução. Assim, enquanto a linhagem comercial Cobb sofreu intensa seleção para melhoria das características produtivas, os ecótipos Caneluda e Peloco mantiveram-se ao longo de seis séculos por cruzamentos aleatórios e seleção

empírica por pequenos criadores, resultando em galinhas menos produtivas, mas com maior resistência às doenças e ao estresse térmico (CEDRAZ et al., 2017).

Os resultados calculados pelos três algoritmos adotados (BestKeeper, geNorm, NormFinder) variaram consideravelmente quanto estabilidade da expressão entre grupos genéticos e ambiente (ver tabelas 06-08). Cada ferramenta forneceu uma classificação de estabilidade dos genes e sugerem que diferentes softwares podem introduzir um *ranking* diferente de genes de referência. Essas divergências de resultados entre as ferramentas também foram observadas em outros trabalhos e, provavelmente, estão relacionadas às diferenças no algoritmo que cada programa usa na classificação de genes e na determinação da estabilidade da expressão gênica, portanto, não se espera que eles produzam resultados idênticos (CRUZ, et al., 2009; NAJAFPANAH et al., 2013).

Entretanto, Cedraz et al., (2017) alegam que como existem variações entre raças e condições ambientais de estresse-conforto, espera-se que ocorram tais variações além das diferenças estatísticas dos algoritmos. Dessa forma, os resultados aqui encontrados corroboraram estudos anteriores e mais uma vez ratificam que não existe um gene de referência universal que se expresse de forma estável em todos os tecidos e condições experimentais e que, para estabelecer os genes de referência realmente adequados para serem usados em um estudo devem-se levar em consideração todas as condições experimentais daquela pesquisa (SCHMITTGEN; ZAKRAJSEK, 2000; CARDEC et al., 2010; CANKORUR-CETINKAYA et al., 2012; NAJAFPANAH et al., 2013; OLIAS et al., 2014).

Além das três ferramentas, uma classificação geral dos genes de maior estabilidade para os genes de menor estabilidade foi estabelecida usando o pacote RanKAggreg (PIHUR et al., 2007). Assim, os genes de referência considerados mais estáveis no rim de diferentes grupos genéticos de frangos submetidos aos tratamentos conforto e estresse térmico agudo foram: *LDHA*, *HRPT1* e *MRPS30* (1º, 2º e 3º lugar, respectivamente) e são recomendados para normalização dos dados de expressão gênica em estudos de RT-qPCR. Esses três genes preencheram a maioria dos critérios por serem fortemente estáveis e apontam flutuação mínima de expressão (KOZERA; RAPACZ, 2013).

O gráfico Heatmap dos genes candidatos confirmou os resultados definidos pelas outras ferramentas estatísticas aqui usadas e permitiu enxergar de maneira clara os

genes mais e os menos estáveis em expressões dos genes candidatos analisados neste trabalho. O Heatmap apresenta a matriz de dados com uma escala de cores, onde as linhas (ou colunas) são ordenadas de maneira que valores similares aparecem próximos, agrupando genes com padrões de expressão similar, auxiliando identificar relações entre eles e, ao mesmo tempo reduzindo a quantidade de informação a ser analisada (BRUN et al., 2005; HIGA et al., 2010).

O gene *LDHA* foi considerado mais estável neste estudo. Esse gene tem função importante em etapas da glicólise; a proteína codificada pelo *LDHA* catalisa a conversão de Lactato e NAD em piruvato e NADH na etapa final da glicólise anaeróbica (NCBI, 2020). A LDH é encontrada em concentrações relativamente altas em diversos órgãos e tecidos corpóreos, desde coração, fígado, músculos e rins, e nas aves é especialmente ativa nos eritrócitos. Em condições de estresse térmico essa enzima pode aumentar sua expressão por estar envolvida na degradação da glicólise (ALMEIDA, 2007). Como faz parte de uma importante reação química que fornece energia para o organismo, sua expressão é constante, o que pode explicar sua estabilidade neste tecido (HAWKINS et al., 2006; CAPITELLI; CROSTA, 2013).

O *HRPT1* codifica uma transferase que catalisa a conversão de hipoxantina em inosina monofosfato e guanina em guanosina monofosfato através da transferência do grupo 5-fosforibosil do 5-fosforibosil 1-pirofosfato. Esta enzima desempenha um papel central na geração de nucleotídeos de purina através da via de recuperação de purina. Uma deficiência nessa enzima inibe a salvação das bases purínicas desencadeando uma grande produção de ácido úrico, o qual se acumula na corrente sanguínea, resultando em patologias como: gota, disfunção renal, hiperuricemia, uricosúria, retardo mental e automutilação (JIMÉNEZ et al., 1998; BAVARESCO, 2004; DELGADILLO, et al. 2012). Nos rins, o acúmulo de cristais de ácido úrico pode formar cálculos renais (PUIG e JIMÉNEZ, 2010).

O terceiro gene mais de estável foi o *MRPS30* é um gene constituinte do ribossomo mitocondrial que gera proteínas que produzem a maior parte do ATP nas células eucarióticas, entre suas vias relacionadas estão a tradução mitocondrial e a biogênese e, a manutenção de organelas. Esse gene também é encontrado em tecidos como coração, músculo esquelético, rim e fígado (NCBI, 2020).

Todos os genes classificados como gene de referência neste trabalho são considerados genes constituintes, encontrados não apenas em rim, mas também em

diversos tecidos de frangos. Esses genes, geralmente tem expressão constante entre as células em diferentes condições experimentais ou fisiológicas por serem expressos a todo o momento em determinadas células (KOZERA; RAPACZ, 2013; NCBI, 2020).

O gene *ACTB* foi classificado como o gene de menor estabilidade neste estudo, pois variaram entre as condições experimentais e não deve ser usado para normalizar os dados de expressão gênica em experimentos semelhantes. Trabalhos de validação de genes de referência em tecidos de frangos realizados por Nascimento et al., (2015), em músculo e Gromboni et al., (2020) em coração, também revelaram que o *ACTB* é o gene menos estável quando comparados com a estabilidade de outros genes candidatos analisados. O *ACTB* é encontrado nas células de todo o corpo e desempenha papéis importantes na determinação da forma celular e no controle do movimento celular e, pelas suas características, figura entre os genes de referências comumente usados como normalizador de reações de RT-qPCR (HEASMAN, 2006; GIRICZ et al., 2008; YANG et al., 2013; JULIAN et al., 2015; ZHANG et al., 2018). Entretanto, muitos estudos atuais tem nos feito desertar dessa ideia e tem refutado o uso do *ACTB* como normalizador universal por esse ser um gene que apresenta variabilidade de expressão.

Nossos resultados ressalta a vital importância de um estudo prévio que selecione e valide de genes de referência apropriados para normalização de dados. De acordo com Bustin e Nolan, (2009) um gene de controle deve ser expresso aproximadamente no mesmo nível do gene de interesse para minimizar a influência do erro técnico e sua variação deve ser a menor possível. Além disso, é importante analisar o perfil de expressão de gene de referência em tecidos específicos, pois eles podem influenciar a interpretação dos dados analisados (GROMBONI et al., 2020).

Essa ideia está se disseminando no meio científico e muitos estudos de RT-qPCR tem procurado validar genes de referência em aves a exemplo de Olias et al., (2014); Zinzow-kramer et al., (2014); Bagés et al., (2015); Nascimento et al., (2015); Cedraz, et al., (2017); Hassanpour et al., (2018); Zhang et al., (2018), Gromboni et al., (2020) e muitos outros.

Este estudo traz informações inéditas em relação à validação de genes de referência em rim de frangos geneticamente divergentes, submetidos a um experimento de conforto e estresse térmico agudo. Nossos resultados podem ser interessantes para pesquisas futuras especialmente, envolvendo as galinhas caipiras Peloco e Caneluda,

uma vez que os estudos genéticos realizados nesses grupos encontram-se em fase inicial.

5. CONCLUSÃO

Este é o primeiro estudo que visa à seleção de genes de referência em rim de frangos geneticamente divergentes (Peloco, Caneluda e Cobb 500[®]) em duas condições ambientais (conforto e estresse térmico). Os genes *LDHA*, *HRPT1* e *MRPS30* permaneceram estáveis para todos os fatores analisados e podem ser recomendados para normalização dos dados de expressão gênica em estudos de RT-qPCR de tecido renal de frangos de diferentes grupos genéticos e condições de estresse térmico.

6. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, E. A. **Influência do estresse pré-abate na expressão gênica e qualidade da carne de frango (*Gallus gallus*)**. Dissertação. Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, São Paulo. 2007.

ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ØRNTOFT, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**. 2004.

AYANOGLU; F. B., ELÇIN; A., ELÇIN Y. M. Selection of Suitable Reference Genes for Quantitative Real-Time PCR Normalization in Human Stem Cell Research. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. 1119:151-168. doi: 10.1007/5584_2018_277. 2018.

ARYA, M.; et al. Basic principles of real-time quantitative PCR. **Expert Review of Molecular Diagnostics**. 5:2, 209-219, DOI: 10.1586/14737159.5.2.209. 2005.

AZARPEYKAN, S.; DITTMER, K. E. Evaluation of housekeeping genes for quantitative gene expression analysis in the equine kidney. **Journal of Equine Veterinary Science**. 27(4):165–168. doi:10.1294/jes.27.165. 2016.

BAGÉS, S. et al. Investigating reference genes for quantitative real-time PCR analysis across four chicken tissues. **Gene**. v.561, n.1, p.82–87. 2015.

BAVARESCO, C. S. **Efeito in vitro das substâncias acumuladas na doença de Lesch-Nyhan sobre a atividade da Na⁺ , K⁺ -ATPase em estriado de ratos**. Dissertação. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

BRUN, M.; JOHNSON, C. D.; RAMOS, K. S. Clustering: revealing intrinsic dependencies in microarray data. In: DOUGHERTY, E. R.; SHMULEVICH, I.; CHEN, J.; WANG, J. (Ed.). **Genomic signal processing and statistics**. New York: Hindawi Publishing Corporation, p. 129-162. 2005.

BUSTIN, S.A.; NOLAN, T. Analysis of mRNA expression by real-time PCR. Real-Time PCR. **Current Technology and Applications**: 111–135. 2009.

CANKORUR-CETINKAYA, A.; et al. A novel strategy for selection and validation of reference genes in dynamic multidimensional experimental design in yeast. **PLoS One**. 7(6):e38351. doi: 10.1371/journal.pone.0038351. 2012.

CAPITELLI, R.; CROSTA, L. Overview of psittacine blood analysis and comparative retrospective study of clinical diagnosis, hematology and blood chemistry in selected psittacine species. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v.16, n.1, p.71–120, 013.

CARADEC, J. et al. Desperate house genes': the dramatic example of hypoxia **British Journal of Cancer** 102, 1037–1043. 2010.

CEDRAZ, H. et al., Heat stress induces expression of HSP genes in genetically divergent chickens. **Plos One**. v.12 n.10, 2017.

CLIMATE-DATA. Clima Itapetinga. 2020. Disponível em <https://pt.climate-data.org/america-do-sul/brasil/bahia/itapetinga-1071/> Acesso em: 11/01/2020.

CLIMA TEMPO. Itapetinga – BA. 2020. Disponível em: <https://www.climatempo.com.br/climatologia/918/itapetinga-ba>. Acesso em: 11/01/2020.

COUTINHO, L. L.; ROSÁRIO, M. F.; JORGE E. C. Animal biotechnology. **Estudos avançados** 24 (70), 2010.

CRUZ, F. et al. Avaliação de genes de referência do café para estudos de expressão relativa por RT-PCR quantitativa em tempo real. **Molecular Breeding**, 23 (4), 607-616. doi: 10.1007 / s11032-009-9259-x. 2009.

DELGADILLO, M. M.; SAAVEDRA, S. F; ROJAS, E. S. G. Síndrome de Lesch-Nyhan, reporte de un caso clínico. **Gaceta Médica Boliviana**,35(.2) 2012.

GIRICZ, O.; LAUER-FIELDS, J. L.; FIELDS, G. B. The normalization of gene expression data in melanoma: investigating the use of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and 18S ribosomal RNA as internal reference genes for quantitative real-time PCR. **Analytical Biochemistry**. 380:137–139. 2008.

GROMBONI, J. G. G.; et al. Influence of heat stress on reference genes stability in heart and liver of two chickens genotypes. **PLoS ONE** 15(2):e0228314. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228314>. 2020.

GUTIERREZ, L.; MAURIAT, M., PELLOUX, J.; BELLINI, C.; VAN WUYTSWINKEL, O. Towards a systematic validation of references in real-time RT-PCR. **The Plant Cell**. vol. 20 (pg. 1734-1735. 2008.

HASSANPOUR, H. et al. Identification of reliable reference genes for quantitative real-time PCR in lung and heart of pulmonary hypertensive chickens. **Poultry Science**, p. 1-9. 2018.

HAWKINS, M. G.; KASS, P. H.; ZINKL, J. G.; TELL, L. A. Comparison of biochemical values in serum and plasma, fresh and frozen plasma, and hemolyzed samples from orange-winged amazon parrots (*Amazona amazonica*). **Veterinary Clinical Pathology**, v.35, n.2, p.219–225, 2006.

HEASMAN, J. Maternal determinants of embryonic cell fate. **Seminars in cell & developmental biology**. 17. 93-8. 10.1016/j.semcdb.2005.11.005. 2006.

HIGA, R. H.; et al., Análise de agrupamento de dados de expressão gênica na Rede Genômica Animal. **Comunicado Técnico**. Campinas, SP. 2010.

HUGGETT, J.; DHEDA, K.; BUSTIN, S.; ZUMLA, A. Real-time RT-PCR normalization; Strategies and considerations. **Genes & Immunity**. 6: 279-284. 2005.

JIMÉNEZ, R. T.; ANTÓN, F. M.; HERNÁNDEZ, T. R., et al. Estudio bioquímico, enzimático y genético de la deficiencia de hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa (HPRT). **Asociación Española de Pediatría**, 48(4): 355-362. 1998.

JULIAN, G. S.; OLIVEIRA, R. W.; TUFIK, S.; CHAGAS, J. R. Análise da estabilidade da expressão de genes de referência no ventrículo cardíaco esquerdo de ratos submetidos à hipóxia intermitente crônica. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. 42(3):211-214. 2015.

KOLDE, R. pheatmap: Pretty Heatmaps. R package version 1.0.12. 2019.

<https://CRAN.R-project.org/package=pheatmap>

KOZERA, B.; RAPACZ, M. Reference genes in real-time PCR. **Journal of Applied Genetics**. 54: 391–406. 2013.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$. **Methods**. 25(4), 402–408, 2001. doi:10.1006/meth.2001.1262.

MACÁRIO M. S. **Genes de referência para expressão gênica em codornas de corte.** Dissertação (Mestrado em Zootecnia) Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, Sergipe. 2016.

NAJAFPANAH, M. J.; SADEGHI, M.; BAKHTIARIZADEH, M. R. Reference genes selection for quantitative real-time PCR using RankAggreg method in different tissues of *Capra hircus*. **PloS one**, 8(12), e83041. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083041>. 2013.

NASCIMENTO, C. S. et al. Identification of Suitable Reference Genes for Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction Assays on Pectoralis major Muscle in Chicken (*Gallus gallus*). **Plos One**. v.10, n.5, p.e0127935. 2015.

NCBI. RefSeq. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>>. Acesso em: 21 mar. 2020.

NOLAN, T.; HANDS, R.; BUSTIN, S. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. **Nature Protocols**. 1559–1582, <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.236>. 2006.

OLIAS, P.; ADAM, I.; MEYER, A.; SCHARFF, C.; GRUBER, A.. Reference Genes for Quantitative Gene Expression Studies in Multiple Avian Species. **PloS one**. 9. e99678. [10.1371/journal.pone.0099678](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099678). 2014.

PAOLACCI, A. R.; et al. Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. **BMC Molecular Biology** 10:11. 2009.

PFAFFL, M. W.; TICHOPAD, A.; PRGOMET, C.; NEUVIANS, T. P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology Letters**, 26(6), 509–515. doi:10.1023/b:bile.0000019559.84305.47. 2004.

PIHUR, V.; DATTA, S.; DATTA, S. Weighted rank aggregation of cluster validation measures: A Monte Carlo cross-entropy approach. **Bioinformatics**, v.23, n.13, p.1607–1615. 2007.

PUIG, J. G.; JIMÉNEZ, R. T. O portal para as doenças raras e os medicamentos órfãos Doença raras. 2010. Disponível em: https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=PT&Expert=510. Acesso em: 22/03/2020.

QU, R.; et al. Selection of reference genes for the quantitative real-time PCR normalization of gene expression in *Isatis indigotica fortune*. **BMC Molecular Biology**. 20(1): 9. doi:10.1186/s12867-019-0126-y. 2019.

R CORE TEAM . **R: A language and environment for statistical computing.** R. Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>. 2020.

ROSTAGNO, H. S.; GOMES, P. C. **Composição de Alimentos e Exigências Nutricionais.** 3 a Edição Editor : Horacio Santiago Rostagno. 2011.

R STUDIO TEAM. **RStudio: Integrated Development for R.** RStudio, Inc., Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>. 2018.

SCHMITTGEN, T.; ZAKRAJSEK, B. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. **Journal of biochemical and biophysical methods**. 46. 69-81. 10.1016/S0165-022X(00)00129-9. 2000.

STAINES, K. et al. AVersatile Panel of Reference Gene Assays for the Measurement of Chicken mRNA by Quantitative PCR. **Plos One**, v.11. 2016.

SUZUKI, R.; TERADA, Y.; SHIMODAIRA, H. **pvclust: Hierarchical Clustering with P-Values via Multiscale Bootstrap Resampling.** R package version 2.2-0. <https://CRAN.R-project.org/package=pvclust>. 2019.

THELLIN, O. et al. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. **Journal of Biotechnology** 75: 291-295. 10.1016/S0168-1656(99)00163-7. 1999.

VANDESOMPELE J, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology** 3(7). 2002.

WONG, M. L.; MEDRANO, J. F. Real-time PCR for mRNA quantitation. **Biotechniques**. 39 (), pp. 75-85. 2005.

YANG, C. G. et al. Evaluation of reference genes for quantitative real-time RT-PCR analysis of gene expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Gene**. v.527, n.1, p.183–192. 2013.

ZHANG, J. et al. Seleção de genes de limpeza para análise quantitativa da expressão gênica em frangos de penas amarelas, **Italian Journal of Animal Science**. 17 : 2, 540-546, DOI: 10,1080 / 1828051X.2017.1365633. 2018.

ZINZOW-KRAMER, W. M.; HORTON, B. M.; MANEY, D. L. Evaluation of reference genes for quantitative real-time PCR in the brain, pituitary, and gonads of songbirds. **Hormones and Behavior**. v.66, n.2, p.267–275. 2014.

6. CAPÍTULO II

**PERFIL GÊNICO DE MEDIADORES DE ESTRESSE TÉRMICO EM
GALINHAS LOCAIS DO NORDESTE DO BRASIL**

ILHÉUS/2020

PERFIL GÊNICO DE MEDIADORES DE ESTRESSE TÉRMICO EM GALINHAS LOCAIS DO NORDESTE DO BRASIL

RESUMO

As linhagens de frango de corte atuais são altamente produtivas, entretanto muito susceptíveis ao estresse térmico. Já, ecótipos de frangos locais do nordeste brasileiro apresentam adaptações às variações ambientais por serem criadas soltas no ambiente e sem controle zootécnico. Dessa forma, avaliar genes de resposta ao estresse por calor, e ao estresse oxidativo nesses grupos genéticos torna-se importante. Objetivou-se avaliar e comparar os níveis de expressão de genes relacionados ao estresse térmico (*HSF1*, *HSF3*, *HSP70*, *HSP90*), genes codificadores de enzimas antioxidantes (*CAT*, *SOD* e *GPx*) em fragmentos do rim de grupos genéticos (GG) de frangos submetidos ao estresse térmico (AMB). Utilizou-se 36 aves e três grupos genéticos sendo 12 indivíduos por grupo (Cobb 500®; e os ecótipos locais Peloco e Caneluda) das quais 06 aves de cada GG foram induzidas ao estresse térmico agudo, submetidas à 39,5°C e as outras 06 em conforto térmico à 23°C. O gene *LDHA* foi utilizado como o normalizador dos genes alvos. Em relação ao tratamento AMB, os genes aqui avaliados não aumentaram sua expressão após o estresse térmico agudo. Nas comparações entre os GG, a linhagem comercial apresentou menores níveis de expressão de *HSF1*, *HSF3*, *CAT*, *SOD1*, *GPx7* enquanto Peloco evidenciaram maior atividade de todos esses genes e Caneluda mostrou expressão intermediária entre os outros dois GG. Quanto aos genes *HSP70* e *HSP90*, as expressões diminuíram nas galinhas caipiras e aumentou na linhagem comercial. Esses genes são os principais responsáveis pela resposta ao estresse térmico e, suas maiores expressões nas aves comerciais, mostram que estas foram mais afetadas pelo estresse térmico agudo. Além disso, os resultados para os outros genes aqui analisados mostram que os ecótipos Peloco e Caneluda já possuem maior expressão desses genes no ambiente conforto sugerindo que as mesmas são mais tolerantes ao estresse térmico agudo do que a linhagem comercial.

