

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

Juliana Gracielle Gonzaga Gromboni

**PERFIL GÊNICO DE MEDIADORES DE ESTRESSE TÉRMICO E OXIDATIVO DO
ECOTIPO PELOCO E FRANGO DE LINHAGEM COMERCIAL**

**Ilhéus - BA
2019**

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

**PERFIL GÊNICO DE MEDIADORES DE ESTRESSE TÉRMICO E OXIDATIVO DO
ECOTIPO PELOCO E FRANGO DE LINHAGEM COMERCIAL**

Juliana Gracielle Gonzaga Gromboni

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

Orientador: Dr. Amauri Arias Wenceslau

**Ilhéus - BA
2019**

G876 Gromboni, Juliana Gracielle Gonzaga.
Perfil gênico de mediadores de estresse térmico e oxidativo do ecotipo peloco e frango de linhagem / Juliana Gracielle Gonzaga Gromboni. – Ilhêus : UESC, 2019.
101f. : il.
Orientador : Amauri Arias Wenceslau.
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Santa Cruz.
Programa de Pós-graduação em Ciência Animal.

Inclui referências.

1. Frango de corte – Criação. 2. Avicultura – Brasil. 3. Agricultura familiar – Brasil. 4. Peloco (Ave) – Criação – Bahia. 5. Proteína de choque térmico. I.Wenceslau, Amauri Arias. II.Título.

CDD – 636.513

Juliana Gracielle Gonzaga Gromboni

PERFIL GÊNICO DE MEDIADORES DE ESTRESSE TÉRMICO E OXIDATIVO DO ECOTIPO PELOCO E FRANGO DE LINHAGEM COMERCIAL

Prof. Dr. Amauri Arias Wenceslau – DSc UESC/DCAA (Orientador)

Prof. Dra. Amanda Ferreira da Silva Mendes – DSc IFBA

Prof. Dr. Antonio Amandio Pinto Garca Júnior – DSc UESB

Prof. Dra. Bianca Mendes Maciel – DSc UESC/DCB

Prof Dr. Juneo Freitas Silva – DSc UESC/ DCB

**Aos meus pais, Luiz
Henrique e Maria Cícera, meus
exemplos de vida e meus heróis, aos
meus irmãos Luíz Fabiano e Tiago
Augusto e ao meu esposo Caio
Gromboni, meu tudo.**

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a Deus pela oportunidade, pela força e por tudo.

Ao Prof. Dr. Amauri Arias Wenceslau, pela orientação, por me acolher, pelo conhecimento, paciência, apoio e amizade. A Prof. Dr. Camila Meneghetti, ao Prof. Dr. Antônio Amandio Pinto Garcia Junior e ao Prof. Ronaldo Vasconcelos Farias Filho pela colaboração. À UESC e à UESB, pela oportunidade de usufruir suas dependências e infraestrutura.

Aos Professores do Hospital Veterinário da UESC.

Aos meus pais, ao meu esposo Caio Fernando Gromboni (meu tudo), meus irmãos e a minha família incluindo tios, tias, primos, primas, pela torcida, incentivo, amor, e por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos da minha vida e serem o alicerce da minha estrutura.

Aos amigos da vida acadêmica Daniele Rocha (pela ajuda no laboratório e as risadas de sempre, Haniel Cedraz (pelas suas minuciosas correções), e todos os demais integrantes do Hospital Veterinário pelas discussões, sugestões e colaboração, o meu mais sincero agradecimento por tudo que vivi com vocês.

Aos funcionários do Hospital Veterinário da UESC pelo auxílio técnico.

Aos grandes amigos de Jaú, Mineiros do Tietê e Ilhéus que sempre me receberam de braços abertos, com muita cerveja e vários churrascos, em especial Cleber Passos, Camila Sandoval, Fabiano Gonzaga, Cleide Gonzaga, Tiago Gonzaga, Adriele Pastori, Silas Souza, Bruna Sandoval, Lucas Sandoval e a minha sogra Regina Eguea e meu sogro Fernando Gromboni por disponibilizarem o espaço para a maioria das confraternizações.

Aos amigos feitos no Hospital Veterinário da UESC durante o período de realização deste trabalho.

A Fapesb, pela bolsa de Doutorado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Santa Cruz- UESC, pela oportunidade e especialmente ao secretário da pós, Eduardo Góes Viana.

A todos os quais eu cometi a injustiça de não listar acima ficam meus sinceros agradecimentos.

Muito obrigada!

“A persistência é o menor caminho do êxito.”

Charles Chaplin

PERFIL GÊNICO DE MEDIADORES DE ESTRESSE TÉRMICO E OXIDATIVO ENTRE ECOTIPOS PELOCO E FRANGOS DE LINHAGEM COMERCIAL

RESUMO

A agricultura familiar possui grande importância para o desenvolvimento regional, sendo a base de subsistência de muitas famílias. Em algumas regiões no interior da Bahia, existe um ecotipo de frango que foi introduzido no Brasil, denominada Peloco, que se caracteriza pela resistência à alta temperatura, adaptabilidade e rusticidade. Esta ave encontra-se em número reduzido, havendo a necessidade de pesquisas para a conservação dessas características e de seu material genético. Existem genes que estão relacionados à resistência ao estresse por calor e genes relacionados ao estresse oxidativo que podem ser expressos em diferentes fases do desenvolvimento e tecidos do animal. A técnica de RT-qPCR verifica a expressão dos genes ligados ao estresse térmico e oxidativo, porém antes é necessário realizar a padronização e escolha de um gene de referência para normalização dos genes alvos. Contudo, objetivou-se com esse trabalho identificar genes de referência estáveis para a normalização de genes alvos no tecido coração e fígado de ecotipos Peloco e frangos de linhagem comercial Cobb 500[®], submetidos ao conforto térmico e estresse térmico agudo, bem como, avaliar e comparar os efeitos do calor elevado sobre os níveis de expressão de genes relacionados ao estresse térmico e oxidativo nesses tecidos nos dois grupos genéticos de frangos. Vinte e quatro aves (12 Peloco e 12 Cobb 500[®]) foram submetidas ao ambiente de conforto térmico (23°C) e de estresse térmico agudo (39,5°C, por 1 hora). Posteriormente, as aves foram abatidas e fragmentos de fígado e coração foram coletados para estudo de expressão gênica. Três algoritmos estatísticos foram utilizados para avaliar a estabilidade da expressão dos genes de referência no grupo de amostras (BestKeeper, GeNorm e NormFinder). Após as análises, o gene considerado mais estável foi o *RPL5* em ambos tecidos estudados. Nas análises de expressão relativa, os genes *HSP70* e *HSF1* tiveram aumento de expressão significativo no fígado dos frangos submetidos ao estresse térmico agudo. O *HSP90* apresentou aumento de expressão significativo tanto no fígado quanto no coração dos animais submetidos ao estresse por calor ($p < 0,05$). O gene *CAT* revelou aumento de expressão significativo no fígado dos animais Cobb 500[®] submetidos à alta temperatura, já o *SOD* foi mais expresso apenas no coração da Peloco. O *GPX* apresentou aumento de expressão

significativa nos dois tecidos nos animais Peloco submetidos ao estresse térmico agudo. O estresse térmico agudo aumenta a expressão de genes relacionados ao estresse térmico e oxidativo tanto no ecotipo Peloco quanto em frangos de linhagem comercial. Contudo, em ambiente de calor elevado os genes relacionados ao estresse térmico e oxidativo revelaram aumento de expressão no ecotipo Peloco quando comparado aos frangos de linhagem comercial, conferindo maior resistência ao calor elevado.

Palavras - chave: RT-qPCR, Genes de referência, HSPs, HSFs, Enzimas antioxidantes.

GENE PROFILE OF MEDIATORS OF THERMAL AND OXIDATIVE STRESS BETWEEN ECOCHESTS PELOCO AND BRANCHES OF COMMERCIAL LINEAGE

ABSTRACT

Family farming has great importance for regional development, being the base of subsistence for many families. In some regions in the interior of Bahia, there is an ecotype of chicken that was introduced in Brazil, called Peloco, which is characterized by high temperature resistance, adaptability and rusticity. This bird is in small numbers, and there is a need for research for the conservation of these characteristics and their genetic material. There are genes that are related to resistance to heat stress and genes related to oxidative stress that can be expressed at different stages of development and tissues of the animal. The RT-qPCR technique verifies the expression of genes linked to thermal and oxidative stress, but it is necessary to standardize and select a reference gene for normalization of target genes. The objective of this work was to identify stable reference genes for the normalization of target genes in the heart and liver tissue of Peloco ecotypes and commercial Cobb 500® broilers subjected to thermal comfort and acute thermal stress, as well as , to evaluate and compare the effects of high heat on the expression levels of genes related to thermal and oxidative stress in these tissues in the two genetic groups of chickens. Twenty-four birds (12 Peloco and 12 Cobb 500®) were submitted to the thermal comfort environment (23 ° C) and acute thermal stress (39.5 ° C, for 1 hour), subsequently fragments of liver and heart to study gene expression. Three statistical algorithms were used to evaluate the expression stability of the reference genes in the sample group (BestKeeper, GeNorm and NormFinder). After the analysis, the gene considered more stable was *RPL5* in both tissues studied. In the relative expression analyzes, the *HSP70* and *HSF1* genes had statistically significant expression increase in the liver tissue of chickens submitted to acute thermal stress. *HSP90* presented a statistically significant increase in expression in the two tissues of the animals submitted to heat stress ($p < 0.05$). The *CAT* gene revealed significant increase in liver expression of Cobb 500® animals subjected to high temperature, since *SOD* was more expressed only in the heart tissue of Peloco and *GPX* showed significant increase of expression in the two tissues in Peloco animals submitted to thermal stress acute. Therefore, it was

possible to conclude that there is variation of gene expression among chickens submitted to acute thermal stress, and that the genes related to thermal and oxidative stress revealed an increase in expression in the Peloco ecotype, conferring greater resistance to high heat.

Key words: RT-qPCR, Reference Genes, HSPs, HSFs, Antioxidant Enzymes.

LISTA DE ABREVIATURAS

- μg : micrograma
- μL : microlitro
- cDNA: DNA complementar
- Ct: cycle treshold
- 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 fosforibosiltransferase1
- *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

- *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*: glutathiona peroxidase
- *SOD*: superóxido dismutase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Frango de corte Cobb 500 [®]	4
Figura 2. Pinto do ecotipo Peloco sem plumagem	6
Figura 3. Box experimental de aquecimento utilizado para a realização do estresse térmico nas aves.....	68
Figura 4. Aquecedores a gás utilizados para o estresse térmico nos animais.....	68
Figura 5. Perfil de expressão do gene <i>HSF1</i> em diferentes tecidos de frangos. (A) Análise comparativa da expressão do gene <i>HSF1</i> em coração de frangos de linhagem comercial Cobb 500 [®] e Peloco submetidos ao conforto térmico (23°C) e estresse térmico agudo (39,5°C). (B) Análise comparativa da expressão do gene <i>HSF1</i> em fígado de frangos de linhagem comercial Cobb 500 [®] e Peloco submetidos ao conforto térmico (23°C) e estresse térmico agudo (39,5°C)	73
Figura 6. Perfil de expressão do gene <i>HSF3</i> em diferentes tecidos de frangos. (A) Análise comparativa da expressão do gene <i>HSF3</i> em coração de frangos de linhagem comercial Cobb 500 [®] e Peloco submetidos ao conforto térmico (23°C) e estresse térmico agudo (39,5°C). (B) Análise comparativa da expressão do gene <i>HSF1</i> em fígado de frangos de linhagem comercial Cobb 500 [®] e Peloco submetidos ao conforto térmico (23°C) e estresse térmico agudo (39,5°C).....	74
Figura 7. Perfil de expressão do gene <i>HSP70</i> em diferentes tecidos de frangos. (A) Análise comparativa da expressão do gene <i>HSP70</i> em coração de frangos de linhagem comercial Cobb 500 [®] e Peloco submetidos ao conforto térmico (23°C) e estresse térmico agudo (39,5°C). (B) Análise comparativa da expressão do gene <i>HSP70</i> em fígado de frangos de linhagem comercial Cobb 500 [®] e Peloco submetidos ao conforto térmico (23°C) e estresse térmico agudo (39,5°C).....	75

Figura 8. Perfil de expressão do gene *HSP90* em diferentes tecidos de frangos. (A) Análise comparativa da expressão do gene *HSP90* em coração de frangos de linhagem comercial Cobb 500[®] e Peloco submetidos ao conforto térmico (23°C) e estresse térmico agudo (39,5°C). (B) Análise comparativa da expressão do gene *HSP90* em fígado de frangos de linhagem comercial Cobb 500[®] e Peloco submetidos ao conforto térmico (23°C) e estresse térmico agudo (39,5°C).....76

Figura 9. Perfil de expressão do gene *CAT* em diferentes tecidos de frangos. (A) Análise comparativa da expressão do gene *CAT* em coração de frangos de linhagem comercial Cobb 500[®] e Peloco submetidos ao conforto térmico (23°C) e estresse térmico agudo (39,5°C). (B) Análise comparativa da expressão do gene *CAT* em fígado de frangos de linhagem comercial Cobb 500[®] e Peloco submetidos ao conforto térmico (23°C) e estresse térmico agudo (39,5°C).77

Figura 10. Perfil de expressão do gene *GPX* em diferentes tecidos de frangos. (A) Análise comparativa da expressão do gene *GPX* em coração de frangos de linhagem comercial Cobb 500[®] e Peloco submetidos ao conforto térmico (23°C) e estresse térmico agudo (39,5°C). (B) Análise comparativa da expressão do gene *GPX* em fígado de frangos de linhagem comercial Cobb 500[®] e Peloco submetidos ao conforto térmico (23°C) e estresse térmico agudo (39,5°C).....78

Figura 11. Perfil de expressão do gene *SOD* em diferentes tecidos de frangos. (A) Análise comparativa da expressão do gene *SOD* em coração de frangos de linhagem comercial Cobb 500[®] e Peloco submetidos ao conforto térmico (23°C) e estresse térmico agudo (39,5°C). (B) Análise comparativa da expressão do gene *SOD* em fígado de frangos de linhagem comercial Cobb 500[®] e Peloco submetidos ao conforto térmico (23°C) e estresse térmico agudo (39,5°C).79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição dos genes de referência de <i>Gallus gallus</i> e seus <i>primers</i> específicos utilizados nas análises de RT-qPCR. Todos os <i>primers</i> foram desenhados por NASCIMENTO et al., (2015).....	42
Tabela 2. Estatística descritiva dos níveis de expressão dos genes de referência obtidos pelo BestKeeper, em coração da linhagem Cobb 500 [®] submetido ao ambiente de conforto (23°C) e estresse térmico agudo (39,5°C).....	45
Tabela 3. Estatística descritiva dos níveis de expressão dos genes de referência obtidos pelo BestKeeper, em coração da Peloco submetido ao ambiente de conforto (23°C) e estresse térmico agudo (39,5°C).	45
Tabela 4. Estatística descritiva dos níveis de expressão dos genes de referência obtidos pelo BestKeeper, em fígado da linhagem Cobb 500 [®] submetido ao ambiente de conforto (23°C) e estresse térmico agudo (39,5°C).....	46
Tabela 5. Estatística descritiva dos níveis de expressão dos genes de referência obtidos pelo BestKeeper, em fígado da Peloco submetido ao ambiente de conforto (23°C) e estresse térmico agudo (39,5°C).	46
Tabela 6. Ranking com os valores de estabilidade de cada fator (raça e ambiente) em coração de frangos, obtidos através da ferramenta BestKeeper.....	47
Tabela 7. Ranking com os valores de estabilidade de cada fator (raça e ambiente) em coração de frangos, obtidos através da ferramenta GeNorm.....	48
Tabela 8. Ranking com os valores de estabilidade de cada fator (raça e ambiente) em coração de frangos, obtidos através da ferramenta NormFinder.	48

Tabela 9. Ranking geral dos genes de referência em coração de frangos, obtidos com as diferentes ferramentas (Bestkeeper, GeNorm e NormFinder) e ranqueado pelo pacote RankAggreg.....	49
Tabela 10. Ranking com os valores de estabilidade de cada fator (raça e ambiente) em fígado de frangos, obtidos através da ferramenta BestKeeper.	49
Tabela 11. Ranking com os valores de estabilidade de cada fator (raça e ambiente) em fígado de frangos, obtidos através da ferramenta GeNorm.....	50
Tabela 12. Ranking com os valores de estabilidade de cada fator (raça e ambiente) em fígado de frangos, obtidos através da ferramenta NormFinder.	51
Tabela 13. Ranking geral dos genes de referência em fígado de frangos, obtidos com as diferentes ferramentas (Bestkeeper, GeNorm e NormFinder) e ranqueado pelo pacote RankAggreg.....	51
Tabela 14. Descrição dos genes alvos e do normalizador e seus <i>primers</i> específicos utilizados nas análises de RT-qPCR em coração e fígado de frangos submetidos ao conforto térmico e estresse térmico agudo.....	70
Tabela 15. Análise estatística de expressão relativa do gene <i>HSF1</i> aplicando-se o teste two-way ANOVA para comparação entre grupos genéticos (ambientes de conforto e estresse térmico e interação entre os fatores) e aplicando-se o teste t não pareado para avaliar os ambientes de conforto e estresse térmico dentro dos grupos genéticos.....	73
Tabela 16. Análise estatística de expressão relativa do gene <i>HSF3</i> aplicando-se o teste two-way ANOVA para comparação entre grupos genéticos (ambientes de conforto e estresse térmico e interação entre os fatores) e aplicando-se o teste t não pareado para avaliar os ambientes de conforto e estresse térmico dentro dos grupos genéticos.....	74

Tabela 17. Análise estatística de expressão relativa do gene *HSP70* aplicando-se o teste two-way ANOVA para comparação entre grupos genéticos (ambientes de conforto e estresse térmico e interação entre os fatores) e aplicando-se o teste t não pareado para avaliar os ambientes de conforto e estresse térmico dentro dos grupos genéticos.....75

Tabela 18. Análise estatística de expressão relativa do gene *HSP90* aplicando-se o teste two-way ANOVA para comparação entre grupos genéticos (ambientes de conforto e estresse térmico e interação entre os fatores) e aplicando-se o teste t não pareado para avaliar os ambientes de conforto e estresse térmico dentro dos grupos genéticos.....76

Tabela 19. Análise estatística de expressão relativa do gene *CAT* aplicando-se o teste two-way ANOVA para comparação entre grupos genéticos (ambientes de conforto e estresse térmico e interação entre os fatores) e aplicando-se o teste t não pareado para avaliar os ambientes de conforto e estresse térmico dentro dos grupos genéticos.....77

Tabela 20. Análise estatística de expressão relativa do gene *GPX* aplicando-se o teste two-way ANOVA para comparação entre grupos genéticos (ambientes de conforto e estresse térmico e interação entre os fatores) e aplicando-se o teste t não pareado para avaliar os ambientes de conforto e estresse térmico dentro dos grupos genéticos.....78

Tabela 21. Análise estatística de expressão relativa do gene *SOD* aplicando-se o teste two-way ANOVA para comparação entre grupos genéticos (ambientes de conforto e estresse térmico e interação entre os fatores) e aplicando-se o teste t não pareado para avaliar os ambientes de conforto e estresse térmico dentro dos grupos genéticos.....79

Tabela 22. Síntese dos resultados de expressão gênica para todos os fatores no tecido coração dos grupos genéticos submetidos ao conforto e estresse térmico agudo.....80

Tabela 23. Síntese dos resultados de expressão gênica para todos os fatores no tecido fígado dos grupos genéticos submetidos ao conforto e estresse térmico agudo.....80

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Panorama da avicultura brasileira	3
2.2 Agricultura familiar e Peloco	4
2.3 Estresse térmico.....	7
2.4 Genes relacionados ao estresse térmico	9
2.4.1 Proteínas de choque térmico (HSPs)	9
2.4.2 Fatores de choque térmico (HSFs)	12
2.5 Estresse oxidativo	15
2.5.1 Superóxido dismutase (SOD)	16
2.5.2 Catalase (CAT).....	18
2.5.3 Glutationa peroxidase (GPX).....	19
2.6 Expressão gênica	20
2.7 Normalização da expressão gênica	21
2.8 Análise da estabilidade dos genes de referência e de expressão relativa dos genes alvos	22
REFERÊNCIAS.....	24
3. OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo geral	34
3.2 Objetivos específicos	34
4. CAPÍTULO 1	35
RESUMO.....	36
ABSTRACT	37
4.1 Introdução	38
4.2 Material e métodos.....	39
4.2.1 Animais.....	39
4.2.2 Estresse térmico.....	40

4.2.3 Coleta de tecidos, extração de RNA e quantificação	40
4.2.4 Transcrição Reversa do mRNA	40
4.2.5 Seleção de genes de referência e otimização da RT-qPCR	41
4.2.6 PCR quantitativa em tempo real.....	42
4.2.7 Determinação da estabilidade da expressão dos genes de referência	42
4.3 Resultados	44
4.3.1 Eficiência e especificidade dos <i>primers</i>	44
4.3.2 Estatística descritiva dos genes de referência	44
4.3.3 Estabilidade de expressão dos genes de referência	47
4.4 Discussão.....	52
4.5 Conclusão	55
REFERÊNCIAS.....	56
5. CAPÍTULO 2.	61
RESUMO.....	62
ABSTRACT	64
5.1 Introdução	66
5.2 Material e métodos.....	67
5.2.1 Animais.....	67
5.2.2 Aquecedores	67
5.2.3 Estresse térmico.....	68
5.2.4 Coleta de tecidos.....	69
5.2.5 Extração, quantificação e qualidade do RNA	69
5.2.6 Transcrição reversa do mRNA	69
5.2.7 Seleção de genes alvos e otimização da RT-qPCR.....	70
5.2.8 PCR quantitativa em tempo real.....	71
5.2.9 Análise estatística da expressão dos genes alvos	72
5.3 Resultados	72
5.3.1 Eficiência e especificidade dos <i>primers</i>	72
5.3.2 Expressão relativa dos genes alvos	72
5.4 Discussão.....	81
5.5 Conclusão	86
REFERÊNCIAS.....	86

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....101

1. Introdução Geral

O setor avícola é uma das áreas mais produtivas da agroindústria mundial. Essa alta produtividade está relacionada com uma série de fatores que influenciam positivamente no seu crescimento, tais como o melhoramento genético, nutrição, ambiente e manejo; contudo, as aves comerciais acabam sofrendo com variações de temperatura, devido a deficiências na regulação de temperatura corporal (CEDRAZ et al., 2017).

Os fatores térmicos, como temperatura e umidade do ar podem comprometer o desenvolvimento das aves, uma vez que afetam sua homeotermia (ALMEIDA, 2013). A linhagem comercial Cobb 500[®] possui excelente conversão alimentar, porém, se comparada as aves caipiras que possuem mais eficiência no controle da temperatura corporal são menos tolerante à altas temperaturas, por ser uma ave geneticamente melhorada (COBB BROILER, 2018).

Embora ainda existam poucos estudos que comprovem a resistência das aves caipiras ao calor elevado, é possível observar que elas são mais resistentes a ambientes adversos. Essas raças nativas, que passaram por processos de seleção natural, são aves pouco produtivas, uma vez que são criadas de maneira extensiva, porém conseguem permanecer em ambientes quentes sem que seu potencial produtivo ou fisiológico seja afetado (ALMEIDA, 2013).

Uma dessas aves é conhecida como Peloco, e se enquadram como um ecotipo, já que não existem trabalhos com o sequenciamento completo do seu genoma. Essas aves são criadas em pequenas propriedades rurais no interior da Bahia, e acredita-se que foram originadas à partir de cruzamentos aleatórios na época da colonização do Brasil, sendo que pouco se sabe sobre o perfil gênico delas. Esse ecotipo está ligado à agricultura familiar e de subsistência, e objetivando a conservação do seu material genético, que apresenta alta variabilidade, como por exemplo, rusticidade, termotolerância e resistência à doenças, existe a necessidade de pesquisas relacionadas ao seu potencial zootécnico, uma vez que isso pode manter os alelos que já foram perdidos em raças e linhagens comerciais (ALMEIDA, 2013).

De modo geral, quando as aves são submetidas a uma temperatura elevada, ocorrem respostas fisiológicas a fim de se adaptar ao ambiente, mantendo a homeostasia. Essa resposta ao fator estressante também está relacionada ao perfil gênico do animal, e podem ocorrer de modo diferente, dependendo do tecido.