Palavras - chave: Apoptose, Cobb 500®, enzimas antioxidantes, expressão gênica, galinhas locais, RT-qPCR.

GENE PROFILE OF THERMAL STRESS MEDIATORS IN LOCAL CHICKENS IN NORTHEAST BRAZIL

ABSTRACT

Current broiler chicken lines are highly productive, however very susceptible to thermal stress. On the other hand, ecotypes of local chickens from northeastern Brazil show adaptations to environmental variations because they are raised loose in the environment and without zootechnical control. Thus, evaluating genes that respond to heat stress and oxidative stress in these genetic groups becomes important. The objective was to evaluate and compare the levels of expression of genes related to thermal stress (*HSF1*, *HSF3*, *HSP70*, *HSP90*), genes encoding antioxidant enzymes (*CAT*, *SOD* and *GPx*) in kidney fragments of chicken genetic groups (GG) subjected to thermal stress (AMB). 36 birds and three genetic groups were used, 12 individuals per group (Cobb 500®; and the local Peloco and Caneluda ecotypes) of which 06 birds of each GG were induced to acute thermal stress, subjected to 39.5°C and the other 06 in thermal comfort at 23 ° C. The *LDHA* gene was used as the normalizer of the target genes. Regarding the AMB treatment, the genes evaluated here did not increase their expression after acute thermal stress. In comparisons between GGs, the commercial line showed lower levels of expression of *HSF1*, *HSF3*, *CAT*, *SOD1*, *GPx7* while Peloco showed greater activity of all these genes and Caneluda showed an intermediate expression between the other two GGs. As for the *HSP70* and *HSP90* genes, expressions decreased in free-range hens and increased in the commercial line. These genes are mainly responsible for the response to thermal stress and, their greatest expression in commercial birds, show that they were more affected by acute thermal stress. In addition, the results for the other genes analyzed here show that the Peloco and Caneluda ecotypes already have greater expression of these genes in the comfort environment, suggesting that they are more tolerant to acute thermal stress than the commercial strain.

Keywords: Apoptosis, Cobb 500®, antioxidant enzymes, gene expression, local chickens, RT-qPCR.

1-INTRODUÇÃO

O estresse térmico pode afetar o bem-estar e a saúde dos animais causando danos celulares em vários órgãos podendo até levar à morte (TANG et al., 2018). Além do impacto negativo para a economia, com o advento do aquecimento global, a forma de criação e o bem-estar animal das aves vêm despertando atenção maior do consumidor (LARA e ROSTAGNO, 2013; AL-ZGHOUL et al., 2109).

Nos frangos de corte a intensa seleção genética contribuiu para que as linhagens atuais melhoradas, como a Cobb 500® sejam muito produtivas, entretanto apresentem grande susceptibilidade ao estresse térmico (FERNANDES et al., 2019; WANG et al., 2019; XIONG et al., 2020).

Em países de clima tropical como o Brasil, o processo de seleção natural favoreceu o surgimento de frangos localmente adaptados, os quais são criados em sistema de avicultura familiar e possuem maior capacidade de para enfrentar as condições adversas como o estresse térmico, parasitas e doenças, que lhes conferiu elevada rusticidade e alta variabilidade genética (EGITO et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2014; CARVALHO et al., 2018; ALMEIDA et al., 2019). Pela sua forma de criação e também pelo fato de possuírem menores índices de produção, muitas raças de galinhas locais desapareceram ou estão ameaçadas de extinção (FAO 2015; ALMEIDA et al., 2019).

Hoje, as galinhas caipiras são consideradas fontes importantes recursos genéticos, e requer o desenvolvimento de estratégia que visem sua conservação e seu uso sustentável (KAYA e YILDIZ, 2008; ALMEIDA, 2016). Uma dessas estratégias é estruturar a avicultura familiar valorizando os produtos dessas aves, diferenciados em aspecto, sabor e qualidade da carne, considerada como um dos pratos mais apreciados no Brasil (BARBOSA et al., 2007; CARVALHO et al., 2018; SOBREIRA; VIOLA, 2019). Além disso, existe a mudança quanto ao perfil do consumidor mundial, que tem passado valorizar o consumo "ético" de alimentos e o bem-estar das aves, preferindo adquirir produtos provenientes das galinhas de quintal ou como são chamadas atualmente, "galinhas felizes" (BRAY; ANKENY, 2017).

No estado da Bahia, estudos foram realizados em dois grupos de frangos locais, os ecótipos Peloco e Caneluda, os quais evidenciaram variabilidade genética e maior tolerância ao estresse térmico agudo do que as linhagens comerciais (ALMEIDA et al.

2012; ALMEIDA et al., 2013; OLIVEIRA et al. 2014; CEDRAZ et al., 2017). Contudo, ainda há uma carência de informações populacionais, fenotípicas, genéticas e produtivas dessas galinhas e suas potencialidades precisam ser avaliadas (ALMEIDA et al., 2019).

De modo geral, para se adaptar às oscilações das condições ambientais os organismos alteram o metabolismo celular e ativam mecanismos de defesa, alterando sua atividade gênica, que conduz à síntese de proteínas específicas nas células, as HSPs (REGITANO e COUTINHO, 2001; SEIDL et al., 2009; SUN et al., 2015; SCHMOLL et al., 2016)). As proteínas de choque térmico (HSPs) atuam como chaperonas reparando os danos e evitando o dobramento incorreto de proteínas após o estresse térmico (PIRKKALA et al., 2001; SCHMOLL et al., 2016; SONG et al., 2017). A ativação transcricional dos genes HSPs é mediada por outros genes chamados de Fatores de Transcrição do Choque Térmico (HSFs), ativados quando o organismo é submetido ao estresse, os quais vão induzir assim a expressão das HSPs. (AKERFELT et al., 2010; FUJIMOTO e NAKAI, 2010).

Além dos danos celulares causados pelo estresse térmico, a exposição ao calor pode resultar em estresse oxidativo, que por sua vez pode levar à citotoxicidade (ANDO et al., 1997; MAINI et al., 2007; AKBARIAN et al., 2016; HABASHY, et al., 2018). Nesse sentido, o organismo responde através da expressão de genes que codificam enzimas antioxidantes como a Superóxido dismutase (SOD), *CATALASE (CAT)* e Glutaciona peroxidase (GPX), diminuindo os efeitos negativos nas células (AKBARIAN et al., 2016; SURAI et al., 2019).

Diante disso, objetivou-se avaliar e comparar a expressão gênica, em fragmentos de rim, de frangos de corte da linhagem comercial Cobb 500® e dos ecótipos locais Caneluda e Peloco, submetidos ao estresse térmico agudo. Utilizou-se genes das famílias dos Fatores de choque térmico (HSFs), Proteínas de choque térmico (HSPs), genes que codificam as enzimas antioxidantes *GPX7*, *SOD* e *CAT*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

O experimento foi realizado seguindo as diretrizes do Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA/UESB, Protocolo aprovado sob número: 109/2015.

A etapa prática do experimento foi realizada Setor de Avicultura da Universidade

Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), no município de Itapetinga, BA. Um total de 36 aves, entre machos e fêmeas, foram destinadas para o trabalho: 12 amostras da linhagem comercial Cobb 500®, 12 amostras da raça Peloco e 12 amostras da raça Caneluda. Os pintos das aves Peloco e Caneluda nasceram à partir de ovos incubados no núcleo de aves do setor de avicultura enquanto que os pintos de um dia das aves comerciais foram adquiridos de uma granja. A criação de todas as aves ocorreu em um galpão aberto, forrado com maravalha, sob as mesmas condições ambientais. Os animais foram alimentadas de acordo com as exigências das respectivas fases de criação seguindo a dieta nutricional de ROSTAGNO; GOMES, (2011).

O experimento foi realizado no período de dois de novembro a dois de dezembro de 2015, considerado uma época de verão intenso na região com temperatura média diária de 26,5°C.

A região de Itapetinga é caracterizada por possuir clima semiárido onde o verão é longo e quente com temperaturas oscilando entre 17°C e 32°C. Durante o dia a temperatura é bem alta e à noite, diminui. Há uma variação sazonal extrema e a sensação de desconforto dura em torno de 9 meses por ano. O mês mais seco é Agosto e tem 30 mm de precipitação e o mês de Dezembro é o mês de maior precipitação com uma média de 140 mm. 857 mm é o valor da pluviosidade média anual (CLIMA TEMPO, 2020; CLIMATE-DATA, 2020).

2.2 Estresse térmico

Para que as aves fossem submetidas ao estresse térmico, foi construído um box experimental de madeira medindo 1,5 metros de comprimento, 1 metro de altura e 1 metro de largura, onde foram instalados dois aquecedores a gás distribuindo homogeneamente o calor por todo o ambiente interno.

Metade das aves utilizadas no experimento (seis de cada grupo genético), foram colocadas na caixa de madeira e, submetidas à uma temperatura média de 39,5°C e com uma umidade relativa de 60%.

Inicialmente seis aves do ecótipo Peloco e seis da Caneluda foram submetidas ao estresse térmico por calor em temperatura média de 39,5°C, com umidade relativa de 60%. Em um segundo momento, seis aves da linhagem Cobb 500® foram submetidas ao estresse térmico sob as mesmas condições de temperatura e umidade. Durante o

período em que as aves estavam submetidas ao calor, elas foram monitoradas, ficando sob observação constante quanto às mudanças de comportamento, para determinar o tempo em que cada grupo genético suportaria a alta temperatura. O estresse térmico foi considerado agudo quando a grande maioria das aves de cada grupo genético (+/- 90%) se mostraram prostradas (deitadas com a face abdominal para baixo) e com frequência respiratória acelerada. Assim, os ecótipos Peloco e Caneluda, suportaram o calor por uma hora. As aves da linhagem comercial prostraram-se ao alcançar 30 minutos sob estresse por calor. Durante o período de estresse todos os animais tiveram acesso à água e comida à vontade. Após o período de estresse térmico, todas as aves foram abatidas por deslocamento cervical. Todas as aves controles (seis aves de cada grupo genético) foram abatidas por deslocamento cervical no início do período da manhã (4h, horário local) para garantir temperatura de conforto térmico (23°C).

2.3 Coleta de tecidos, extração e quantificação

Após o abate, foram coletados fragmentos de rim, as amostras foram armazenadas em tubos criogênicos, identificados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Após a coleta, as amostras foram encaminhadas ao laboratório de Genética Veterinária Animal da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) e armazenadas em ultrafreezer -80°C.

Realizou-se a extração do RNA total das amostras selecionadas com Trizol® - Invitrogen. As concentrações dos RNAs extraídos foram verificadas usando o espectrofotômetro NanoDrop 2000® e a qualidade desses RNAs por meio de eletroforese em gel de agarose à 1% corados com brometo de etídio e visualizados em luz ultravioleta.

2.4 Transcrição Reversa do mRNA

A transcrição Reversa foi realizada com o *kit* comercial GoScript™ Reverse Transcription System (Promega Corporation, Madison, EUA). Foram utilizados 4µl de RNA obtidos a partir do tecido renal e padronizados para 500ng, acrescidos de 1µl de Oligodt, e 15 µl de um mix contendo enzima Transcriptase Reversa, inibidor de ribonuclease recombinante RNase OUT, RT buffer, dNTP, e água ultrapura, para um

volume final de 20 µl. As amostras foram incubadas em termociclador a 50°C por 50 min, 85°C por 5 min, e refrigerado em gelo. O cDNA foi acondicionado em *freezer* - 20°C, para posterior utilização nos experimentos de expressão gênica.

2.5 PCR quantitativa em tempo real

A avaliação da expressão gênica utilizando o cDNA obtido a partir de RNA extraído das amostras de interesse foi realizada em duplicata. Para a construção da curva padrão, foi utilizado um *pool* de cDNA, de todos os tratamentos e tecidos para calcular a eficiência da PCR, por meio de uma diluição seriada (nas concentrações de 5, 15, 45 e 135ng/µl com três concentrações de *primers*: 200, 400 e 800 mM). Após calcular os valores de eficiência e escolher os melhores parâmetros (T de anelamento, concentração de *primers* e cDNA), as amostras foram submetidas à amplificação por PCR em tempo real para a comparação dos cycle threshold (Cts). Todas as amostras foram realizadas em duplicata.

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador (PCR 7500 Fast - Applied Biosystems), no ensaio ddCt (Relative Quantification), sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C durante dois minutos e 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos. A temperatura de extensão foi padronizada individualmente para cada par de *primers* durante 60 segundos. Ao final da reação de amplificação foi incluído um passo adicional com elevação gradual de temperatura de 60°C a 95°C para obter a curva de dissociação. A amplificação de todos os genes foi realizada na plataforma Real Time PCR 7500 Fast (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e os resultados foram obtidos com o programa Sequence Detection Systems (V. 2.0.6) (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) que gerou o parâmetro Ct. Os valores de Cts das duplicatas foram obtidos diretamente pelo programa e usados para calcular o Ct médio e o desvio-padrão. A eficiência da amplificação da PCR foi calculada para cada gene de referência usando a fórmula $E = (10^{(-1/\text{coeficiente angular})} - 1) \times 100$ (PFAFFL, 2001). Posteriormente, as curvas de dissociação foram avaliadas quanto à amplificação e à especificidade. Após a análise de eficiência, a temperatura de anelamento e a concentração dos *primers* mais adequadas foram empregadas nas reações de RT-qPCR.

2.6 Expressão nos Genes Alvos

Quatro genes relacionados ao estresse térmico (*HSF1*, *HSF3*, *HSP70*, *HSP90*), três genes de resposta ao estresse oxidativo (*CAT*, *SOD1*, *GPx7*), foram selecionados para serem avaliados em relação ao ambiente (AMB), nas condições de conforto térmico e estresse térmico agudo em três grupos Genéticos distintos (GG) (Tabela 14). Os níveis de expressão do mRNA desses genes foram estabelecidos por quantificação relativa em amostras de rim. A reação foi normalizada pelo controle endógeno, o gene *LDHA* definido previamente. A tabela 01 descreve cada gene bem como a função de cada um deles.

Tabela 01: Descrição dos genes alvos e do normalizador e seus *primers* específicos utilizados nas análises de RT-qPCR em rim de frangos submetidos ao conforto térmico e estresse térmico agudo.

Nome do Gene	Seqüência do iniciador (5' - 3')	Função
Heat shock factor protein 1 (<i>HSF1</i>)	F: TGTGGCTGATTCTTGGCTTT R: GAGGGAGACAGAGGGGTTTC	Codificação de proteínas Que se ligam ao HSE
Heat shock factor protein 3 (<i>HSF3</i>)	F: CGGAAGATGGAAATGGAGAG R: TCAGGAAGCAGGAGAGGAGA	Codificação de proteínas Que se ligam ao HSE
Heat shock protein 70kDa (<i>HSP70</i>)	F: ATTCTTGCGTGGGTGTCTTC R: GATGGTGTGGTGGGGTTC	Resposta ao choque térmico
Heat shock protein 90kDa (<i>HSP90</i>)	F: TGAAACACTGAGGCAGAAGG R: AAAGCCAGAGGACAGGAGAG	Resposta a choque térmico
Superóxido dismutase 1 (<i>SOD</i>)	F: TGGACCTCGTTTAGCTTGTG R: ACACGGAAGAGCAAGTACAG	Decompõe radicais superóxido para H ₂ O ₂ e O ₂
CATALASE (<i>CAT</i>)	F: ACTGGTGTGGCAACCC R: ACGTGGCCCAACTGTCAT	Catalisa a degradação H ₂ O ₂ para H ₂ O e O ₂
Glutathiona peroxidase 7 (<i>GPX7</i>)	F: TTGTAAACATCAGGGGCAA R: TGGGCCAAGATCTTTCTGTAA	Decompõe H ₂ O ₂ para H ₂ O
Lactato desidrogenase A (<i>LDHA</i>)	F:CTATGTGGCCTGGAAGATCAG R: GCAGCTCAGAGGATGGATG	Participa da etapa final da glicólise anaeróbica

As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se o Kit Power SYBR Green PCR Master Mix (Promega, Madison, WI, EUA), conforme as recomendações do fabricante, utilizando-se *primers* específicos. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador ABI Prism 7500® (Applied BioSystems), no ensaio ddCt (Relative Quantification) plate. Após a determinação da

eficiência média das amplificações, as diferenças nas frequências dos transcritos alvos foram calculadas pela equação: razão de expressão = $[1 + (\text{eficiência média da PCR})]^{\text{Ct médio do grupo testado} - \text{Ct médio do grupo referência}}$ (LIVAK e SCHITTGEN, 2001). A normalização dos dados foi feita utilizando a técnica de $\Delta\Delta\text{CT}$ (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001)

2.7 Análises estatísticas

Análises de variância (ANOVA) foram utilizadas para comparar os níveis de expressão dos genes em relação aos grupos genéticos (Cobb 500® e Peloco), ao ambiente (conforto x estresse) e a interação entre os fatores. A ANOVA foi realizada segundo o modelo:

$$y_{ijk} = \mu + G_i + AMB_j + GGAMB_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Em que: μ é a média da expressão do gene; G_i é o efeito do Grupo Genético; AMB_j é o efeito de Ambiente; $GGAMB_{ij}$ o efeito da interação entre Grupo Genético e Ambiente e; ε_{ijk} o erro experimental associado.

Um gráfico heatmap foi utilizado para sumarizar o agrupamento e a relação desses com as expressões dos genes. Foi utilizada a distância Euclidiana e para oobstrap 10.000 reamostragens. Os grupos que evidenciaram valores de aproximação imparcial (AI) acima de 95% foram considerados fortemente suportados pelos dados. Todas as análises foram realizadas utilizando o software R v. 3.6.3 (R CORE TEAM, 2020).

3 RESULTADOS

3.1 Expressão relativa dos genes alvo

Não houve interação (P valor > 0,05) entre o ambiente (conforto e estresse) e os grupos genéticos (Cobb 500®0, Peloco e Caneluda) para os níveis de expressão de todos os genes.

Em relação ao tratamento ambiente, após o estresse térmico agudo nenhum dos genes apresentou diferenças estatisticamente significativas para as amostras de rim nos

três grupos genéticos analisados, ou seja, nenhum dos genes aumentou significativamente seus níveis de expressão nesse tecido após o estresse térmico para ambos os fatores analisados (Tabela 02).

Tabela 02. Médias e desvio padrão para expressão dos genes em rim de frangos geneticamente divergentes após ANOVA

	Caneluda	Cobb500®	Peloco	p.valor
	N=12	N=12	N=12	
<i>CATALASE</i>	1.30 (1.87)	1.15 (1.68)	1.78 (2.74)	0.758
<i>GPX</i>	3.04 (6.99)	0.97 (0.62)	1.67 (3.09)	0.512
<i>HSF1</i>	2.85 (3.95)	0.89 (0.54)	3.71 (2.37)	0.042
<i>HSF3</i>	1.28 (1.02)	1.01 (0.42)	4.52 (4.32)	0.003
<i>HSP70</i>	2.13 (5.77)	3.29 (3.93)	0.83 (0.55)	0.342
<i>HSP90</i>	0.12 (0.14)	2.27 (2.82)	0.37 (0.48)	0.006
<i>SOD</i>	3.58 (4.52)	1.83 (1.30)	8.02 (9.08)	0.042

Valores informados como $\mu(\sigma)$, a / b diferenças significativas para Grupo Genético, A / B diferenças significativas para Ambiente. Letras maiúsculas diferentes referem-se a diferenças significativas para ambientes (Conforto e Stress). Letras minúsculas diferentes referem-se a diferenças significativas para grupos genéticos (COBB 500®, Peloco e Caneluda). Médias com letras minúsculas iguais na mesma linha e maiúsculas na mesma coluna não diferem estatisticamente ($P > 0,05$) pelo teste F da ANOVA.

Em relação aos GG, os genes *HSF1*, *HSF3*, *HSP90* e *SOD* apresentaram diferenças estatisticamente significativas para um ou mais grupos. Observou-se diferenças estatísticas nos níveis de expressão dos fatores de transcrição *HSF1* ($p = 0.042$) e *HSF3* ($p = 0.003$) (Tabela 02) entre os GG, sendo que as galinhas de criação caipira Peloco e Caneluda apresentaram níveis maiores de expressão do mRNA *HSF1* e Peloco apresentou maior atividade do *HSF3*, do que Caneluda e Cobb 500® (figura 01).

No que se refere à expressão dos genes de resposta ao estresse térmico HSPs, o *HSP70*, não apresentou discrepância entre os fatores avaliados e o gene *HSP90* apresentou níveis significativamente maiores de expressão na linhagem comercial Cobb500® do que nos ecótipos localmente adaptados (Tabela 02; figura 01).

Os resultados das análises dos padrões de expressão dos genes de resposta ao estresse oxidativo evidenciaram que apenas o gene *SOD1* ($P= 0.042$) apresentou diferenças entre os GG, no qual podemos observar que Peloco mostrou níveis de expressão cerca de 2 vezes mais altos que Caneluda e 4 vezes maiores que Cobb 500@ (Tabela 02 e Figura 01). *CAT* e *GPX7* não apresentaram diferenças em nenhum dos fatores analisados. A linhagem comercial apresentou os menores níveis de expressão para todos os genes relacionados ao estresse oxidativo analisados.

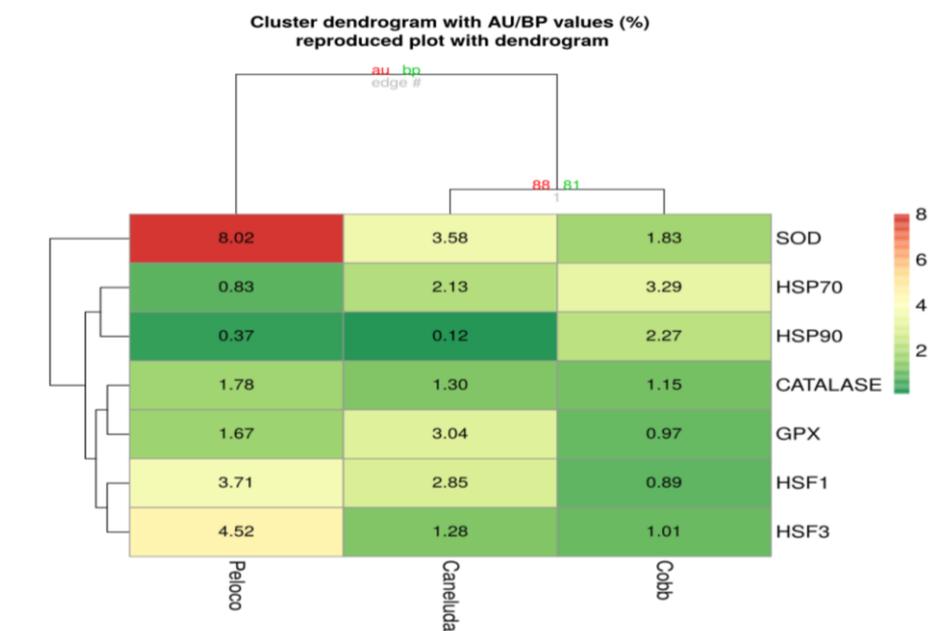


Figura 01- Gráfico gerado pelo Heatmap comparando os valores de Cts provenientes das reações de RT-qPCR em fragmentos de rim dos genes *HSF1*, *HSF3*, *HSP70*, *HSP90*; *CAT*, *SOD1* e *GPx7* em três grupos genéticos divergente = Peloco, Cobb 500@ e Caneluda. Os tons mais para verde são os menores valores de expressão e os mais para vermelho, os maiores.

4. DISCUSSÃO

O estresse por calor agudo é um dos maiores entraves na criação de frangos seja na indústria, seja na produção de aves caipiras em fazendas, especialmente nas regiões quentes do mundo, pois pode afetar o bem-estar e a saúde dos animais e até levar à morte (RENAUDEAU et al., 2011; VARASTEHE et al., 2015; DUANGJINDA et al., 2017; TANG et al., 2018; HEIKAL et al., 2019). Com relação aspecto molecular, o

estresse térmico provoca o acúmulo de proteínas mal enoveladas que podem ser muito prejudiciais à integridade celular e afetar vários órgãos causando grandes danos ao organismo (STAIB et al., 2007; VOISINE et al., 2007; SANTOS VAZ et al., 2016).

A elevação de temperatura estimula o aumento da expressão de genes específicos capazes de acompanhar essas proteínas mal enoveladas, corrigir os danos e, reestabelecer a homeostase (PIRKALA et al., 2001). Essa resposta é desencadeada por uma família gênica, evolutivamente conservada, conhecidas como HSPs (Proteínas de Choque Térmico), que desempenham papéis cruciais de restaurar as proteínas danificadas (MEYER e DA SILVA, 1999; GAO et al., 2007; SUN et al., 2015; ROUSHDY et al., 2018). De acordo com Meyer e da Silva (1999), a resposta ao estresse térmico se inicia pela ativação de um fator específico de transcrição, chamado HSF (fator do choque térmico). Dentro da família de HSFs conhecidos até o momento, os genes *HSF1* e *HSF3* são considerados os principais genes de transcrição na resposta ao choque térmico em aves (MORIMOTO; 1998; INOUE et al., 2003; FUJIMOTO e NAKAI 2010; ALBOKHADAIM et al., 2019).

No presente trabalho observou-se que não houve diferença de expressão dos fatores de transcrição *HSF1* e *HSF3* após o tratamento ambiente, ou seja, o estresse térmico agudo não aumentou a atividade desses genes nas aves avaliadas. Resultados semelhantes foram observados por Cedraz et al. (2017), em um estudo envolvendo estresse térmico agudo em frangos locais (Peloco e Caneluda) e a linha comercial de frangos de corte Cobb 500®, os quais notaram que o calor agudo de 39 °C não induziu aumento da expressão de *HSF1* e *HSF3* no músculo do peito. Em resultados semelhantes, com galinhas poedeiras da raça Arbor Acres, Xie et al., (2014) não detectaram alteração de expressão de *HSF1* em tecido hepático e de *HSF1* e *HSF3* no músculo do peito após tratamento térmico agudo. Nesse contexto, de acordo Cedraz et al., (2017), os genes *HSF1* e *HSF3* não são bem expressos em estresse térmico agudo. Esses genes possuem limiares diferentes de ativação após o calor. O *HSF1* é ativado em estresse térmico médio e mais rápido, enquanto que o *HSF3* é ativado em estresse térmico severo e mais demorado (TANABE et al., 1997; MORIMOTO, 1998). Assim, a não ativação dos fatores de transcrição após estresse térmico agudo pode ser atribuído ao método de indução do estresse ou ao tempo em que as aves estiveram expostas às altas temperaturas em nosso experimento. Além disso, os mecanismos que regulam a transcrição dos genes HSFs não estão completamente esclarecidos e não se sabe se

existe um limite de temperatura para ativar a transcrição gênica de HSFs (XIE et al., 2014).

Nas comparações entre os três GG, os genes *HSF1* e *HSF3* mostraram diferenças no nível de expressão. De maneira geral, o ecótipo Peloco teve uma expressão maior desses genes quando comparados com a linhagem comercial. As aves do grupo Caneluda apresentaram níveis de expressão intermediário entre Cobb 500® e Peloco.

As divergências de expressão observadas nos genes *HSF1* e *HSF3* entre os grupos genéticos (Cobb 500®, Caneluda e Peloco) são compatíveis com as características fisiológicas de cada grupo, pois essas aves se originaram a partir de processos seletivos divergentes, levando a perfis completamente diferentes. Enquanto a seleção da linhagem comercial foi feita em ambientes ótimos de produção e devem ser criadas de acordo com pacotes tecnológicos definidos pelas empresas de melhoramento, os ecótipos naturalizados são aves caipiras criadas em fazendas, forrageando, sujeitas à infecção por patógenos e alterações de temperatura (ALMEIDA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2014; CEDRAZ et al., 2017).

Em relação às HSPs, os genes HSP70 e HSP90 não aumentaram sua a expressão após os tratamentos ambiente (AMB). O gene HSP70 também não mostrou resposta diferenciada entre os grupos genéticos. Resultados semelhantes foram constatados por Tamzil et al. (2013) ao analisar a expressão do mRNA de HSP70 no cérebro de frangos. Entretanto, em um estudo de estresse térmico agudo (39,5° C) conduzido em três grupos genéticos (Cobb 500®, Caneluda e Peloco) usando tecido muscular, Cedraz et al. (2017) observaram que o gene HSP70 apresentou alta expressão e foi estatisticamente diferentes nos três grupos genéticos. Heikal et al., (2019) também registraram que a exposição aguda ao calor aumentou significativamente os níveis do mRNA HSP70 no tecido cerebral em duas raças de galinhas - a local Fayoumi e a comercial Leghorn. Outro trabalho realizado por Yu e Bao, (2008) analisando a expressão do gene em diferentes tecidos de uma raça de frango comercial sob estresse por calor por 0 (controle), 2, 3,5 e 10 h, demonstraram que os níveis de HSP70 no coração foram significativamente maior no tratamento de 2 horas do que em aves controle. No fígado, aumentaram com o estresse térmico em comparação com o controle após 2, 3 e 10 horas e após 2 e 10 h de no rim. Essa pesquisa mostrou que a quantificação do mRNA HSP70 eram dependentes do tempo e do tecido. Assim os resultados dos níveis de expressão do gene HSP70 parecem estar condicionados a maneira como ocorreu o estresse, ao tempo

em que o animal foi submetido ao estresse ou como o tecido foi afetado pelo estresse ou ainda em que grupo genético ocorreu esse estresse (ZHANG et al., 2014; KONG et al., 2015; CEDRAZ et al., 2017).

O gene HSP90 exibiu níveis maiores de mRNA na linhagem comercial após o estresse térmico do que nas raças locais, salientando que a galinha caipira Peloco apresentou níveis bem baixos de mRNA desse gene. Esses resultados foram coincidentes com aqueles observados por Cedraz et al., (2017), que também notaram um aumento da expressão de HSP90 no músculo de aves comerciais. De acordo com estes autores, tais resultados reforçam a suscetibilidade das linhagens comerciais e maior resistência das raças locais ao estresse por calor agudo. Dessa forma, acreditamos que o genótipo possa influenciar a expressão de HSPs durante o estresse térmico e as galinhas locais Peloco e Caneluda demonstraram ser mais tolerantes ao calor e ao estresse térmico agudo do que a linhagem comercial. Entretanto, Jaiswal et al. (2018) enfatizam que o mecanismo de como e em que medida o HSP protege para as aves não são totalmente conhecidos e ainda exigem mais pesquisas.

Os resultados obtidos aqui mostraram uma não sincronização na ativação transcricional entre os genes HSFs e HSPs. De acordo com XIE et al., (2014) pode haver outros motivos reguladores, além dos elementos de choque térmico, nas regiões promotoras dos genes HSP. Além disso, os mesmos autores argumentam que não se pode chegar a uma conclusão definitiva, dada a incerteza quanto à correlação da abundância de mRNA de HSF com suas atividades de ligação de DNA a genes HSP. Vale ressaltar, que esse é um dos primeiros estudos que buscou investigar a expressão dos HSFs e HSPs em aves de criação caipiras na Bahia e outras pesquisas devem ser realizadas, utilizando esses grupos genéticos a fim de traçar um perfil molecular em relação ao estresse térmico em frangos do nordeste do Brasil.

O rim é um órgão que desempenha funções homeostáticas de grande importância atuando na filtração do sangue, na recuperação dos componentes aproveitáveis da urina por reabsorção, na eliminação dos produtos metabólicos ou tóxicos e na regulação do balanço hídrico, de eletrólitos e do equilíbrio ácido-básico. (GAW et al., 2001; MINAFRA, et al 2009; FLORIANO, 2013). Todos os genes analisados nesse trabalho tem expressão elevada no rim (NCBI, 2020). Por isso, podemos afirmar que o rim é verdadeiramente um órgão vital e susceptível ao estresse térmico. Embora existam poucos estudos sobre o efeito do estresse térmico e oxidativo no rim das aves, sabe-se

que esse evento afeta direta e indiretamente todas as facetas do rim de humanos e animais, incluindo reatividade vascular e hemodinâmica renal, filtração glomerular e reabsorção e secreção tubular em todos os segmentos do néfron (RATLIFF et al., 2016).

Um sintoma geral do estresse térmico é a perturbação do equilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e/ou espécies reativas de nitrogênio (ERN) e as defesas antioxidantes celulares, resultando em estresse oxidativo (LIN et al., 2006; RIMOLD et al., 2015; VARASTEY et al., 2015). Usualmente, após o estresse térmico agudo, as atividades das enzimas antioxidantes (*CAT*, *GPX* e *SOD*) aumentam acentuadamente para proteger e atuam para converter as EROs em espécies menos reativas nas células (AKBARIAN et al., 2016; HABASHY, et al., 2019; SURAI et al., 2019). Estudos em frangos de corte demonstraram lesão oxidativa induzida por altas temperaturas (LIN et al., 2000; MAHMOUD e EDENS, 2003; ALTAN et al., 2003; MUJAHID et al., 2007; SAHIN et al., 2010).

Notamos em nosso estudo que os níveis expressão de *GPX7*, *SOD1* e *CAT* não aumentaram entre os tratamentos AMB, ou seja, o estresse térmico agudo não estabeleceu o estresse oxidativo no rim dos frangos analisados. Habashy et al. (2019), usando diferentes tecidos da linhagem Cobb 500®, também não observaram alterações nos níveis de *CAT* e *GPX* no fígado após estresse térmico de 1 dia e de *GPx* e *SOD* no músculo peitoral tanto em 1 quanto em 12 dias de estresse térmico. Lin et al. (2006) também constataram que atividade da *SOD* não foi alterada em tecidos cardíacos e Hepático de aves Cobb 500® após 03 horas de estresse e Kikusato et al. (2015), concluíram em sua investigação que o nível de expressão de *SOD* permaneceu inalterado nas células musculares de frangos da linhagem Ross após estresse térmico.

Entretanto, espera-se que a atividade dos genes de resposta ao estresse oxidativo seja alterado após o estresse térmico. Conforme demonstrado por Habashy et al. (2019), os níveis de *SOD* e *GPX* aumentaram no fígado após 12 dias de estresse (estresse térmico crônico), e enquanto que o nível de *CAT* diminuiu no músculo após 1 dia (estresse térmico agudo). Resultados semelhantes foram obtidos por Lin et al., (2006), que perceberam um aumento na atividade de *SOD* em frangos após um estresse térmico de 6 horas; Del Vesco et al. (2017), analisando fragmentos de fígado da linhagem cobb que foram submetidos ao estresse por calor aos 21 e aos 42 dias, notando que a idade influenciou na expressão gênica de *SOD* e *GPx7*, com maior expressão em aves de 21 dias do que em aves de 42 dias. Os níveis de expressão dos genes *SOD*, *GPX7* e *CAT*,

após estresse térmico, estão vinculados a especificidade tecidual e a tolerância de cada tecido ao dano causado pela oxidação, podem depender também do grupo genético, da idade e ainda da duração do estresse. Nesse contexto, Habashy, et al., (2019) afirmam que as principais vias redox, incluindo SOD, CAT e GPx, podem responder de maneira diferente, de acordo com a necessidade do tecido de desintoxicar a ERO ou a tolerância à ERO.

Ao se avaliar o efeito dos grupos genéticos, o *SOD1* apresentou maior expressão nas galinhas caipiras Peloco e Caneluda. Os resultados aqui observados permitem inferir que as galinhas caipiras (Peloco e Caneluda) são homeotérmicas mais competentes que a Cobb e apresentam uma maior indução de *SOD1* no rim. Em um estudo utilizando duas linhagens comerciais Cobb (C) e Ross (R), Altan et al., (2003), constataram que as aves da linhagem R apresentaram maiores aumentos nas atividades de SOD, CAT e GPx do que Cobb 500® após estresse térmico. Al- Zghoul et al. (2019), observaram que os níveis de expressão de mRNA de SOD2 em fígado foram maiores em galinhas da raça Hubbard em comparação com aves da linhagem Cobb 500®. As galinhas da raça Hubbard caracterizam-se como um frango de crescimento lento destinado ao mercado ao ar livre e/ou orgânico e maior resistência às variações de temperatura que a Cobb 500® (RIMOLDI et al., 2015; SANTOS et al., 2019). Assim, as respostas oxidativas ao estresse térmico podem sofrer influência quanto ao genótipo indicando que grupos genéticos divergentes como os do presente estudo, apresentam perfis próprios de expressão de mRNA dos quais algumas raças são mais tolerantes ao estresse por calor agudo do que outras. A alta expressão do gene SOD em aves locais pode ser decorrente das mesmas portarem um sistema de resposta ao estresse oxidativo mais eficiente do que da linhagem comercial.

Vale ressaltar que esse é um dos primeiros estudos que buscou investigar a expressão dos HSFs e HSPs e das enzimas antioxidantes (*SOD1*, *GPX7* e *CAT*) em aves de criação caipiras na Bahia. Novas pesquisas utilizando esses grupos genéticos são recomendadas a fim de traçar um perfil molecular em relação em estresse térmico em frangos locais do nordeste do Brasil.

5 CONCLUSÕES

Os níveis de expressão de genes relacionados ao estresse térmico HSFs e HSPs e ao estresse oxidativo (GPX, *CAT* e *SOD*), apresentaram discrepâncias de expressão entre os grupos genéticos analisados. As galinhas caipiras Peloco e Caneluda demonstraram ser mais tolerantes ao estresse térmico agudo quando comparados com a linhagem comercial Cobb 500®. Entre as aves caipiras é possível inferir ainda que o ecótipo Peloco é mais adaptado às altas temperaturas do que o ecótipo Caneluda, ressaltando a importância de se conservar as aves nativas locais.

6 REFERÊNCIAS

AKBARIAN, A.; .et al. Association between heat stress and oxidative stress in poultry; mitochondrial dysfunction and dietary interventions with phytochemicals. **Journal of Animal Science and Biotechnology**. **7**, 37, <https://doi.org/10.1186/s40104-016-0097-5>. 2016.

AKERFELT, M.; MORIMOTO, R. I.; SISTONEN, L. Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. **Nature Reviews Molecular cell biology**, v.11, n.8, p.545–55, 2010.

ALBOKHADAIM, I. F.; ALTHNAIAN, T. A.; EL-BAHR, S. M. Gene expression of heat shock proteins/factors (HSP60, HSP70, HSP90, HSF-1, HSF-3) and antioxidant enzyme activities in heat stressed broilers treated with vitamin C. **Polish Journal of Veterinary Sciences**.22(3):565–572, doi:10.24425/pjvs.2019.129965. 2019.

ALMEIDA E. C. J. et al., Incubabilidade e Coloração da Casca dos Ovos de Reprodutoras Peloco (*Gallus gallus domesticus*). **Actas Iberoamericanas de Conservación Animal** 2, 99 99-102. 2012.

ALMEIDA E. C. J. et al., Características de carcaça de galinha naturalizada Peloco comparada a linhagens de frango caipira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.48, n.11, p.1517-1523. 2013.

ALMEIDA, E. C. D. J. **Diversidade fenotípica de galinhas nativas da raça Peloco com base em descritores fenotípicos sob análise multivariada.** Dissertação. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Bahia. 2013.

ALMEIDA, E. C. D. J. **Caracterização Fenotípica E Produtiva De Galinhas E Patos No Estado Da Bahia.** Tese. Universidade Federal da, Bahia. 2016.

ALMEIDA, E.C.J. et al., Características físicas de ovos de galinhas nativas comparadas a linhagem de postura. **Archivos de Zootecnia.** 68 (261): 82-87. 2019.

ALTAN, O.; et al. Effect of heat stress on oxidative stress, lipid peroxidation and some stress parameters in broilers. **British poultry science.** 44. 545-50, 10.1080/00071660310001618334. 2003.

AL-ZGHOUL, M. B., EL-BAHR, S.M. Basal and dynamics mRNA expression of muscular HSP108, HSP90, HSF-1 and HSF-2 in thermally manipulated broilers during embryogenesis. **BMC Veterinary Research.** 15(1):83. doi:10.1186/s12917-019-1827-7 2019.

ANDO, Y. ; SUHR, O.; EI-SALHY, M. Oxidative stress and amyloidosis. **Histology and Histopathology.** 13: 845-850, 1998.

BARBOSA, F. J. V.; et al. **Sistema alternativo de criação de galinhas caipiras resina.** Embrapa Meio-Norte, 2007.