Com o intuito de minimizar esses danos causados pelo estresse térmico, o organismo responde através da transcrição de genes que são fundamentais na manutenção celular. Dentre esses genes estão as Proteínas de choque térmico (HSPs) e os Fatores de choque térmico (HSFs). 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. Nesse sentido, o organismo responde através da expressão de genes que codificam enzimas antioxidantes como a Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione peroxidase (GPX), diminuindo os efeitos negativos nas células (MUJAHID et al., 2005).

A técnica mais utilizada para analisar a expressão de determinados genes, é a PCR Quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR), sendo que para analisar os genes em estudo, é necessário a normalização dos dados, ou seja, comparar a expressão dos genes alvos com a expressão de um gene que se expressa uniformemente no organismo, independente das condições. Esses genes estáveis são conhecidos como genes de referência (GR) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Diante disso, objetivou-se com esse trabalho avaliar e comparar a expressão gênica em fragmentos de fígado e coração entre a Peloco e frango de corte de linhagem comercial Cobb 500[®] submetidos ao estresse térmico utilizando genes das famílias dos Fatores de choque térmico (HSFs), Proteínas de choque térmico (HSPs) e genes que codificam as enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPX.

2. Revisão de literatura

2.1 Panorama da avicultura brasileira

O Brasil é um dos principais países que se destaca pela grande produção e exportação de carne de frango, o que traz para o setor avícola cada vez mais investimentos. Segundo o relatório da Associação Brasileira de Proteína Animal, a produção de carne de frango chegou a 13.1 milhões de toneladas em 2017, com um consumo per capita de 44,8 Kg/Hab, o que torna o Brasil o segundo maior produtor de carne de frango no mundo (ABPA, 2018).

Devido à grande demanda de produtos que provém de aves e que são consumidos no Brasil, produtores nacionais sempre buscam novidades para aumentar a produtividade animal, oferecer produtos de maior qualidade e com baixas perdas econômicas. Essa busca por melhorias abrange diversos aspectos dentro do setor, seja através da seleção de raças mais produtivas ou por sistemas de produção que possam permitir maior conforto e adaptabilidade para o animal apresentar boa produtividade e qualidade dos produtos. As linhagens comerciais de aves que são utilizadas no Brasil são geneticamente melhoradas, e são selecionadas para maior produção de carne ou ovos (MARIANTE et al.,2009).

Na avicultura, a adaptação do animal ao ambiente pode estar relacionada com fatores biológicos, genéticos e fisiológicos. Dessa forma, é importante adequar às condições necessárias que envolvem os processos de desenvolvimento desde o período de incubação do animal até as condições ambientais adequadas para sobrevivência na fase adulta. Porém, o grande entrave dessa seleção é a adaptação às condições adversas, principalmente a temperatura elevada, uma vez que essas aves comerciais são adaptadas em ambientes com controle de temperatura e umidade do ar (ALMEIDA, 2013).

As linhagens comerciais consistem em animais de produção geneticamente aprimorados para rápido crescimento e deposição de tecido muscular, características obtidas devido a avanços genéticos e nutricionais aplicados

(BOSCHINI et al., 2011). Contudo, sua atividade termorreguladora não é suficientemente eficiente. Segundo a Cobb Broiler (2018), a linhagem comercial Cobb 500[®] (**Figura1**), é uma ave com bom desempenho e conversão alimentar, e que possui excelentes cortes de carne, porém como salientado, possuem baixa adaptabilidade a ambiente muito quente, fato esse que também ocorre em outras linhagens comerciais.



Figura 1. Frango de corte Cobb 500[®] (Cobb Broiler, 2018)

2.2 Agricultura familiar e Peloco

A agricultura familiar é um assunto de grande importância para o desenvolvimento das comunidades rurais e promoção do estilo de vida mais saudável (TOADER; ROMAN, 2015). Ela consiste em organizar a produção agrícola, e o gerenciamento da mesma dependente principalmente da mão de obra familiar (FAO, 2019).

Esse sistema é composto por pequenos produtores que desempenham uma função essencial na produção de alimentos, sustentando a economia rural regional e preservando a biodiversidade, sempre objetivando melhorar os sistemas agroecológicos e a proteção dos recursos naturais (EKWALL, 2014).

Atualmente, existem cerca de 570 milhões de fazendas ao redor do mundo, sendo que mais de 90% dessas são administradas por uma pessoa ou por uma família; a agricultura familiar produz mais de 80% da comida do mundo, e desta forma destaca-se no cenário internacional. Essas famílias que cultivam alimentos, tem um importante papel no combate à fome, na redução da pobreza e no desenvolvimento sustentável de territórios rurais. Além disso, agricultores familiares desempenham papel fundamental na preservação de alimentos tradicionais, contribuindo para a conservação da biodiversidade mundial (BERCHIN, et al., 2019).

No Brasil, esse tipo de sistema também é de extrema importância para a produção agrícola. Ela corresponde a 84,4% (4,4 milhões de fazendas) de unidades rurais no país, oferecendo 74,4% (12,3 milhões de pessoas) de mão de obra nas áreas rurais e ocupa cerca de 24,3% (80,10 milhões ha) da área total das unidades agrícolas brasileiras (BERCHIN, et al., 2019).

Na Bahia, existem algumas regiões rurais que desenvolvem a agricultura familiar e em algumas dessas regiões são criadas um ecotipo de galinha caipira que são conhecidas como Peloco. Essas aves são originárias de cruzamentos aleatórios que foram introduzidas no Brasil na época da colonização. Em virtude do processo de adaptação e seleção natural que ocorreu espontaneamente por muito tempo, essas aves adquiriram características peculiares, como resistência, adaptabilidade e rusticidade, porém possuem baixo índice produtivo.

A Peloco é caracterizada pela ausência de penas durante um longo período do desenvolvimento e por possuírem esse fenótipo também são conhecidas como “Pelado” (**Figura 2**). Além disso, essas aves são criadas em sistema extensivo, indicando boa adaptação e exposição aos parasitas (ALMEIDA, 2013). A Peloco é encontrada principalmente em fazendas e criações de quintais na Chapada Diamantina e nas regiões Sul e extremo Sul da Bahia, onde são criadas em conjunto com outras raças (FARIAS FILHO et al., 2008a). Salienta-se que elas conseguem viver em regiões de altas temperaturas e servem de fonte de renda para pequenos produtores.



Figura 2. Pinto do ecotipo Peloco sem plumagem (Arquivo pessoal).

Esse ecotipo tem coloração escura da carne, e é muito diferenciada em relação à produção de carnes e ovos (FARIAS FILHO et al., 2008b). Por possuírem essa diversidade, os trabalhos realizados até os dias atuais limitaram-se na caracterização fenotípica (FIGUEIREDO, 2015).

Embora apresentem baixa produtividade em relação às linhagens comerciais, elas são consideradas fonte de recursos genéticos, e inclusive podem apresentar alelos únicos ou mesmo combinações alélicas que podem estar relacionadas à expressão de características específicas relacionadas à ambientes adversos. Devido às altas temperaturas dessas regiões percebe-se que a Peloco é mais resistente ao calor, uma vez que seu funcionamento fisiológico e reprodutivo permanece normal mesmo nessas condições adversas. Em virtude dessas características peculiares, sugere-se que ela tem grande variabilidade genética, havendo a necessidade de pesquisas relacionadas à sua fisiologia para detectar seu potencial zootécnico. Como elas são fonte de renda de famílias que residem nessas regiões, é necessário garantir a conservação do material genético e buscar respostas que expliquem sua resistência em determinados ambientes (ALMEIDA, 2013).

Essas aves naturalizadas são muito úteis para os pequenos produtores, e por possuírem determinadas características, possuem custo de manejo reduzido e apresentam-se como alternativa mais lucrativa para eles (CEDRAZ et al., 2017). Portanto, existe a importância de estudos objetivando o conhecimento da

termotolerância desse ecotipo, bem como buscar respostas que expliquem os mecanismos envolvidos.

2.3 Estresse Térmico

De acordo com Dantzer et al, (2014), estresse é uma resposta fisiológica que desafia a estabilidade do indivíduo e “fator estressante” é a perturbação ambiental que desencadeia essa instabilidade.

O estresse térmico ocorre frequentemente em regiões tropicais devido as condições climáticas e têm contribuído de uma maneira negativa na produtividade e na qualidade de criação de frangos, principalmente pela alta taxa de mortalidade, diminuição da ingestão de água e alimento (BOSCHINI et al., 2011).

A manutenção da homeotermia contribui para a diminuição do estresse e está relacionada com a temperatura, movimentação e umidade do ar (TINOCO, 2011). Quando esses fatores são alterados, saindo do conforto térmico, as aves diminuem sua habilidade de dissipar calor, entrando em um estado de ofegação, a fim de perder calor por evaporação. Quando essa perda de calor se torna ineficiente, ocorre o acúmulo de calor corporal, levando a ave a um estado de prostração, perda de eletrólitos e morte por falência cardiovascular (ESTRADA; MÁRQUEZ; BETANCUR, 2007).

Visando minimizar essas perdas de aves por fatores ambientais, estudos moleculares buscam fornecer informações relacionadas a determinadas características que causam essas mortalidades. Nesse contexto, enquadra-se a busca por aves mais resistentes ao calor elevado (SHIH- HAN, 2013).

Em situações de estresse térmico, alguns tecidos viscerais, tais como fígado e coração, são mais afetados (TEIXEIRA, 2011). O fígado desempenha uma diversidade de funções no metabolismo energético, digestão e capacidade imunológica e é mais susceptível ao estresse térmico e oxidativo quando comparado a outros órgãos. Por ser mais propenso a lesões pelo estresse térmico, torna-se um tecido candidato ideal para estudar o impacto causado por altas temperaturas (LIN,

2006). Já o coração, é um órgão de importância vital e está relacionado a várias doenças aviárias, além de fazer parte dos processos metabólicos, o que também o torna um órgão candidato para estudos relacionados à expressão de genes em aves.

A fim de minimizar essas situações de estresse, a capacidade da homeostase contribui para diminuir os danos celulares, mudando a capacidade da transcrição de genes na presença dessas condições estressantes (DE NADAL; AMMERER; POSAS, 2011).

Além das perdas relacionadas às características de desempenho produtivo, o estresse por calor também causa outros transtornos metabólicos; ele é considerado um dos estressores mais significativos, principalmente nas regiões tropicais, afetando inclusive o desenvolvimento das aves por induzir o estresse oxidativo (EL - TRABANY, 2016).

Em resposta a essas situações estressantes, destacam-se uma classe de proteínas altamente conservadas, as Proteínas de choque térmico (HSPs), essenciais para a sobrevivência das células expostas ao estresse. As HSPs desempenham um papel crucial em muitos processos celulares e fisiológicos, tais como dobragem, transporte e montagem de proteínas (TANG et al, 2018).

Além disso, a expressão gênica é induzida por fatores de transcrição que podem ser ativados quando o organismo é submetido ao estresse. Esses fatores são conhecidos por Fatores de transcrição de choque térmico (HSFs), sendo conhecidos quatro tipos (HSF1, HSF2, HSF3 e HSF4), porém apenas a HSF1 e HSF3 estão envolvidos na regulação das HSPs em resposta a condições estressantes (AKERFELT et al., 2010; FUJIMOTO; NAKAI, 2010).

A expressão de HSPs, HSFs, bem como genes que codificam enzimas antioxidantes, tem sido estudada em diferentes tecidos de aves, inclusive em fígado e coração, mostrando que os níveis de expressão do gene que codifica essa proteína, pode apresentar variação de expressão (GIVIZIEZ et al., 2011).

2.4 Genes relacionados ao estresse térmico

2.4.1 Proteínas de choque térmico (HSPs)

Existe uma grande importância no conhecimento da estrutura, função e como as Proteínas de choque térmico atuam em determinados organismos, para que se possam compreender os mecanismos envolvidos nesse processo de resposta a algum tipo de estresse.

Em 1962, Ferruccio Ritossa descobriu um novo padrão de espessamento em cromossomos através da exposição de células salivares de *Drosophila melanogaster* expostas ao calor. Esse espessamento representava sítios específicos de transcrição para a síntese de proteínas. A partir daí foi possível observar que a exposição dessas células ao calor induzia a expressão de determinados genes, até então quiescentes, sintetizar proteínas em resposta ao estresse. Essa resposta acontece em praticamente todos os organismos vivos. Quando os organismos são submetidos a algum tipo de estresse, seja ele térmico, mecânico ou químico, ocorre uma resposta rápida e transitória na expressão desses genes (JINDAL et al., 2016).

Nesse sentido, existem as HSPs que são uma classe de proteínas altamente conservadas e são classificadas de acordo com suas sequências de aminoácidos e peso molecular; e desempenham uma infinidade de papéis biológicos, conferindo proteção às células (JINDAL et al., 2016). As HSPs são divididas por seus pesos moleculares, onde as mais estudadas são as proteínas com pesos moleculares de 60, 70, 90 e 110 Kda (LIN et al, 2004). As que possuem pesos moleculares menores, são conhecidas como Pequenas proteínas de choque térmico (smHSPs), que atuam em situação de estresse, ligando-se à proteínas enoveladas prevenindo desnaturação irreversível (ROMANO et al, 2017).

Quando agentes estressores atuam nas células, ocorre uma conformação incorreta na estrutura e conseqüentemente, altera a atividade da proteína. Para corrigir o dobramento incorreto, se inicia a resposta ao estresse, no qual as HSPs

recebem um estímulo através da ativação da HSF1. Quando ocorre essa resposta, o HSF1 sofre uma mudança conformacional possibilitando sua ligação à Elementos de choque térmico (HSE) que ficam situados na região promotora dos genes que codificam as HSPs (SANTORO, 2000).

As HSPs também são conhecidas como chaperonas moleculares (KARP, 2005). Chaperonas agem designando substâncias que atuam evitando interações incorretas e auxiliando na montagem final das proteínas, como também controlando a síntese, endereçamento, dobramento e degradação (GUPTA et al., 2007). O processo de dobramento de uma determinada proteína é muito importante, pois, possibilita a proteínas desempenhar todas suas funções corretamente. Todas as proteínas funcionais estão completamente dobradas, com suas porções hidrofóbicas de seus aminoácidos voltadas para o interior da molécula e os hidrofílicos para o exterior. Essa disposição é importante para evitar agregação e possibilitar o movimento e solubilidade das proteínas em meio aquoso. As proteínas de choque térmico atuam evitando agregações aleatórias, até que o término de dobramento ocorra e a proteína adquira resistência (KAMPINGA; CRAIG, 2010). Dos muitos *HSPs* expressos, o *HSP70* e *HSP90* parecem estar mais intimamente associados à tolerância ao calor em frangos (AL-ZGHOUL et al., 2015)

Um estudo realizado por Elshimaa et al., (2018), analisou a expressão do gene *HSP70* no fígado de duas diferentes linhagens de frangos de corte (Ross e Cobb 500[®]), submetidas ao estresse térmico crônico (36°C, por 4 horas). Os resultados mostraram que houve um aumento significativo na expressão desse gene na linhagem Ross quando comparado à linhagem Cobb 500[®]. Além disso, os autores registraram que o estresse térmico aumenta a síntese e expressão do gene *HSP70*, e que também desempenha um papel protetor essencial contra lesões teciduais induzidas por estresse (YU et al., 2008).

Recentemente, Song et al., (2017) relataram um aumento na expressão do gene *HSP70* no jejuno e íleo de frangos de corte criados sob estresse térmico (34 ± 1°C por 8h). Já Rimoldi et al., (2015) não detectaram qualquer alteração nas cópias de mRNA de *HSP70* em frangos de corte após quatro semanas de estresse térmico. Além disso, Felver-Gant et al. (2012) relataram que galinhas poedeiras submetidas a estresse térmico por uma semana apresentaram maior número de cópias de mRNA

de *HSP70* no fígado, mas a expressão desse gene não permaneceu elevada ao final da 2ª semana de exposição à alta temperatura. De acordo com Cedraz et al., (2017), o gene *HSP70* é altamente expresso em músculo de galinhas Peloco quando estas são expostas ao estresse térmico agudo (39°C), o que leva a considerar que esse frango é mais resistente que as linhagens de frango de corte geneticamente melhoradas para ganho de peso, como acontece com a Cobb 500®.

Além das *HSP70*, outro gene que está envolvido na resposta ao estresse térmico é o *HSP90*. A *HSP90* está relacionada com a manutenção da conformação, estabilidade e função em uma série de proteínas envolvidas na transdução de sinal, ciclo celular e apoptose. Juntas, as *HSP70* e *HSP90* atuam protegendo os organismos de estresses ambientais, genéticos e no envelhecimento de proteínas. Diferente de outras chaperonas, a *HSP90* possui um grupo de substratos que dependem dela para sua funcionalidade (TIROLI; RAMOS, 2011). Entre os substratos estão presentes a telomerase, receptores de hormônios esteroides, fatores de transcrição e proteínas quinases (PEARL, 2005).

Essa proteína possui uma importante função que é a estabilização de proteínas mutadas, que teoricamente seriam degradadas na ausência desta chaperona (QUEITSCH; SANGSTER; LINDQUIST, 2002; SANGSTER et al., 2008). A *HSP90* também regula o Fator de choque térmico 1 (*HSF1*). Além disso, ela representa cerca de 1 a 2% do total das proteínas nas células em situações normais (SANGSTER; QUEITSCH, 2005).

Em células eucarióticas, a *HSP90* é codificada por uma família multigênica com proteínas estruturalmente relacionadas que variam de 80 a 180 kDa. Além de proteção celular, a *HSP90* está envolvida na regulação da expressão gênica. Cerca de 3% das *HSP90* estão localizadas no núcleo, regulando o remodelamento da cromatina e de outros eventos nucleares. Essa chaperona está associada à regulação da atividade de determinados receptores de hormônios que transitam entre o citoplasma e o núcleo. Dessa forma, ela tem um papel crucial para integrar todos esses processos celulares, como endereçamento, estabilidade, ligação e atividade transcricional (TREPEL et al., 2011).

Como todo organismo vivo, os frangos possuem mecanismos de defesa contra situações ambientais adversas. Um dos mecanismos de defesa está

relacionado com essas HSPs, e de acordo com Manolli et al, (2007), o fígado durante a exposição ao estresse por alta temperatura mobiliza lipídios e carboidratos para energia, diminuindo os efeitos negativos causados pelo estresse.

Um estudo realizado por Rimoldi et al., (2015), de duas linhagens diferentes de frangos submetidos à altas temperaturas, mostraram que não houve efeito significativo de expressão do gene *HSP90* no fígado dos animais entre o genótipo e o ambiente. Assim como o gene *HSP70*, o *HSP90* é expresso em baixos níveis em condições normais, porém a expressão é aumentada quando o animal está sobre estresse térmico. Lei et al., (2009) relataram que ocorre um aumento de expressão do gene *HSP90* nas primeiras três horas de estresse agudo, porém no estresse crônico (depois de 6 horas), a expressão desse gene diminuiu.

A maioria dos estudos de expressão gênica realizados são voltados para a avicultura industrial, onde os animais em estudos são os frangos de linhagens comerciais. Porém, até o momento, há poucos trabalhos descritos na literatura que tenham avaliado a expressão de genes relacionados ao estresse térmico e oxidativo no ecotipo Peloco que demonstra maior adaptabilidade as essas situações adversas.

2.4.2 Fatores de choque térmico (HSFs)

Visando a proteção ao estresse térmico e oxidativo, várias estratégias foram desenvolvidas pelas células contra os danos causados por mudanças no ambiente. Os Fatores de choque térmico (HSFs) são essenciais para todos os organismos sobreviverem à exposição ao estresse térmico agudo. Esses fatores regulam a expressão das chaperonas, reconhecendo Elementos de choque térmico (HSEs) dentro de suas regiões promotoras, iniciando a transcrição (AKERFELT et al., 2010; SCHARF et al., 2012; GUO et al., 2016).

Os HSFs já foram identificados em diferentes organismos, como plantas e vertebrados. De acordo com Santoro (2000), os diferentes HSFs presentes em

eucariotos podem interagir para proteger os organismos de diferentes danos ambientais.

A atividade desses genes pode ser regulada por diferentes condições. HSFs formam complexos citoplasmáticos com as chaperonas HSP90 / HSP70 para manter seus estados inativos sob condições normais, enquanto sob condições de estresse, os HSFs são liberados e modificados, permitindo que liguem a seus genes alvo (NOVER et al., 2001; AKERFELT et al. al., 2010; SCHARF et al., 2012; WESTERHEIDE et al., 2012). Com uma quantidade considerável de HSPs produzidas, o equilíbrio inicial de chaperonas e proteínas não nativas é reestabelecido e a transcrição é reprimida, através da ligação das HSPs nos sítios dos HSFs (SANTORO, 2000).

Existem vários fatores de choque térmico que desempenham um papel de resposta rápida ao estresse térmico. Além dos *HSF1*, há os *HSF2*, *HSF3* e *HSF4*. Os *HSF2* são caracterizados por atuarem na diferenciação celular, bem como no processo de desenvolvimento, enquanto que o *HSF3* parece estar relacionado à resposta por estresse térmico extremo e na regulação dos *HSF1*, atuando com precisão nessa regulação; e o *HSF4* também está envolvido na regulação da expressão, porém é regulador negativo, ou seja, reprime a expressão das proteínas HSPs (SANTORO, 2000).

Em aves, as células expressam três genes do fator de transcrição do choque térmico, o *HSF1*, *HSF2* e *HSF3*, sendo esse último, de acordo com Fujimoto e Nakai (2010), o principal em aves caipiras.

Segundo o trabalho realizado por Zhang et al., (2012), a expressão de mRNA de *HSF1* teve um aumento no coração de suínos quando esses animais foram submetidos ao estresse térmico (40°). Cabe salientar que também aconteceu aumento na expressão do gene *HSP70*. Já Nakamura et al., (2012) encontraram uma alta expressão dos genes *HSF1* e *HSP70* em corais, porém esse aumento de expressão só permaneceu nas primeiras horas de exposição ao calor e depois ocorreu um declínio.

Sabe-se que a expressão de genes relacionados ao estresse térmico pode variar dependendo do tecido. Uma pesquisa realizada com camundongos

submetidos ao estresse térmico demonstrou especificidade tecidual, pois, em fígado o gene *HSF1* foi expresso, enquanto que no coração não foi detectada alteração de expressão (ISLAM et al., 2013). Contudo, diferentes tecidos em frangos expostos a altas temperaturas ainda tem uma investigação limitada.

Uma pesquisa realizada por Zhang et al., (2014) analisaram as mudanças de expressão dos genes *HSF3* e *HSP70* em coração, fígado, músculo e cérebro de duas raças de frangos, as galinhas Lingshans (LSC) e os Recessivos Brancos Rock (WRR), quando esses foram expostos ao calor com tratamento térmico crescente. Esse trabalho resultou na baixa expressão gênica nas primeiras três horas, e depois apresentou um aumento significativo na expressão desses dois genes, em ambas as raças. Já em relação à expressão desses genes nos tecidos, observaram que a expressão do gene *HSP70* diminuiu no coração após 6 horas de tratamento térmico, enquanto que a expressão do *HSF3* continuou a aumentar. No fígado, a expressão do gene *HSP70* foi significativamente maior, comparado ao coração nas LSC. Entretanto, a expressão do gene *HSF3* foi maior em cérebro e músculo de LSC, comparado com a WWR. Os resultados desse trabalho evidenciam que existe especificidade de raça e tecido na expressão desses genes.

Em outro trabalho realizado recentemente, foram comparados três grupos genéticos de galinhas (Cobb 500[®], Peloco e Caneluda) que foram submetidos ao estresse térmico agudo (39,5°C por 1 hora) e, posteriormente, foram avaliadas a expressão dos genes *HSF1* e *HSF3* em músculo do peito. Os resultados demonstraram que não houve diferença significativa na expressão dos dois genes em nenhuma das raças expostas ao calor elevado (CEDRAZ, et al., 2017).

A investigação sobre o perfil de expressão dos *HSFs* em aves submetidos ao estresse térmico tem se limitado a frangos de corte. Poucos são os trabalhos encontrados sobre a expressão desses fatores em aves caipiras criadas em sistema extensivo, fato essencial, uma vez que a expressão dos *HSFs* e *HSPs* desempenham a função de proteger as células do estresse térmico, a fim de evitar outros danos metabólicos, como por exemplo, o estresse oxidativo.

2.5 Estresse oxidativo

Atualmente, muito se tem estudado sobre compostos antioxidantes, sendo que a formação em excesso de radicais livres no organismo é conceituado como estresse oxidativo e uma ampla gama de espécies reativas é produzida como resultado dos processos metabólicos que ocorrem no corpo, podendo ser espécies reativas de oxigênio (ROS) ou espécies reativas de nitrogênio (RNS) (IVANOV, et al., 2016).