BRAY, H. J.; ANKENY, R. A. Happy Chickens Lay Tastier Eggs: Motivations for Buying Free-range Eggs in Australia. **Anthrozoös,** 30 (2), 213–226. doi:10.1080/08927936.2017.1310986. 2017.

CARVALHO, D. A.; et al. Variabilidade genética de 12 loci de microssatélites em galinhas crioulas Canela-Preta. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** v.70, n.4, p.1275-1281, 2018.

CEDRAZ, H. et al., Heat stress induces expression of HSP genes in genetically divergent chickens. *Plos One* v.12 n.10, 2017.

CLIMATE-DATA. **Clima Itapetinga**. 2020. Disponível em <https://pt.climate-data.org/america-do-sul/brasil/bahia/itapetinga-1071/> Acesso em: 11/01/2020.

CLIMA TEMPO. **Itapetinga – BA**. 2020. Disponível em: <https://www.climatempo.com.br/climatologia/918/itapetinga-ba>. Acesso em: 11/01/2020.

DEL VESCO, A. P.; et al. Age-related oxidative stress and antioxidant capacity in heat-stressed broilers. *Animal*. 11. 1-8, 10.1017/S1751731117000386. 2017.

DUANGJINDA, M. et al . Hsp70 Genotypes and Heat Tolerance of Commercial and Native Chickens Reared in Hot and Humid Conditions. *Brazilian Journal of Poultry Science*. 19, n. 1, p. 7-18, 2017.

EGITO, A.A.; MARIANTE, A.S.; ALBUQUERQUE, M.S.M. Programa brasileiro de conservação de recursos genéticos animais. *Archivos de Zootecnia*, v.51, p.39-52, 2002.

FAO. **The Second Report on the State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture**, edited by SCHERF, B.D.; PILLING D. FAO Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture Assessments. 2015.

FERNANDES, F. A.; et al. Ajuste de modelos de crescimento para frangos machos. *Sigmae*, Alfenas, v.8, n,2, p. 788-795, 2019.

FUJIMOTO, M.; NAKAI, A. The heat shock factor family and adaptation to proteotoxic stress. *The FEBS Journal*. 277: 4112–4125, 2010.

GAO, H.; et al., Systematic review and evaluation of physiological track and trigger warning systems for identifying at-risk patients on the ward. **Intensive Care Medicine**, 33(4), 667–679, doi:10.1007/s00134-007-0532-3. 2007.

GAW, A. et al. **Bioquímica clínica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

HABASHY, W. S., et al., Expression of genes that encode cellular oxidant/antioxidant systems are affected by heat stress. *Molecular Biology Reports*, 45(3), 389–394. doi:10.1007/s11033-018-4173-0. 2018.

HABASHY, W. S.; et al., Cellular antioxidant enzyme activity and biomarkers for oxidative stress are affected by heat stress. **International Journal of Biometeorology**. 63(12) 1569-1584. doi:10.1007/s00484-019-01769-z. PMID: 31352522. 2019.

HEIKAL, H. S.; et al., Variation in the Transcripts Level of HSP70 and HSP90 in Fayoumi and Leghorn Chicken's Breeds in Response to Acute Heat Stress. **Alexandria Journal of Veterinary Sciences**. Vol. 63 (2): 6-13 Oct. 2019.

INOUYE, S.; et al. Activation of heat shock genes is not necessary for protection by heat shock transcription factor 1 against cell death due to a single exposure to high temperatures. **Molecular and Cellular Biology**. 23,5882–5895, 2003.

JAISWAL K.; et al., Heat Stress and Its Relation With Expression of Heat Shock Proteins In Poultry S. **International Journal of Science**. Vol. 6, No 1, 159 – 166. 2017.

KIKUSATO, M.; et al., Effect of heat stress-induced production of mitochondrial reactive oxygen species on NADPH oxidase and heme oxygenase-1 mRNA levels in avian muscle cells. **Journal of Thermal Biology**, 52, 8–13. doi:10.1016/j.jtherbio.2015.04.005. 2015.

KONG, L. N.; et al., Association analysis between SNPs in the 5'-flanking region of the chicken *GRP78* gene, thermotolerance parameters, and tissue mRNA expression.; **Genetics and Molecular Research** 14 (2): 6110-6123 2015.

LIN, H.; DECUYPERE, E.; BUYSE, J. Acute heat stress induces oxidative stress in broiler chickens. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 144: 11–17, 2006.

LIN, H.; DU, R.; ZHANG, Z. Y. Peroxide status in tissues of heat-stressed broilers. **Asian Australasian Journal of Animal Sciences**;13:1373–1376, 2000.

LARA, J.; M. H. ROSTAGNO. Impact of heat stress on poultry production. **Animals**. 3:356–369. 2013.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$. **Methods**. 25(4), 402–408, 2001. doi:10.1006/meth.2001.1262.

MAHMOUD, K. Z.; EDENS, F. W. Influence of selenium sources on age-related and mild heat stress-related changes of blood and liver glutathione redox cycle in broiler chickens (*Gallus domesticus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**. 136(4):921–934, doi:10.1016/s1096-4959(03)00288-4. 2003.

MAINI, S.; et al., Evaluation of Oxidative Stress and its Amelioration through Certain Antioxidants in Broilers during Summer. **The Journal of Poultry Science**. 44(3), 339–347, 2007. doi:10.2141/jpsa.44.339

MEYER, T. N.; DA SILVA, A. L. Resposta celular ao estresse. **Revista da Associação Médica Brasileira**. 45(2): 181-8, 1999.

MORIMOTO, R. I. et al. **The heat-shock response: regulation and function of heatshock proteins and molecular chaperones**. Essays in Biochemistry, v.32, p.17–29. 1998.

MUJAHID, A, et al., "Mitochondrial Oxidative Damage In Chicken Skeletal Muscle Induced by Acute Heat Stress." **The Journal of Poultry Science**. v. 44,.4 pp. 439-445. 2007.

OLIVEIRA C. G. et al. Marcadores Microsatélites Para a Linhagem Brasileira de Galinha Caipira Peloco. **Actas Iberoamericanas de Conservación Animal**. 4, 120-122. 2014.

PIRKKALA, L., NYKÄNEN, P.; SISTONEN, L. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. **FASEB Journal**.15(7):1118–1131, doi:10.1096/fj00-0294rev. 2001.

R Core Team (2020). **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

RATLIFF, B. B.; et al., Oxidant Mechanisms in Renal Injury and Disease. **Antioxidants e redox signaling**, 25(3), 119–146. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6665>. 2016.

REGITANO, L. C. A.; COUTINHO, L. L. **Biologia molecular aplicada à produção animal**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica,. 215 p, 2001.

RENAUDEAU, D.; et al., Adaptation to hot climate and strategies to alleviate heat stress in livestock production Animal. **The Animal Consortium**, 6:5, pp 707–728, 2011.

RIMOLDI, S.; et al. Expression profile of six stress-related genes and productive performances of fast and slow growing broiler strains reared under heat stress conditions. **Meta Gene**. 6:17–25. 2015.

ROUSHDY, E. M.; ZAGLOOL, A. W.; EL-TARABANY, M. S. Effects of chronic thermal stress on growth performance, carcass traits, antioxidant indices and the expression of HSP70, growth hormone and superoxide dismutase genes in two broiler strains. **Journal of Thermal Biology**.74:337–343, doi:10.1016/j.jtherbio.2018.04.009. 2018.

ROSTAGNO, H. S.; GOMES, P. C. **Composição de Alimentos e Exigências Nutricionais**. 3 a Edição, 2011.

SAHIN, K.; et al. EpigalloCATEchin-3-gallate prevents lipid peroxidation and enhances antioxidant defence system via modulating hepatic nuclear transcription factors in heat-stressed quails. **Poultry Science**. 89:2251–8, 2010.

SANTOS VAZ, A. B. et al. Broiler Meat Quality Evaluation Created in Simulated Conditions of Heat. **Journal of Food Processing & Technology**. 7: 634. doi: 10.4172/2157-7110.1000634. 2016.

SANTOS, A.M. et al. Efeito de diferentes tempos de exposição ao calor e de linhagens sobre o rendimento de carcaça e a composição química de peito de frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. 71, 1, 243-251, 2019.

SCHMOLL, M.; et al., The genomes of three uneven siblings: footprints of the lifestyles of three *Trichoderma* species. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. 80, 205–327, <https://doi.org/10.1128/MMBR.00040-15>. 2016.

SEIDL, V.; et al., Transcriptomic response of the mycoparasitic fungus *Trichoderma atroviride* to the presence of a fungal prey. **BMC Genomics**. 10, 567, <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-567>. 2009.

SOBREIRA, R. dos S.; VIOLA, T. H. Criação de galinhas comuns localmente adaptadas. In: MELO, R. F. de; VOLTOLINI, T. V. (Ed.). **Agricultura familiar dependente de chuva no Semiárido**. Brasília, DF, Embrapa, cap. 9, 303-332. Biblioteca(s): Embrapa Semiárido. 2019.

SONG, E., TANG S, XU J, YIN B, BAO E, HARTUNG J. Lenti-siRNA Hsp60 promote bax in mitochondria and induces apoptosis during heat stress. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. ;481:125–131, doi: 10.1016/j.bbrc.2016.10.153. 2017.

STAIB, J. C.; et al., Increased temperature, not cardiac load, activates heat shock transcription factor 1 and heat shock protein 72 expression in the heart. **American Journal of Physiology- Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. 292:432-439, 2007.

SURAI, P. Antioxidant systems in poultry biology: superoxide dismutase. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**. 1:1-18, 2015.

SUN, L.; et al. Transcriptome response to heat stress in a chicken hepatocellular carcinoma cell line. **Cell Stress & Chaperones**, 20, 939-950, 2015.

TAMZIL, M. H. et al. Acute heat stress responses of three lines of chickens with different heat shock protein (HSP)-70 genotypes. **International Journal of Poultry Science**. 12, 264-272, 2013.

TANABE M.; et al., Different thresholds in the responses of two heat shock transcription factors, *HSF1* and *HSF3*. **Journal Biology Chemical**. v.272, p.15389-15395, 1997.

TANG, J.; et al., Acute microplastic exposure raises stress response and suppresses detoxification and immune capacities in the scleractinian coral *Pocillopora damicornis*. **Environmental Pollution**. 24366-74. doi: 10.1016/j.envpol.2018.08.045. Epub 2018 Aug 20. 2018.

VARASTEH, S.; et al., Differences in susceptibility to heat stress along the chicken intestine and the protective effects of galactooligosaccharides. **PLoS One**. 10, e0138975. 2015.

VOISINE, C.; ORTON, K.; MORIMOTO, R. I. Protein Misfolding, Chaperone Networks, and the Heat Shock Response in the Nervous System. **In Molecular Neurology**. pp. 59-76. <https://doi.org/10.1016/B978-012369509-3.50007-X>. 2007.

XIE, J.; et al. Differential expression of heat shock transcription factors and heat shock proteins after acute and chronic heat stress in laying chickens (*Gallus Gallus*). **PLoS One**. 9, e 102204, 2014.

XIONG, Y.; et al. Oxidative Stress and Endoplasmic Reticulum Stress Are Involved in the Protective Effect of Alpha Lipoic Acid Against Heat Damage in Chicken Testes. **Animals (Basel)**.10(3):384. doi:10.3390/ani10030384. 2020.

WANG, J. et al. Effects of duration of thermal stress on growth performance, serum oxidative stress indices, the expression and localization of ABCG2 and mitochondria ROS production of skeletal muscle, small intestine and immune organs in broilers. **Journal of Thermal Biology**; 85:102420. doi:10.1016/j.jtherbio. 2019.

YU, J.; BAO, E. Effect of Acute Heat Stress on Heat Shock Protein 70 and Its Corresponding mRNA Expression in the Heart, Liver, and Kidney of Broilers. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**. 21(8):1116-1126. 2008.

ZHANG, W. W.; et al., Alteration of *HSF3* and *HSP70* mRNA expression in the tissues of two chicken breeds during acute heat stress. **Genetics and Molecular Research**, 13, 9787–9794. 2014.

8. CAPÍTULO III

**EFEITO DO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO NA EXPRESSÃO DE GENES
LIGADOS AO ESTRESSE DO RETÍCULO ENDOPLÁSMATICO EM
DIFERENTES TECIDOS DE GALINHAS COMERCIAIS E FRANGOS
CAIPIRAS DO BRASIL**

ILHÉUS/2020

EFEITO DO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO NA EXPRESSÃO DE GENES LIGADOS AO ESTRESSE DO RETÍCULO ENDOPLÁSMATICO EM DIFERENTES TECIDOS DE GALINHAS COMERCIAIS E FRANGOS CAIPIRAS DO BRASIL

RESUMO

As galinhas de criação caipira, como a linhagem Peloco, são aves rústicas e estão mais adaptadas ao calor que os frangos de corte, uma vez que estresse térmico é um dos principais fatores de perdas produtivas das aves comerciais. Assim, esse trabalho envolveu 24 frangos de dois grupos genéticos (Cobb 500®; e a linhagem local Peloco), sendo 12 indivíduos de cada grupo, em que, 06 aves de cada grupo foram submetidas à tratamento por estresse térmico agudo de 39,5°C e as outras 06 foram mantidas em conforto térmico a 23°C. Fragmentos de coração, fígado, músculo e rim foram coletados com o objetivo de analisar a expressão dos genes relacionados ao estresse do retículo endoplasmático (*GRP78*; *EI2Fα*; *IRE1* e *ATF6*). Em relação ao tratamento ambiente (AMB), apenas o gene *GRP78* demonstrou diferenças significativas em dois tecidos (coração e rim), no qual ambos os grupos genéticos (GG) aumentaram a expressão do gene após o estresse térmico. Em relação ao GG, diferenças significativas de expressão entre a linhagem comercial e a linhagem Peloco foram observadas nos genes *EI2FA* ($p = 0.01301$) e *GRP78* ($p = 0.00593$) no fígado e em *ATF6* ($p = 0.005807$), *EI2FA* ($p = 0.01640$) e *IRE1* ($p = 0.007695$) no rim. No tecido muscular não houve diferenças estatisticamente significativas para nenhum dos tratamentos (GG, AMB e GGXAMB). Dentre as vias de UPR, apenas a via da *IRE1* foi ativada no fígado da linhagem comercial que aumentou sua expressão após o estresse térmico. Esses resultados trazem informações inéditas importantes para analisar a disparidade transcricional de genes relacionados ao estresse do RE em diferentes tecidos e grupos de frangos após exposição a estresse térmico agudo.

Palavras - chave: Cobb 500®, expressão gênica, Peloco, RT-qPCR, UPR.

EFFECT OF ACUTE THERMAL STRESS ON THE EXPRESSION OF GENES CONNECTED TO STRESS OF THE ENDOPLASMATIC RETICLE IN DIFFERENT TISSUES FROM COMMERCIAL CHICKENS AND CAIPIRAS CHICKEN IN BRAZIL

RESUME

Free-range chickens, such as the Peloco lineage, are rustic birds and are more adapted to heat than broiler chickens, since thermal stress is one of the main factors of productive losses of commercial birds. Thus, this work involved 24 chickens from two genetic groups (Cobb 500®; and the local Peloco strain), 12 individuals from each group, in which 06 birds from each group were subjected to treatment by acute thermal stress of 39.5°C and the other 06 were kept in thermal comfort at 23 ° C. Heart, liver, muscle and kidney fragments were collected in order to analyze the expression of genes related to endoplasmic reticulum stress (*GRP78*; *EI2Fα*; *IRE1* and *ATF6*). Regarding the environmental treatment (AMB), only the *GRP78* gene demonstrated significant differences in two tissues (heart and kidney), in which both genetic groups (GG) increased the expression of the gene after heat stress. Regarding GG, significant differences in expression between the commercial line and the Peloco line were observed in the *EI2FA* ($p = 0.01301$) and *GRP78* ($p = 0.00593$) genes in the liver and in *ATF6* ($p = 0.005807$), *EI2FA* ($p = 0.01640$) and *IRE1* ($p = 0.007695$) in the kidney. There was no statistically significant difference in muscle tissue for any of the treatments (GG, AMB and GGXAMB). Among the UPR pathways, only the *IRE1* pathway was activated in the liver of the commercial strain, which increased its expression after thermal stress. These results provide important new information to analyze the transcriptional disparity of genes related to ER stress in different tissues and groups of chickens after exposure to acute thermal stress.

Keywords: Cobb 500®, gene expression, Peloco, RT-qPCR, UPR

1. INTRODUÇÃO

As altas temperaturas tem forte influência no desempenho zootécnico das aves, constituindo um dos principais fatores de perdas produtivas em climas tropicais. As linhagens comerciais de frangos de corte, como a Cobb 500®, foram geneticamente selecionadas para apresentar bons índices de produção e taxas de crescimento mais rápidas, entretanto tornaram-se mais susceptíveis às variações ambientais, apresentando baixa resistência ao estresse por calor (BROSSI et al., 2009; RENAUDEAU et al., 2011; DUANGJINDA et al., 2011; SOLEIMANI et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2019; WANG et al., 2019; AL-ZGHOUL et al., 2019).

Sob outra perspectiva, as raças de galinhas caipiras, que se desenvolveram em áreas tropicais, demonstram ser mais resistentes ao estresse térmico, uma vez que elas se formaram sob as pressões seletivas locais ou sofreram com altas temperaturas durante o processo de formação. Em muitos locais essas aves são criadas em sistema de avicultura familiar com pouco ou nenhum controle zootécnico (BARBOSA et al., 2007; SOLEIMANI et al., 2011; CARVALHO 2016; SOBREIRA; VIOLA, 2019). Na Bahia, aves naturalizadas como a linhagem Peloco, são rústicas e adaptadas a ambientes adversos e com temperatura elevadas. Estudos recentes de expressão gênica comprovaram que essa linhagem possui maior resistência a altas temperaturas do que a linhagem comercial Cobb 500® (CEDRAZ et al., 2017). Essas aves têm grande importância local, sendo criadas em fazendas e seus produtos contribuem para os rendimentos familiares carentes dos pequenos produtores.

Situações estressantes como as altas temperaturas podem acarretar um acúmulo de proteínas mal enoveladas, as quais podem resultar no estresse do retículo endoplasmático. Assim, o estresse térmico e o estresse oxidativo estão muitas vezes associados ao estresse do retículo endoplasmático RE, uma organela intracelular complexa, dinâmica, com múltiplas funções essenciais para a homeostase celular (BRAVO et al., 2013; BRAAKMAN e HEBER, 2013; REID e NICCHITTA, 2015; SCHWARZ; BLOWER, 2016). De maneira geral, o retículo endoplasmático desempenha papéis muito importantes e estão intimamente relacionados a uma série de processos, incluindo (a) síntese, dobragem, modificação e transporte de proteínas; (b) síntese e distribuição de fosfolipídios e esteroides; (c) armazenamento de íons cálcio

dentro de seu lúmen e sua liberação regulada no citoplasma e (d) interações com outras organelas como o complexo de Golgi (SCHRODER, 2008; HOTAMISLIGIL, 2010).

O acúmulo dessas proteínas mal enoveladas no RE desencadeia uma resposta evolutivamente conservada em todos os eucariotos, designada resposta das proteínas mal enoveladas (unfolded protein response - UPR) (MAA e HENDERSHOT, 2004; HOTAMISLIGIL, 2010). Até o momento foram descritas 03 vias da UPR: PERK (fator de iniciação eucariótica do tipo PKR2 α quinase), *IRE1* (inositol que requer a enzima 1) e *ATF6* (ativação do fator de transcrição 6). Quando o retículo endoplasmático está em funcionamento normal, essas três proteínas são ligadas a chaperona BiP também conhecida como GRP7 ou HSPA5 (BERTOLOTTI et al., 2000; SHEN et al., 2002; HOTAMISLIGIL, 2010; BRAVO et al., 2013). Quando ocorre estresse da organela, a chaperona HSPA5 se dissocia, torna-se ativa e libera as vias de resposta, as quais podem desencadear cascatas de sinalizações que agem ora simultaneamente, ora sequencialmente, visando reverter o estresse do RE (SCHEUNER et al., 2001; SCHRODER e KAUFMAN, 2005; ZHANG et al., 2014). Pesquisas que visem investigar o perfil da expressão dos genes de resposta ao estresse do Retículo endoplasmático em diferentes tecidos de aves de criação caipira da região Nordeste são inexistentes.

Deste modo, no presente trabalho analisou-se a expressão do mRNA de genes relacionados ao estresse do retículo endoplasmático em diferentes tecidos em dois grupos de frangos (linhagem comercial Cobb e a linhagem localmente adaptado Peloco) submetidos ao estresse térmico agudo a 39,5°C. Foram avaliados os níveis de expressão da chaperona *GRP78* e para verificar quais vias UPR estavam envolvidas no estresse do retículo endoplasmático examinaram-se genes das três vias UPR: *EI2F α* ; *IRE1* e *ATF6*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais e Experimento

Para a realização do experimento foram criadas 24 aves, entre machos e fêmeas: 12 da linhagem comerciais Cobb 500® e 12 a linhagem Peloco.

O experimento foi realizado no Setor de Avicultura da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), no município de Itapetinga, BA, onde foram incubados

ovos de matrizes do agrupamento Genético Peloco, enquanto que os pintos de um dia das aves comerciais foram comprados de uma granja. Essas aves chegaram ao Setor de Avicultura da UESB, uma semana após a eclosão dos ovos de Peloco. A realização do projeto foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA / UESB, registrado com o nº 166/2017, Protocolo 109/2015.

A cidade de Itapetinga possui clima semiárido e a estação quente dura cerca de cinco meses e meio, de 19 de Outubro a 04 de abril, com temperatura máxima média diária acima de 30 °C, sendo que o mês mais seco é Agosto, com 30 mm de precipitação. E o mês de maior precipitação é Dezembro (média de 140 mm). O inverno permanece por dois meses e meio, de 2 de Junho a 20 de Agosto, com temperatura máxima diária em média abaixo de 27°C (WEATHER SPARK, 2020; CLIMATE-DATA, 2020). No decorrer do experimento, temperatura dos galpões foi monitorada e a média diária de temperatura durante o período em que o experimento foi conduzido foi de 26,5 °C.

As aves foram criadas em um galpão aberto forrado com maravalha, sob as mesmas condições ambientais no período de dois de novembro a dois de dezembro de 2015. Ração e água foram fornecidas *ad libitum* para as aves durante todo o período experimental. As rações utilizadas na dieta nutricional das aves foram produzidas no Setor de Avicultura da UESB seguindo as exigências das Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos (ROSTAGNO; GOMES, 2011) (Tabela 01). Para o ensaio de estresse térmico foi confeccionada uma câmara climática madeira com dimensões de 1,5 metros de comprimento, 1 metro de altura e 1 metro de largura e equipada com dois aquecedores a gás.

Uma vez que as aves comerciais chegaram uma semana após o nascimento das galinhas locais, o estresse por alta temperatura foi realizado em dois momentos, para que as aves fossem abatidas com a mesma idade, com 30 dias de vida. A submissão das aves ao estresse térmico aconteceu da seguinte maneira: inicialmente seis aves da linhagem Peloco foram transferidas para a câmara climática experimental e mantidas a temperatura média de 39,5°C e com uma umidade relativa de 60%. Uma semana depois, 06 aves da linhagem Cobb 500® foram também submetidas estresse térmico com as mesmas condições de temperatura e umidade.

As aves expostas ao calor ficaram sob observação contínua para detectar tanto as alterações comportamentais que evidenciassem o estresse térmico quanto para definir

momento de parar, a fim de evitar a morte dos animais. Assim, como não houve tempo determinado, o estresse térmico foi considerado agudo quando a maioria das aves modificaram seu comportamento, recusando o consumo de alimento e água e mantiveram-se prostradas (+/- 90%), e com respiração ofegante. Os frangos da linhagem Peloco suportaram o calor por uma hora enquanto que as aves da linhagem comercial prostraram-se ao alcançar 30 minutos sob estresse por calor. Imediatamente após constatar o estresse térmico agudo das aves, elas foram abatidas por deslocamento cervical. As outras seis aves de cada grupo genético foram mantidas no galpão e foram abatidas às 4h, para garantir temperatura de conforto térmico (23°C).

Tabela 1: Composição da ração que foi usada para os pintainhos até os 30 dias de idade segundo ROSTAGNO; GOMES (2011).

Milho	61,1%
Farelo de soja	35,0%
Fosfato bi cálcico	2,00%
Calcário	1,10%
NaCl	0,30%
Suplemento vitamínico e mineral	0,40%
Níveis nutricionais	
Pb	21,2%
Em	2,89%
Ca	1,01%
P disponível	0,49%
Sódio	1,63%
Lisina	1,10%
Met + cis	0,74%

2.2 Coleta de tecidos, extração e quantificação

Fragmentos de tecidos (coração, músculo do peito, fígado e rim) de cada ave foram rapidamente coletados, armazenados em tubos criogênicos, identificados e congelados em nitrogênio líquido. O material coletado foi levado à Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), nas dependências do laboratório de Genética Veterinária Animal onde foram armazenadas em ultrafreezer -80.

A extração do RNA total de amostras de cada tecido foi feita utilizando-se reagente Trizol® da Invitrogen seguindo o protocolo do fabricante. Usando um aparelho espectrofotômetro NanoDrop 2000® as concentrações e purzas dos RNAs foram

medidas e a integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio e visualizados em luz ultravioleta.

2.3 Transcrição Reversa do mRNA

O kit comercial GoScript™ Reverse Transcription System (Promega Corporation, Madison, EUA) foi utilizado para a transcrição Reversa do mRNA para cDNA. Foram utilizados 4 µl de RNA com concentração de 500ng, acrescidos de 1 µl de Oligodt. A reação foi incubada por cinco minutos a 70°C e, então, mantida em gelo por um minuto. Logo após, foi adicionado 15 µl de um mix contendo enzima Transcriptase Reversa, inibidor de ribonuclease, recombinante RNase OUT, RT buffer, dNTP, e água ultrapura, para um volume final de 20 µl. As amostras foram incubadas em termociclador utilizando-se as seguintes temperaturas e tempos: anelamento 72°C por 5 min e, em seguida de extensão, 50°C por 50 min, e refrigeradas em gelo. O cDNA foi mantido em freezer -20°C até a sua utilização.

2.4 Eficiência e PCR quantitativa em tempo real

Para o estudo de expressão gênica, as PCRs foram realizadas com cada amostra em duplicatas. Inicialmente, foi feito um teste de eficiência para determinar as condições adequadas para uma reação de RT-QPCR. Um *pool* de cDNA contendo 05 µl de amostra foi utilizado para otimizar e calcular a eficiência da PCR. Esse *pool* foi então diluído em quatro concentrações de cDNA (5, 15, 45 e 135ng/µl) e, três concentrações de cada *primer* (200, 400 e 800 mM). Essas diferentes concentrações foram para amplificação via em PCR em tempo real para a visando comparar os cycle threshold (Cts) e contruir a curva padrão útil para otimizar e calcular a eficiência da PCR. Todas as reações de amplificação foram conduzidas em termociclador, no ensaio ddCt (Relative Quantification), sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C durante dois minutos e 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos. A temperatura de extensão determinada para cada par de primers durante 60 segundos. A curva de dissociação foi obtida na etapa final, onde eleva-se gradualmente a temperatura de 60°C a 95°C. As amplificações dos genes ocorreram dentro da plataforma Real Time PCR 7500 Fast (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e os

resultados foram obtidos com o programa Sequence Detection Systems (V. 2.0.6) (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) que gerou o parâmetro cycle threshold, (Ct) os quais possibilitaram os cálculos de Desvio Padrão de Ct médio. A eficiência da amplificação da PCR foi calculada usando a fórmula $E = (10^{(-1/\text{coeficiente angular})} - 1) \times 100$ (PFAFFL, 2001).

2.5 Expressão nos Genes Alvos

Após a otimização reações de RT-qPCR, a expressão de quatro genes relacionados ao estresse do retículo endoplasmático (*ATF6*; *EI2F α* ; *GRP78* e *IRE1*) foi avaliada por meio de quantificação relativa em amostras de músculo, rim, coração e fígado dos dois grupos genéticos de frangos em ambientes de conforto e estresse térmico. A tabela 02, descreve cada *primer*, bem como a função desses genes que foram desenhados por Guo et al. (2016). Todas as reações de PCR em tempo real realizadas com reagentes do kit Power SYBR Green PCR Master Mix (Promega, Madison, WI, EUA), utilizando *primers* específicos. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador ABI Prism 7500® (Applied BioSystems), no ensaio ddCt (Relative Quantification) plate.

As reações foram normalizadas por controles endógenos escolhidos para cada tecido: *LDHA* para o tecido renal, *RPL5* para o coração e o fígado e, *MRPS27* para o músculo. Os normalizadores *LDHA*, *RPL5* e *MRPS27* demonstraram estabilidade para serem utilizados como controle endógeno em reações de RT-QPCR no experimento com frangos geneticamente divergentes (linhagem Cobb 500® e linhagem Peloco) submetidos ao tratamento ambiente (conforto e estresse térmico agudo). Após a determinação da eficiência média das amplificações, as diferenças nas frequências dos transcritos alvos foram calculadas pela equação: razão de expressão = $[1 + (\text{eficiência média da PCR})]^{Ct \text{ médio do grupo testado} - Ct \text{ médio do grupo referência}}$ (LIVAK; SCHITTGEN, 2001).

2.6 Análises estatísticas

As análises comparativas dos genes em relação aos grupos genéticos (Cobb 500® e Peloco), ao ambiente (conforto x estresse) e a interação entre os fatores foram feitas utilizando análises uni e multivariadas, de acordo com o seguinte modelo:

$$y_{ijk} = \mu + G_i + AMB_j + GGAMB_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Em que: μ é a média da expressão do gene; G_i é o efeito do Grupo Genético; AMB_j é o efeito de Ambiente; $GGAMB_{ij}$ o efeito da interação entre Grupo Genético e Ambiente e; ε_{ijk} o erro experimental associado.

Avaliou-se, via ANOVA, os efeitos de GG, AMB E GGAMB sobre a expressão dos genes nos diferentes tecidos. Posteriormente realizou-se MANOVA e Análise de Componentes Principais (PCA), considerando os grupos formados pela interação GGxAMB como tratamentos.

Tabela 02: Descrição dos genes relacionados ao estresse do retículo endoplasmático e seus primers específicos utilizados nas análises de RT-qPCR em diferentes tecidos de frangos submetidos ao conforto térmico e estresse térmico agudo.

GENE	SEQUÊNCIA 5'-3'	FUNÇÃO
GRP78 - 78-kDa glucose-regulated protein	F:GAATCGGCTAACACCAGAGGA R:CGCATAGCTCTCCAGCTCATT	Reestabelecer a homeostase do RE
EiF2α - α -subunit of eukaryotic initiation factor 2	F:GCTGCGAGTCAGTAATGGGTATAA R:CTGCCAGGAACTTGCCACA	Reverter o estresse do RE
IRE1 - Inositol-requiring enzyme 1	F:TGAGGGCAATGAGAAATAAGAAGC R:TGTAGGAGCAGGTGAGGGAAGC	Reverter o estresse do RE
ATF6 - Activating Transcription Factor 6	F: GATTGTGGGCGTCACTTCTCG R:TGGGATGCCAATGTTAGCCTG	Reverter o estresse do RE
MRPS27 - Mitochondrial Small Ribosomal Subunit Protein MS27	F:GCTCCCAGCTCTATGGTTATG R:ATCACCTGCAAGGCTCTATTT	Ajudam na síntese de proteínas na mitocôndria
RPL5 - Ribosomal Protein L5	F:ATATAACGCCTGATGGGATGG R:TTGACTTCTCTTGGGTTTCT	Catalisam a síntese de proteínas,
LDHA -Lactato desidrogenase A	F:CTATGTGGCCTGGAAGATCAG R: GCAGCTCAGAGGATGGATG	Participa da etapa final da glicólise anaeróbica

Adicionalmente foi confeccionado um gráfico heatmap, utilizando-se o programa R (R Development Core Team, 2008), no intuito de verificar a existência de expressão gênica diferencial entre os grupos genéticos em ambiente de conforto e estresse térmico, além de identificar a relação entre os genes avaliados. Para o

dendrograma atrelado ao gráfico heatmap, foi considerada a distância euclidiana média com agrupamento por meio de ligação completa. Foram considerados fortemente suportados pelos dados os grupos com valores de aproximação imparcial (AI) acima de 95%.

3. RESULTADOS

3.1 Expressão relativa dos genes alvo

Os normalizadores *LDHA* (rim), *RPL5* (fígado e coração) e *MRPS270* (músculo) demonstraram ser estáveis e desse modo ideais para servir como controle endógeno em reações de RT-qPCR no experimento com frangos geneticamente divergentes (linhagem Cobb 500® e linhagem Peloco) submetidos ao tratamento ambiente (conforto e estresse térmico agudo).

Dentre todos os tecidos avaliados, o muscular foi o único que não apresentou diferenças estatisticamente significativas, pela ANOVA, para todos os tratamentos (GG, AMB e GGXAMB). Ou seja, nenhum dos genes aumentou significativamente seus níveis de expressão nesse tecido após o estresse térmico para ambos os fatores analisados (Tabela 03).

As análises de variância, a partir dos resultados da PCR quantitativa em todos os tecidos, não revelaram diferenças significativas para a interação ($P > 0,05$) entre os grupos genéticos e o ambiente (GG x AMB) em músculo, coração e rim.

No tecido cardíaco, as análises dos níveis de expressão para o gene *GRP78* foram significativas para AMB ($p = 0.01546$). As aves de ambos os grupos genéticos quando submetidos ao estresse térmico expressaram níveis maiores de mRNA de *GRP78* do que aqueles mantidos em conforto. Os outros genes analisados no coração, não apresentaram diferenças significativas nos níveis de expressão para ambos aos grupos genéticos e para o tratamento ambiente (Tabela 03). No fígado, foram observadas diferenças estatísticas significativas para os genes *EI2FA* ($p = 0.01301$) e *GRP78* ($p = 0.00593$) quanto ao GG (Tabela 03).

A MANOVA foi realizada para cada tecido, considerando os tratamentos formados pela interação GG x AMB e a expressão dos genes como variáveis dependentes. Observaram-se diferenças significativas no tecido hepático (Wilks, $p = 0,004363$) e para avaliar os perfis de expressão dos grupos, foi realizada a Análise de

Componentes Principais (PCA), na qual os dois primeiros componentes explicaram 99% da variação observada. Os componentes principais PC1 e PC2 podem ser observados na figura 01. Os primeiros componentes principais (PC1) foram responsáveis por 94,7% da variação e foi descrito como: *ATF6* (0.271), *EI2FA*(0.147), *GRP78* (0.342) e *IRE1* (0.888). Verificou-se que a variável mais importante para evidenciar a expressão diferencial dos grupos genéticos nos diferentes ambientes no tecido hepático, foi o gene *IRE1*, que apresentou o maior coeficiente, seguido pelo *GRP78*, com moderado coeficiente e pelos genes *ATF6* e *EI2FA*, que apresentaram expressões baixas e próximas da média (Figura 01).

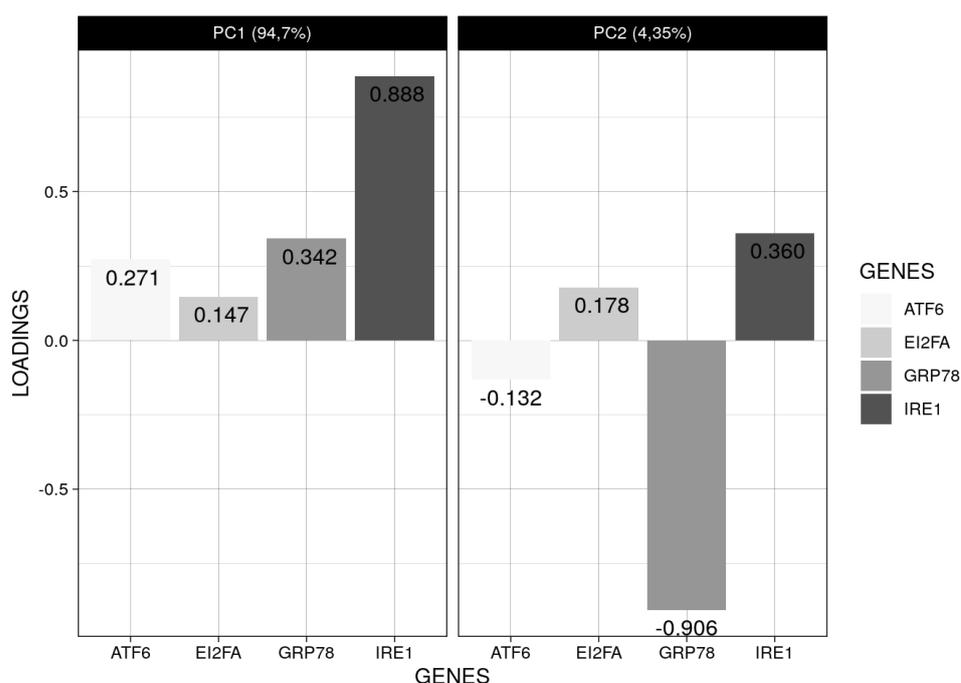


Figura 01: Análise de Componentes Principais (PCA). O PC1 (94,7%) O PC2 que explica 4,35%.

O gene *IRE1* apresentou uma superexpressão nas aves da linhagem Cobb 500® sob estresse (Figura 02, tabela 03), seguido dos outros genes que também apresentaram expressões elevadas nesse tratamento. Vale ressaltar o gene *GRP78*, que apresentou níveis consideráveis de expressão nos dois grupos genéticos sob estresse térmico, fato que não aconteceu com o *IRE1*, que apresentou níveis muito altos de expressão apenas na Cobb sob estresse. O segundo componente, foi responsável apenas por 4,35 % da variação dos dados, porém traz uma explicação complementar para a expressão diferencial dos genes nos tratamentos (Figura 01). A variável com maior contribuição

foi o gene *GRP78*, com baixa expressão nas aves de ambos os grupos genéticos mantidas em ambiente de conforto térmico, evidenciando uma variação no conjunto de dados em que esse gene aumenta sua expressão sob estresse para ambos os grupos genéticos (Figura 2; Tabela 03).

A análise da expressão dos genes no fígado permitiu notar que todos os genes aumentaram sua expressão na linhagem comercial e ainda que no ecótipo Peloco a expressão do gene *IRE1* diminuiu no estresse, enquanto que o *GRP78* teve um leve aumento nos níveis de expressão nesse grupo genético após estresse térmico (figura 02). Já em relação a expressão do gene *EI2FA* nesse tecido, a Peloco apresentou níveis de expressão praticamente igual para os dois ambientes e menores que aqueles observados para a ave comercial (Tabela 03).

Tabela 03. Médias e desvio padrão para expressão dos genes cada tecido após ANOVA

	Genes	COBB		PELOCO	
		Conforto	Stress	Conforto	Stress
MÚSCULO	<i>ATF6</i>	1,12(0,49)	1,44(1,14)	4,41(6,55)	3,56(5,85)
	<i>GRP78</i>	1,05(0,35)	3,10(5,31)	1,97(2,76)	4,07(5,55)
	<i>IRE1</i>	1,06(0,37)	1,04(0,69)	1,42(0,73)	1,53(0,72)
	<i>EI2FA</i>	1,03(0,26)	0,85(0,36)	1,60(1,44)	1,13(0,53)
CORAÇÃO	<i>ATF6</i>	1,08(0,51)	2,08(2,85)	0,68(0,25)	0,29(0,26)
	<i>GRP78</i>	1,01(0,17) A	7,06(5,27) B	1,26(0,57) A	6,29(8,78) B
	<i>IRE1</i>	1,03(0,29)	0,88(0,45)	0,92(0,43)	1,17(0,52)
	<i>EI2FA</i>	1,03(0,30)	0,85(0,56)	0,86(0,22)	1,00(0,29)
FÍGADO	<i>ATF6</i>	1,20(0,93)	2,73(1,78)	0,67(0,27)	1,25(1,13)
	<i>GRP78</i>	1,04(0,33) a	3,86(5,63) a	1,68(0,56) b	2,49(1,04) b
	<i>IRE1</i>	1,21(0,81)	6,55(13,03)	1,41(0,89)	0,66(0,32)
	<i>EI2FA</i>	1,09(0,47) a	1,81(0,92) a	0,85(0,22) b	0,76(0,25) b
RIM	<i>ATF6</i>	1,34(0,98) a	1,74(0,83) a	2,86(1,96) b	4,11(2,01) b
	<i>GRP78</i>	1,37(1,03) A	6,69(6,05) B	6,36(4,73) A	9,70(5,96) B
	<i>IRE1</i>	1,32(0,73) a	2,02(0,82) a	3,00(2,59) b	4,25(1,58) b
	<i>EI2FA</i>	1,27(0,74) a	1,74(0,96) a	2,33(1,67) b	6,21(4,73) b

Valores informados como $\mu(\sigma)$, a / b diferenças significativas para Grupo Genético, A / B diferenças significativas para Ambiente. Letras maiúsculas diferentes referem-se a diferenças significativas para ambientes (Conforto e Stress). Letras minúsculas diferentes referem-se a diferenças significativas para grupos genéticos (COBB e Peloco). Médias com letras minúsculas iguais na mesma linha e maiúsculas na mesma coluna não diferem estatisticamente ($P > 0,05$) pelo teste F da ANOVA.