Dentro das espécies reativas de oxigênio, incluem-se os radicais livres que no organismo estão envolvidos em várias funções, como produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização celular, síntese de substâncias biológicas importantes e transporte iônico (REHMAN, et al., 2018). Porém, quando esses se encontram em excesso, podem ser prejudiciais agredindo tecidos, lipídios, proteínas e DNA acarretando erros na transcrição, inibindo a síntese proteica e podendo causar mutações (KUMAR et al., 2011).

Para combater esses efeitos oxidativos algumas enzimas atuam como antioxidantes, com a finalidade de diminuir os danos causados. Entre elas estão a Catalase (CAT), a Superóxido dismutase (SOD) e a Glutathione peroxidase (GPX). A CAT tem a função de catalisar a degradação de peróxido de hidrogênio para água e oxigênio, já a SOD catalisa a dismutação de radicais superóxido para peróxido de hidrogênio e oxigênio enquanto que a GPX decompõe peróxidos através de outros mecanismos (BRIGELIUS- FLOHÉ; MAIORINO 2013).

De acordo com Rimoldi et al, (2015), altas temperaturas podem causar estresse oxidativo em frangos, e quando ocorre uma exposição ao calor elevado, observa-se um aumento compensatório na atividade dessas enzimas antioxidantes em diferentes tecidos, visando diminuir os danos causados nas células por esse tipo de estresse. Em um outro estudo realizado por Lin et al., (2006), o autores concluíram que frangos de corte com 42 dias apresentaram estresse oxidativo nas células quando foram expostos ao calor elevado (32°C) por 6 horas. Esse trabalho sugeriu que o calor elevado induz mudanças metabólicas, que estão envolvidas com esse tipo de estresse.

Outro trabalho realizado por Elshimaa et al., (2018), os autores investigaram a expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo no fígado de frangos de corte, e foi observado que durante o estresse térmico as reservas celulares de lipídios e carboidratos podem ser mobilizadas para produzir uma energia suficiente atenuando os impactos negativos do estresse.

Além desses, vários outros estudos demonstraram claramente que a exposição a altas temperaturas causam um aumento compensatório na atividade das enzimas SOD, GPX e CAT no soro, fígado e músculo de frangos de corte (TAN et al., 2010; AZAD et al., 2010). Como se sabe, o estresse térmico pode ser considerado como um dos principais fatores ambientais responsáveis pelo estresse oxidativo e pelos danos relacionados ao tecido.

Dessa forma, estudar genes relacionados com a produção desses radicais livres no ecotipo Peloco é de extrema importância, uma vez que ainda não existem trabalhos neste contexto e a regulação da expressão de genes codificantes de enzimas antioxidantes, cuja atividade evita ou reduz os danos potenciais causados pelas ROS, faz parte da resposta a esse estresse (CYRNE et al., 2003).

Além disso, o estresse oxidativo é responsável pelo desenvolvimento de várias doenças, diminuindo a produção, afetando o desenvolvimento e, conseqüentemente, trazendo prejuízo para o produtor, seja na avicultura ou na agricultura familiar (CRUMP et al., 2013).

2.5.1 Superóxido dismutase (SOD)

Em 1994, Gershman e Gilbert, realizaram um trabalho onde foi demonstrado que a maioria dos efeitos nocivos causados pelo excesso de oxigênio no organismo poderia ser atribuída a formação de radicais livres. Diante dessa informação, e associado a trabalhos posteriores, foi descoberta uma enzima: a Superóxido dismutase (SOD), que é específica para a remoção catalítica de um radical de oxigênio. A Superóxido dismutase, em conjunto com a enzima Catalase (CAT) e

Glutathiona peroxidase (GPX) formam a primeira linha de defesa antioxidante de organismos superiores (ZHENG, 2019)

A enzima Superóxido dismutase (EC 1.15.1.1) corresponde a uma família de metaloenzimas, que catalisam a formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) à partir de radicais superóxidos (O_2^-). Essa enzima diminui esses radicais, e dessa forma protege a célula de oxidação (ZHENG, 2019).

A classificação dessa enzima é feita de acordo com o componente encontrado no seu sítio ativo, e podem ser divididas em três grupos: cobre/zinco (Cu/Zn), Manganês (Mn) ou Ferro (Fe), e sua estrutura varia de acordo com o organismo em que ela pode ser encontrada (FUKAI et al., 2011).

De acordo com Azad et al (2010), o estresse térmico aumentou os níveis de mRNA do gene *SOD* no músculo esquelético de frangos de corte submetidos a uma temperatura de 34° C por duas semanas. Contudo, alguns pesquisadores já relatam que a expressão do gene *SOD* não é alterada quando os frangos de corte são submetidos ao estresse térmico (WILLEMMSEN et al., 2011; RIMOLDI et al., 2015). Por outro lado, de acordo com Al- Zghoul et al., (2018), os níveis de expressão desse gene em fígado de frangos submetidos a alta temperatura mostrou-se significativamente menor do que os controles. Em um estudo realizado por Haibo Yu et al., (2017) com *Oreonectes macrolepis*, os resultados mostraram alteração na expressão do mRNA do *SOD* em fígado e coração, aumentando significativamente sua expressão quando os peixes foram submetidos à altas temperaturas. Além disso, a expressão variou nos diferentes tecidos, indicando diferentes sensibilidades dos tecidos e resposta ao estresse térmico.

Em outro trabalho, realizado por Lin et al., (2006), onde investigaram os danos oxidativos causados por altas temperaturas em fígado e coração de frangos de corte, o gene *SOD* não teve um aumento significativo de expressão em nenhum dos tecidos testados quando os frangos foram submetidos às altas temperaturas.

Dessa forma, a expressão do gene que codifica essa enzima revela variação de expressão nos tecidos e nas espécies. Naturalmente, o peróxido de hidrogênio também é um composto perigoso, então a célula deve usar a enzima CAT para desintoxicá-la (KHAN et al., 2019).

2.5.2 Catalase (CAT)

A Catalase (CAT, EC.1.11.1.6) é uma enzima que também faz parte do sistema antioxidante do organismo. Ela é encontrada em peroxissomos celulares e tem como função decompor o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio resultante da dismutação do ânion radical peróxido (HELDT; HELDT, 2005; DUBEY, 2011).

A CAT é encontrada em todos os organismos vivos, sendo considerada uma enzima tetramérica, por possuir grupos hemes em sua estrutura (MALLICK; MOHN, 2000).

Essa enzima é a única que não consome equivalentes redutores celulares para tal função. Ela está presente na maioria das células aeróbicas, e é encontrada nos animais em abundância nos rins, fígado e eritrócitos, e em pouca quantidade no coração (MALLICK; MOHN, 2000).

Um estudo realizado por Rimoldi et al., (2015) mostraram que quatro semanas de estresse crônico por exposição a altas temperaturas ambientais causaram aumento da expressão do *CAT* em frangos de corte. Um aumento na atividade da enzima *CAT* também foi observado como resposta protetora ao estresse oxidativo em humanos (DEVI et al., 2000). De acordo com Al-Zghoul et al., (2018), os níveis de expressão do *CAT* em fígado de frangos submetidos a alta temperatura, mostrou-se significativamente menor do que os controles. Por outro lado, um trabalho realizado por Habashy et al., (2018), os autores demonstraram que o estresse térmico agudo altera a expressão de mRNA de *SOD*, *CAT* e *GPX*.

Em outro trabalho realizado, Tan et al., (2010), os autores investigaram os efeitos da alta temperatura na disfunção da respiração mitocondrial hepática, no sistema enzimático antioxidante e na lesão oxidativa em frangos de corte, e encontraram um aumento gradual da atividade das enzimas *SOD* e *GPX*, porém, a *CAT* não teve sua atividade alterada. Entretanto, as altas temperaturas reprimiram a respiração mitocondrial hepática, levando a produção de espécies reativas de oxigênio e, conseqüentemente, a lesão oxidativa.

Apesar de se tratar de outra espécie, em um estudo realizado com peixes, os resultados demonstraram alteração na expressão do mRNA do *CAT* em fígado e coração, aumentando significativamente sua expressão quando esses foram submetidos à altas temperaturas. Além disso, a expressão desse gene variou em diferentes tecidos, indicando diferentes sensibilidades dos tecidos e resposta ao estresse térmico (HAIBO YU et al., 2017). Além disso, esse trabalho mostrou uma relação dinâmica entre a *CAT* e a enzima *GPX*.

2.5.3 Glutationa peroxidase (GPX)

A Glutationa peroxidase (EC. 1.11.1) foi descoberta em 1959 por Mills, em tecidos de mamíferos, sendo que os animais possuem dois tipos de *GPXs*, sendo uma dependente de selênio e a outra não (ARAÚJO, 2015).

A *GPX* dependente de selênio é capaz de reduzir qualquer hidroperóxido orgânico. Esse tipo de enzima tem peso molecular de 81.000 Kb, e possui um átomo de selênio em cada uma das suas quatro subunidades. Já a enzima não dependente de selênio tem peso molecular de 35.000 Kb, com duas subunidades, porém não consegue reduzir o H_2O_2 (ARAÚJO, 2015).

O fígado possui alta atividade de *GPX*, já o coração, pulmão e cérebro tem uma atividade moderada desta enzima. Nos animais, a enzima *GPX* dependente de selênio é na maior parte responsável por todas as atividades, porém pode existir uma variação dependendo da espécie e do tecido em que ela se encontra (MALLICK; MOHN, 2000).

A *GPX* age junto com a *CAT* na eliminação de hidroperóxidos. Ela age catalisando a redução de peróxido de hidrogênio e outros peróxidos orgânicos por meio da conversão da Glutationa reduzida à Glutationa oxidada, o que contribui para a proteção das macromoléculas e biomembranas da oxidação (ARAÚJO 2015).

Atualmente, oito isoformas de *GPX* são encontradas, porém apenas quatro são dependentes de selênio. A *GPX1* foi a primeira a ser identificada e se encontra no citosol de mamíferos, e atua transformando H_2O_2 em peróxido e álcool. A *GPX2*

está presente na mucosa gastrointestinal e também no fígado. A GPX3 se encontra em abundância nos rins e a GPX4 é responsável pela destruição de hidroperóxidos lipídicos. Ela atua na defesa antioxidante principalmente durante o desenvolvimento embrionário e na espermatogênese. A GPX5, 6 e 7 são encontradas no epidídimo, epitélio olfatório e tecidos embrionários, respectivamente (DUARTE et al., 2017).

A atividade da GPX selênio dependente parece ter uma correlação positiva com a ingestão de selênio na dieta. Quando os níveis de selênio são inadequados no organismo, os níveis da GPX também são menores, diminuindo a degradação de peróxidos de hidrogênio (HOLOVSKÁ et al., 2003)

Poucos são os trabalhos encontrados para verificar o perfil de expressão gênica dessa enzima em frangos submetidos ao estresse térmico, bem como no ecotipo Peloco.

2.6 Expressão gênica

Os genes codificam as proteínas e RNAs regulatórios que determinam os transcritos que vão ser sintetizados. A expressão gênica é um processo complexo envolvendo proteínas específicas que atuam em conjunto permitindo flexibilidade no controle da expressão gênica (O'CONNOR; ADAMS, 2010).

A expressão de genes de 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).

Para analisar determinadas características, como por exemplo, a resistência de aves ao calor elevado é importante traçar um perfil da expressão de genes específicos em grupos genéticos diferentes. Apesar de existirem várias técnicas que realizam análise de expressão gênica, a PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR), tem sido a mais utilizada para avaliar a expressão dos transcritos, uma vez que a análise pode ser realizada em diferentes tecidos e espécies (RUTLEDGE; CÔTÉ, 2003).

A técnica consiste em analisar simultaneamente diferentes amostras, utilizando uma enzima de Transcrição Reversa (*Transcriptase Reversa*) para obter um cDNA a partir da fita de RNA, com posterior amplificação do gene de interesse. A amplificação é monitorada no decorrer da reação, através da fluorescência de moléculas intercalantes. Ao final da reação é possível calcular o número original de moléculas da sequência amplificada presente na amostra (RUTLEDGE; CÔTÉ, 2003). Para tanto um gene de referência é essencial para normalizar os resultados experimentais.

2.7 Normalização da expressão gênica

A normalização precisa é um pré requisito para a medição correta da expressão gênica (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Quando se faz esse tipo de estudo, vários parâmetros precisam ser controlados para se obter medidas confiáveis na expressão quantitativa, tais como quantidade inicial da amostra, qualidade e integridade do RNA, eficiência do cDNA e diferença na atividade transcricional dos tecidos analisados (ANDERSEN, et al., 2004).

A quantificação de genes pela PCR em tempo real necessita de um método que valide os resultados gerados. Para tanto um gene de referência é utilizado para normalizar os resultados experimentais. Um gene de referência (GR) 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).

Em estudos de expressão gênica, alguns genes são mais comumente testados, tais como o *GAPDH*, *ACTB*, *MRPS27*, *MRPS30*, entre outros. Geralmente são selecionados como normalizadores os genes expressos que participam do metabolismo primário e da manutenção da estrutura celular (MACÁRIO, 2016). A seleção de um gene de referência para os experimentos de expressão exige os seguintes critérios: uniformidade dos níveis de expressão em todas as amostras (requer a comparação dos Cts do gene de referência em várias amostras e tratamentos) e similaridade de eficiência de amplificação entre o gene alvo e o de

referência (realização do teste de eficiência de amplificação) (HASSANPOUR et al., 2018).

Entretanto, existem trabalhos que relatam que esses genes mesmo participando de rotas celulares essenciais, podem apresentar regulação de expressão quando submetidos em diferentes condições experimentais (BRUNNER; YAKOVLEV; STRAUSS, 2004; CZECHOWSKI et al., 2005; EXPÓSITO-RODRÍGUEZ et al., 2008; GUTIERREZ et al., 2008). Além disso, alguns autores relatam que nenhum gene é constitutivamente expresso em todos os tipos de tecidos e sob todas as condições experimentais, necessitando de uma determinação específica para a espécie em estudo, visto que um gene de referência pode ser adequado para uma espécie e não ser para outra (BRUNNER; YAKOVLEV; STRAUSS, 2004; GUTIERREZ et al., 2008).

Portanto, existe a necessidade de avaliar a estabilidade de expressão dos genes de referência, antes do uso destes na análise de expressão gênica.

2.8 Análise de estabilidade dos genes de referência e de expressão relativa do genes alvos

A estabilidade dos genes de referência podem ser medidas através de ferramentas estatísticas específicas. Dentre as mais utilizadas e confiáveis estão os algoritmos: BestKeeper (PFAFFL et al., 2004), GeNorm (VANDESOMPELE et al., 2002) e NormFinder (ANDERSEN; JENSEN; ØRNTOFT, 2004).

O BestKeeper é um algoritmo que realiza uma análise descritiva dos valores e das variabilidades de expressão dos genes de referência utilizando os valores de Ct (*cycle threshold*) (WANG et al., 2012). O seu método de interpretação é através do desvio padrão e do coeficiente de variação. Assim, o software calcula a variação para todos os genes de referência baseadas na média geométrica do valor de Cq. Os genes com desvio padrão maior que 1,0 são considerados não estáveis (PFAFFL et al., 2004).

O GeNorm é um algoritmo que realiza as análises par a par (de um gene endógeno com todos os genes controles testados), classificando os genes a partir da sua estabilidade de expressão média (M). A partir dessa análise, é obtido o desvio padrão para cada par de genes, e o gene que apresentar menor média é considerado o mais estável, sendo que esse valor deve se encontrar abaixo de 1,0. Cabe ressaltar, que além de calcular o valor de M, essa ferramenta indica um número de genes necessários para a normalização eficaz dos dados (VANDESOMPELE et al., 2002).

Já o NormFinder é uma ferramenta desenvolvida por Andersen et al. (2004), que também usa um modelo estatístico na sua abordagem, sendo que genes com alta variação devem ser excluídos. Esse método de análise propõe avaliar a estabilidade dentro de grupo e entre grupos, gerando um valor final de estabilidade combinando os dois (inter e intragrupos). O software indica a expressão do gene mais estável por valores médios mais baixos, identificando vários genes de referência de acordo com seus grupos de variação, encontrando o gene com maior estabilidade. Além disso, o desvio padrão acumulado funciona como um bom indicador do número ideal de genes a ser empregado na normalização dos dados (ANDERSEN et al. (2004). Para cada um dos valores obtidos com estas diferentes abordagens estatísticas, são realizadas combinações para obter uma lista de estabilidade agregada com o uso do algoritmo Monte Carlo ou Brute Force executadas pelo programa RankAgregg (KOZERA; RAPACZ, 2013).

Após a escolha do gene de referência, é realizada a normalização, possibilitando a correção de variabilidades inerentes ao RNA. Para a normalização dos dados, geralmente é utilizado o método de quantificação relativa, onde é aplicada uma fórmula em que a razão de expressão relativa do gene alvo é normalizada pelo gene de referência (PFAFFL, 2004). O método utilizado é conhecido como “dois elevado a menos Delta Delta Ct” ($2^{-\Delta\Delta CT}$) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Esse método consiste em calcular a mudança na expressão relativa de experimentos utilizando a RT- qPCR. 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.

Referências

- ABPA. Relatório Anual. Disponível em: <<http://www.abpa-br.org>>. Acesso em: 21 jun. 2016.
- ABREU, P. G. DE; ABREU, V. M. N. **Estresse calórico – como ocorre e o que fazer?** Embrapa - Suínos e Aves, p.3, 2018.
- 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. DE. **Influência do estresse pré-abate na expressão gênica e qualidade da carne de frango (*Gallus gallus*)**. 2007. Dissertação. Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, São Paulo.
- ALMEIDA, E. C. D. J. **Diversidade fenotípica de galinhas nativas da raça Peloco com base em descritores fenotípicos sob análise multivariada**. 2013. Tese. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Bahia.
- AL-ZGHOUL M.B.; SUKKER H.; ABEBNEH M.M. Effect of thermal manipulation of broilers embryos on the response to heat-induced oxidative stress. **Poultry Science**, p.1-11, 2018.
- AL-ZGHOUL M.B. et al. Thermal manipulation during broiler chicken embryogenesis: Effect on mRNA expressions of Hsp108, Hsp47 and Hsf3- during subsequent post-hatch thermal challenge. **Research in Veterinary Science**, v.103, p.211-217, 2015.
- 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.
- ARAÚJO R. S. **Expressão Gênica em frango de corte submetido a diferentes níveis de alimentos alternativos**. 2015. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) Universidade Federal do Piauí, Piauí.
- AZAD, M.A. et al. Metabolic characteristics and oxidative damage to skeletal muscle in broiler chickens exposed to chronic heat stress. **Comparative Biochemistry Physiology. Part. A Molecular Integrative Physiology**, v.155, p.401–406, 2010.
- BEPPELLING, A. et al. Alternative bacterial two-component small heat shock protein systems. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, v.109, p.20407–20412, 2012.

BERCHIN, I. I. et al. The contributions of public policies for strengthening family farming and increasing food security: The case of Brazil. **Land Use Policy**, v.82, p.573-584. 2019.

BOROWSKA D. et al. Identification of stable reference genes for quantitative PCR in cells derived from chicken lymphoid organs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.170, p.20-24, 2016.

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

BRIGELIUS- FLOEÉ, R.; MAIORINO, M. Glutathione peroxidases. **Biochimica et Biophysica Acta –General Subjects**, v.1830, p.3289–3303, 2013.

BRUNNER, A. M.; YAKOVLEV, I. A; STRAUSS, S. H. Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. **BMC Plant Biology**, v.4, p.14, 2004.

BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.29, n.1, p.23– 39, 2002.

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.

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.

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

COBB BROILER. **Guia de gerenciamento**. 2018. Disponível em: <https://www.bbb-vantress.com/products/cobb-500>. Acesso em 12 Dez. 2018.

CONSTANTINI, D.; S.VERHUST. Does high antioxidant capacity indicate low oxidative stress? **Functional Ecology**, v.23, p.506–509, 2009.

CRUMP K. E. et al. Antioxidant treatment regulates the humoral immune response during acute viral infection. **Journal of Virology**, v.87, p.2577–2586, 2013.

CYRNE, L. et al. Regulation of antioxidant enzymes gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* during stationary phase. **Free Radical Biology & Medicine**, v.34, p.385-393, 2003.

CZECHOWSKI, T. et al. Genome-Wide Identification and Testing of Superior Reference Genes for Transcript Normalization. **Plant Physiology**, v.139, p.5–17, 2005.

DANTZER, B. et al. Measures of physiological stress: a transparent or opaque window into the status, management and conservation of species? **Conservation Physiology**, v.2, p.1–18, 2014.

DE NADAL, E.; AMMERER, G.; POSAS, F. Controlling gene expression in response to stress. **Nature Reviews Genetics**, v.12, n.12, p.833–845, 2011.

DEVI, G.S. et al. Free radicals antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different types of leukemias. **Clinica Chimica Acta**, v.293, p.53–62, 2000.

DUARTE G. B. S.; COMINETTI C.; COZZOLINO S. M. F. **Funções Plenamente Reconhecidas de Nutrientes - Selênio / ILSI Brasil**. v.8, 2017.

DUBEY, R.S. Metal toxicity, oxidative stress and antioxidative defense system in plants. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants, **Science Publishers**, v.9, p.178-203, 2011.

EKWALL, B. **Family Farming: Building a Sustainable Future, 2014**. Disponível em: <<http://www.worldfooddayusa.org/> barbara_ekwall. Acesso em: 23 març. 2019.

ELSHIMAA M. et al. 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**, p.337-343, 2018.

EL- TARABANY M. S. Impacto of temperature – humidity index on egg- laying characteristics and related stress and immunity parameters of Japaneses quails. **International Journal of Biometereology**, v.60, p.957-964, 2016.

ESTRADA-PAREJA, M. M.; MÁRQUEZ-GIRÓN, S. M.; BETANCUR, L. F. R. Efecto de la temperatura y la humedad relativa en los parámetros productivos y la transferencia de calor en pollos de engorde. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v.20, n.3, p.288-303, 2007.

EXPÓSITO-RODRÍGUEZ, M. et al. Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. **BMC Plant Biology**, v.8, n.1, p.131, 2008.

FAO. FAOSTAT, **Production**. 2019. Available at: Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data>>, Acesso em: 20 março de 2019.

FARIAS FILHO, R. V. et al. **Avaliação inicial da postura da galinha denominada Peloco (*Gallus gallus domesticus*) no estado da Bahia, Brasil**. In: Anais do IX

Simpósio Iberoamericano sobre Conservación Y Utilización de Recursos Zoogenéticos, Mar del Plata, Argentina. 2008. p. 165.

FARIAS FILHO, R. V. et al. **Descrição do agrupamento genético denominado Peloco (*Gallus gallus*) nas regiões agrícolas do estado da Bahia, Brasil.** In: Anais do IX Simpósio Iberoamericano sobre Conservación Y Utilización de Recursos Zoogenéticos, Mar del Plata, Argentina. 2008. p. 197.

FELVER-GANT, J.N. et al. Genetic variations alter physiological responses following heat stress in strains of laying hens. **Poultry Science**, v.91, p.1542–1551, 2012.

FIGUEIREDO, N. E. M. **Diversidade genética e avaliação de crescimento da raça Peloco (*Gallus gallus domesticus*) visando sua conservação e utilização.** 2015. Dissertação (Mestrado em Genética, Biodiversidade e Conservação) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Bahia.

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

FUKAI T. et al. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. **Antioxidante Redox Signal**, v.15, p.1583-1606, 2011.

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.

GIVISIEZ P. E. N. et al. Heat or cold chronic stress affects organ weights and HSP70 levels in chicken embryos. **Journal Animal Science**, v.81, p.83-87, 2011.

GIVISIEZ P. E. N.; FURLAN R. L.; MALHEIROS E.B.; MACARI M. Incubation and rearing temperature effects on Hsp70 levels and heat stress response in broilers. **Canadian Journal of Animal Science**, v.83, p.213-220, 2003.

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, M. et al. The plant heat stress transcription factors (HSFs): structure, regulation, and function in response to abiotic stresses. **Front. Plant Science**. 7:114, 2016.

GUPTA S. C. et al. Induction of Hsp70, alteration in oxidative stress markers and apoptosis against dichlorvos exposure in transgenic *Drosophila melanogaster*: modulation by reactive oxygen species. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1770, p.1382-1394, 2007.

GUTIERREZ, L. et al. The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants. **Plant Biotechnology Journal**, v.6, n.6, p.609–18, 2008.

HABASHY W.S. et al., Expression of genes that encode cellular oxidant/antioxidant systems are affected by heat stress. **Molecular Biology Reports**, v.45, p.389-394, 2018.

HAIBO YU. et al. Antioxidant defenses of *Onychostoma macrolepis* in response to thermal stress: Insight from mRNA expression and activity of superoxide dismutase and catalase. **Fish and Shellfish Immunology**, v.66, p.50-61, 2017.

HANSEN, P. J. Effects of heat stress on mammalian reproduction. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 364, n. 1534, p. 3341–50, 2009.

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.

HELDT, H.W.; HELDT, F. Mitochondria are the power station of the cell. **Plant biochemistry**, p.135-164, 2005.

HOLOVSKÁ Jr. et al., Antioxidant enzyme activities in liver tissue of chickens fed diets supplemented with various forms and amounts and selenium. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v.12, p.143-152, 2003.

ISLAM A. et al. Tissue-specific upregulation of HSP72 in mice following short-term administration of alcohol. **Cell Stress Chaperones**, v.18, p.215-222, 2013.

IVANOV A. V.; VALUEV-ELLISTON V. T.; IVANOVA O. N. et al. Oxidative stress during HIV infection: mechanisms and consequences. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, Article ID 8910396, 18 pages, 2016.

JINDAL, P. G. et al. Heat shock proteins in pathology: A review. **Journal of Pierre Fauchard Academy**, v.30, p.84-87, 2016.

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.

KAMPINGA H. H.; CRAIG E.A. The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. **Nature reviews**, v.11, p.579-592, 2010.

KARP G. **Biologia celular e molecular: conceitos e experimentos**. 3a Ed. Editora Manole, São Paulo, p.832, 2005.

KHAN, Z. A.; MISHRA C.; JYOTIRANJAN T. In silico analysis of caprine superoxide dismutase 1 (SOD1) gene. **Genomics**, pii: S0888-7543(18)30636-0. doi:10.1016/j.ygeno.2019.01.016.

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

KUMAR, M. et al. Protective effects of green and white tea against benzo (a) pyrene induced oxidative stress and DNA damage in murine model. **Nutrition and Cancer**, v.64, n.2, p.300-6, 2012.

LEI, et al. Expression of heat shock protein 90 (Hsp90) and transcription of its corresponding mRNA in broilers exposed to high temperature. **Poultry Science**, v.50, p.504–511, 2009.

LIN, H.; DECUYPERE, E.; BUYSE J. Oxidative stress induced by corticosterone administration in broiler chickens (*Gallus gallus domesticus*): Short-term effect. **Comparative Biochemistry and Physiology B Biochemistry and Molecular Biology**, v.139, p.745–751, 2004.

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

LING, D. SASqPCR: robust and rapid analysis of RT-qPCR data in SAS. **Plos One**, v.287, n.1, p.e29788, 2012.

LIU, T. et al. Comprehensive review on the HSC70 functions, interactions with related molecules and involvement in clinical diseases and therapeutic potential. **Pharmacology and Therapeutics**, v.136, p.354–374, 2012.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)) Method. **Methods**, v.25, n.4, p. 402–8, 2001.

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

MALLICK N.; MOHN F. H. Reactive oxygen species: response of algal cells. **Journal of Plant Physiology**, v.157, p.183-193, 2000.

MANOLI, I. et al., Mitochondria as key components of the stress response. **Trends Endocrinology & Metabolism**, v.18, n.5, p.190–198, 2007.

MARIANTE, A. S. et al. Present status of the conservation of livestock genetic resources in Brazil. **Livestock Science**, v.120, n.3, p.204–212, 2009.

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.; YOSHIKI, Y.; AKIBA, Y.; TOYOMIZU, M. Superoxide radical production in chicken skeletal muscle induced by acute heat stress. **Poultry Science**. v.84, p.307–314, 2005.

NAKAMURA M.; MORITA M.; KURIHARA H.; MITARAI S. Expression of hsp70, hsp90 and hsf1 in the reef coral *Acropora digitifera* under prospective acidified conditions over the next several decades. **Biology Open**, v.1, p.75-81, 2012.

NASCIMENTO, C. S.; BARBOSA, L. T.; BRITO, C.; 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.1 – 15, 2015.

NOVER L., et al. Arabidopsis and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need? **Cell Stress & Chaperone**, v.6, n.3, p. 177–189, 2001.

O'CONNOR, C. M.; ADAMS, J. U. Essentials of Cell Biology. Online ed. [s.l.] NPG Education, 2010.

PEARL, L. H. Hsp90 and Cdc37 - a chaperone cancer conspiracy. **Current Opinion in Genetics & Development**, v.15, p.55-61, 2005.

PFAFFL, 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**, v.26, n.6, p.509–15, 2004.

QUEITSCH, C., SANGSTER, T.A., LINDQUIST, S. Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation. **Nature**, v.417, p.618-624, 2002.

REHMAN Z. U.; CHE L.; REN S. et al. Supplementation of vitamin E protects chickens from Newcastle disease virus-mediated exacerbation of intestinal oxidative stress and tissue damage, **Cellular Physiology and Biochemistry**, vol.47, no.4, p.1655–1666, 2018.

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**, v.6, p.17–25, 2015.

- ROMANO, G. et al. Small non- coding RNA and cancer. **Carcinogenesis**, v.38, p.485-491, 2017.
- RUTLEDGE, R. G.; CÔTÉ, C. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. **Nucleic Acids Research**, v.31, n.16, p.93–93, 2003.
- SAGRILO, E. et al. **Agricultura Familiar - Galinha Caipira**. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/AgriculturaFamiliar/RegiaoMeioNorteBrasil/GalinhaCaipira/index.htm>>. Acesso em: 19 jan. 2018.
- SANGSTER, T. A.; QUEITSCH, C. The HSP90 chaperone complex, an emerging force in plant development and phenotypic plasticity. **Current Opinion in Plant Biology**, v.8, p.86-92, 2005.
- SANGSTER, T. A. et al. HSP90 affects the expression of genetic variation and developmental stability in quantitative traits. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.105, p.2963-2968, 2008.
- SANTORO M.G. Heat shock factors and the control of the stress response. **Biochemical Pharmacology**. v.59, p.55-63, 2000.
- SHIH-HAN, W. et al. Differential gene expressions in testes of L2 strain Taiwan country chicken in response to acute heat stress. **Theriogenology**, v.79, p.374–382, 2013.
- SCHARF, K. D.; BERBERICK, T.; EBERSBERGER, I.; Nover. The plant heat stress transcription factor (Hsf) family: structure, function and evolution. **Biochemistry Biophysical Acta**. v.1819, p.104–119, 2012.
- SILVER, N. et al. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. **BMC Molecular Biology**, v.7, n.1, p.33, 2006.
- SONG, Z., CHENG, K., ZHANG, L., WANG, T. 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.
- STEPHANOU, A.; LATCHMAN, D. S. Transcriptional modulation of heat-shock protein gene expression. **Biochemistry Research International**, v. 2011, 2011.
- TAN, G. Y. et al. Effects of different acute high ambient temperatures on function of hepatic mitochondrial respiration, antioxidative enzymes, and oxidative injury in broiler chickens. **Poultry Science**, v.89, p.115–122, 2010.

TANG, S. et al. Heat stress-induced renal damage in poultry and the protective effects of HSP60 and HSP47. **Cell Stress and Chaperones**, v.23, p. 1033-1040, 2018.

TEAM, R. C. **A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing Vienna, 2015**. Disponível em: <http://www.r-project.org/>. Acesso em: 15 de fev. de 2019.

TEIXEIRA, M. P. F. **Vitamina C em ração para frangos de corte estressados por calor**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade Universidade Federal do Piauí, Piauí.

TINOCO, I. F. F. Avicultura industrial: novos conceitos de materiais, concepções e técnicas construtivas disponíveis para galpões avícolas brasileiros. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.3, n.1, p.1- 26, 2001.

TIROLI-CEPEDA, A.O.; RAMOS, C.H. An Overview of the Role of Molecular Chaperones in Protein Homeostasis. **Protein & Peptide Letters**, v.18, p.101-109, 2011.

TREPEL, J.; MOLLAPOUR, M.; GIACCONE, G.; NECKERS, L. Targeting the dynamic HSP90 complex in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v.10, p.537-549, 2010.

TOADER, M.; ROMAN, G. V. Family Farming – Examples for Rural Communities Development. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v.6, p. 89-94, 2015.

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

VELCULESCU, V. E. et al. Serial Analysis of Gene Expression. **Science**, v.270, n.5235, p. 484–487, 1995.

WANG, Q. et al. Stability of endogenous reference genes in postmortem human brains for normalization of quantitative real-time PCR data: comprehensive evaluation using geNorm, NormFinder, and BestKeeper. **International Journal of Legal Medicine**, v.126, n.6, p.943–52, 2012.

WESTERHEIDE, S. et al. HSF transcription factor family, heat shock response, and protein intrinsic disorder. **Current Protein and Peptide Science**, v.13, p.86–103, 2012.

WILLEMSEN, H.J. et al., Effects of dietary supplementation of methionine and its hydroxy analog dl-2-hydroxy-4-methylthiobutanoic acid on growth performance,

plasma hormone levels, and the redox status of broiler chickens exposed to high temperatures. **Poultry Science**. v.90, p.2311–2320, 2011.

XIE, J. et al. Effects of acute and chronic heat stress on plasma metabolites, hormones and oxidant status in restrictedly fed broiler breeders. **Poultry Science** v.94, p.1635–1644, 2015.

YU, J. et al. Expression and localization of Hsps in the heart and blood vessel of heat-stressed broilers. **Cell Stress and Chaperones**, v.13, n.3, p.327–335, 2008.

ZHANG, Z. et al. Effects of constant and cyclic heat stress on muscle metabolism and meat quality of broiler breast fillet and thigh meat. **Poultry Science**, v.91, p.2931–2937, 2012.

ZHANG, T. W. T.; LI Y.; CHENG X. A eukaryotic expression plasmid carrying chicken interleukin-18 enhances the response to Newcastle disease virus vaccine. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.22, n.1, p.56–64, 2014.

ZHENG, J. et al. Effects of thermal stress on oxidative stress and antioxidant response, heat shock proteins expression profiles and histological changes in *Marsupenaeus japonicas*. **Ecological Indicators**, v.101, p.780-791, 2019.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Analisar e comparar a expressão gênica relativa em fragmentos do tecido coração e fígado do ecotipo Peloco e frangos de corte de linhagem comercial (Cobb500[®]), submetidas ao estresse térmico agudo utilizando sequências de genes das famílias das HSPs, HSFs e genes relacionados ao estresse oxidativo de *Gallus gallus*.

3.2 Objetivos específicos:

Identificar genes de referência estáveis para a normalização da expressão relativa dos genes alvos em fragmentos de fígado e coração em aves geneticamente divergentes sobre efeito de conforto térmico e estresse térmico agudo;

Quantificar a expressão relativa dos genes alvos (*HSF1*, *HSF3*, *HSP70*, *HSP90*, *SOD*, *CAT* e *GPX*) em fragmentos de fígado e coração em aves submetidas ao estresse térmico por calor.

Comparar o nível de expressão de genes alvo nos tecidos de frangos geneticamente divergentes submetidos aos ambientes de conforto e estresse térmico agudo.

4. CAPÍTULO I

INFLUÊNCIA DO ESTRESSE TÉRMICO SOBRE A ESTABILIDADE DOS GENES DE REFERÊNCIA EM CORAÇÃO E FÍGADO DE FRANGOS

RESUMO

A PCR em tempo real é uma ferramenta importante para analisar a expressão de genes. Para tanto é necessário que haja a normalização dos genes de referência, a fim de encontrar o gene mais estável para ser usado como controle endógeno nas análises de genes alvos. É considerado um bom normalizador o gene que permanece estável em todas as amostras em diferentes tratamentos. Dessa forma, objetivou-se com esse trabalho identificar genes de referência estáveis para normalização de genes alvos em coração e fígado de dois grupos de frangos geneticamente divergentes submetidos ao estresse térmico. Foram analisados oito genes de referência (*ACTB*, *HPRT1*, *RPL5*, *EEF1*, *MRPS27*, *MRPS30*, *TFRC* e *LDHA*) quanto à estabilidade de expressão. O experimento foi realizado com 24 amostras de frangos, sendo 12 do ecotipo Peloco e 12 da linhagem comercial Cobb 500[®] que foram submetidos a dois ambientes (conforto térmico e estresse térmico agudo). A temperatura que os frangos foram submetidos ao estresse térmico foi de 39,5°C por 1 hora e de conforto, 23°C. Posteriormente, os animais foram abatidos, e foram coletados fragmentos de coração e fígado para extração de RNA e amplificação. Para determinar a taxa de estabilidade da expressão gênica, foram aplicados três algoritmos estatísticos diferentes: BestKeeper, GeNorm e NormFinder. Além disso, foi utilizada a ferramenta RankAggreg, que baseada nos três algoritmos apresenta um ranking geral. Os genes mais estáveis no BestKeeper incluindo os dois fatores (raça e ambiente) para o tecido coração foram o *LDHA*, *RPL5* e *MRPS27*, e para o tecido fígado, foram *TFRC*, *RPL5* e *EEF1*. Na ferramenta GeNorm para o tecido coração, os melhores genes foram o *RPL5*, *EEF1* e *MRPS30* e no fígado os genes mais estáveis foram *LDHA*, *EEF1* e *RPL5*. Utilizando o algoritmo NormFinder, os genes mais estáveis para o tecido coração foram *EEF1*, *RPL5* e *LDHA*, já no fígado os genes mais estáveis foram o *EEF1*, *RPL5* e *ACTB*. No ranking geral obtido pelo software RankAggreg, incluindo todos os fatores e as três ferramentas, os genes indicados como mais estáveis para o tecido coração foram o *RPL5*, *EEF1* e *LDHA*, enquanto que para o tecido fígado os mais estáveis foram o *RPL5*, *EEF1* e *ACTB*. Diante disso, foi possível concluir que o *RPL5* é indicado como normalizador mais estável para ambos os tecidos de frangos no ambiente conforto e de estresse térmico agudo.

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

INFLUENCE OF THERMAL STRESS AND GENETIC GROUPS ON THE STABILITY OF REFERENCE GENES IN HEART AND BIRD LIVER

ABSTRACT

Real-time PCR is an important tool for analyzing gene expression. To do so, it is necessary to normalize the reference genes in order to find the most stable gene to be used as endogenous control in the analysis of target genes. The gene that remains stable in all samples in different treatments is considered a good normalizer. Thus, the objective of this work was to identify stable reference genes for normalization of target genes in the heart and liver of two groups of genetically divergent chickens submitted to thermal stress. Eight reference genes (*ACTB*, *HPRT1*, *RPL5*, *EEF1*, *MRPS27*, *MRPS30*, *TFRC* and *LDHA*) were analyzed for expression stability. The experiment was carried out with 24 chickens, 12 of the Peloco ecotype and 12 of the Cobb 500[®] commercial strain that were submitted to two environments (heat stress and comfort). The temperature that the chickens underwent thermal stress was 39.5 ° C and comfort, 23 ° C, for 1 hour. Afterwards, the animals were slaughtered, and heart-to-liver fragments were collected for RNA extraction and amplification. To determine the rate of stability of gene expression, three different statistical algorithms were applied: BestKeeper, GeNorm and NormFinder. In addition, we used the RankAggreg tool, which based on the three algorithms presents a general ranking. The most stable genes in BestKeeper including the two factors (race and environment) for heart tissue were *LDHA*, *RPL5* and *MRPS27*, and for liver tissue, were *TFRC*, *RPL5* and *EEF1*. In the GeNorm tool for heart tissue, the best genes were *RPL5*, *EEF1* and *MRPS30* and in the liver the most stable genes were *LDHA*, *EEF1* and *RPL5*. Using the NormFinder algorithm, the most stable genes for the heart tissue were *EEF1*, *RPL5* and *LDHA*, whereas in the liver the most stable genes were *EEF1*, *RPL5* and *ACTB*. In the general ranking obtained by the RankAggreg software, including all variables and the three statics tools, the genes most indicated for heart tissue were *RPL5*, *EEF1* and *LDHA*, whereas for liver tissue the most stable were *RPL5*, *EEF1* and *ACTB*. Therefore, it was possible to conclude that *RPL5* is indicated as a more stable normalizer for both chicken tissues in the comfort environment and acute thermal stress.

Keywords: RT-qPCR, Peloco, Endogenous Control, BestKeeper, GeNorm, NormFinder.

4.1 Introdução

A PCR em tempo real é uma técnica muito utilizada para estudos de expressão gênica, visto que é um método sensível e eficiente para a análise de transcritos (BUSTIN et al., 2005; NOLAN; HANDS; BUSTIN, 2006). Para tanto é necessário a correção das variações técnicas que são inerentes da qualidade e da quantidade do RNA introduzidas durante o procedimento de extração, da transcrição reversa e eficiência da PCR, a fim de se obter resultados confiáveis de expressão (FLEIGE; PFAFFL, 2006; UDVARDI; CZECHOWSKI; SCHEIBLE, 2008). O método mais utilizado para obtenção de resultados confiáveis é a normalização para um controle endógeno, a fim de escolher um gene de referência (GR) estável, que será utilizado como normalizador dos genes alvos (OLIAS et al., 2014).

Um gene de referência indicado como normalizador deve ser um gene onde os níveis de expressão se mantem estáveis independente da espécie, tecido, tratamento e condições experimentais. Porém, é importante estabelecer um gene de referência para cada nova condição experimental, com o intuito de controlar as variações que possam vir influenciar nos resultados (VANDESOMPELE et al., 2002). Os GRs que geralmente são utilizados como normalizadores são aqueles que fazem parte da estrutura celular ou de rotas essenciais das células, como o *GAPDH* (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase), *18S* e *28S* (rnas ribossomais), *ACTB* (beta actina), *RPL5* (proteína ribossomal L5), entre outros (NERREN et al., 2010).

Diante disso, a estabilidade da expressão desses genes de referência necessita ser avaliada antes de ser usado como normalizador dos genes alvos, já que a utilização desses genes podem influenciar os resultados do mRNA e a quantificação (BUSTIN, 2000; RODONIC et al., 2004; DHEDA et al., 2005). Para analisar a estabilidade desses genes, existem ferramentas específicas, e dentre as mais utilizadas estão o BestKeeper (PFAFFL et al., 2004), GeNorm (VANDESOMPELE et al., 2002), e NormFinder (ANDERSEN, et al., 2004). Essas ferramentas permitem analisar os dados de expressão obtidos da RT-qPCR, avaliando a estabilidade dos genes de referência testados e indicando os mais adequados, para ser utilizado como normalizador. Contudo, para que o procedimento de normalização seja eficaz, é necessário eficiências de amplificação

adequadas, tanto dos genes de referência, como dos genes alvos (NOLAN; HANDS; BUSTIN, 2006)

Vários estudos tem demonstrado a estabilidade de genes de referência na normalização dos genes alvos em diferentes tecidos e espécies como bovinos (LISOWSKI et al., 2008), suínos (MARTÍNEZ-GINER et al., 2013), peixes (ZHENG; SUN, 2011; YANG et al., 2013), fígado de frangos de corte (BAGÉS et al., 2015; NASCIMENTO et al., 2015), pulmão e coração de frangos de corte (HASSANPOUR et al., 2018) e em músculo do ecotipo Peloco (CEDRAZ, et al., 2017).

Porém, até o presente momento, não existem trabalhos descritos na literatura que tenham avaliado genes de referência em coração e fígado da Peloco, sob condições de conforto e estresse térmico agudo.

Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi identificar genes de referência estáveis para a normalização de genes alvos no tecido coração e fígado de dois grupos de frangos geneticamente divergentes (Cobb 500[®] e Peloco), sob condições de conforto e estresse térmico agudo.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Animais

Para a realização do experimento foram utilizadas 24 aves, entre machos e fêmeas sendo, 12 pintos da raça Peloco (6 controles e 6 estressadas por calor) e 12 pintos comerciais Cobb 500[®] (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 sobre as mesmas condições ambientais no período entre dois de novembro a dois de dezembro de 2015. Essas aves foram alimentadas seguindo as exigências nutricionais (ROSTAGNO; GOMES; 2011) e foram criadas em galpão aberto forrado com maravalha (raspas de madeira). Todo o experimento teve aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/UESB, Protocolo 109/2015.

4.2.2 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. Inicialmente 6 aves Peloco foram submetidas ao estresse térmico por calor em temperatura média de 39,5°C, com umidade relativa de 60%, por uma hora, com água e comida à vontade. Em outro momento, 6 aves da raça Cobb 500[®] foram submetidas ao estresse térmico sob as mesmas condições. Durante todo o período em que as aves ficaram submetidas ao estresse térmico, elas foram observadas, a fim de verificar o comportamento das mesmas, evitando assim que viessem a óbito durante o período de estresse. 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).

4.2.3 Coleta de tecidos, extração de RNAs e quantificação

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

Inicialmente foi realizada a extração do RNA total das amostras selecionadas com Trizol[®] seguindo o protocolo do fabricante. As concentrações dos RNA's extraídos foram verificadas através de espectrofotômetro NanoDrop 2000[®] e a qualidade desses RNA's através de eletroforese em gel de agarose à 1% corados com brometo de etídio e visualizados em luz ultravioleta.

4.2.4 Transcrição Reversa do mRNA

A transcrição Reversa foi realizada com o kit comercial *GoScript™ reverse Transcription System* (Promega Corporation, Madison, EUA). Foram utilizados, 2 µl

de RNA obtidos a partir dos tecidos (fígado e coração), acrescidos de 10 µl de 10X RT buffer, 4µl de dNTP, 1 µl de Oligodt, 1 µl da enzima *Transcriptase Reversa*, 1 µl de inibidor de ribonuclease recombinante RNase OUT, e água ultrapura, para um volume final de 20 µl. As amostras foram incubadas em termociclador a 50°C por 50 min, em seguida submetidas a 85°C por 5 min, e refrigeradas em gelo. O cDNA obtido foi armazenado em freezer -20°C, para posterior utilização nos experimentos de expressão gênica.

4.2.5 Seleção de genes de referência e otimização da RT-qPCR

Foram selecionados na literatura, sequências de oito diferentes genes de referência (NASCIMENTO et al., 2015) para análise da estabilidade de expressão e para posterior estudos de expressão gênica (**Tabela 1**).

Para calcular a eficiência da PCR, uma curva padrão foi construída a partir de um *pool* de cDNA de todos os tratamentos e fatores, tanto para o tecido fígado, como para o tecido coração. Para tanto foram realizadas as seguintes diluições: 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 *primer* 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 no Sistema 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 RT-qPCR.

Tabela 1. Descrição dos genes de referência de *Gallus gallus* e seus *primers* específicos utilizados nas análises de RT-qPCR. Todos os *primers* foram desenhados por NASCIMENTO et al., (2015).

GENE	ID GENE	SEQUÊNCIA 5' - 3'	DESCRIÇÃO
<i>ACTB</i>	M11100.1	F: CACCCTGTCTGACTACAACATC R: ACAAGACTGCTGACAACAATA	Beta actina
<i>HPRT1</i>	AJ132697	F: GCACTATGACTCTACCGACTATT R: CAGTTCTGGGTTGATGAGGTT	Hipoxantina fosforibosiltransferase 1
<i>MRPS27</i>	XM_424803	F: GCTCCCAGCTCTATGGTTATG R: ATCACCTGCAAGGCTCTATTT	Proteína ribossômica mitocondrial S27
<i>TFRC</i>	ENSGALE00000080099	F: CTCCTTTGAGGCTGGTGAG R: CGTTCCACACTTTATCCAAGAAG	Receptor de transferrina
<i>LDHA</i>	ENSGALE00000067556	F: CTATGTGGCCTGGAAGATCAG R: GCAGCTCAGAGGATGGATG	Lactato desidrogenase A
<i>EEF1</i>	NM_204157.2	F: GCCCGAAGTTCCTGAAATCT R: AACGACCCAGAGGAGGATAA	Fator de alongamento de tradução eucariótica 1 alfa
<i>MRPS30</i>	NM_204939.1	F: CCTGAATCCCGAGGTTAACTATT R: GAGGTGCGGCTTATCATCTATC	Proteína ribossômica mitocondrial S30
<i>RPL5</i>	NM_204581.4	F: AATATAACGCCTGATGGGATGG R: CTTGACTTCTCTTTGGGTTTCT	Proteína ribossomal L5

4.2.6 PCR quantitativa em tempo real

Após calcular os valores de eficiência e escolher os melhores parâmetros (T° de anelamento, concentração de *primer* 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 duplicata.