Para o tecido rim, a expressão relativa apresentou diferenças significativas entre os fatores GG para os genes *ATF6* ($p = 0.005807$), *EI2FA* ($p = 0.01640$) e *IRE1* ($p = 0.007695$). Por outro lado, o gene *GPR78* não apresentou diferenças entre os grupos genéticos, mas foi o único no tecido renal que apresentou diferenças significativas para o tratamento AMB (*GPR78* - $p = 0.04209$), no qual ambos os grupos genéticos aumentaram a expressão desse gene após o estresse térmico agudo (Tabela 03).

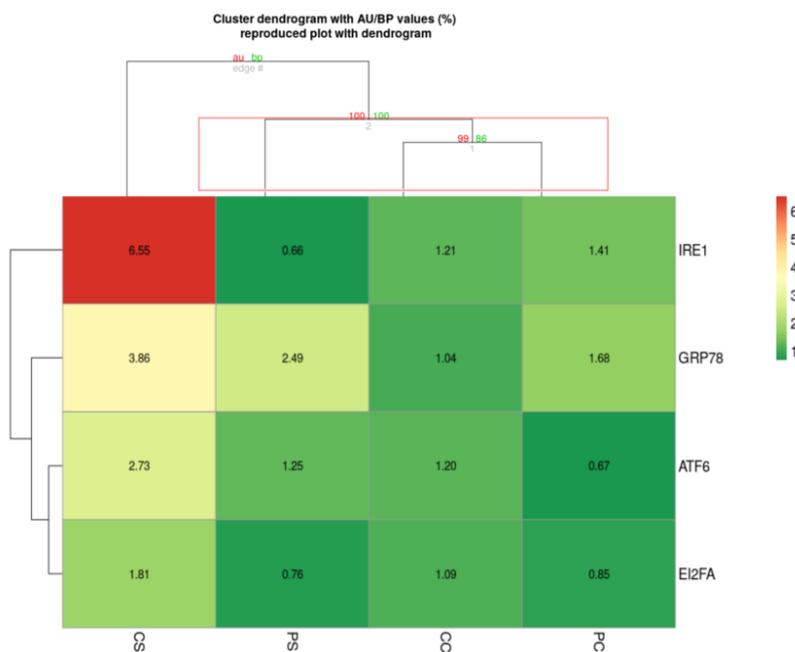


Figura 02: Gráfico gerado pelo Heatmap comparando os valores de Cts provenientes das reações de RT-qPCR em fragmentos fígado de quatro genes relacionados ao estresse do retículo endoplasmático analisando em função da interação Grupo genéticos (PC = Peloco Conforto, PE = Peloco Estresse, CC = Cobb 500® Conforto, CE= Cobb 500® Estresse). Os tons mais para verde são os menores valores de expressão e os mais para vermelho, os maiores.

4. DISCUSSÃO

Analisou-se a expressão de genes relacionados ao estresse do retículo endoplasmático (RE) (*GRP78*; *EI2Fα*; *IRE1* e *ATF6*) em quatro tecidos diferentes. Os resultados evidenciaram diferenças estatisticamente significativas de expressão entre os

grupos genéticos, condições ambientais que foram analisadas e da interação entre ambos em análises uni e multivariadas.

O retículo endoplasmático é uma organela essencial para a síntese proteica, modificações dobráveis e pós-traducionais, bem como tem um papel essencial para a homeostase celular, desenvolvimento e capacidade de resposta ao estresse (JI et al., 2011; BRAVO et al., 2013; REID e NICCHITTA, 2015; SCHWARZ e BLOWER, 2016). O estresse por calor agudo pode ser muito prejudicial à integridade celular, ocasionando no acúmulo de proteínas tóxicas e mal enoveladas no lúmen do RE (BRAVO et al., 2013). A restauração da homeostase do RE é essencial para a sobrevivência celular o qual responde as perturbações ativando uma rede coordenada de transcrição e tradução denominada Resposta das Proteínas mal enoveladas (UPR). Essa resposta envolve a chaperona *GRP78*, a qual permite a ativação de até três vias distintas de UPR. Cada uma dessas vias é capaz de desencadear uma cascata de sinalização cujo objetivo final é restabelecer as condições fisiológicas adequadas à organela celular (MAA e HENDERSHOT 2004; BRAVO et al., 2013; ADAMS et al., 2019; GUO et al., 2020).

Nas aves, o estresse térmico afeta seu status fisiológico provocando alterações nas atividades de vários órgãos desses animais, inclusive no músculo. Podem ocorrer mudanças no metabolismo, nas reações de glicólise determinando alterações nas características de qualidade da carne e perda de água e peso do órgão (GONZALES e SARTORI, 2002; FLORIANO, 2018; SANTOS VAZ et al. 2016). Diversos estudos têm mostrado que a expressão gênica é temporal, tecido-específica e grupo-genético-específica. Assim, um mesmo gene pode expressar níveis maiores ou menores de acordo com o tecido, com o grupo genético analisado ou com o tempo de estresse a que foi submetido (ZHANG et al., 2014; KONG et al., 2015; CEDRAZ et al., 2017;)

O tecido músculo não é adequado para avaliar a expressão de genes relacionados ao estresse do retículo endoplasmático nos grupos genéticos propostos. Nas células musculares, está presente uma variante do RE, denominada retículo sarcoplasmático (SR), formando uma rede de túbulos e cisternas que armazenam íons de cálcio, cuja principal função é controlar a liberação desse cálcio para a contração muscular (BRAVO et al., 2013; SANTOS, 2020). Isso poderia ser a explicação para não terem sido observadas diferenças significativas entre genes investigados. O retículo sarcoplasmático pode não estar envolvido em respostas ao estresse térmico ou, o tempo

de exposição ao calor, pode não ter sido suficiente para aumentar o nível da expressão dos genes no músculo do peito. Além disso, o estresse térmico afeta mais diretamente alguns tecidos considerados viscerais (metabolicamente ativos) tais como fígado, coração e rim (BROSSI et al., 2009; ZHU; LEE, 2015).

Tanto a linhagem comercial quanto a galinha caipira apresentaram aumento na expressão do *GRP78* nos tecidos analisados, após o estresse térmico, evidenciando que o estresse térmico agudo provavelmente causou estresse no RE. Um estudo recente, WANG et al., (2018), analisando a expressão de HSPA5, também conhecida como *GRP78*, observou que essa chaperona aumentou o nível de expressão do mRNA em testículos de frango de corte após estresse térmico agudo.

O sistema cardiovascular tem grande implicação prática para a avicultura de corte, pois o crescimento acelerado dos frangos sobrecarrega o coração e um desequilíbrio, ainda que pequeno, nas condições ambientais pode ocasionar em déficit de oxigenação nos tecidos prejudicando a manutenção da homeostase celular que é premissa importante para a maioria dos organismos (MACARI e LUQUETI, 2002; FLORIANO, 2018). Quando as aves são submetidas ao estresse pelo calor, há no tecido cardíaco, um aumento na expressão de genes de resposta ao estresse. Esses genes são responsáveis por corrigir imediatamente as proteínas mal enoveladas e evitar a queda nos níveis de oxigenação até danos graves no órgão como a fragmentação do miocárdio nas fibras musculares cardíacas (ZHANG et al., 2016). Nesse contexto, no tecido cardíaco, ambos os grupos genéticos aumentaram a atividade do gene *GRP78* após estresse térmico agudo. Esse gene é um sensor de estresse do RE e o aumento em seu nível de expressão, indica o acúmulo de proteínas mal enoveladas no RE.

No fígado, observou-se diferença nas variações de expressão apenas para grupo genético, entretanto à partir da MANOVA observou-se interação GgxAMB significativa. A maior expressão do *IRE1* deixa evidente que a via de resposta de UPR - *IRE1* foi ativada nesse tecido.

De acordo com Adams et al. (2019), o BiP e o *IRE1* estão diretamente implicando na sinalização UPR,) considerados como sensores do estresse de ER. No geral, o mecanismo pelo qual o *IRE1* detecta o estresse do RE e induz a sinalização UPR ainda não está claramente entendido. Existem três modelos que fornecem mecanismos contrastantes para explicar como o estresse do RE é detectado (ADAMS et al., 2019). O modelo mais citado na literatura diz que, capacidade do *IRE1 α* de detectar

o estresse do RE depende de sua dissociação do complexo BiP / *GRP78*, em que, o alto grau de estresse do RE provoca essa dissociação e promove a oligomerização do *IRE1* α que detecta proteínas mal enoveladas no lúmen, se liga às mesmas e desencadeia uma das vias de sinalização intracelular da UPR, a via da *IRE1* (BERTOLOTTI et al., 2000; KIMATA et al., 2003 ; OIKAWA et al., 2009 ; AMIN-WETZEL et al., 2017; ADAMS et al., 2019). Assim, o gene *IRE1* desempenha um papel importante na percepção e sinalização do estresse do RE, ativando a via de UPR que pode atenuar o estresse do RE (TIRASOPHON et al., 1998; MORI, 2009).

No presente estudo, os genes *GRP78* e *IRE1* tiveram sua expressão aumentada e, a superexpressão do *IRE1* na linhagem comercial no tecido hepático pode estar relacionada à maior susceptibilidade da Cobb500®, as quais podem ter acumulado mais proteínas mal enoveladas que a galinha caipira durante o estresse térmico.

O fígado é a maior glândula do corpo, desempenha uma variedade de funções no metabolismo energético, digestão e capacidade imunológica, e seu alto nível de função secretora torna esse órgão particularmente suscetível ao estresse do RE, propenso a lesões e acúmulo excessivo de triglicérides (esteatose hepática), sendo considerado ideal para estudar o impacto causado por altas temperaturas (McCORMICK, 1990; MINAFRA, et al 2009; JI et al., 2011; FU et al., 2012). De acordo com Ji et al., (2011), UPR desempenha um papel fundamental no fígado, na manutenção da homeostase do RE em condições basais e na adaptação às flutuações na disponibilidade de nutrientes.

Entre os tecidos aqui analisados, o rim se mostrou promissor para estudos de expressão gênica diferencial frente ao estresse térmico, pois foi o único tecido em que ambos os genes analisados mostraram diferenças significativas em pelo menos um dos fatores analisados, com os genes *ATF6*, *EI2FA* e *IRE1* apresentando diferenças entre os grupos genéticos e o gene *GRP78* nos ambientes.

O rim é um órgão que está diretamente relacionado como o funcionamento cardiovascular colaborando com as respostas fisiológicas compensatórias das aves submetidas ao estresse por calor. Esse órgão mantém a composição química dos líquidos corporais e desempenha funções homeostáticas de grande importância como regulação do balanço hídrico, de eletrólitos e do equilíbrio ácido-básico (GAW et al., 2001). Em condições de estresse pode ocorrer alcalose respiratória, provocando alteração no equilíbrio ácido-base das aves e quando isso ocorre, os rins aumentam a excreção de HCO_3^- e reduzem a excreção de H^+ , na tentativa de manter o equilíbrio

(BORGES et al., 2003; MINAFRA, et al., 2009). Assim como coração e fígado, o rim é um órgão susceptível ao estresse térmico e a exposição às altas temperaturas pode regular significativamente a expressão de genes que atuam na estabilização da estrutura proteica intracelular e preservação da integridade celular, reestabelecendo a homeostase da organela.

Mais uma vez, em nosso estudo, observamos que, a expressão de um gene está intimamente relacionada ao tecido analisado. Nesse contexto, perfis diferentes de expressão gênica entre tecidos foram relatados em estudos com frangos após estresse térmico por Zhen et al. (2006), que observaram níveis diferentes do HSP70 no fígado, cérebro e músculo ao analisarem 162 indivíduos de duas populações F2 gerados após acasalar Xinghua com Taihe e Silkies com White Recessive Rock. Zhang et al., (2014) encontraram expressões distintas de mRNA de HSP70 e *HSF3* em Galinhas Lingshan (LSC) e White Recessive Rock (WRR) nos quatro tecidos testados (coração, fígado, cérebro e músculos da coxa).

Em relação ao tratamento ambiente, o gene *GRP78* foi o único que apresentou aumento de expressão após estresse térmico agudo em ambos os grupos genéticos nos tecidos coração e rim. Esses resultados representam evidências consistentes de que o estresse térmico agudo desencadeou a resposta de proteínas mal enoveladas e consequentemente causou estresse no RE no coração e no rim da linhagem comercial e também da galinha localmente adaptada Peloco. Um estudo de estresse térmico realizado por Kong et al., (2015) na raça de galinha White Recessive Rock (WRR) também mostrou que os níveis diferentes de expressão do mRNA de *GRP78* no fígado, cérebro e cardíaco, foi notavelmente mais alta após 3h de estresse térmico quando comparado com o grupo controle.

De acordo com Wang et al., (2018) e Zhu e Lee (2015), a HSPA5, também conhecida como *GRP78* é um marcador de estresse no retículo. Sob condições fisiológicas normais, a chaperona *GRP78* ou BIP, atua como repressor chave da UPR, pois, se liga aos domínios luminais das proteínas PERK, *IRE1* e *ATF6* mantendo-os inativos (HETZ, 2012). Com o acúmulo de proteínas mal enoveladas, *GRP78* são liberadas das vias de UPR e permite suas ativações (WALTER e RON 2011; BRAAKMAN e HEBER, 2013; REID e NICCHITTA, 2015; SCHWARZ e BLOWER, 2016). Até o momento, três vias UPR foram documentadas: PERK, *IRE1* e *ATF6* (HOTAMISLIGIL 2010; HETZ, 2012; BASAR et al., 2014; GUO et al., 2016).

O presente estudo também monitorou genes que ativam as três vias UPR: via PERK, via *IRE1* e via *ATF6*, a fim de identificar quais as vias de resposta do estresse do retículo endoplasmático foram ativadas após o estresse térmico agudo nos dois grupos de frangos. Nesse contexto, apenas a via da *IRE1* foi ativada na linhagem comercial Cobb 500® no tecido fígado. As outras duas vias não foram ativadas em nenhum dos tecidos ou grupo genético avaliado.

Em relação aos grupos genéticos (Cobb 500® e Peloco) diferenças nos níveis de expressão foram observadas em genes nos tecidos fígado, no qual a linhagem comercial aumentou a expressão de *GRP78* e *EI2FA* após estresse térmico, e rim, no qual Peloco apresentou níveis maiores de mRNA dos genes *ATF6*, *IRE1* e *EI2FA* já no tratamento conforto, e ainda aumentaram sua atividade após estresse térmico.

Divergências de expressão gênica entre grupos genéticos de frangos após tratamento térmico também foram obtidos em estudos de Zhang et al., (2014) ao analisarem a expressão de genes (*HSF3* e *HSP70*) em quatro tecidos de Galinhas Lingshan (LSC) e White Recessive Rock (WRR) sob 0, 2, 3 e 6 h de tratamento térmico. Esses autores observaram que, no tratamento controle, o gene *HSP70* não apresentou diferenças de expressão enquanto o *HSF3* apresentou níveis mRNA maiores no cérebro e no coração de LSC. Após 2 e 3 h de tratamento térmico, no músculo da perna e cérebro e após 6 h, no músculo da perna e coração, a expressão do mRNA de *HSF3* também foi maior em LSC do que WRR. Já para o gene *HSP70*, após 2 h de tratamento térmico, no músculo da perna e fígado a expressão do mRNA foi maior na WRR. Após 3 h no fígado e coração, e após 6 h no fígado, cérebro e coração houve maior expressão em LSC que em WRR.

Outro estudo, realizado no Brasil por Cedraz et al., (2017), também deixaram evidentes as divergências nos níveis de expressão gênica quando analisa-se grupos genéticos diferentes, ainda que estes grupos pertençam a mesma espécie. Dessa forma. Cedraz et al., (2017), utilizaram em sua investigação três grupos genéticos de frangos (a linhagem comercial Cobb e as linhagens localmente adaptadas Peloco e Caneluda) e, estresse térmico agudo a 39°C notaram que as galinhas de criação caipira apresentaram níveis maiores de mRNA *HSP70* do que Cobb500®.

Tais disparidades mostram que os genes se expressam de maneira particular em cada tecido e/ou em cada grupo genético, bem como, sua expressão pode depender das

condições experimentais que os animais foram submetidos como o tempo de estresse (ZHEN et al., 2006; ZHANG et al., 2014; KONG et al., 2015).

O ecótipo Peloco expressou níveis maiores dos genes aqui analisados do que Cobb 500® no ambiente conforto, principalmente nos genes do tecido renal, sugerindo que o mesmo possui maior resistência ao estresse do retículo endoplasmático do que a linhagem comercial. Estudos envolvendo estresse térmico e realizados por Cedraz et al., (2017); comparando níveis de expressão de genes em Peloco e Cobb 500®, mostraram que a linhagem Peloco expressaram níveis maiores de mRNA HSP70 que a linhagem comercial e, os referidos autores, sugeriram que a galinha localmente adaptada é mais resistente ao estresse por calor agudo do que a linhagem comercial. De acordo Cedraz et al., (2017), as diferenças observadas entre esses grupos genéticos para o mesmo tecido podem ser atribuídas às características próprias de cada grupo, uma vez que passaram por processos seletivos diferentes durante a evolução. A Cobb 500® é uma linhagem de frango comercial e passou por seleção para melhoria dos índices produtivos, enquanto que a Peloco é uma ave caipira localmente adaptada, que não passou por seleção artificial, mas em contrapartida, foram submetidas às pressões seletivas do ambiente (seleção natural), o que as conferiu a adaptação local (ALMEIDA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2014). Enfatiza-se que a linhagem Peloco é um reservatório de alelos importante para a segurança alimentar. Adicionalmente, tem grande potencial para fomentar um mercado crescente dentro e fora do Brasil no qual os consumidores estão mais interessados no consumo "éticos" e bem-estar dos animais valorizando o consumo das galinhas de criação de quintal ou galinhas felizes (BRAY e ANKENY, 2017).

Os resultados aqui disponibilizados constituem os primeiros estudos sobre a influência do estresse térmico no estresse retículo endoplasmático em tecidos de frangos de grupos genéticos distintos. Os resultados indicam diferentes sensibilidades dos tecidos e dos grupos genéticos na resposta ao estresse térmico. Como cada órgão apresenta funções diferentes, os mesmos regulam a expressão dos genes de maneira específica.

Esses resultados podem ser utilizados como base para explorar os mecanismos de respostas ao estresse térmico em frangos de diferentes grupos genético. Além disso, novos estudos seriam interessantes visando compreender os mecanismos que regulam a expressão desses genes, a fim de explicar como a variabilidade de determinado grupo

genético e a intensidade e/ou extensão do estresse térmico pode propiciar respostas tão variáveis, efeitos e consequências tão distintas e, com isso, contornar problemas e prejuízos na avicultura.

5. CONCLUSÃO

Os níveis de expressão de genes relacionados ao estresse térmico o estresse do retículo endoplasmático (*GRP78*; *EI2Fα*; *IRE1* e *ATF6*) apresentaram variações de expressão entre os tecidos, entre os grupos genéticos e, o gene o *GRP78*, entre as condições ambientais em que foram analisadas. É possível apontar que a linhagem Peloco é mais adaptado à alta temperatura, do que a linhagem comercial Cobb 500® em virtude de que o estresse térmico não ativou vias de UPR nesse grupo genético, além do mais Peloco apresentou maior atividade dos genes já na temperatura de conforto térmico, especialmente no tecido renal do que linhagem comercial. Esses resultados demonstram que a linhagem localmente adaptado Peloco possui alelos importantes para a termotolerância em aves e ressaltam a necessidade estratégia que visem seu uso sustentável e sua conservação.

6. REFERÊNCIAS

ADAMS, C. J.; et al. Structure and Molecular Mechanism of ER Stress Signaling by the Unfolded Protein Response Signal Activator *IRE1*. **Frontiers in Molecular Biosciences** . 6:11. doi: 10.3389/fmolb.2019.00011. 2019.

ALMEIDA E. C. J.; et al. Incubabilidade e Coloração da Casca dos Ovos de Reprodutoras Peloco (*Gallus gallus domesticus*). **Actas Iberoamericanas de Conservación Animal** 2, 99 99-102. 2012.

AL-ZGHOUL, M. B., EL-BAHR, S.M. Basal and dynamics mRNA expression of muscular HSP108, HSP90, HSF-1 and HSF-2 in thermally manipulated broilers during embryogenesis. **BMC Veterinary Research**. 15(1):83. doi:10.1186/s12917-019-1827-7 2019.

AMIN-WETZEL, N.; et al. A J-Protein co-chaperone recruits BiP to monomerize *IRE1* and repress the unfolded protein response. **Cell** 171, 1625–1637.e1613. doi: 10.1016/j.cell.2017.10.040. 2017.

BASAR, M.; et al. Unfolded protein response prevents blastocyst formation during preimplantation embryo development in vitro. **Fertility and sterility**. 102:1777-1784. 2014.

BARBOSA, F. J. V.; et al. Sistema alternativo de criação de galinhas caipiras resina. Embrapa Meio-Norte, 2007.

BRAAKMAN, I.; HEBERT D. N. “Protein folding in the endoplasmic reticulum”, in Ferro-Novick, S, R. Schekman, and T. Rapoport (ed.), **Endoplasmic Reticulum Monograph**, Cold Spring Harbor Laboratory Press. May 1;5(5):a013201. 2013.

BERTOLOTTI, A.; et al. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. **Nature Cell Biology** 2, 326-332. 2000.

BORGES S.; MAIORKA, A. A.; SILVA A. V. Heat stress physiology and eletrolites for broilers. **Ciência Rural**, v.33, n.5, p.975-981. 2003.

BRAVO, R.; et al. Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration. **International Review of Cell and Molecular Biology**. v. 301, p. 215-290, 2013.

BRAY, H. J.; ANKENY, R. A. Happy Chickens Lay Tastier Eggs: Motivations for Buying Free-range Eggs in Australia. **Anthrozoös**, 30 (2), 213–226. doi:10.1080/08927936.2017.1310986. 2017.

BROSSI, C.; et al. M. Estresse térmico durante o pré-abate em frangos de corte. **Ciência Rural**. v.39, n.4, p.1296-1305. 2009.

CARVALHO, D. A. **Caracterização Fenotípica E Genotípica De Galinhas Nativas Canelas-Preta**. Tese. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Diamantina/MG. 2016.

CLIMATE-DATA. **Clima Itapetinga**. 2020. Disponível em <https://pt.climate-data.org/america-do-sul/brasil/bahia/itapetinga-1071/> Acesso em: 11/01/2020.

CEDRAZ, H. et al., Heat stress induces expression of HSP genes in genetically divergent chickens. **Plos One** v.12 n.10, 2017.

DUANGJINDA, M.; et al . Hsp70 Genotypes and Heat Tolerance of Commercial and Native Chickens Reared in Hot and Humid Conditions. **Brazilian Journal of Poultry Science**. 19, n. 1, p. 7-18, 2017.

FLORIANO L. S. Anatomia e Fisiologia das aves domésticas. **Avicultura**. URUTAÍ. 2018.

FU, S.; WATKINS, S. M.; HOTAMISLIGIL, G. S. The role of endoplasmic reticulum in hepatic lipid homeostasis and stress signaling. **Cell Metabolism**. 15:623-634. 2012.

GAW, A.; et al. **Bioquímica clínica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

GONZALES, E.; SARTORI, J. R. Crescimento e metabolismo muscular. In: MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. 2002. p. 279-297.

GUO, J.; et al. Copper Induces Apoptosis Through Endoplasmic Reticulum Stress in Skeletal Muscle of Broilers. **Biological Trace Element Research**. <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02076-0>. 2020.

GUO, H. et al. Nickel chloride (NiCl₂) induces endoplasmic reticulum (ER) stress by activating UPR pathways in the kidney of broiler chickens. **Oncotarget**. 7:17508–19. 2016.

HETZ, C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. 13:89–102. 2012.

HOTAMISLIGIL, G. S. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. **Cell**. 140:900–917. 2010.

Ji, C.; et al. Liver-specific loss of glucose-regulated protein 78 perturbs the unfolded protein response and exacerbates a spectrum of liver diseases in mice. **Hepatology**.;54(1):229–239. doi:10.1002/hep.24368, 2011.

KIMATA, Y.; et al. Genetic evidence for a role of BiP/Kar2 that regulates *IRE1* in response to accumulation of unfolded proteins. **Molecular Biology of the Cell**. 14, 2559–2569. doi: 10.1091/mbc.e02-11-0708. 2003.

KONG, L. N.; et al., Association analysis between SNPs in the 5'-flanking region of the chicken *GRP78* gene, thermotolerance parameters, and tissue mRNA expression.; **Genetics and Molecular Research** 14 (2): 6110-6123 2015.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$. **Methods**. 25(4), 402–408, doi:10.1006/meth.2001.1262. 2001.

MAA, Y; HENDERSHOT, L.M. ER chaperone functions during normal and stress conditions. **Nournal of Chemical Neuroanatomy**. 28(1-2):51–65. doi:10.1016/j.jchemneu.2003.08.007. 2004.

MACARI, M.; LUQUETTI, B.C. Fisiologia cardiovascular. In: MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E. (Eds.) **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. 2.ed.Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista,. p.17-36. 2002

MCCORMACK, J. G.; HALESTRAP, A.P. Denton RM. Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. **Physiological Reviews**. 70: 391–425.1990.

MINAFRA, C.; et al. Eletrolítico And Protein Diet Balance On Aminotransferases On Liver, Kidney And Serum And Seric Magnesium And Cholride Levels In Broilers. **Ciência Animal Brasileira**. 10. 10.5216/cab.v10i2.1267. 2009.

MORI, K. Signaling Pathways in the Unfolded Protein Response: Development from Yeast to Mammals. **Journal of Biochemistry**, 146(6), 743–750. doi:10.1093/jb/mvp166. 2009.

OIKAWA, D.; et al. Activation of mammalian *IRE1 α* upon ER stress depends on dissociation of BiP rather thanon direct interaction with unfolded proteins. **Experimental Cell Research**. 315, 2496–504. doi: 10.1016/j.yexcr.2009.06.009. 2009.

OLIVEIRA C. G.; et al. Marcadores Microsatélites Para a Linhagem Brasileira de Galinha Caipira Peloco. **Actas Iberoamericanas de Conservación Animal**. 4, 120-122. 2014.

OLIVEIRA, G. S.; et al. Protótipo para o Estudo do Comportamento e da Zona de Conforto Térmico de Frangos de Corte. **Revista Eixo**. 8, 1, 2019.

R CORE TEAM . **R: A language and environment for statistical computing**. R. Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>. 2020.

REID, D.; NICCHITTA, C. Diversity and selectivity in mRNA translation on the endoplasmic reticulum. **Nature reviews. Neuroscience**. 16. 10.1038/nrm3958. 2015.

RENAUDEAU, D. et al. Adaptation to hot climate and strategies to alleviate heat stress in livestock production Animal. **The Animal Consortium**, 6:5, pp 707–728, 2011.

ROSTAGNO, H. S.; GOMES, P. C. **Composição de Alimentos e Exigências Nutricionais**. 3 a Edição, 2011.

SANTOS, R. A. C. Biologia molecular: o movimento de contração muscular e a importância do cálcio. **Jornal Biosferas**. 2020. Disponível em: <http://www.rc.unesp.br/biosferas/Art0085.html>; acesso em: 25/03/2020

SANTOS VAZ, A. B.; et al. Broiler Meat Quality Evaluation Created in Simulated Conditions of Heat. **Journal of Food Processing & Technology**. 7: 634. doi: 10.4172/2157-7110.1000634. 2016.

SCHEUNER, D.; et al. Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. **Molecular Cell**. 7:1165–76, 2001.

SCHWARZ, D. S.; BLOWER, M. D. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. **Cellular and Molecular Life Sciences**. 73(1):79–94. doi:10.1007/s00018-015-2052-6, 2016.

SHEN, J.; et al. ER stress regulation of *ATF6* localization by dissociation of BiP/*GRP78* binding and unmasking of Golgi localization signals. **Developmental Cell**. 3(1):99–111. doi:10.1016/s1534-5807(02)00203-4. 2002.

SCHRODER, M.; KAUFMAN, R.J. The mammalian unfolded protein response. **Annual Review of Biochemistry**. 74, 739-789. 2005.

SCHRODER, M. Endoplasmic reticulum stress responses. **Cellular and Molecular Life Sciences**. 65(6):862–894. doi:10.1007/s00018-007-7383-5. 2008.

SOBREIRA, R. dos S.; VIOLA, T. H. Criação de galinhas comuns localmente adaptadas. In: MELO, R. F. de; VOLTOLINI, T. V. (Ed.). **Agricultura familiar dependente de chuva no Semiárido**. Brasília, DF, Embrapa, cap. 9, 303-332. Biblioteca(s): Embrapa Semiárido. 2019.

SOLEIMANI, A. F.; et al. Physiological responses of 3 chicken breeds to acute heat stress. **Poultry Science**. 90(7), 1435–1440. doi:10.3382/ps.2011-01381. 2011.

TIRASOPHON, W.; WELIHINDA, A. A.; KAUFMAN, R. J. A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (*IRE1p*) in mammalian cells. **Genes & Development**.12:1812–1824. 1998.

WALTER, P.; RON, D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. **Science**. 334:1081–1086. 2011.

WANG, J.; et al. Effects of duration of thermal stress on growth performance, serum oxidative stress indices, the expression and localization of ABCG2 and mitochondria ROS production of skeletal muscle, small intestine and immune organs in broilers. **Journal of Thermal Biology**; 85:102420. doi:10.1016/j.jtherbio.2019.102420. 2019.

WANG, S. H.; et al. Acute Heat Stress Changes Protein Expression in the Testes of a Broiler-Type Strain of Taiwan Country Chickens. **Animal Biotechnology**, 1–17.doi:10.1080/10495398.2018.1446972. 2018.

WEATHER SPARK. **Condições meteorológicas médias de Itapetinga**. 2020. Disponível em: <https://pt.weatherspark.com/y/30886/Clima-caracter%C3%ADstico-em-Itapetinga-Brasil-durante-o-ano>. Acesso em: 22/03/2020.

ZHANG, W.; et al. Alteration of *HSF3* and *HSP70* mRNA expression in the tissues of two chicken breeds during acute heat stress. **Genetics and Molecular Research**, 13, 9787–9794, 2014.

ZHANG, X. H.; et al. The association of Hsp90 expression induced by aspirin with anti-stress damage in chicken myocardial cells. **Journal of Veterinary Science**.17(1):35–44. doi:10.4142/jvs.2016.17.1.35. 2016.

ZHEN, F. S.; et al. Tissue and allele specific expression of hsp 70 gene in chicken basal and heat stress-induced mRNA level quantified with real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. *British Poultry Science*. 47: 449-455. 2006.

ZHU, G.; LEE A. S. "Role of the unfolded protein response, *GRP78* and *GRP94* in organ homeostasis." *Journal of cellular physiology* vol. 230, 7 1413-20. doi:10.1002/jcp.24923. 2015.

8. CAPÍTULO IV

PERFIL GÊNICO DA CASPASE 6 APÓS ESTRESSE TÉRMICO AGUDO EM TRÊS GRUPOS DE FRANGOS GENETICAMENTE DIVERGENTES

Artigo submetido, Brazilian Journal Of Food Technology ISSN - 1981 - 6723

PERFIL GÊNICO DA CASPASE 6 APÓS ESTRESSE TÉRMICO AGUDO EM TRÊS GRUPOS DE FRANGOS GENETICAMENTE DIVERGENTES

Josivanda Santos Almeida^{1*}; Haniel Cedraz de Oliveira²; Juliana Gracielle Gonzaga Gromboni¹; Carolina Maria de Almeida Barbosa¹; Pedro Alexandre Gomes Leite¹; Antonio Amandio Pinto Garcia Junior³; Ronaldo Vasconcelos Farias Filho³; Paulo Luiz Souza Carneiro³; Amauri Arias Wenceslau¹

¹ **Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC, Ilhéus, Bahia, Brasil,**

² **Departamento de Ciência Animal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa 36570-900, Brasil,**

³ **Departamento de Tecnologia Rural e Animal - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Campus Itapetinga - UESB, Itapetinga, Bahia, Brasil,**

***Autor Correspondente: Josivanda Santos Almeida, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC, Ilhéus, Bahia, Brasil, e-mail: josivanda@yahoo.com.br**

PERFIL GÊNICO DA CASPASE 6 APÓS ESTRESSE TÉRMICO AGUDO EM TRÊS GRUPOS DE FRANGOS GENETICAMENTE DIVERGENTES

RESUMO

O frango de corte da linhagem Cobb 500® passou por seleção genética para melhorar sua produtividade, diminuindo assim sua capacidade de adaptação deixando-o susceptível ao estresse térmico especialmente em países tropicais. Por outro lado, galinha de criação caipira, como os ecótipos Peloco e Caneluda, surgiram a partir de cruzamentos naturais, são geralmente criadas no sistema de avicultura familiar com pouco controle zootécnico e estão localmente adaptadas, fato que as tornaram mais rústicas e mais tolerantes às oscilações de temperatura. A nível molecular as aves, quando são expostas ao estresse térmico, ativam uma resposta rápida e transitória a níveis de transcrição e tradução a fim de retornar sua homeostase. Se as perturbações ambientais forem severas e as condições não poderem ser aliviadas pelos mecanismos de defesas, é ativada uma via apoptótica de morte celular que envolve a atuação de proteínas conhecidas como caspases. Diante disso, objetivamos avaliar e comparar os níveis de expressão do gene *CASPASE6* envolvida no processo apoptótico em fragmentos de rim de 36 aves provenientes de três grupos genéticos diferentes (ecótipos naturalizados Peloco e Caneluda e, linhagem comercial Cobb 500®), sendo 12 aves para cada grupo, das quais metade de cada grupo foi mantida em conforto térmico e a outra metade foi submetida ao estresse por calor agudo 39,5°C. Nossos resultados não evidenciaram diferenças significativas na expressão do mRNA de *CASPASE6* após o estresse térmico agudo. Adicionalmente, também não foi possível observar divergências entre os grupos genéticos de frango aqui analisados.

Palavras - chave: RT-qPCR, expressão gênica, homeostase; aves naturalizadas, Cobb 500®, apoptose.

GENICAL PROFILE OF CASPASE 6 AFTER ACUTE THERMAL STRESS IN THREE GROUPS OF GENETICALLY DIVERGENT CHICKENS

ABSTRACT

The Cobb 500® broiler has undergone genetic selection to improve its productivity, thus reducing its ability to adapt leaving it susceptible to thermal stress especially in tropical countries. On the other hand, free-range chicken, such as the Peloco and Caneluda ecotypes, emerged from natural crossbreeding, are generally raised in the family poultry system with little zootechnical control and are locally adapted, a fact that made them more rustic and more tolerant to temperature fluctuations. At the molecular level, birds, when exposed to thermal stress, activate a rapid and transient response to levels of transcription and translation in order to return their homeostasis. If the environmental disturbances are severe and the conditions cannot be alleviated by the defense mechanisms, an apoptotic pathway of cell death is activated that involves the action of proteins known as caspases. Therefore, we aim to evaluate and compare the expression levels of the *CASPASE6* gene involved in the apoptotic process in kidney fragments from 36 birds from three different genetic groups (naturalized ecotypes Peloco and Caneluda and, commercial line Cobb 500®), being 12 birds for each group, of which half of each group was kept in thermal comfort and the other half was subjected to acute heat stress at 39.5°C. Our results did not show significant differences in the expression of *CASPASE6* mRNA after acute thermal stress. Additionally, it was also not possible to observe divergences between the chicken genetic groups analyzed here.

Keywords: RT-qPCR, gene expression, homeostasis; naturalized birds, Cobb 500®, apoptosis.

I. INTRODUÇÃO

O estresse térmico causa grande prejuízo na avicultura comercial, elevando os custos da produção, bem como pode afetar o bem-estar e a saúde dos animais causando danos celulares em vários órgãos, e também levar à morte. De maneira geral, o aumento da demanda por carne de frango levou esses animais a passarem por seleção genética que promoveu em melhorias na produtividade, mas os deixou suscetíveis a condições de estresse térmico (Soleimani et al., 2011; Abreu et al., 2019).

Por outro lado, as aves naturalizadas apresentam características importantes como rusticidade e adaptabilidade às oscilações climáticas das regiões tropicais. Essas aves evoluíram a partir do processo de seleção natural, são criadas em sistema avicultura familiar e são capazes de tolerar mais o estresse térmico (Egito et al., 2002; Mariante et al., 2011).

No Estado da Bahia há a criação de alguns grupos de galinhas naturalizadas, dentre quais podemos citar os ecótipos Peloco e Caneluda. As aves do ecótipo Peloco se caracterizam por possuir um padrão de empenamento tardio. Suas populações encontram-se em número bastante reduzido e não se tem muitas informações sobre seu potencial para a produção de carne e ovos. Já o ecótipo Caneluda, apesar de ser uma ave naturalizada, caracteriza-se com aves robustas, pernaltas, com excelente conformação corporal e índices produtivos relativamente melhores que Peloco (Almeida, 2013).

As aves possuem a capacidade de lidar com as variações ambientais, ativando seus mecanismos de defesa e restaurando a homeotermia. Em nível molecular, os organismos podem alterar sua atividade gênica, direcionando a síntese de proteínas específicas nas células (Regitano & Coutinho, 2001; Joly et al., 2010; Sun et al., 2015).

Outro mecanismo que visa reestabelecer a homeostase após estresse térmico, é a morte celular programada - apoptose (Gorman et al., 1996). Quando as células sofrem estresse irreversível, ocorre eliminação das células danificadas por apoptose. Nesse sentido, as caspases são proteases que desempenham um papel fundamental na morte celular programada (apoptose), sendo assim muito importantes para manter a homeostase (McIlwain et al., 2013).

Há diferentes tipos de caspases: as apoptóticas (caspases-2, -3, -6, -7, -8, -9 e -10) e as inflamatórias (caspases -1, -4, -5, -11, -12 e -13). Por sua vez, as apoptóticas

são classificadas em dois grupos: caspases iniciadoras (-2, -8, -9 e -10) e caspases executoras (-3, -6 e -7) (LAVRIK et al., 2005; FERNÁNDEZ e LAMKANFI, 2015).

Normalmente, as caspases estão no seu estado inativo e necessitam de uma modificação bioquímica para se tornarem ativas e desempenhar as suas funções durante a apoptose (Macpherson et al., 2019). As caspases iniciadoras ativam caspases executoras que, posteriormente, coordenam suas atividades para demolir as principais proteínas estruturais e ativar outras enzimas (McIlwain et al., 2013). Pela sua importância, é fundamental que se busque compreender a dinâmica e o funcionamento de todas as caspases (Macpherson et al., 2019).

Diante disso, objetivou-se com esse trabalho avaliar e comparar a expressão gênica em fragmentos de rim entre o frango de corte da linhagem comercial Cobb 500® 500® e os ecótipos naturalizados Caneluda e Peloco, submetidos ao estresse térmico agudo, utilizando o gene da *CASPASE6*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Experimento de Estresse térmico

Todo o experimento teve aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/UESB, Protocolo 109/2015.

Para a realização do experimento foram utilizadas 36 aves, entre machos e fêmeas: 12 pintos da linhagem comerciais Cobb 500® (6 controles e 6 estressadas), 12 pintos da raça Peloco (6 controles e 6 estressadas) e 12 pintos da raça Caneluda (6 controles e 6 estressadas).

As aves comerciais foram adquiridas uma semana após o nascimento das aves Peloco no setor de Avicultura da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Campus de Itapetinga, onde foram criadas sob as mesmas condições ambientais entre 02/11/2015 e 02/12/2015. Todas as aves foram criadas em galpão aberto forrado com maravalha (raspas de madeira) e alimentadas seguindo a dieta nutricional de Rostagno & Gomes, (2011). Durante o experimento a temperatura média local foi de 26,5°C.

Metade das aves utilizadas no experimento (seis de cada grupo genético), foram submetidas à uma temperatura média de 39,5°C e com uma umidade relativa de 60%. Inicialmente 06 aves da raça Peloco e 06 da Caneluda foram submetidas ao estresse

térmico por calor em temperatura média de 39,5°C, com umidade relativa de 60%. No segundo momento, 06 aves da linhagem Cobb 500® foram submetidas ao estresse térmico com as mesmas condições de temperatura e umidade.

Durante o período em que as aves estavam submetidas ao calor, elas foram monitoradas, ficando sob observação constante quanto às mudanças de comportamento, para determinar o tempo em que cada grupo genético suportaria a alta temperatura. O estresse térmico foi considerado agudo quando a grande maioria das aves de cada grupo genético (+/- 90%), se mostrou prostradas (deitados com a face abdominal para baixo) e com frequência respiratória acelerada. Assim, os ecótipos Peloco e Caneluda, suportaram o calor por uma hora. E a linhagem comercial prostraram-se ao alcançar 30 minutos sob estresse por calor.