4.2.7 Determinação da estabilidade da expressão dos genes de referência

Para determinar a estabilidade dos genes de referência, foi utilizado os valores médios de Ct, que foi usado como arquivo de entrada, de acordo com cada algoritmo. Foram aplicados três algoritmos estatísticos diferentes, o BestKeeper (PFAFFL et al., 2004), GeNomr (VANDESOMPELE 2002) e NormFinder

(ANDERSEN et al., 2004). Todas as análises foram realizadas no software estatístico R (TEAM, 2015). Além disso, foi gerado um ranking geral para cada tecido empregando as três ferramentas através do algoritmo RankAgreeg (PIHUR; DATTA; DATTA, 2007)

Na abordagem da ferramenta estatística BestKeeper, a relação intergene, o coeficiente de correlação de Pearson, a integridade da amostra e a estabilidade da expressão em cada gene de referência foram calculados por uma variação intrínseca da expressão. Os dados genéticos que indicam maiores valores de correlação são incorporados para calcular a média geométrica dos valores de Ct como índice de BestKeeper. Em seguida, o coeficiente de correlação de Pearson é contado entre cada gene e o índice, o que fornece uma estimativa da participação do gene nesse índice (PFAFFL et al., 2004).

O processo de cálculo no programa GeNorm é baseado em valores de Ct normalizados, nos quais os valores individuais de um gene são normalizados para a amostra com o menor valor de Ct (a expressão mais alta) para esse gene. Os valores de Ct normalizados são estimados segundo Vandesompele et al. (2002). Nesta abordagem, a variação de pares de um gene específico é caracterizada com todos os outros genes de controle como o desvio padrão das razões de expressão transformadas logaritmicamente.

A estabilidade do gene de controle interno (M) é determinada como a média da variação paritária de um gene com outros genes de referência. O menor valor M significa que a expressão do gene é a mais estável. Para escolher o (s) melhor (s) gene (s) de referência, o método GeNorm novamente conta a estabilidade M após a eliminação do gene menos estável e repete a análise até que apenas os 2 genes mais estáveis permaneçam. A abordagem GeNorm também determina o número mínimo de genes de referência necessários para a normalização adequada dos dados (VANDESOMPELE et al., 2002).

O NormFinder é uma abordagem que usa valores de Ct normalizados e estima a variação global dos genes de referência à normalização e a variação entre os subgrupos das mesmas amostras. Este método aplica as variações intra e intergrupos para calcular um valor de estabilidade para cada gene. Os genes de referência candidatos podem então ser classificados com base no valor de estabilidade, onde os menores valores correspondem aos genes mais estáveis (ANDERSEN et al., 2004; STAINES et al., 2016). Para cada ferramenta foi obtido um

ranking de estabilidade, e empregando as três diferentes abordagens estatísticas, foi obtido uma lista agregada gerada pelo programa RankAgregg (PIHUR; DATTA; DATTA, 2007).

4.3 Resultados

4.3.1 Eficiência e especificidade dos *primers*

Foi realizado o teste de eficiência da reação para verificar as principais características dos *primers* antes da realização da RT-qPCR. A temperatura dos *primers* variou entre 60 e 62 graus, sendo que a melhor eficiência foi com concentração de cDNA de 45ng/μl e *primer* de 400mM, tanto para coração como para fígado. A eficiência de amplificação variou entre 95% a 102%, o que é aceitável de acordo com a literatura, indicando boa correlação linear. A especificidade do *primer* foi avaliada através da curva de dissociação e visualização em gel de agarose, não sendo observado dímeros ou bandas inespecíficas.

4.3.2 Estatística descritiva dos genes de referência

Foram analisados oito genes de referência através da técnica de RT-qPCR e foi observado que houve grande variabilidade de expressão entre os genes no fígado e coração dos dois diferentes grupos genéticos. As tabelas de 2 a 5 apresentam os dados da estatística descritiva para ambos os tecidos e grupos genéticos de frangos, empregando o algoritmo estatístico BestKeeper. Na linhagem Cobb 500[®], no tecido coração os genes *RPL5* e *ACTB* foram altamente expressos, uma vez que apresentaram valores de Ct de 17,12 e 17,36, respectivamente. Já os genes *HPRT1*, *MRPS27*, *LDHA*, *MRPS30*, *EEF1* e *TFRC* tiveram uma expressão moderada variando entre 24 e 29 ciclos (NASCIMENTO et al., 2015). Também foi possível notar um alto coeficiente de variação, sendo que o valor mais baixo corresponde ao gene *MRPS30* (CV= 2,752) e o mais alto ao gene *HPRT1* (CV=6,773) para este tecido.

Já em relação ao desvio padrão, para que um gene seja considerado estável, o valor do desvio deve estar situado abaixo de 1,0 (PFAFFL et al., 2004). Dessa forma, três genes foram considerados estáveis na linhagem Cobb 500[®] para o tecido coração: o *RPL5*, *MRPS30* e *EEF1*, cujos desvios padrão foram 0,735; 0,753 e 0,733 respectivamente. Os demais genes apresentaram desvios padrão superior a 1,0 (**Tabela 2**).

Tabela 2. Estatística descritiva dos níveis de expressão dos genes de referência obtidos pelo BestKeeper, em coração da linhagem Cobb 500[®] submetido ao ambiente de conforto (23°C) e estresse térmico agudo (39,5°C).

n = 12	<i>RPL5</i>	<i>LDHA</i>	<i>MRPS30</i>	<i>EEF1</i>	<i>ACTB</i>	<i>HPRT1</i>	<i>MRPS27</i>	<i>TFRC</i>
Média geométrica [Cq]	17,12	25,88	27,34	27,34	17,36	24,69	24,71	29,62
Média aritmética [Cq]	17,15	25,91	27,36	20,83	17,41	24,75	24,75	29,66
min [Cq]	15,58	23,9	25,46	19,93	15,68	22,39	22,52	27,19
max [Cq]	20,03	28,98	29,34	24,27	20,68	27,07	27,38	32,57
Desvio padrão [± Cq]	0,735	1,044	0,753	0,733	1,143	1,677	1,16	1,162
CV [% Cq]	4,282	4,029	2,752	3,52	6,566	6,773	4,686	3,917
Coef. de correlação [r]	0,863	0,922	0,713	0,883	0,547	0,589	0,624	0,468

Ao avaliar o mesmo tecido, mas no ecotipo Peloco, os genes *RPL5*, *ACTB* e *EEF1* apresentaram alta expressão, com valores de Ct de 17,25; 19,85 e 21,18, respectivamente. Os demais genes tiveram variação de expressão de 24 e 29 ciclos, ou seja, apresentaram expressão moderada (NASCIMENTO et al., 2015); diante disso, é possível observar um baixo coeficiente de variação quando se compara aos valores obtidos para a linhagem Cobb 500[®]; nessa situação o valor mais baixo foi do gene *TFRC* (CV= 3,616) e o mais alto do gene *ACTB* (CV= 5,086). Avaliando o desvio padrão, os genes considerados estáveis no coração de Peloco, foram o *RPL5*, *EEF1* e o *HPRT1* cujos desvios foram 0,806; 0,834 e 0,933 respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3. Estatística descritiva dos níveis de expressão dos genes de referência obtidos pelo BestKeeper, em coração da Peloco submetido ao ambiente de conforto (23°C) e estresse térmico agudo (39,5°C).

n = 12	<i>RPL5</i>	<i>LDHA</i>	<i>MRPS30</i>	<i>EEF1</i>	<i>ACTB</i>	<i>HPRT1</i>	<i>MRPS27</i>	<i>TFRC</i>
Média geométrica [Cq]	17,25	26,07	27,44	21,18	19,85	24,82	25,36	29,51
Média aritmética [Cq]	17,27	26,09	27,47	21,2	19,89	24,85	25,39	29,54
min [Cq]	15,21	24,29	24,41	19,93	17,97	23,45	22,91	21,2
max [Cq]	18,83	27,95	29,56	22,88	22,59	27,29	27,71	31,65
Desvio padrão [± Cq]	0,806	1,037	1,238	0,834	1,012	0,933	1,026	1,068
CV [% Cq]	4,663	3,972	4,504	3,934	5,086	3,753	4,04	3,616
Coef. de correlação [r]	0,661	0,823	0,774	0,803	0,702	0,779	0,831	0,324

Para o tecido fígado na linhagem Cobb 500[®], dos oito genes avaliados, o *RPL5*, *EEF1* e o *ACTB* baseado nos valores de Ct, tiveram alta expressão (Ct=

18,18; 20,38; 20,75, respectivamente). Os demais genes apresentaram expressão moderada, com valores de Ct variando entre 24 a 30,03. No entanto, todos os genes mostraram alta variância. Apesar dos genes *RPL5*, *EEF1* e *ACTB* apresentarem alta expressão, os seus desvios padrão estão situados acima de 1,0 sendo considerado não estáveis, assim como os demais genes (**Tabela 4**).

Tabela 4. Estatística descritiva dos níveis de expressão dos genes de referência obtidos pelo BestKeeper, em fígado da linhagem Cobb 500[®] submetido ao ambiente de conforto (23°C) e estresse térmico agudo (39,5°C).

n = 12	<i>RPL5</i>	<i>LDHA</i>	<i>MRPS30</i>	<i>EEF1</i>	<i>ACTB</i>	<i>HPRT1</i>	<i>MRPS27</i>	<i>TFRC</i>
Média geométrica [Cq]	18,18	24,6	25,86	20,38	20,75	29,64	27,07	30,03
Média aritmética [Cq]	19,25	24,7	25,92	20,44	20,81	29,67	27,2	30,07
min [Cq]	17,54	21,82	23,69	18,55	17,95	28,06	24,35	27,76
max [Cq]	22,96	28,58	29,55	24,11	23,13	32,25	34,3	32,36
Desvio padrão [\pm Cq]	1,293	2,072	1,45	1,42	1,164	1,211	2,147	1,419
CV [% Cq]	6,716	8,385	5,593	6,953	5,594	4,082	7,892	4,719
Coef. de correlação [r]	0,842	0,856	0,757	0,891	0,887	0,47	0,604	0,409

Avaliando os resultados do tecido fígado do ecotipo Peloco, o gene *RPL5* apresentou uma alta expressão (Ct= 16,26), enquanto que os demais genes tiveram expressão moderada. Em relação ao coeficiente de variação, o *RPL5* e o *TFRC* foram os genes com menor dispersão (CV= 4,86 e 4,3 respectivamente), quando comparado aos demais. Já em relação ao desvio padrão, apenas o *RPL5* teve um desvio menor que 1,0 e dessa forma foi considerado um gene estável nesse tecido (**Tabela 5**).

Tabela 5. Estatística descritiva dos níveis de expressão dos genes de referência obtidos pelo BestKeeper, em fígado da Peloco submetido ao ambiente de conforto (23°C) e estresse térmico agudo (39,5°C).

n = 12	<i>RPL5</i>	<i>LDHA</i>	<i>MRPS30</i>	<i>EEF1</i>	<i>ACTB</i>	<i>HPRT1</i>	<i>MRPS27</i>	<i>TFRC</i>
Média geométrica [Cq]	16,26	26,06	27,42	21,46	22,7	30,3	28,64	30,4
Média aritmética [Cq]	19,29	26,12	27,49	21,54	22,79	30,36	28,71	30,44
min [Cq]	17,55	22,48	24,29	18,81	19,3	28,14	25,23	27,95
max [Cq]	22,28	29,69	32,17	25,36	26,5	34,63	32,89	32,75
Desvio padrão [\pm Cq]	0,939	1,469	1,463	1,46	1,714	1,505	1,564	1,309
CV [% Cq]	4,866	5,622	5,32	6,777	7,519	4,958	5,445	4,3
Coef. de correlação [r]	0,944	0,929	0,953	0,898	0,879	0,903	0,962	0,703

4.3.3 Estabilidade de expressão dos genes de referência

Para que as análises de estabilidade pudessem contemplar todos os fatores, os dados foram divididos em dois grupos para cada um dos tecidos: grupo genético (considerando o ecotipo Peloco e a linhagem Cobb 500[®]) e ambiente (considerando conforto térmico e estresse térmico agudo). No tecido coração, de acordo com a ferramenta BestKeeper, considerando apenas o grupo genético (Cobb 500[®] e Peloco) os melhores genes de referência foram o *EEF1* (0,733) e *RPL5* (0,806), respectivamente. Já considerando o ambiente (conforto térmico e estresse térmico agudo), os melhores genes de acordo com o valores obtidos foram o *RPL5* (0,529) e o *LDHA* (0,968), respectivamente. No ranking geral do BestKeeper, envolvendo os grupos genéticos e as duas condições ambientais, o gene *LDHA* foi considerado o mais estável e o menos estável foi o *ACTB* (**Tabela 6**).

Tabela 6. Ranking com os valores de estabilidade de cada fator (raça e ambiente) em coração de frangos, obtidos através da ferramenta BestKeeper.

Genes	Cobb n=12	Peloco n=12	Conforto n=12	Estresse n=12	Rank BestKeeper
<i>ACTB</i>	1,143 (5)	1,012 (4)	1,133 (8)	1,705 (8)	8
<i>EEF1</i>	0,733 (1)	0,834 (2)	0,673 (2)	1,018 (3)	4
<i>HPRT1</i>	1,677 (8)	0,933 (3)	1,108 (7)	1,318 (7)	5
<i>LDHA</i>	1,044 (4)	1,037 (6)	0,806 (3)	0,968 (1)	1
<i>MRPS27</i>	1,16 (6)	1,026 (5)	0,862 (4)	1,24 (6)	3
<i>MRPS30</i>	0,753 (3)	1,238 (8)	0,887 (5)	1,074 (4)	6
<i>RPL5</i>	0,735 (2)	0,806 (1)	0,529 (1)	1,012 (2)	2
<i>TFRC</i>	1,162 (7)	1,068 (7)	1,06 (6)	1,147 (5)	7

Ao utilizar a ferramenta estatística GeNorm, também foram gerados ranking de estabilidade dos genes de referência para cada grupo genético e dos ambientes. No grupo genético, os genes mais estáveis foram o *RPL5* e *EEF1* (0,58) para a linhagem Cobb 500[®] e para a Peloco o *LDHA* e *RPL5* (0,66). Em relação ao ambiente, os melhores genes foram o *EEF1* e *RPL5* (0,53) para a situação de conforto térmico e *EEF1* e *RPL5* (0,70) para o estresse térmico agudo. No ranking geral obtido através dessa ferramenta, o gene *RPL5* foi o mais estável e o *ACTB* o menos estável (**Tabela 7**).

Tabela 7. Ranking com os valores de estabilidade de cada fator (raça e ambiente) em coração de frangos, obtidos através da ferramenta GeNorm.

Genes	Cobb n=12	Peloco n=12	Conforto n=12	Estresse n=12	Rank Genorm
<i>ACTB</i>	1,15 (6)	1,16 (7)	1,22 (8)	1,53 (8)	8
<i>EEF1</i>	0,58 (1)	0,78 (3)	0,53 (1)	0,70 (1)	2
<i>HPRT1</i>	1,40 (8)	1,03 (5)	0,90 (5)	1,24 (6)	7
<i>LDHA</i>	0,85 (4)	0,66 (1)	0,54 (3)	0,85 (4)	4
<i>MRPS27</i>	1,29 (7)	1,11 (6)	1,11 (7)	1,15 (5)	5
<i>MRPS30</i>	0,74 (3)	0,81 (4)	0,67 (4)	0,81 (3)	3
<i>RPL5</i>	0,58 (1)	0,66 (1)	0,53 (1)	0,70 (1)	1
<i>TFRC</i>	0,97 (5)	1,23 (8)	1,03 (6)	1,36 (7)	6

Nos dados gerados através da ferramenta NormFinder, os genes mais estáveis considerando o grupo genético foram o *RPL5* (0,46) para a linhagem Cobb 500[®] e *EEF1* (0,58) para o ecotipo Peloco. Em relação ao ambiente, os genes considerados mais estáveis foram o *RPL5* (0,30) para o conforto térmico e o *LDHA* (0,57) para o estresse térmico agudo. No ranking geral obtido através da ferramenta Normfinder, o gene *EEF1* foi o mais estável, enquanto que o *HRPT1* foi o menos estável (**Tabela 8**).

Tabela 8. Ranking com os valores de estabilidade de cada fator (raça e ambiente) em coração de frangos, obtidos através da ferramenta NormFinder.

Genes	Cobb n=12	Peloco n=12	Conforto n=12	Estresse n=12	Rank NormFinder
<i>ACTB</i>	1,44 (6)	0,98 (6)	1,48 (8)	1,91 (8)	6
<i>EEF1</i>	0,48 (2)	0,58 (1)	0,34 (2)	0,64 (2)	1
<i>HPRT1</i>	1,61 (8)	0,8 (3)	1,21 (6)	1,32 (6)	8
<i>LDHA</i>	0,58 (3)	0,76 (2)	0,63 (3)	0,57 (1)	3
<i>MRPS27</i>	1,24 (5)	0,84(4)	0,82 (4)	1,18 (5)	4
<i>MRPS30</i>	0,69 (4)	1,12 (7)	0,89 (5)	0,93(4)	5
<i>RPL5</i>	0,46 (1)	0,88 (5)	0,30 (1)	0,89 (3)	2
<i>TFRC</i>	1,51 (7)	1,46 (8)	1,39 (7)	1,6 (7)	7

Para realizar o ranking geral para o tecido coração empregando as três ferramentas estatísticas foi utilizado o pacote RankAggreg (PIHUR; DATTA; DATTA,

2007) no software R utilizando o algoritmo brute force com a função BruteAggreg. O pacote ordena os genes em ordem de estabilidade levando em consideração os valores de estabilidade e a frequência em que cada gene aparece posicionado de acordo com os algoritmos das ferramentas de análises de estabilidade (BestKeeper, Genorm e NormFinder). O ranking geral dos genes de referência mais estáveis para o tecido coração obtido pelo pacote, foram o *RPL5*, *EEF1* e *LDHA* (**Tabela 9**).

Tabela 9. Ranking geral dos genes de referência em coração de frangos, obtidos com as diferentes ferramentas (Bestkeeper, GeNorm e NormFinder) e ranqueado pelo pacote RankAggreg.

	Rank BestKeeper	Rank GeNorm	Rank NormFinder	Rank geral RankAggreg
<i>ACTB</i>	8	8	6	8
<i>EEF1</i>	4	2	1	2
<i>HRPT1</i>	5	7	8	6
<i>LDHA</i>	1	4	3	3
<i>MRPS27</i>	3	5	4	5
<i>MRPS30</i>	6	3	5	4
<i>RPL5</i>	2	1	2	1
<i>TFRC</i>	7	6	7	7

Semelhante ao tratamento realizado dos dados obtidos com o tecido coração, as três ferramentas estatísticas também foram utilizadas para analisar os genes de referências das amostras do tecido fígado. Para a ferramenta BestKeeper, os genes indicados como mais estáveis no grupo genético foram o *ACTB* (1,164) para Cobb 500[®] e *RPL5* (0,939) para Peloco. Em relação ao ambiente, os genes considerados mais estáveis foram o *RPL5* (0,949) avaliando a situação de conforto térmico e o *TFRC* (0,915) na condição de estresse térmico agudo. No ranking gerado pelo BestKeeper englobando os dois grupos genéticos e ambos ambientes, o gene *TRFC* foi o mais estável enquanto que o *MRPS27* foi o menos estável (**Tabela 10**).

Tabela 10. Ranking com os valores de estabilidade de cada fator (raça e ambiente) em fígado de frangos, obtidos através da ferramenta BestKeeper.

Genes	Cobb n=12	Peloco n=12	Conforto n=12	Estresse n=12	Rank BestKeeper
<i>ACTB</i>	1,164 (1)	1,714 (8)	1,388 (3)	1,841 (8)	5
<i>EEF1</i>	1,422 (5)	1,46 (3)	1,519 (5)	1,414 (4)	3
<i>HPRT1</i>	1,211 (2)	1,505 (6)	1,466 (4)	1,092 (2)	4

LDHA	2,072 (7)	1,469 (5)	1,968 (7)	1,666 (6)	7
MRPS27	2,147 (8)	1,564 (7)	2,474 (8)	1,706 (7)	8
MRPS30	1,45 (6)	1,463 (4)	1,918 (6)	1,526 (5)	6
RPL5	1,293 (3)	0,939 (1)	0,949 (1)	1,25 (3)	2
TFRC	1,419 (4)	1,309 (2)	1,259 (2)	0,915 (1)	1

Para a ferramenta GeNorm, os genes mais estáveis para a Cobb 500[®] foram o *EEF1* e *RPL5* (0,76) e para a Peloco foram o *EEF1* e *LDHA* (0,63). Já em relação ao ambiente, os genes indicados como mais estáveis para o conforto térmico foram o *EEF1* e *LDHA* (0,80) e para o estresse agudo térmico foram *EEF1* e *LDHA* (0,82). Ainda foi gerado o ranking da ferramenta, envolvendo todos os fatores, sendo que o *EEF1* foi classificado como o mais estável enquanto que o *TRFC* foi o menos estável (**Tabela 11**).

Tabela 11. Ranking com os valores de estabilidade de cada fator (raça e ambiente) em fígado de frangos, obtidos através da ferramenta GeNorm.

Genes	Cobb n=12	Peloco n=12	Conforto n=12	Estresse n=12	Rank GeNorm
ACTB	1,29 (5)	1,10 (7)	1,19 (5)	1,38 (8)	7
EEF1	0,76 (1)	0,63 (1)	0,80 (1)	0,82 (1)	1
HPRT1	1,51 (6)	1,03 (6)	1,34 (6)	1,26 (6)	6
LDHA	0,93 (3)	0,63 (1)	0,80 (1)	0,82 (1)	2
MRPS27	1,85 (8)	0,89 (4)	1,70 (8)	0,99 (3)	5
MRPS30	1,09 (4)	0,98 (5)	0,92 (3)	1,19 (5)	4
RPL5	0,76 (1)	0,81 (3)	1,04 (4)	1,09 (4)	3
TFRC	1,62 (7)	1,18 (8)	1,44 (7)	1,33 (7)	8

Utilizando a ferramenta NormFinder, os genes indicados como mais estáveis no grupo genético foram o *ACTB* (0,48) para a Cobb 500[®] e para a Peloco o gene *RPL5* (0,65). Ao considerar o ambiente, os genes mais estáveis foram o *ACTB* (0,54) para o conforto térmico, enquanto que o *MRPS30* (0,74) foi o melhor para a situação de estresse térmico agudo. No ranking da ferramenta com todos os fatores, o gene *EEF1* foi o mais estável e o *MRPS27* foi o menos estável (**Tabela 12**).

Tabela 12. Ranking com os valores de estabilidade de cada fator (raça e ambiente) em fígado de frangos, obtidos através da ferramenta NormFinder.

Genes	Cobb n=12	Peloco n=12	Conforto n=12	Estresse n=12	Rank NormFinder
<i>ACTB</i>	0,48 (1)	1,15 (7)	0,54 (1)	1,31 (7)	3
<i>EEF1</i>	0,84 (2)	0,94 (6)	0,73 (3)	0,93 (3)	1
<i>HPRT1</i>	1,48 (5)	0,8 (5)	1,22 (4)	0,93 (3)	7
<i>LDHA</i>	1,61 (6)	0,76 (4)	1,41 (6)	1,11 (5)	5
<i>MRPS27</i>	2,56 (8)	0,68 (2)	2,55 (8)	0,77 (2)	8
<i>MRPS30</i>	1,37 (4)	0,69 (3)	1,41 (6)	0,74 (1)	4
<i>RPL5</i>	0,99 (3)	0,65 (1)	0,67 (2)	1,17 (6)	2
<i>TFRC</i>	1,7 (7)	1,35 (8)	1,39 (5)	1,36 (8)	6

Assim como nas amostras de coração, para realizar o ranking geral dos genes de referência das três ferramentas utilizadas (BestKeeper, GeNorm, NormFinder), foi utilizado o pacote RankAggreg (PIHUR; DATTA; DATTA, 2007). No ranking geral, os genes de referência mais estáveis para o tecido fígado foram o *RPL5*, *EEF1* e *ACTB* (1°, 2° e 3° lugar, respectivamente) (**Tabela 13**).

Tabela 13. Ranking geral dos genes de referência em fígado de frangos, obtidos com as diferentes ferramentas (Bestkeeper, GeNorm e NormFinder) e ranqueado pelo pacote RankAggreg.

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

4.4 Discussão

Em todos os *primers* analisados neste trabalho foram verificados valores de eficiência de amplificação, e neste caso variou entre 95 e 102%, com valores de R^2 acima de 0,99, indicando boa correlação linear. A temperatura de anelamento dos *primers* variaram entre 60 e 62°C e foi eficaz para amplificação de todos os genes. Esses valores de eficiência e temperaturas diferem dos valores que foram propostos por Nascimento et al., (2015) e Cedraz et al., (2017) que utilizaram os mesmos pares de *primers*, contudo em tecido muscular de *G. gallus* submetidos a tratamentos diferentes do realizado nesse experimento. Esse fato pode ser atribuído devido às condições distintas no delineamento experimental, bem como o tecido que foi utilizado, o que ratifica a importância da realização do teste de eficiência para cada experimento.

O uso de genes de referência adequado para a normalização dos dados de RT-qPCR é essencial para obter resultados confiáveis e que representem verdadeiramente a abundância relativa de transcritos de genes, em diferentes espécies, células e tecidos.

De acordo com os resultados obtidos nesse estudo no tecido coração, os genes *RPL5*, *EEF1* e *LDHA* foram ranqueados pela ferramenta RankAggreg como os genes mais estáveis e o *ACTB* foi o de pior estabilidade. Esse resultado corrobora com os obtidos por Macário (2016), onde o autor classificou os genes *EEF1* e *LDHA* como os mais estáveis só que em baço de codornas. Além disso, esse trabalho também está em concordância com o de Nascimento et al., (2015) onde foi relatado que o gene *ACTB* é o menos estável em músculo peitoral de *G. gallus*. Tais variações de expressão podem ser observadas dentro de um mesmo tecido devido suas funções fisiológicas (JEMIOLO; TRAPPE, 2004), já que a quantidade de transcritos pode ser diferente no conforto térmico e no estresse térmico agudo, bem como nos diferentes grupos genéticos de frangos.

No tecido coração do ecotipo Peloco, o gene *RPL5* foi classificado como o melhor, em duas das três ferramentas utilizadas, além disso, esse gene revelou alta expressão. Já para a linhagem comercial Cobb 500[®], no mesmo tecido, o gene

EEF1 foi o que apresentou maior estabilidade em duas das três ferramentas analisadas. Como existe diferenças entre as raças, bem como entre os tecidos, pode-se esperar que aconteçam essas variações.

Assim como nesse trabalho, Cedraz et al., (2017) evidenciaram que o gene *RPL5* permaneceu entre os mais estáveis em músculo do peito da Peloco no conforto térmico e estresse térmico agudo.

O gene *RPL5* codifica uma pequena proteína que é componente da subunidade 60S e é responsável pelo transporte de rRNA 5S para o nucléolo. Essa proteína atua especificamente com a subunidade beta de caseína-quinase II, sendo típico para os genes que codificam proteínas ribossomais (NCB1, 2019). Dessa forma, o *RPL5* está envolvido no processo essencial de transporte de rRNA das células, atuando de forma frequente, o que explica em parte sua maior expressão nos tecidos das raças de frangos estudados. Em um estudo realizado por Mengmeng et al., (2017) em coração de humanos, os autores relataram que o *RPL5* foi o gene mais estável, enquanto que o *ACTB* foi o menos estável.

Já o *EEF1* é um gene que codifica uma proteína responsável pelo fator de alongação alfa1 e tem a função de entrega enzimática do tRNAs aminoacil para o ribossomo durante a síntese de proteínas, e dessa forma sua expressão é considerada contínua, o que pode explicar sua estabilidade no coração de frangos submetidos ao estresse térmico. O resultado do presente estudo está de acordo com os encontrados por Kapila et al., (2013), onde o gene *EEF1* foi o segundo mais estável em búfalos em condições de estresse térmico, relatando também que o *ACTB* foi considerado o menos estável, sugerindo que sua regulação pode ser afetada pela condição experimental, já que ele é um gene muito usado como normalizador.

Cabe salientar que não existe um gene de referência universal, e ao analisar diferentes fatores em diferentes tecidos, em diferentes organismos que estão constantemente se adaptando em condições de mudanças, esses podem exibir diferentes perfis de expressão de genes de referência. Portanto, enfatiza-se a extrema necessidade de abordagens únicas para cada experimento e a necessidade da validação de genes de referência. Além disso, os rankings de estabilidade de expressão gênica obtidos pelos diferentes algoritmos sempre deve ter como prioridade encontrar o gene que é caracterizado com uma alta estabilidade não apenas para um único algoritmo (KOZERA; RAPACZ, 2013). Nesse contexto, o

RankAggreg é de suma importância visto que faz a sua classificação baseado nos outros três algoritmos estatísticos utilizados nesse trabalho.

O gene *LDHA* que revelou-se como terceiro mais estável está presente em etapas da glicólise; a proteína codificada por este gene catalisa a conversão de L-lactato e NAD em piruvato e NADH na etapa final da glicólise anaeróbica (NCBI, 2019). Essa proteína é encontrada predominantemente no tecido muscular, e nas aves, é especialmente ativa nos eritrócitos. 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).

Nos resultados obtidos para o tecido fígado, foi possível observar que os genes mais estáveis no ranking geral, ou seja, incluindo todos os fatores (Cobb 500[®] e Peloco; conforto e estresse térmico agudo) e as três ferramentas estatísticas foram o *RPL5*, *EEF1* e *ACTB*. No fígado da Peloco o gene *RPL5* foi o mais estável em duas das três ferramentas utilizadas, e na linhagem Cobb 500[®], o gene *ACTB* foi considerado o mais estável em duas das três ferramentas. Neste tecido, o *MRPS27* foi indicado como o menos instável. Este resultado difere do trabalho publicado Cedraz et al., (2017), onde o autores relatam que o *MRPS27* foi o gene mais estável em musculo do peito do ecotipo Peloco. Essa divergência pode estar relacionada ao tecido utilizado no trabalho, já que um gene de referência pode ser estável para um tecido, e não ser para outro, ainda que na mesma espécie.

O *ACTB* é o gene que codifica uma das seis proteínas actinas existentes, e essas são proteínas que estão envolvidas na motilidade celular, estrutura e integridade (NCBI, 2019). Em aves, sua expressão é mais elevada no coração, rim, fígado, cérebro e músculo esquelético (WEBER et al., 2014). Embora seja um gene expresso em todos os tecidos, alguns experimentos que avaliaram a estabilidade de genes de referência em aves encontram grande variabilidade do mesmo, impossibilitando de utilizá-lo como gene de referência, apesar de apresentar alta expressão (NAJAFPANAH et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2015), assim como ocorreu neste trabalho.

Muitos estudos de RT-qPCR tem procurado validar genes de referência em diferentes espécies, tecidos e tratamentos tanto em animais, incluindo bovinos (LISOWSKI et al., 2008), pulmão e coração de frangos de corte (HASSANPOUR et

al., 2018) em músculo do ecotipo Peloco (CEDRAZ, et al., 2017) suínos (MARTÍNEZ-GINER et al., 2013), ovinos (ZANG et al., 2011) caprinos (NAJAFPANAH; SADEGHI; BAKHTIARIZADEH, 2013), equinos (KUNG et al., 2011), aves (BAGÉS et al., 2015; NASCIMENTO et al., 2015; OLIAS et al., 2014; ZINZOW-KRAMER; HORTON; MANEY, 2014) e peixes (YANG et al., 2013; ZHENG; SUN, 2011), quanto em vegetais (MAFRA et al., 2012; ZHU et al., 2013).

É importante ressaltar que existem genes que se expressam apenas em determinados tecidos, que são considerados tecido - específico e estão sob regulação tecido - específica. Entretanto, existem diferentes genes que são controlados por regulação temporal, ou seja, se expressam em determinados períodos. Dessa forma, diferentes tecidos, bem como diferentes grupos genéticos submetidos à condições ambientais adversas podem apresentar componentes estruturais e proteicos diferentes, resultando em um perfil gênico específico adequando-se a cada necessidade (COSTA; PACHECO, 2013).

Até o presente momento, não são conhecidos trabalhos que tenham analisado genes de referência em coração e fígado de Peloco e Cobb 500[®] sob as mesmas condições experimentais utilizadas nesse estudo (conforto e estresse térmico agudo). Diante disso, esses resultados podem ser úteis para pesquisas futuras do ecotipo Peloco, já que os estudos realizados até o momento para esse grupo genético específico estão voltados apenas para características fenotípicas e o conhecimento do seu perfil gênico é de suma relevância. Além disso, existe a importância de se analisar o perfil da expressão de genes de referência em determinados tecidos, já que estes podem alterar a interpretação dos dados analisados. Tendo isso em vista, uma correta normalização, torna-se indispensável, uma vez que é preciso levar em consideração a relevância biológica das amostras de diferentes espécies e/ou tecidos, bem como as condições experimentais.

4.5 Conclusão

De acordo com a classificação apontada pela ferramenta RankAggreg, baseando-se nos três algoritmos utilizados (BestKeeper, GeNorm, NormFinder), no coração de frangos dos dois grupos genéticos avaliados submetidos ao conforto e

estresse térmico agudo, os genes mais estáveis foram *RPL5*, *EEF1* e *LDHA*. Já para o tecido fígado dos grupos genéticos divergentes submetidos ao conforto e estresse térmico agudo, os genes mais estáveis foram o *RPL5*, *EEF1* e *ACTB*, concluindo portanto, que o *RPL5* é indicado como normalizador mais estável para ser empregado como gene de referência em ambos os tecidos de frangos submetidos ao conforto térmico e estresse térmico agudo.

Referências

- ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ØRNTTOFT, 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**, v.1, p. 5245-5250, 2004.
- 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.
- BRUNNER, A. M.; YAKOVLEV, I. A; STRAUSS, S. H. Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. **BMC Plant Biology**, v.4, p.14, 2004.
- BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RTPCR): trends and problems. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.29, n.1, p. 23– 39, 2002.
- BUSTIN, S. A. et al. Quantitative real-time RT-qPCR - A perspective. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.34, n.3, p.597–601, 2005.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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, 2013.
- CEDRAZ, H. et al., Heat stress induces expression of HSP genes in genetically divergent chickens. **Plos One** v.12 n.10, 2017.

COSTA, E de B. O.; PACHECO, C. Epigenética: regulação da expressão gênica em nível transcricional e suas implicações. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v.34, n.2, p.125-136, 2013.

CZECHOWSKI, T. et al. Genome-Wide Identification and Testing of Superior Reference Genes for Transcript Normalization. **Plant Physiology**, v. 39, p.5–17, 2005.

DHEDA, K., J. et al. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. **BioTechniques**, v.37, p.112–119, 2004.

DHEDA, K. et al. The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization. **Analytical Biochemistry**, v.344, p.141–448, 2005.

FIEIGE, S.; PFAAFFL M. W. Integridade do RNA e o efeito no desempenho em tempo real da PCR-qRT. **Molecular Aspects of Medicine**, v.27, p.126–139. 2006.

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.

JEMIOLO B.; TRAPPE, S. Single muscle fiber gene expression in human skeletal muscle: validation of internal control with exercise. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.320, n.3, p.1043 – 1050, 2004.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)) Method. **Methods**, v.25, n.4, p.402–8, 2001.

LISOWSKI, P. et al. Evaluation of reference genes for studies of gene expression in the bovine liver, kidney, pituitary, and thyroid. **Journal of Applied Genetics**, v.49, n.4, p.367–372, 2008.

KAPILA, N. et al. Temporal changes in mRNA expression of heat shock protein genes in mammary epithelial cells of riverine buffalo in response to heat stress in vitro. **International Journal of Animal Biotechnology**, v.3, p.5– 9, 2013.

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

KUNG, A. et al. Identification of reference genes for normalization of gene expression in thoroughbred and Jeju native horse (Jeju pony) tissues. **Genes and Genomics**, v. 33, n. 3, p. 245–250, 2011.

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

MAFRA, V. et al. Reference genes for accurate transcript normalization in citrus genotypes under different experimental conditions. **Plos One**, v.7, n.2, 2012.

MARTÍNEZ-GINER, M. et al. Selection of Internal Control Genes for Real-Time Quantitative PCR in Ovary and Uterus of Sows across Pregnancy. **Plos One**, v.8, n.6, 2013.

MENGMENG, L. et al. Selection of reference genes for gene expression studies in heart failure for left and right ventricle. **Gene**, v.620, p.30-35, 2017.

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**, v.8, n.12, p.1–10, 2013.

NASCIMENTO, C. S.; BARBOSA, L. T.; BRITO, C.; 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.1 – 15, 2015.

NCBI. RefSeq. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>>. Acesso em: 21 jan. 2019.

NERREN, J. R.; HE, H.; GENOVESE, K.; KOGUT, M. H.; Expression of the avianspecific toll-like receptor in chicken heterophils is mediated by gram-negative and gram-positive bacteria, but not TLR agonists. **Veterinary Immunology Immunopathology**. v.136, p.151–156, 2010.

NYGARD, A.B.; JORGENSEN, C.B.; CICERA, S.; FREDHOLM, M. Seletion of reference genes for gene expression studies in pig tissues using SYBR Gree qPCR. **BMC Molecullar Biology**. v.8, n.67, p.1-6, 2007.

NOLAN, T.; HANDS, R. E.; BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time RTPCR. **Nature Protocols**, v.1, n.3, p.1559–82, 2006.

OLIAS, P. et al. Reference genes for quantitative gene expression studies in multiple avian species. **Plos One**, v.9, n.6, p.26–28, 2014.

PFAFFL, 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**, v.26, n.6, p.509–15, 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.

RADONIC, A. et al. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. **Biochemistry and Biophysical Research Communication**, v.313, p.856-862, 2004.

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

SUN Z. B.; LI S. D.; SUN M. H. Seleção de genes de referência confiáveis para estudos de expressão gênica em *Clonostachys rosea* 67-1 sob indução esclerótica. **Journal of Microbiological Methods**, v.114, p.62-65, 2015.

UDVARDI, M. K.; CZECHOWSKI, T.; SCHEIBLE, W.-R. Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. **The Plant Cell**, v.20, n.7, p.1736–1737, 2008.

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

WANG, Q. et al. Stability of endogenous reference genes in postmortem human brains for normalization of quantitative real-time PCR data: comprehensive evaluation using geNorm, NormFinder, and BestKeeper. **International Journal of Legal Medicine**, v.126, n.6, p.943–52, 2012.

WEBER, R.; BERTONI, A. P. S.; BESSESTIL, L. W.; et al. Validation of Reference Genes for Normalization Gene Expression in Reverse Transcription Quantitative PCR in Human Normal Thyroid and Goiter Tissue. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

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.

ZANG, R. et al. Selection of Suitable Reference Genes for Real-time Quantitative PCR Studies in Lanzhou Fat-tailed Sheep (*Ovis aries*). **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.6, n.8, p.789–804, 2011.

ZHENG, W.-J.; SUN, L. Evaluation of housekeeping genes as references for quantitative real time RT-PCR analysis of gene expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Fish & Shellfish Immunology**, v.30, n.2, p.638–645, 2011.

ZHU, J. et al. Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in *Caragana intermedia* under different abiotic stress conditions. **Plos One**, v.8, n.1, 2013.

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.

5. CAPÍTULO II

EXPRESSÃO RELATIVA DE GENES RELACIONADOS AO ESTRESSE TÉRMICO E OXIDATIVO EM FRANGOS GENETICAMENTE DIVERGENTES

RESUMO

A alta temperatura tem contribuído de forma negativa na produção dos frangos. Em frente ao desenvolvimento de características selecionadas para maior ganho de peso e conversão alimentar, as linhagens comerciais sofrem de uma deficiência na regulação da temperatura corporal, tornando-as muito sensíveis às variações ambientais. Em contrapartida, em algumas regiões rurais do interior da Bahia, principalmente em sistemas de agricultura familiar, existe um ecotipo de frango denominado Peloco que possui características peculiares, como resistência à altas temperaturas. Porém essas aves encontram-se em número reduzido e existe a necessidade de pesquisas relacionadas a sua fisiologia para verificar o seu potencial zootécnico, valorizando essa importante característica para o pequeno produtor. Sabe-se que existem genes que estão relacionados aos principais mecanismos de defesa celular durante a exposição em ambiente quentes, bem como genes relacionados ao estresse oxidativo que protegem dos danos causados pela alta temperatura. Tendo isso em vista, objetivou-se com este trabalho avaliar e comparar os efeitos do calor agudo sobre os níveis de expressão dos genes *HSF1*, *HSF3*, *HSP70*, *HSP90*, *SOD*, *CAT* e *GPX* em coração e fígado de ecotipos Peloco e frangos de linhagem comercial Cobb 500[®]. Vinte e quatro aves (12 Peloco e 12 Cobb 500[®]) foram submetidas ao ambiente de conforto térmico (23°C) e de estresse térmico agudo (39,5°C durante 1h), posteriormente foram abatidos e coletados fragmentos de fígado e coração para análises utilizando a RT-qPCR. Foi possível observar, através dos dados de expressão relativa, que nos animais submetidos ao ambiente de estresse térmico, os genes *HSF1* e *HSP70* tiveram aumento de expressão significativa no fígado dos frangos. O *HSP90* revelou aumento de expressão significativa nos dois tecidos dos dois grupos genéticos submetidos ao estresse por calor. Já o gene *CAT* teve aumento de expressão significativo no fígado dos animais Cobb 500[®] submetidos à alta temperatura, enquanto que o *SOD* foi mais expresso apenas no tecido coração da Peloco; o gene *GPX* apresentou aumento de expressão significativa no coração das aves Peloco que foram submetidos ao estresse térmico agudo. Não foram encontradas diferenças significativas de expressão no gene *HSF3*. Diante disso, conclui-se que existe variação de expressão dos genes de estresse térmico e oxidativo no coração e no

fígado da Peloco submetidos ao estresse térmico, indicando expressão tecido – específica. Além disso, de acordo com os resultados, sugere-se que esse ecotipo é mais adaptado ao calor elevado, comparado a linhagem comercial Cobb 500[®].

Palavras - chave: RT-qPCR, Peloco, expressão gênica, Cobb 500[®], enzimas antioxidantes.

EXPRESSION ON RELATED GENE TO STRESS AND THERMAL OXIDATIVE IN CHICKENS GENETICALLY DIVERGENT

ABSTRACT

The high temperature has contributed in a negative way in the production of the chickens. Faced with the development of selected characteristics for greater weight gain and feed conversion, commercial strains suffer from a deficiency in body temperature regulation, making them very sensitive to environmental variations. On the other hand, in some rural regions of the interior of Bahia, mainly in family farming systems, there is an ecotype of chicken called Peloco that has peculiar characteristics, such as resistance to high temperatures. However, these birds are few in number and there is a need for research related to their physiology to verify their zootechnical potential, valuing this important characteristic for the small producer. It is known that there are genes that are related to the major cellular defense mechanisms during exposure in warm environments, as well as genes related to oxidative stress that protect from damage caused by high temperature. The objective of this study was to evaluate and compare the effects of acute heat on the expression levels of *HSF1*, *HSF3*, *HSP70*, *HSP90*, *SOD*, *CAT* and *GPX* genes in heart and liver of Peloco and broiler chickens commercial Cobb 500[®]. Twenty-four birds (12 Peloco and 12 Cobb 500[®]) were submitted to the thermal comfort environment (23°C) and acute thermal stress (39,5 °C for 1 h), later they were slaughtered and collected fragments of liver and heart for analysis using RT-qPCR. It was possible to observe, through the data of relative expression, that in the animals submitted to the thermal stress environment, the *HSF1* and *HSP70* genes had significant expression in the liver of the chickens. *HSP90* revealed significant increase of expression in the two tissues of the two genetic groups submitted to heat stress. The *CAT* gene, on the other hand, had significant expression in the liver of Cobb 500[®] animals subjected to high temperature, whereas *SOD* was expressed only in the Peloco heart tissue; the *GPX* gene showed increased expression in the heart of Peloco birds that were submitted to acute thermal stress. No significant differences in expression were found in the *HSF3* gene. Therefore, it is concluded

that there is variation in expression of the thermal and oxidative stress genes in Peloco's heart and liver submitted to thermal stress, indicating tissue-specific expression. In addition, according to the results, it is suggested that this ecotype is more adapted to the high heat, compared to the commercial line Cobb 500[®].

Keywords: RT-qPCR, Peloco, Gene Expression, Cobb 500[®], Antioxidant Enzymes.

5.1 Introdução

Em algumas regiões rurais no interior da Bahia, principalmente onde predominam-se sistema de agricultura familiar, existe um ecotipo de frango denominado Peloco. Essas aves são caracterizadas pela ausência de penas durante um longo período do desenvolvimento, e são criadas em sistema extensivo, observa-se que são bem adaptadas às altas temperaturas e resistentes à várias condições adversas, e além disso, servem de fonte de renda para pequenos produtores. A Peloco encontra-se em número reduzido, e dessa forma pesquisas relacionadas ao seu potencial zootécnico são necessários, a fim de conservar esse material genético e manter as características que agregam na agricultura familiar (ALMEIDA, 2013; SAGRILO et al., 2018).

As linhagens comerciais de frangos são geneticamente melhoradas visando o rápido crescimento e ganho de peso, contudo apresentam atividade termorreguladora deficiente. Dessa forma, em algumas regiões, a alta temperatura acaba contribuindo de maneira negativa na qualidade e no desenvolvimento dos frangos já que esses não se adaptam bem ao ambiente quente (TEMIM et al., 2000; XIE et al., 2014).

Existem alguns fatores que atuam no mecanismo de defesa contra altas temperaturas, sendo que a capacidade da homeostase pode minimizar os danos celulares (DE NADAL; AMMERER; POSAS, 2011) alterando a expressão dos genes na presença do estresse e voltando às condições basais após voltar às condições de conforto térmico (GASCH et al., 2000; CAUSTON et al., 2001).

Um desses mecanismos de defesa é a ativação de genes que estão envolvidos na resposta ao estresse térmico, dentre eles estão os HSFs (Fatores de choque térmico) que induzem a expressão gênica e os HSPs (Proteínas de choque térmico) que está entre as principais formas de defesas do estresse (WORKMAN, 2010; GUERTIN et al., 2011; WEAKE).

Existem vários estudos com genes relacionados ao estresse térmico em mamíferos (SONNA et al., 2002; AHN; THIELE, 2003), plantas (NAGAYA et al., 2010), peixes (YEH; HSU, 2002) e frangos de corte (FIGUEIREDO et al., 2007; LEI et al., 2014), porém, até o momento não foram encontrados estudos em coração e fígado do ecotipo de galinha caipira Peloco.

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. Nesse sentido, o organismo responde através da expressão de genes que codificam enzimas antioxidantes como a Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione peroxidase (GPX), diminuindo os efeitos negativos nas células (MUJAHID et al., 2005). Alguns trabalhos na literatura demonstram que a exposição a altas temperaturas causa um aumento compensatório na atividade da SOD, GPX e CAT no soro, fígado e músculo de frangos (TAN et al., 2010, AZAD et al., 2010).

Diante disso, objetivou-se com este trabalho, analisar e comparar a expressão de genes relacionados ao estresse térmico e oxidativo em frangos Peloco e na linhagem comercial Cobb 500[®] submetidos ao conforto e estresse térmico agudo.

5.2 Material e métodos

5.2.1 Animais

Para a realização do experimento foram utilizadas 24 aves: 12 pintos da raça Peloco e 12 pintos comerciais Cobb 500[®]. 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 sobre as mesmas condições ambientais no período entre dois de novembro a dois de dezembro de 2015. Todas as aves foram criadas em galpão aberto forrado com maravalha (raspas de madeira) e foram alimentadas seguindo todas as exigências nutricionais até os 30 dias de vida (ROSTAGNO; GOMES; 2011). Todo o experimento teve aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/UESB, Protocolo 109/2015.

5.2.2 Aquecedores

Para submeter as aves a condição de estresse térmico agudo, foi construído um box medindo 1,5 metros de comprimento, 1 metro de altura e 1 metro de largura

(**Figura 3**) com dois aquecedores a gás instalados visando homogeneizar o calor por todo o ambiente interno (**Figura 4**).



Figura 3. Box experimental de aquecimento utilizado para a realização do estresse térmico nas aves.



Figura 4. Aquecedores a gás utilizados para o estresse térmico nos animais.