Durante o período de estresse todos os animais tiveram acesso à água e comida à vontade. Após o período de estresse térmico, todas as aves foram abatidas por deslocamento cervical.

Todas as aves controles (06 aves de cada grupo genético) foram abatidas por deslocamento cervical no início do período da manhã (4h, horário local) para garantir temperatura de conforto térmico (23°C).

2.2 Coleta de tecidos, extração, quantificação e transcrição reversa do mRNA

Após o abate, foram coletados fragmentos de rim, armazenados em tubos criogênicos, identificados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. As amostras foram encaminhadas ao laboratório de Genética Veterinária Animal da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) e armazenadas em ultrafreezer -80.

Inicialmente foi realizada a extração do RNA total das amostras selecionadas com Trizol® - Invitrogen. As concentrações dos RNAs verificadas através de espectrofotômetro NanoDrop 2000® e a qualidade desses RNAs foram atestadas através de eletroforese em gel de agarose à 1% corados com brometo de etídio e visualizados em luz ultravioleta.

A transcrição Reversa foi realizada com o kit comercial GoScript™ Reverse Transcription System (Promega Corporation, Madison, EUA). Foram utilizados, 4 µl de RNA obtidos a partir do tecido e padronizados para 500ng, acrescidos de 1 µl de Oligodt, e 15 µl de um mix contendo enzima Transcriptase Reversa, inibidor de

ribonuclease recombinante RNase OUT, RT buffer, dNTP, e água ultrapura, para um volume final de 20 µl. As amostras foram incubadas em termociclador a 50°C por 50 min, 85°C por 5 min, e refrigerado em gelo. O cDNA foi acondicionado em freezer -20°C, para posterior utilização nos experimentos de expressão gênica.

2.3 Expressão gênica

Para a construção da curva padrão, foi utilizado um pool de cDNA, de todos os tratamentos e tecidos, para calcular a eficiência da PCR, através de uma diluição seriada (nas concentrações de 5, 15, 45 e 135ng/µl com três concentrações de *primers*: 200, 400 e 800 mM).

Para a comparação dos Cts, as amostras dos tecidos foram destinadas à amplificação em PCR em tempo real. As condições da reação de qPCR foram definidas com desnaturação inicial a 95°C durante dois minutos e 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos. A temperatura de extensão foi padronizada individualmente para cada par de *primers* durante 60 segundos. Ao final da reação de amplificação foi incluído um passo adicional com elevação gradual de temperatura de 60°C a 95°C para se obter a curva de dissociação. A amplificação de todos os genes foi realizada na plataforma Real Time PCR 7500 Fast (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e os resultados foram obtidos com o programa Sequence Detection Systems (V. 2.0.6) (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) que gerou o parâmetro cycle threshold (Cts). Os valores de Cts das duplicatas foram obtidos diretamente pelo programa acima citado e usados para calcular o Ct médio e o desvio-padrão. A eficiência da amplificação da PCR foi calculada para cada gene de referência usando a fórmula $E = (10^{(-1/\text{coeficiente angular})} - 1) \times 100$ (PFAFFL, 2001). Posteriormente, as curvas de dissociação foram avaliadas quanto à amplificação e à especificidade. Após a análise de eficiência, a temperatura de anelamento e a concentração dos *primers* mais adequada foram empregadas nas reações de RTqPCR.

A expressão do gene relacionado a processos apoptóticos (CASP6) foi feita por quantificação relativa em amostras de rim de diferentes grupos genéticos de frangos em ambientes de conforto e estresse térmico. A reação foi normalizada pelo controle endógeno escolhido, o gene *LDHA*. O *primer* do gene Capese-6 foi desenhado por

nosso grupo de pesquisa. A tabela 01 descreve cada gene bem como, a função de cada um deles.

As condições de reação de PCR em tempo real foram de 1x de Power SYBR Green PCR Master Mix (Promega, Madison, WI, EUA), utilizando *primers* específicos. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador ABI Prism 7500® (AppliedBioSystems), no ensaio ddCt (Relative Quantification) plate. Após a determinação da eficiência média das amplificações, as diferenças nas frequências dos transcritos alvos foram calculadas pela equação: razão de expressão = $[1 + (\text{eficiência média da PCR})]^{Ct \text{ médio do grupo testado} - Ct \text{ médio do grupo referência}}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

Tabela 01: Descrição dos genes alvos e do normalizador e seus *primers* específicos utilizados nas análises de RT-qPCR em rim de frangos submetidos ao conforto térmico e estresse térmico agudo.

Nome do Gene	Seqüência do iniciador (5' - 3')	Função
Caspase 6 (CASP6)	F:CAATTAACCCTCACTAAAGGGT GGACAGCAAACCTACTCACCA R: GGGCATCATATGCGTAGACA	Controle da morte celular programada
Lactato desidrogenase A (LDHA)	F:CTATGTGGCCTGGAAGATCAG R: GCAGCTCAGAGGATGGATG	Catalisa a conversão de L-lactato e NAD em piruvato e NADH na etapa final da glicólise anaeróbica

Posteriormente, a razão de expressão relativa do gene alvo foi normalizada pelo controle endógeno, previamente estabelecido para o rim no presente experimento, o *LDHA*.

As análises comparativas do gene em relação aos grupos genéticos (Cobb 500®, Peloco e Caneluda) ao tratamento ambiente (conforto x estresse) e a interação entre os fatores foram feitas utilizando o software Graph Prism 8.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Eficiência e especificidade dos *primers*

Após o teste de eficiência, estabelecemos como ótima, uma temperatura de anelamento dos *primers* de 60 °C. A concentração de cDNA de 45ng/μl foi considerada

a melhor. E, a concentração do *primer* foi 400mM. A eficiência de amplificação foi de 92% com a inclinação da reta entre -3,52 e valor de $R^2= 0,99$, indicando boa correlação linear

A especificidade do *primers* foi avaliada através da curva de dissociação e também das curvas de fusão as quais mostraram um pico específico, não sendo observados dímeros indicando um desempenho ideal dos iniciadores (Figura 01).

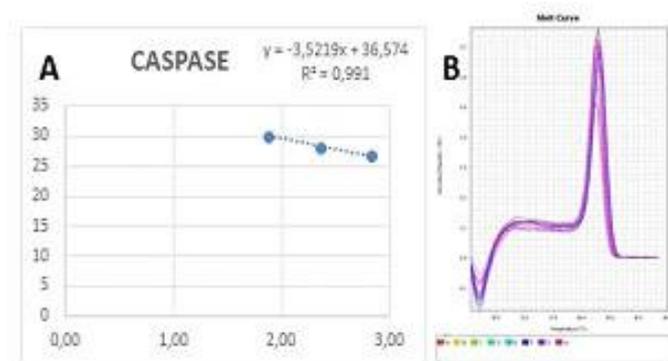


Figura 01. Curvas de regressão e dissociação do teste de eficiência do gene *CASP6* em reações RT-qPCR.

Os valores definidos aqui para eficiência de amplificação estão de acordo com o que proposto pela literatura, encontrando-se dentro de uma faixa de porcentagem precisa e confiável para este tipo de estudo (Livak & Schmittgen, 2001, Zhang et al., 2017).

3.2 Expressão relativa da *CASPASE6*

O gene Caspase 6, relacionado à morte celular programada, não aumentou a sua atividade após estresse térmico agudo para todos os fatores analisados (GG x AMB). Dessa forma, o estresse térmico agudo não foi capaz de induzir aumento na expressão desse gene nas condições desse experimento (figura 2).

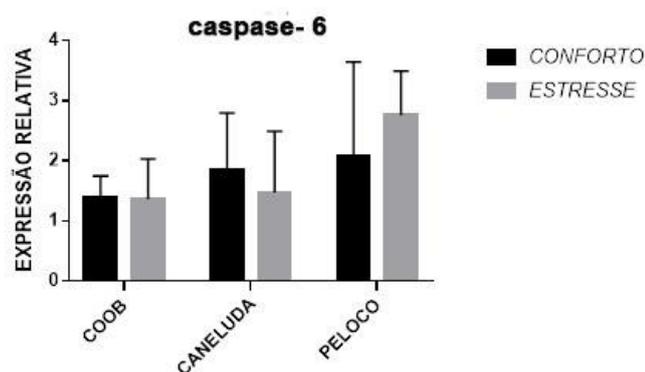


Figura 2. Perfil de expressão do gene *CASPASE6* em fragmentos de rim de frangos de linhagem comercial Cobb 500® e dos ecótipos caneluda e Peloco submetidos ao conforto térmico (23°C) e estresse térmico agudo (39,5°C).

Embora a viabilidade celular seja importante para os organismos vivos a eliminação de células desnecessárias ou danificadas também é fundamental para a manutenção da homeostase nos tecidos, órgãos e em todo o organismo (KIRAZ et al., 2016). Diferentes tipos de estresses celulares, incluindo o estresse por calor agudo podem ativar a apoptose. A protease caspase 6 está diretamente envolvida na casCATA de ativação de caspases responsáveis pela execução da apoptose, embora detalhes estruturais subjacentes à ativação da caspase-6 ainda são limitado (Dagbay & Hardy, 2017).

Os estudos de Habashy et al., (2018) corroboram com nossos resultados, os quais observaram que os níveis de mRNA *CASP6* além de não aumentarem, foram regulados negativamente após 1 dia de estresse térmico. Entretanto, os autores verificaram que esse gene aumentou a expressão após 12 dias de estresse térmico. Outra investigação conduzida por Zhang et al., (2017), em que avaliaram a influência do estresse térmico na viabilidade celular e apoptose das células do tecido cardíaco de frangos, evidenciou que, a partir de 1 h de estresse térmico, a viabilidade celular diminuiu, enquanto a taxa de apoptose aumentou. Nesse contexto, está claro que estresse térmico em frangos pode provocar perturbações nas vias metabólicas e isso pode vir a deflagrar a apoptose (PAROLIN e REASON, 2001; RIMOLDI et al., 2015).

De acordo com Monroe et al. (2002), numerosos genes podem estar envolvidos na decisão de uma célula de sofrer apoptose. A caspase 6 é um gene classificado como um efetor apoptótico que está diretamente envolvido na casCATA de ativação de

caspases responsáveis pela execução da morte celular, embora detalhes estruturais subjacentes à ativação da caspase-6 ainda sejam limitados, sabe-se que esse gene possui mecanismos únicos de ativação e regulação que diferem de outras caspases efetoras (WANG et al., 2015; DAGBAY e HARDY, 2017).

Por mais que os nossos dados aqui apresentados não tenham comprovado o aumento dos níveis de expressão da caspase6, este estudo fornece as primeiras análises de regulação transcricional desse gene em rim de frangos da linhagem comercial e dos ecótipos naturalizados Peloco e Caneluda submetidos ao estresse térmico agudo. Estudos futuros podem corroborar com nossos dados, mostrando que esse gene é regulado de maneira semelhante em outros sistemas, ou podem ser divergentes e levantar hipótese novas sobre a regulação da caspase-6 em frangos.

4. CONCLUSÃO

Esse trabalho fornece informações inéditas sobre a regulação transcricional de Caspase-6 em rim de frangos geneticamente divergentes. Adicionalmente, nosso estudo mostrou que o estresse térmico agudo não induziu aumento da expressão do gene *CASPASE6* no rim de frangos da linhagem comercial linhagem Cobb 500® e nem nos ecótipos de galinhas naturalizadas Caneluda e Peloco nas condições desse experimento.

AGÊNCIA DE FOMENTO

Fundação de Amparo a pesquisa da Bahia –FAPESB

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) e à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), pelo acesso à sua estrutura, possibilitando a realização desse trabalho.

5. REFERÊNCIAS

Abreu, L. H. P., Junior, T. Y., Campos, A. T., Lourençoni, D., & Bahuti, M. (2019). Fuzzy Model For Predicting Cloacal Temperature Of Broiler Chickens Under Thermal Stress . Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/1809-4430> *Engenharia Agrícola*, v39n1p18-25.

Almeida, E. C. D. J. (2013.). *Diversidade fenotípica de galinhas nativas da raça Peloco com base em descritores fenotípicos sob análise multivariada*. Dissertação. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Bahia.

Ayanoglu, F. B., Elçin; A., & Elçin Y. M. (2018). Selection of Suitable Reference Genes for Quantitative Real-Time PCR Normalization in Human Stem Cell Research. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1119:151-168. doi: 10.1007/5584_2018_277.

Dagbay, K. B., & Hardy, J. A. (2017). Multiple proteolytic events in caspase-6 self-activation impact conformations of discrete structural regions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(38), E7977–E7986. doi:10.1073/pnas.1704640114

Egito, A.A., Mariante, A.S., & Albuquerque, M.S.M. (2002). Programa brasileiro de conservação de recursos genéticos animais. *Archivos de Zootecnia*, v.51, p.39-52,.

Fernández, D., & Lamkanfi, M. (2015). Inflammatory caspases: key regulators of inflammation and cell death. *Biological Chemistry*, 396: 193-203.

Gorman, A.M., McGowan, A., O'Neill, C., & Cotter, T. (1996). Oxidative stress and apoptosis in neurodegeneration. *Journal of the Neurological Sciences*. 139, 45–52.

Joly, N. L., Wettstein, G, Mignot, G., Ghiringhelli, F., & Garrido C. (2010). Papel Duplo de Proteínas de Choque Térmico como Reguladores de Apoptose e Imunidade Inata. *Journal of Innate Immunity. Innate Immunity*. 2:238–247, DOI: 10.1159/000296508.

Kumar, S., & Colussi, P. A. (1999). Prodomains-adaptors-oligomerization: the pursuit of caspase activation in apoptosis. *Trends in Biochemical Sciences*, 24:1–3.

Lavrik, I., Golks, A., & Krammer P. (2005). Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *The Journal of Clinical Investigation*, 115: 2665-2672.

Lincz, L. F. (1998). Deciphering the apoptotic pathway: all roads lead to death. *Immunology & Cell Biology*, 76:1–19.

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$. *Methods*. 25(4), 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262.

Mariante, A. S., Albuquerque, M. S. M., & Ramos, A. F. (2011). Criopreservação de recursos genéticos animais brasileiros. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 35, n. 2, p. 64 – 68.

McIlwain, D. R., Berger, T., & Mak, T. W. (2013). Caspase functions in cell death and disease [published correction appears in Cold Spring Harb Perspect Biol. 2015 Apr;7(4). doi: 10.1101/cshperspect.a026716]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(4):a008656. doi:10.1101/cshperspect.a008656

MacPherson, D. J., Mills, C. L., Ondrechen, J. M., & Hardy, J. A. (2019). Tri-arginine exosite patch of caspase-6 recruits substrates for hydrolysis First. *The Journal of Biological Chemistry*, 294, 71-88. doi: 10.1074/jbc.RA118.005914.

Monroe, D. G., Berger, R.R., & Sanders, M. M. (2002). Tissue-Protective Effects of Estrogen Involve Regulation of Caspase Gene Expression. *Molecular Endocrinology*, Volume 16, Issue 6, 1 June, Pages 1322–1331, <https://doi.org/10.1210/mend.16.6.0855>

Nicholson, D. W., & Thornberry, N. A. (1997) Caspases: killer proteases. *Trends in Biochemical Sciences*, 22:299–306.

Nunez, G., Benedict, M. A., Hu, Y., & Inohara, N. (1998). Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* 17:3237–3245.

Paolacci, A. R., Tanzarella, O. A., Porceddu, E., & Ciaff, M. (2009). Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. *BMC Molecular Biology*, 10:11.

Parolin, M. B., & Reason, I. J. M. (2001). Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. *Arquivos de Gastroenterologia*. vol.38, n.2 pp.138-144. ISSN 0004-2803. <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-28032001000200011>.

Regitano, L. C. A. & Coutinho, L. L. (2001). *Biologia molecular aplicada à produção animal*. Brasília: *Embrapa Informação Tecnológica*., 215 p.

ROSTAGNO, H. S.. & GOMES, P. C. (2011). *Composição de Alimentos e Exigências Nutricionais*. 3 a Edição.

Soleimani, A. F., Zulkifli, I., Omar, A. R., & Raha, A. R. (2011). Physiological responses of 3 chicken breeds to acute heat stress. *Poultry Science*. 90(7), 1435–1440. doi:10.3382/ps.2011-01381.

Sun, L., Lamont, S. J., Cooksey, A. M., McCarthy, F., Tudor, C. O., Vijay-Shanker, K., & Schmidt, C. J. (2015). Transcriptome response to heat stress in a chicken hepatocellular carcinoma cell line. *Cell stress & chaperones*, 20(6), 939–950. doi:10.1007/s12192-015-0621-0.

Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A., & Heinen, E: (1999). Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of Biotechnology*, 75: 291-295. 10.1016/S0168-1656(99)00163-7.

Weather Spark. **Condições meteorológicas médias de Itapetinga**. 2020. Disponível em: <https://pt.weatherspark.com/y/30886/Clima-caracter%C3%ADstico-em-Itapetinga-Brasil-durante-o-ano>. Acesso em: 22/03/2020.

Wong, M. L., & Medrano, J. F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39 pp. 75-85.

Zhang, X. H., Wu, H., Tang, S., Li, Q. N., Xu, J., Zhang, M., Su, Y. N., Yin, B., Zhao, Q. L., Kemper, N., Hartung, J., & Bao, E. D. (2017). Apoptosis in response to heat stress is positively associated with heat-shock protein 90 expression in chicken myocardial cells in vitro. *Journal of Veterinary Science*, 18(2):129-140. <https://doi.org/10.4142/jvs.2017.18.2.129>.

10. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo revelou que a expressão de diferentes genes relacionados ao estresse térmico pode variar de acordo com o tecido e com o grupo genético em que é analisado. O estresse térmico agudo de 39°C não foi capaz de aumentar a atividade da maioria dos genes analisados. O único gene a aumentar os níveis de expressão foi o *GRP78*, em coração e rim de Cobb 500® e Peloco após o estresse térmico.

Os grupos genéticos evidenciaram perfis diferentes de expressão dos genes, assim os genes *HSP70* e *HSP90*, diretamente responsáveis pela resposta ao estresse térmico, apresentaram expressão maior na linhagem comercial que nas galinhas caipiras. Enquanto *HSF1*, *HSF3*, *CAT*, *SOD1*, *GPx7* e *CASP6* apresentaram o inverso: menores níveis de expressão na linhagem comercial e maior atividade nas aves Peloco, exceto para a *CASP6*, onde o ecótipo Caneluda mostrou expressão um pouco maior que os outros grupos.

O ecótipo Caneluda, geralmente apresentou níveis intermediários, sempre entre Cobb500® e Peloco, exceto para o gene *CASP6*.

Em relação estresse do Retículo endoplasmático, diferenças de expressão entre os tecidos também ficaram evidente. Dos quatro tecidos analisados em dois deles foi possível notar diferenças significativas entre os grupos genéticos, onde os genes *EI2FA* e *GRP78* no fígado expressaram níveis maiores na linhagem comercial do que no ecótipo Peloco e, no rim, em *ATF6*, *EI2FA* e *IRE1*, a galinha caipira expressou maiores níveis que a Cobb. Além disso, o *GRP78* aumentou sua atividade em coração e rim de Cobb500® e Peloco após o estresse térmico.

Esses resultados sugerem que as aves comerciais foram mais afetadas pelo estresse térmico agudo e ressaltam que as galinhas de criação caipira Caneluda em menor grau e Peloco em maior grau são mais tolerantes ao estresse térmico.

Pela sua forma de criação e sua constituição genética essas galinhas locais, especialmente o ecótipo Peloco são fontes importantes recursos genéticos necessários para a segurança alimentar que podem ser facilmente criadas em regiões de clima quente e representa uma alternativa ao aquecimento global tão preocupante para mercado avicultor. Além disso, o consumidor tem preferido adquirir produtos provenientes de criação mais "ética" que valorize o bem-estar das aves. Dada a asua

importância, é necessário desenvolver estratégias que visem a conservação e o uso sustentável das aves caipiara da Bahia.

Os resultados aqui apresentados fornecem dados inéditos sobre os ecótipos naturalizados Peloco e Caneluda do estado da Bahia/Brasil e reforça-se a necessidade de investigação molecular mais detalhada que contribua para traçar perfis gênicos desses frangos e conhecer seus potenciais na produção avícola, bem como conservar determinadas características que colaboram com o baixo custo de criação para o pequeno produtor na agricultura familiar.