5.2.3 Estresse térmico

O estresse térmico foi realizado em dois momentos para que as aves tivessem a mesma idade de abate (30 dias de vida). No primeiro momento, 6 aves do ecotipo Peloco foram submetidos a temperatura ambiental de 39,5°C, com umidade relativa de 60% durante 1 hora. Em um segundo momento, as mesmas condições foram replicadas para 6 aves da linhagem Cobb 500[®], sendo que em ambos períodos as aves tiveram acesso à água e comida.

Durante o período de estresse térmico, as aves foram observadas a fim de evitar óbito pela alta temperatura, e o estresse térmico agudo foi determinado quando os animais se mostraram prostrados e com frequência respiratória acelerada. Imediatamente após o período de estresse, os animais foram abatidos por deslocamento cervical. Já as aves controles de cada grupo genético foram abatidas no início da manhã (4 h), para garantir condições de conforto térmico (Temperatura ambiental de 23°C).

5.2.4 Coleta de tecidos

Após o abate, foram coletados fragmentos de coração e fígado, sendo que essas amostras foram colocadas em tubos criogênicos e imediatamente armazenadas em botijão contendo nitrogênio líquido e transportadas para o laboratório de Genética Animal do Hospital Veterinário na Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC e armazenadas em *ultrafreezer* -80°C até o momento da extração do RNA.

5.2.5 Extração, quantificação e qualidade do RNA

A extração do RNA total das amostras selecionadas foi realizada com Trizol[®] seguindo o protocolo do fabricante. A concentração do RNA foi quantificada através de espectrofotômetro NanoDrop 2000[®] e a qualidade do RNA extraído foi verificada através de eletroforese em gel de agarose à 1%, corados com brometo de etídio e visualizados em luz ultra violeta.

5.2.6 Transcrição reversa do mRNA

A transcrição reversa foi realizada com o kit comercial *GoScript™ reverse Transcription System* (Promega Corporation, Madison, EUA). Foram utilizados, 2 µl de RNA obtidos a partir da extração realizada nos tecidos (fígado e coração), acrescidos de 10 µl de 10X RT buffer, 4µl de dNTP, 1 µl de Oligodt, 1 µl da enzima *Transcriptase Reversa*, 1 µl de inibidor de ribonuclease recombinante RNase OUT, e água ultrapura, para um volume final de 20 µl. As amostras foram incubadas em termociclador a 50°C por 50 min, em seguida a temperatura foi elevada a 85°C por 5 min, e na sequência foram refrigeradas em gelo. O cDNA obtido foi armazenado em freezer -20°C, para posterior utilização nos experimentos de expressão gênica.

5.2.7 Seleção de genes alvos e otimização da RT-qPCR

Quatro genes relacionados ao estresse térmico e três genes envolvidos no estresse oxidativo foram selecionados para serem avaliados nos dois grupos genéticos de frangos nas condições de conforto térmico e estresse térmico agudo (**Tabela 14**).

Tabela 14. Descrição dos genes alvos e do normalizador e seus primers específicos utilizados nas análises de RT-qPCR em coração e fígado de frangos submetidos ao conforto térmico e estresse térmico agudo.

Gene	Sequência (5'-3')	Descrição	
<i>HSF1</i>	F: TGTGGCTGATTCTTGGCTTT R: GAGGGAGACAGAGGGGTTTC	Fator de choque térmico 1	Cedraz et al; (2017)
<i>HSF3</i>	F: CGGAAGATGGAAATGGAGAG R: TCAGGAAGCAGGAGAGGAGA	Fator de choque térmico 2	Almeida (2007)
<i>HSP70</i>	F: ATTCTTGCCTGGGTGTCTTC R: GATGGTGTGGTGGGGTTC	Proteína de choque térmico 70 Kda	Almeida (2007)
<i>HSP90</i>	F: TGAAACACTGAGGCAGAAGG R: AAAGCCAGAGGACAGGAGAG	Proteína de choque térmico 90 Kda	Almeida (2007)
<i>CAT</i>	F: ACTGGTGCTGGCAACCC R: ACGTGGCCCAACTGTCAT	Catalase	Rimoldi (2015)
<i>SOD</i>	F: TGGACCTCGTTTAGCTTGTG R: ACACGGAAGAGCAAGTACAG	Superóxido Dismutase	Del Vesco (2017)
<i>GPX</i>	F: TTGTAAACATCAGGGGCAAA	Glutationa peroxidase	Del Vesco (2017)

	R: TGGGCCAAGATCTTTCTGTAA		
RPL5	F: AATATAACGCCTGATGGGATGG R: CTTGACTTCTCTCTGGGTTTCT	Proteína ribossomal L5	Nascimento et al; (2015)

Para calcular a eficiência da PCR, uma curva padrão foi construída a partir de um *pool* de cDNA de todos os tratamentos e fatores, para ambos tecidos. Para tanto foram realizadas as seguintes diluições: 5, 15, 45 e 135ng/μl de cDNA com três concentrações de *primers*: 200, 400 e 800 mM.

Visando realizar 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 *primer* durante 60 segundos. Ao final da reação de amplificação foi incluído um passo adicional com elevação gradual da temperatura de 60°C a 95°C para ser possível a obtenção da curva de dissociação. A amplificação de todos os genes foi realizada no Sistema Real Time PCR 7500 Fast (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e, os resultados foram obtidos utilizando 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 dos dados experimentais. 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 da PCR, a temperatura de anelamento e a concentração dos *primers* mais adequada, foram empregadas nas reações de RT-qPCR.

5.2.8 PCR quantitativa em tempo real

Após o cálculo dos valores de eficiência e da escolha dos melhores parâmetros (temperatura de anelamento, concentração de *primer* e cDNA), as

amostras foram submetidas à amplificação por PCR em tempo real, seguindo as condições estabelecidas de reação e termociclagem do teste de eficiência. Todas as reações do experimento foram realizadas em duplicatas utilizando o método de $2^{-\Delta\Delta CT}$.

5.2.9 Análise estatística da expressão dos genes alvos

Para a análise estatística dos dados obtidos da RT-qPCR foi utilizado o programa estatístico *Graph – Prism 8* utilizando dois testes estatísticos: Two – way ANOVA onde avaliou-se: (I) a expressão relativa do gene em relação aos grupos genéticos; (II) a expressão relativa dos genes em relação ao ambiente (conforto ou estresse térmico agudo); (III) a interação de todos os fatores; e o teste T não pareado onde comparou-se dentro dos grupos genéticos a situação de conforto e estresse: (IV) Cobb conforto x estresse e (V) Peloco conforto x estresse, com intervalo de confiança de 95%.

5.3 Resultados

5.3.1 Eficiência e especificidade dos *primers*

Antes da realização da análise de expressão dos genes alvos foi realizado o teste de eficiência para otimização dos parâmetros a serem utilizados no estudo. Ficou determinada a temperatura de anelamento de 60°C e a concentração de cDNA igual 45ng/μl, e 400Mm foi a concentração ideal para todos os *primers*. A eficiência de amplificação dos *primers* variaram entre 92% e 103%. Os valores de coeficiente de determinação (R^2) ficaram acima de 0,99, indicando boa correlação linear. A especificidade dos *primers* foi avaliada através da curva de dissociação a qual revelou apenas um pico, não sendo observado dímeros de *primers*.

5.3.2 Expressão relativa dos genes alvos

Baseado nos resultados obtidos no capítulo I, o gene *RPL5* foi utilizado como normalizador dos genes alvos, tanto para o coração como para fígado dos frangos.

De acordo com os dados gerados através da RT-qPCR foi possível observar que no tecido coração, o gene *HSF1* não revelou alteração de expressão tanto na Cobb 500[®] quanto na Peloco (**Figura 5 A**). Já no fígado, esse gene teve um aumento significativo de expressão comparando os animais do conforto térmico com os animais em condição de estresse térmico (sem considerar o grupo genético) (**Tabela 15**) (**Figura 5 B**).

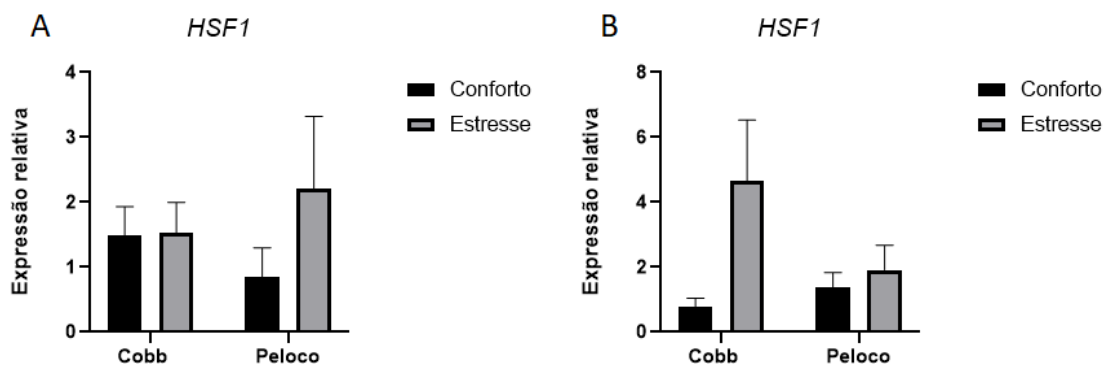


Figura 5. Perfil de expressão do gene *HSF1* em diferentes tecidos de frangos. (A) Análise comparativa da expressão do gene *HSF1* em coração de frangos de linhagem comercial Cobb 500[®] e Peloco submetidos ao conforto térmico (23°C) e estresse térmico agudo (39,5°C). (B) Análise comparativa da expressão do gene *HSF1* em fígado de frangos de linhagem comercial Cobb 500[®] e Peloco submetidos ao conforto térmico (23°C) e estresse térmico agudo (39,5°C).

Tabela 15. Análise estatística de expressão relativa do gene *HSF1* aplicando-se o teste two-way ANOVA para comparação entre grupos genéticos (ambientes de conforto e estresse térmico e interação entre os fatores) e aplicando-se o teste t não pareado para avaliar os ambientes de conforto e estresse térmico dentro dos grupos genéticos de frangos.

Gene: <i>HSF1</i>	P valor	
	Coração	Fígado
Cobb x Peloco	0,9709	0,2833
Conforto X estresse	0,2906	0,0389*
Interação	0,3128	0,1103
Cobb conforto x estresse	0,9616	0,0863
Peloco conforto x estresse	0,2576	0,55

* p<0,05 apresentam diferença estatística

Quanto à expressão do gene *HSF3*, em ambos tecidos estudados, esse gene não revelou alteração de expressão nos dois grupos genéticos submetidos ao estresse térmico (**Figura 6**), (**Tabela 16**).

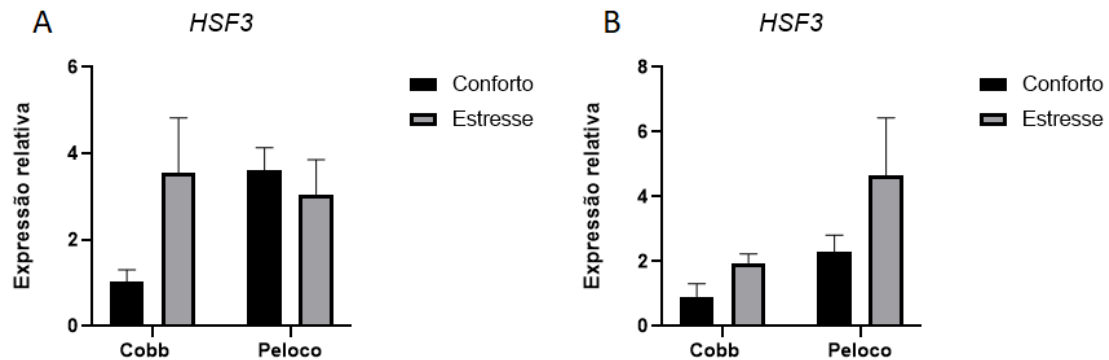


Figura 6. Perfil de expressão do gene *HSF3* em diferentes tecidos de frangos. (A) Análise comparativa da expressão do gene *HSF3* em coração de frangos de linhagem comercial Cobb 500® e Peloco submetidos ao conforto térmico (23°C) e estresse térmico agudo (39,5°C). (B) Análise comparativa da expressão do gene *HSF1* em fígado de frangos de linhagem comercial Cobb 500® e Peloco submetidos ao conforto térmico (23°C) e estresse térmico agudo (39,5°C).

Tabela 16. Análise estatística de expressão relativa do gene *HSF3* aplicando-se o teste two-way ANOVA para comparação entre grupos genéticos (ambientes de conforto e estresse térmico e interação entre os fatores) e aplicando-se o teste t não pareado para avaliar os ambientes de conforto e estresse térmico dentro dos grupos genéticos de frangos.

Gene: <i>HSF3</i>	P valor	
	Coração	Fígado
Cobb x Peloco	0,2323	0,065
Conforto X estresse	0,2536	0,1139
Interação	0,0878	0,5192
Cobb conforto x estresse	0,0661	0,0779
Peloco conforto x estresse	0,599	0,2043

* $p < 0,05$ apresentam diferença estatística

Em relação à expressão do gene *HSP70* os resultados revelaram maior expressão relativa desse gene no fígado dos animais que foram submetidos ao calor elevado (sem considerar o grupo genético), com diferença estatística significativa (**Figura 7**) (**Tabela 17**).

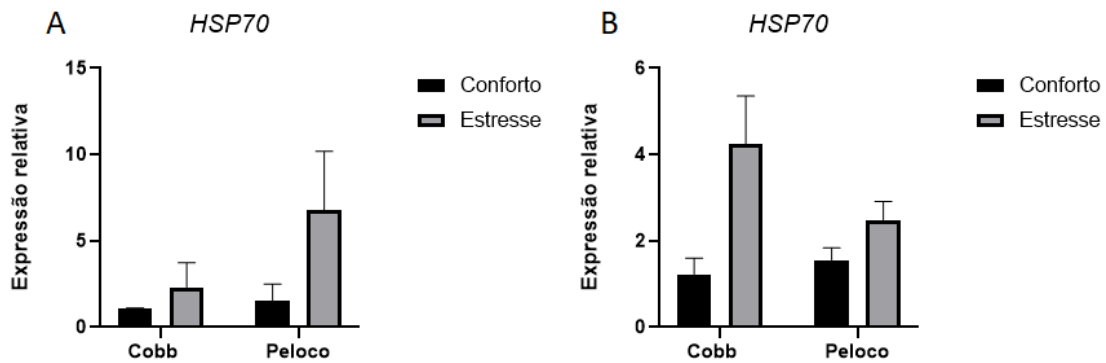


Figura 7. Perfil de expressão do gene *HSP70* em diferentes tecidos de frangos. (A) Análise comparativa da expressão do gene *HSP70* em coração de frangos de linhagem comercial Cobb 500® e Peloco submetidos ao conforto térmico (23°C) e estresse térmico agudo (39,5°C). (B) Análise comparativa da expressão do gene *HSP70* em fígado de frangos de linhagem comercial Cobb 500® e Peloco submetidos ao conforto térmico (23°C) e estresse térmico agudo (39,5°C).

Tabela 17. Análise estatística de expressão relativa do gene *HSP70* aplicando-se o teste two-way ANOVA para comparação entre grupos genéticos (ambientes de conforto e estresse térmico e interação entre os fatores) e aplicando-se o teste t não pareado para avaliar os ambientes de conforto e estresse térmico dentro dos grupos genéticos de frangos.

Gene: <i>HSP70</i>	P valor	
	Coração	Fígado
Cobb x Peloco	0,1555	0,2948
Conforto X estresse	0,0701	0,0093*
Interação	0,2446	0,1339
Cobb conforto x estresse	0,4102	0,0515
Peloco conforto x estresse	0,1517	0,091

* $p < 0,05$ apresentam diferença estatística

Quanto ao gene *HSP90*, observa-se que em ambos tecidos ocorre aumento na expressão quando os animais são submetidos a situação de estresse térmico agudo; sendo que para os dois tecidos ao comparar o fator ambiente os resultados foram estatisticamente significativos; no coração, ao comparar a situação conforto e estresse dentro do grupo genético, é possível notar que não houve alteração de expressão, (**Figura 8 A**). Contudo, no fígado, os animais que foram submetidos ao estresse térmico, além de apresentarem essa mesma tendência observado no coração, tiveram aumento de expressão do gene *HSP90* na linhagem Cobb 500® como na Peloco (**Tabela 18**) (**Figura 8 B**).

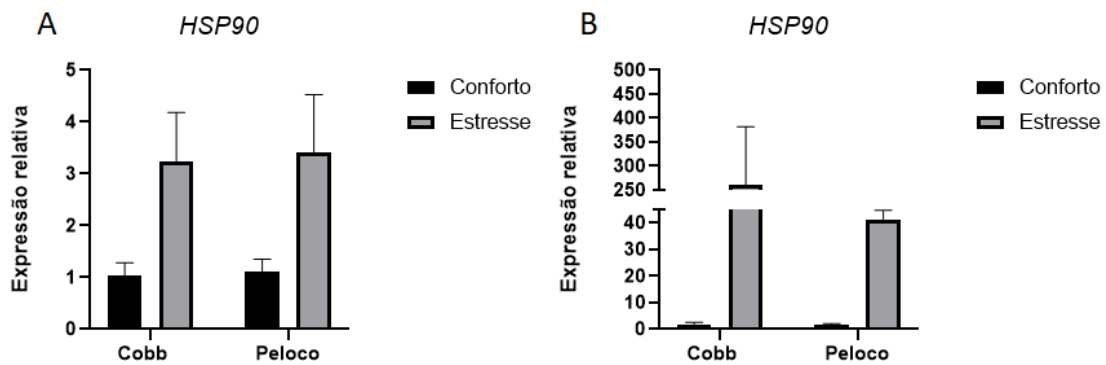


Figura 8. Perfil de expressão do gene *HSP90* em diferentes tecidos de frangos. (A) Análise comparativa da expressão do gene *HSP90* em coração de frangos de linhagem comercial Cobb 500® e Peloco submetidos ao conforto térmico (23°C) e estresse térmico agudo (39,5°C). (B) Análise comparativa da expressão do gene *HSP90* em fígado de frangos de linhagem comercial Cobb 500® e Peloco submetidos ao conforto térmico (23°C) e estresse térmico agudo (39,5°C).

Tabela 18. Análise estatística de expressão relativa do gene *HSP90* aplicando-se o teste two-way ANOVA para comparação entre grupos genéticos (ambientes de conforto e estresse térmico e interação entre os fatores) e aplicando-se o teste t não pareado para avaliar os ambientes de conforto e estresse térmico dentro dos grupos genéticos de frangos.

Gene: <i>HSP90</i>	P valor	
	Coração	Fígado
Cobb x Peloco	0,8655	0,0258*
Conforto X estresse	0,0076*	0,0048*
Interação	0,9526	0,0257*
Cobb conforto x estresse	0,0622	0,0254*
Peloco conforto x estresse	0,0657	0,0067*

* $p < 0,05$ apresentam diferença estatística

Ao analisar os genes de estresse oxidativo, a expressão do gene *CAT* no tecido coração não apresentou diferença de expressão significativa em nenhuma das situações avaliadas (**Figura 9 A**). Já no fígado, o gene *CAT* apresentou diferença estatística tanto na comparação dos grupos genéticos, quanto nos ambientes de conforto e estresse; já na linhagem Cobb 500®, ele foi mais expresso nos animais submetidos ao estresse térmico se comparado ao conforto apresentando diferença significativa nos níveis de expressão; enquanto que na Peloco os valores obtidos foram praticamente o mesmo independente do ambiente (**Figura 9 B**) (**Tabela 19**).

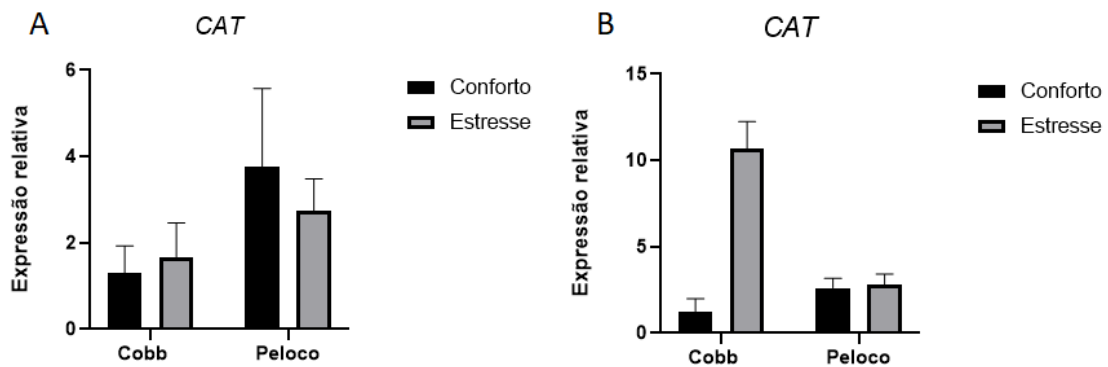


Figura 9. Perfil de expressão do gene *CAT* em diferentes tecidos de frangos. (A) Análise comparativa da expressão do gene *CAT* em coração de frangos de linhagem comercial Cobb 500® e Peloco submetidos ao conforto térmico (23°C) e estresse térmico agudo (39,5°C). (B) Análise comparativa da expressão do gene *CAT* em fígado de frangos de linhagem comercial Cobb 500® e Peloco submetidos ao conforto térmico (23°C) e estresse térmico agudo (39,5°C).

Tabela 19. Análise estatística de expressão relativa do gene *CAT* aplicando-se o teste two-way ANOVA para comparação entre grupos genéticos (ambientes de conforto e estresse térmico e interação entre os fatores) e aplicando-se o teste t não pareado para avaliar os ambientes de conforto e estresse térmico dentro dos grupos genéticos de frangos.

Gene: <i>CAT</i>	p valor	
	Coração	Fígado
Cobb x Peloco	0,1308	0,0057*
Conforto X estresse	0,7617	0,0003*
Interação	0,5281	0,0005*
Cobb conforto x estresse	0,747	0,0017*
Peloco conforto x estresse	0,6246	0,8006

* $p < 0,05$ apresentam diferença estatística

Em relação a expressão do gene *GPX*, os resultados do tecido coração revelaram que existe diferença de expressão entre os grupos genéticos e no ambiente; no ecotipo Peloco, as aves submetidas ao estresse térmico tiveram maior expressão que todos os demais animais; ao comparar os animais da Peloco nas situações de conforto e estresse térmico, observa-se um aumento estatisticamente significativo na expressão dos animais submetidos ao estresse por calor. (**Figura 10 A**). Já no tecido fígado, ao comparar os grupos genéticos observa-se diferença estatística entre os mesmos, sendo a expressão da linhagem comercial maior do

que na Peloco. Já para o ecotipo Peloco, a expressão do *GPX* no fígado apresentou expressão similar entre grupo conforto e estressado (**Figura 10 B**) (**Tabela 20**).

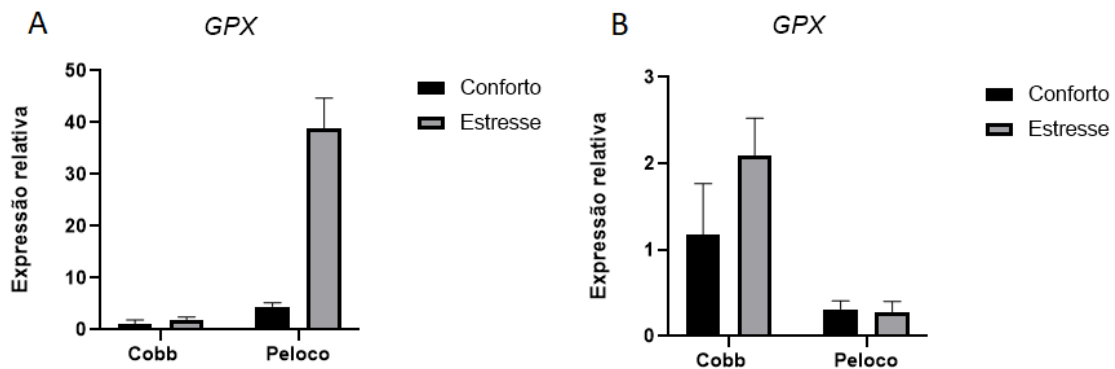


Figura 10. Perfil de expressão do gene *GPX* em diferentes tecidos de frangos. (A) Análise comparativa da expressão do gene *GPX* em coração de frangos de linhagem comercial Cobb 500® e Peloco submetidos ao conforto térmico (23°C) e estresse térmico agudo (39,5°C). (B) Análise comparativa da expressão do gene *GPX* em fígado de frangos de linhagem comercial Cobb 500® e Peloco submetidos ao conforto térmico (23°C) e estresse térmico agudo (39,5°C).

Tabela 20. Análise estatística de expressão relativa do gene *GPX* aplicando-se o teste two-way ANOVA para comparação entre grupos genéticos (ambientes de conforto e estresse térmico e interação entre os fatores) e aplicando-se o teste t não pareado para avaliar os ambientes de conforto e estresse térmico dentro dos grupos genéticos de frangos.

Gene: <i>GPX</i>	p valor	
	Coração	Fígado
Cobb x Peloco	<0,0001*	0,007*
Conforto X estresse	<0,0001*	0,3118
Interação	<0,0001*	0,2781
Cobb conforto x estresse	0,4481	0,2755
Peloco conforto x estresse	0,0010*	0,839

* p<0,05 apresentam diferença estatística

Nas análises referentes ao gene *SOD*, no tecido coração nota-se que existe diferença estatística de expressão quando compara-se os grupos genéticos e também quando compara-se os ambientes; em relação aos grupos genéticos, a expressão na Peloco é maior do que na Cobb 500®; enquanto que em relação aos ambientes, a situação de estresse térmico ocasionou uma maior expressão gênica; dentro dos grupos observa-se que em situação de estresse a expressão desse gene é maior, contudo apenas na Peloco observou-se diferença estatística significativa

(Figura 11 A). No fígado, a expressão do gene *SOD* não foi alterada quando as aves foram submetidas ao estresse térmico (Figura 11 B) (Tabela 21).

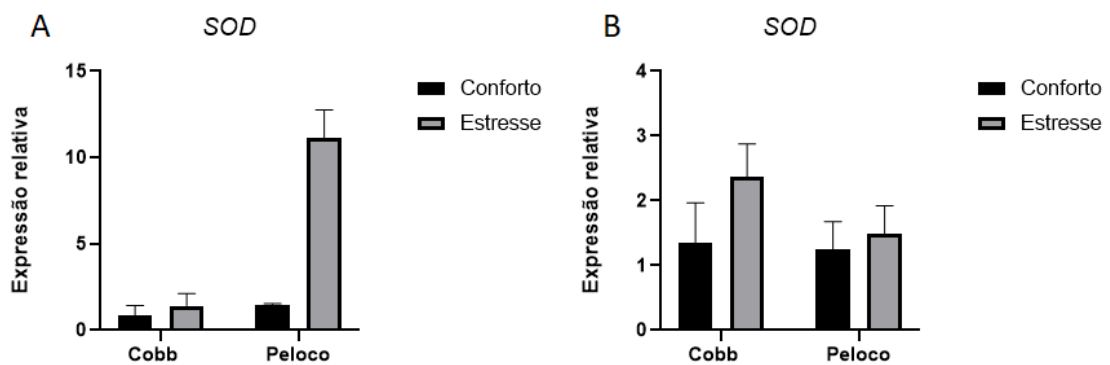


Figura 11. Perfil de expressão do gene *SOD* em diferentes tecidos de frangos. (A) Análise comparativa da expressão do gene *SOD* em coração de frangos de linhagem comercial Cobb 500® e Peloco submetidos ao conforto térmico (23°C) e estresse térmico agudo (39,5°C). (B) Análise comparativa da expressão do gene *SOD* em fígado de frangos de linhagem comercial Cobb 500® e Peloco submetidos ao conforto térmico (23°C) e estresse térmico agudo (39,5°C).

Tabela 21. Análise estatística de expressão relativa do gene *SOD* aplicando-se o teste two-way ANOVA para comparação entre grupos genéticos (ambientes de conforto e estresse térmico e interação entre os fatores) e aplicando-se o teste t não pareado para avaliar os ambientes de conforto e estresse térmico dentro dos grupos genéticos de frangos.

Gene: <i>SOD</i>	p valor	
	Coração	Fígado
Cobb x Peloco	0,0004*	0,3531
Conforto X estresse	0,0004*	0,2252
Interação	0,0009*	0,448
Cobb conforto x estresse	0,576	0,2597
Peloco conforto x estresse	0,0041*	0,699

* p<0,05 apresentam diferença estatística

Nas tabelas 22 e 23 são apresentadas uma síntese dos resultados de expressão gênica obtidos nesse estudo para coração e fígado de frangos, respectivamente.

Tabela 22. Síntese dos resultados de expressão gênica para todos os fatores no tecido coração dos grupos genéticos de frangos submetidos ao conforto e estresse térmico agudo.

Gene	Coração			
	Grupo genético: Cobb x Peloco	Ambiente: conforto x estresse	Cobb: conforto x estresse	Peloco: conforto x estresse
<i>HSF1</i>				
<i>HSF3</i>				
<i>HSP70</i>				
<i>HSP90</i>		↑*		
<i>CAT</i>				
<i>GPX</i>	↑*	↑*		↑*
<i>SOD</i>	↑*	↑*		↑*

Legenda: ↑* aumento de expressão estatisticamente significativa *($p < 0,05$); ↓* queda de expressão estatisticamente significativo *($p < 0,05$).

Tabela 23. Síntese dos resultados de expressão gênica para todos os fatores no tecido fígado dos grupos genéticos de frangos submetidos ao conforto e estresse térmico agudo.

Gene	Fígado			
	Grupo genético: Cobb x Peloco	Ambiente: conforto x estresse	Cobb: conforto x estresse	Peloco: conforto x estresse
<i>HSF1</i>		↑*		
<i>HSF3</i>				
<i>HSP70</i>		↑*		
<i>HSP90</i>	↓*	↑*	↑*	↑*
<i>CAT</i>	↓*	↑*	↑*	
<i>GPX</i>	↓*			
<i>SOD</i>				

Legenda: ↑* aumento de expressão estatisticamente significativa *($p < 0,05$); ↓* queda de expressão estatisticamente significativo *($p < 0,05$).

5.4 Discussão

Altas temperaturas podem causar vários danos e afetar economicamente produtores que contribuem no sustento da economia rural através da agricultura familiar. Diversas raças de galinhas caipiras encontram-se ameaçadas de extinção (BLACKBURN, 2006), e o ecotipo Peloco faz parte dessas aves, correndo o risco de perder genótipos e características importantes para o pequeno produtor e em virtude disso existe a importância de investigar os mecanismos moleculares que as tornam mais resistentes ao calor elevado, bem como conservar essa característica.

Neste estudo, foram analisados genes relacionados ao estresse térmico e oxidativo em coração e fígado da Peloco, e a linhagem comercial Cobb 500[®] foi utilizada a fim de comparação dos dados. Essa linhagem é uma ave melhorada geneticamente para características de produção que engloba ganho de peso, conversão alimentar e bom rendimento de carcaça (COBB BROILER, 2018).

Com os resultados foi possível observar que no coração dos animais do ecotipo Peloco quando submetidos ao calor, o gene *HSF1* não revelou diferença de expressão; já no fígado nota-se aumento de expressão desse gene nos animais em ambos grupos genéticos submetidos ao estresse térmico agudo de 39,5°C. O gene *HSF3*, quando analisado no tecido coração da Peloco, revelou expressão igual dos animais submetidos ao calor se comparado aos animais conforto desse grupo genético.

De acordo com De Nadal et al., (2011) a exposição ao estresse térmico pode induzir a expressão de genes relacionados à sobrevivência, ao invés de genes menos essenciais, resultando na rápida expressão dos fatores e nas proteínas de choque térmico. De acordo com alguns autores, o *HSF1* é ativado em estresse térmico agudo e médio, enquanto que o *HSF3* é ativado em estresse térmico crônico, sugerindo que o *HSF3* desempenha importante papel em períodos mais longos de estresse por calor em aves (TANABE et al., 1997; KAWAZOE et al., 1999; PIRKKALA; NYKÄNEN; SISTONEN, 2001). Nota-se que a Peloco já tem um nível de expressão maior do gene *HSF3* em situações de conforto comparado à linhagem

comercial, indicando a necessidade de um tempo mais prolongado de exposição ao calor elevado para que ocorra aumento de expressão.

É possível observar também entre os grupos genéticos estudados, que o perfil de expressão dos genes em questão são diferentes, indicando seus diferentes papéis na regulação gênica de frangos.

Em células eucarióticas, a regulação dos genes *HSPs* pelo calor é controlada pelos *HSFs*, deflagrando o processo de transcrição (SANTORO, 2000). Contudo, em um grande número de eucariotos, o *HSF1* e o *HSF3* está presente tanto em células fisiologicamente normais, como em células submetidas a diferentes tipos de estresse. Porém, durante o estresse térmico, os *HSFs* se ligam a elementos de choque térmico (*HSE*) criando uma cascata de eventos e de proteínas mal configuradas que competem com os *HSFs* para se associarem com a *HSP70*. Através de um processo de fosforilação e mudança conformacional, a transcrição é iniciada, seguida pela tradução. Diante disso, o aumento de expressão dos *HSFs* induz a expressão das *HSPs*, em particular da *HSP70* (SANTORO, 2000). Neste trabalho, foi possível notar que o gene *HSF1* e *HSP70* revelaram maior expressão no fígado dos animais Cobb que foram submetidos ao estresse térmico, reforçando que o *HSF1* induz a expressão do gene *HSP70* nas aves estudadas durante o estresse por calor (INOUYE et al., 2003). Além disso, as linhagens comerciais são animais de produção geneticamente melhorados para rápido crescimento e deposição de tecido muscular, contudo, suger-se que o fígado dessas aves se tornam mais susceptíveis ao calor elevado quando comparada a Peloco que são aves criadas em sistema extensivo.

Em um experimento realizado por Zhang et al., (2012), onde suínos foram expostos a altas temperaturas, revelou-se que a expressão do gene *HSP70* variou no coração, fígado e estômago. Essa especificidade de tecido pode explicar o aumento de expressão significativo dos genes *HSF1* e *HSP70* no fígado dos frangos submetidos à alta temperatura.

Em relação ao gene *HSP90*, os dados mostraram alta expressão tanto no coração como no fígado dos animais submetidos ao estresse térmico. No tecido coração notou-se um aumento significativo de expressão apenas comparando o ambiente (sem considerar o grupo genético). No fígado, os dados indicaram que o

gene *HSP90* teve aumento significativo de expressão nos animais submetidos ao estresse térmico nos dois grupos genéticos. Esses resultados corroboram com a literatura que associa a elevada expressão desse gene com o estresse térmico agudo em frangos (LEI et al., 2009). As *HSP90* representam cerca de 1 a 2% do total de proteínas celulares na ausência de estresse, contudo, em temperaturas elevadas e outros estresse ambientais tem sua expressão aumentada (SANGSTER; QUEITSCH, 2005).

Embora o gene *HSP90* tenha revelado aumento significativo de expressão nos animais submetidos ao estresse térmico agudo no fígado do ecotipo Peloco, essa expressão foi menor quando comparada a linhagem Cobb 500[®], sugerindo que a Peloco é mais adaptada à temperatura elevada, atribuindo também ao seu fenótipo, que por conta de uma quantidade menor de penas, esse ecotipo tem mais facilidade na dissipação do calor. De acordo com Manolli et al., (2007), quando o animal é submetido ao estresse térmico, as reservas celulares de lipídios e carboidratos podem ser mobilizadas produzindo uma energia suficiente para atenuar os impactos negativos do estresse. O fígado por ser o centro do metabolismo, torna-se mais susceptível ao estresse, o que poderia explicar a alta expressão desse gene nesse tecido quando comparado ao coração dos mesmos animais submetidos ao estresse térmico.

Segundo Cedraz et al, (2017), a galinha caipira Peloco por ser criada em sistema extensivo, é mais adaptada ao ambiente de clima quente e consegue se manter sob alta temperatura com maior facilidade do que as aves Cobb 500[®]. O estresse térmico ocorre quando a quantidade de calor produzida por um animal ultrapassa a capacidade do animal de dissipar calor para o ambiente circundante (ABKARIAN et al., 2016). Tendo isso em vista, foi possível observar nesse experimento que durante o período que esses animais foram expostos ao estresse térmico elevado, a Peloco manteve-se menos desconfortável, enquanto que a linhagem comercial demonstrou bastante desconforto.

Os resultados de expressão dos genes *HSF1*, *HSF3*, *HSP70* e *HSP90* apresentados nesse estudo estão de acordo com os encontrados por Yu et al., (2008); Lei et al., (2009); entretanto, os genes *HSF1* e *HSF3* mostraram resultados diferentes dos que foram encontrados por Xie et al., (2014), que reportou alta

expressão desses genes em frangos submetidos ao estresse térmico. Essa divergência de resultados pode ter sido em função do método de indução às altas temperaturas, do tempo de exposição dos animais, dos tecidos, bem como das diferenças fisiológicas dos grupos genéticos estudados.

Além dos efeitos negativos causados pelo estresse térmico em frangos, esses animais expostos ao calor elevado podem ter seu desempenho produtivo reduzido devido ao estresse oxidativo induzido pela alta temperatura. O estresse por calor provoca uma perturbação no estado fisiológico dos frangos, incluindo uma redução geral do sistema antioxidante (MUJAHID et al., 2007).

A CAT é uma enzima que atua como primeira linha de defesa antioxidante, e neste estudo, observou-se aumento de expressão desse gene no fígado da linhagem comercial submetida ao estresse agudo por alta temperatura. Esse fato pode ser atribuído ao sistema de criação dessa ave, resultando em considerável mudança genética e susceptibilidade de alguns órgãos ao estresse oxidativo. Em relação a esse gene, os dados revelaram que no tecido coração, a expressão não foi afetada quando os animais foram submetidos ao calor nos dois grupos genéticos estudados. Observa-se que no coração o grupo conforto apresenta altos níveis de CAT, o que pode ter sido suficiente para combater o estresse oxidativo.

Vários estudos relatam aumento de atividade e expressão de mRNA de enzimas antioxidantes em frangos durante período de estresse térmico agudo ou crônico, indicando seus papéis protetores para diminuir o estresse (ALTAN et al., 2003; TAN et al., 2010; HAO; GU, 2014; RIMOLDI et al., 2015), porém existem trabalhos que atribuem a diferença de expressão ao tecido, ou seja, a capacidade antioxidativa pode variar de tecido para tecido. A Catalase é encontrada em abundância no fígado dos animais, e em pequena quantidade no coração (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1985), o que pode ser atribuído a expressão no fígado.

Ainda em relação a expressão das enzimas antioxidantes, foi observado um aumento de expressão do gene *GPX* no coração dos animais submetidos ao estresse térmico. Verificou-se que no coração, a Peloco revelou aumento de expressão no grupo submetido ao calor com diferença significativa. De acordo com Mallick; Mohn, (2000), o coração tem uma atividade moderada desta enzima,

podendo existir variação dependendo da espécie e do tecido em que ele se encontra. Além disso, a GPX age articuladamente com a CAT, impedindo o acúmulo de peróxidos de hidrogênio (KOIVULA; EEVA, 2010).

Já no fígado, o *GPX* revelou aumento de expressão significativo apenas quando comparados os grupos genéticos. De acordo Lin et al., (2006), a temperatura corporal elevada pode induzir alterações metabólicas envolvidas na indução do estresse oxidativo. Além disso, sugere-se que o fígado de aves selecionadas para rápido crescimento é mais susceptível que o coração a esse tipo de estresse durante a exposição aguda ao calor. Esse fato pode estar relacionado ao alto conteúdo de ácidos graxos insaturados, apresentando alta peroxidação lipídica (SZABÓ et al., 2005). No entanto, nesse tecido, a Peloco, além de ter tido baixa expressão comparada a Cobb 500[®], os níveis desse gene não foi alterado quando os animais foram submetidos ao estresse térmico. Além da especificidade tecidual, sugere-se que esse ecotipo é mais adaptado ao ambiente de clima quente e dessa forma, consegue se manter em alta temperatura com mais facilidade sem alterar a expressão de determinados genes.

Outro gene do sistema antioxidante analisado foi o *SOD* e de acordo com os resultados, foi possível notar que no coração, a expressão desse gene teve um aumento significativo nos animais Peloco. Já no fígado, a expressão desse gene não foi alterada.

A *SOD* é essencial para sobrevivência das células, pois é considerada a primeira barreira antioxidante, e é responsável pela dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio, que é menos reativo e pode ser degradado pela CAT e GPX. Diante disso, sugere-se que o *SOD* foi degradado, explicando o porque de não ter ocorrido uma expressão significativa neste tecido nos dois grupos genéticos (RIMOLDI et al., 2015).

Segundo Zhang et al., (2014), diferenças na expressão dos genes que codificam enzimas antioxidantes podem depender em grande parte das condições do experimento, espécies, tecidos e tempo de exposição ao estresse térmico. Vários trabalhos tem mostrado alterações de expressão de genes que codificam enzimas antioxidantes em frangos de corte (TAN et al., 2010; AZAD et al., 2010; WILLEMSSEN et al., 2011; RIMOLDI et al., 2015; DEL VESCO et al., 2017), porém,

até o momento não existem relatos do perfil de expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo no ecotipo Peloco submetidos ao calor elevado.

No entanto, foi estabelecido que a capacidade antioxidante sozinha não pode ser extrapolada para fazer suposições sobre o estresse oxidativo, mas serve como um parâmetro útil em experimentos de estresse de calor quando incluído ao lado de outros (CONSTANTINI; VERHULST, 2009).

Dessa forma, é importante ressaltar que só existem relatos na literatura da expressão de genes relacionados ao estresse térmico e oxidativo no ecotipo Peloco no tecido músculo, sendo que os dados desse trabalho são o ponto de partida para novas pesquisas, a fim de traçar um perfil gênico desse frango, fornecendo informações essenciais para futuras investigações funcionais.

5.5 Conclusão

Diante do exposto, é possível concluir que existe alteração de expressão relativa nos genes relacionados ao estresse térmico e oxidativo nos dois grupos genéticos estudados, e que o ecotipo Peloco apresenta perfil de expressão diferente das linhagens comerciais, e que esse perfil gênico pode variar dependendo do tecido. Além disso, os dados sugerem que o frango Peloco é mais adaptada a ambientes de clima quente, sendo os frangos da linhagem comercial mais susceptíveis ao calor elevado.

Referências

ABKARIAN, 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**, v.7. n.37, 2016.

ABPA. Relatório Anual 2017. Disponível em: <<http://www.abpa-br.org>>. Acesso em: 21 dez. 2019.

ABREU, P. G. DE; ABREU, V. M. N. ESTRESSE CALÓRICO – **Como Ocorre e o Que Fazer?** Embrapa - Suínos e Aves, p. 3, 2011.

ADAMS, M. et al. Complementary DNA Sequencing: expressed sequence tags and human genome project. **Science**, v.252, n.5013, p.1651–1656, 1991.

AHN, S.-G.; THIELE, D. J. Redox regulation of mammalian heat shock factor 1 is essential for Hsp gene activation and protection from stress. **Genes & Development**, v.17, n.4, p.516–28, 2003.

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

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

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

ALTAN Ö.; PABUCCUOGLU A.;; ALTAN A; KONYALIOGLU S.; BAYRAKTAR H. Effect of heat stress on oxidative stress, lipid peroxidation and some stress parameters in broilers. **British Poultry Science**, v.44, p.545–50, 2003.

AL-ZGHOUL M.B.; SUKKER H.; ABEBNEH M.M. Effect of thermal manipulation of broilers embryos on the response to heat-induced oxidative stress. **Poultry Science**. Doi: 10.3382 / ps / pey379, 2018.

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**, v.64, p. 5245-50, 2004.

ANDO, M. et al., Agerelated effects of heat stress on protective enzymes for peroxides and microsomal monooxygenase in rat liver. **Environmental Health Perspectives**, v.105, n.7, p.726–733, 1997.

ARAÚJO R. S. **Expressão Gênica em frango de corte submetido a diferentes níveis de alimentos alternativos**. 2015. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) Universidade Federal do Piauí, Piauí.

AZAD, M.A. et al., Metabolic characteristics and oxidative damage to skeletal muscle in broiler chickens exposed to chronic heat stress. **Comparative Biochemistry Physiology. Part. A Molecular Integrative Physiology**, v.155, p.401–406, 2010.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre gerações de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v.29, n.1, p.113-123, 2006.

BARROT, H. G. Effects of Temperature, Humidity and Other Factors on Hatch of Eggs and on Energy Metabolism of Chick Embryos. **USDA Technical**, v.553, p.1-46, 1937.

BLACKBURN, H. D. The national animal germplasm program: Challenges and opportunities for poultry genetic resources. **Poultry Science**, v.85, p.210, 215, 2006.

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

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.

BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.29, n.1, p.23–39, 2002.

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.

CAUSTON, H. C. et al. Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. **Molecular Biology of the Cell**, v.12, p.323–37, 2001.

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

CLASSEN, H. L. Managing metabolic disease in rapidly growing strains of poultry. **Journal of the British Society of Animal Science**, v.27, p.63–64, 2000.

CONSTANTINI, D.; S.VERHUST. Does high antioxidant capacity indicate low oxidative stress? **Functional Ecology**, v.23, p.506–509, 2009.

CZECHOWSKI, T. et al. Genome-Wide Identification and Testing of Superior Reference Genes for Transcript Normalization. **Plant Physiology**, v.139, p.5–17, 2005.

COBB BROILER. **Guia de gerenciamento**. 2018. Disponível em: <<https://www.cobb-vantress.com/products/cobb-500>>. Acesso em: 15 Jun. 2018.

DANTZER, B. et al. Measures of physiological stress: a transparent or opaque window into the status, management and conservation of species? **Conservation Physiology**, v.2, p.1–18, 2014.

DE NADAL, E.; AMMERER, G.; POSAS, F. Controlling gene expression in response to stress. **Nature Reviews Genetics**, v.12, n.12, p.833–845, 2011.

DEL VESCO A. P. et al., Age-related oxidative stress and antioxidant capacity in heat-stressed broilers. **Animal**, v.11, p.1783-1790, 2017.

DEL VESCO AP, GASPARINO E. Production of reactive oxygen species, gene expression, and enzymatic activity in quail subjected to acute heat stress. **Journal Animal Science**, v.91, p.582–7, 2013.

DEVI, G.S. et al., Free radicals antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different types of leukemias. **Clinica Chimica Acta**, v.293, p.53–62, 2000.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiology Review**, v.82, p.47–95, 2002.

ELLIS R.J. Proteins as molecular chaperones. **Nature**, v.328, p.378-9. 1987.

ELSHIMAA M. et al., 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**, p.337-343, 2018.

ESTRADA-PAREJA, M. M.; MÁRQUEZ-GIRÓN, S. M.; BETANCUR, L. F. R. Efecto de la temperatura y la humedad relativa en los parámetros productivos y la transferencia de calor en pollos de engorde. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 20, n. 3, p. 288-303, 2007.

EXPÓSITO-RODRÍGUEZ, M. et al. Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. **BMC Plant Biology**, v.8, n.1, p.131, 2008.

FEHRENBACH A. NIESS, A. M. Role of heat shock proteins in the exercise response. **Exercise Immunology Review**, v.5, p.57-77, 1999.

FEIGE U, POLLA BS. Hsp70 - a multi-gene, multi-structure, multi-function family with potential clinical applications. **Experientia**, v.50, p.979-86, 1994.

FELVER-GANT, J.N. et al., Genetic variations alter physiological responses following heat stress in 2 strains of laying hens. **Poultry Science**, v.91, p.1542–1551, 2012.

FIGUEIREDO, D. et al. Leptin downregulates heat shock protein-70 (HSP-70) gene expression in chicken liver and hypothalamus. **Cell and Tissue Research**, v.329, n.1, p.91–101, 2007.

FIGUEIREDO, D. F. **Efeito do estresse sobre a expressão de HSP70 em embriões e a resposta imune pós-eclosão em frangos de corte**. 2006. Tese (Doutorado em zootecnia) – Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Jaboticabal.

FIGUEIREDO, N. E. M. **Diversidade genética e avaliação de crescimento da raça Peloco (*Gallus gallus domesticus*) visando sua conservação e utilização**. Dissertação (Mestrado em Genética, Biodiversidade e Conservação) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2015.

FU, W. J. et al. Statistical models in assessing fold change of gene expression in real-time RT-PCR experiments. **Computational Biology and Chemistry**, v.30, n.1, p.21–26, 2006.

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. **Efeitos do nível energético da ração e do estresse térmico na expressão da proteína de choque térmico Hsp70 e nos níveis de seu RNA mensageiro no fígado de frangos de corte em diferentes estágios de desenvolvimento**. 1996. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

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.

GERAERT, P. A.; PADILHA, J.C.; GUILLAUMIN, S. Metabolic and endocrine changes induced by chronic heat exposure in broiler chickens: Growth performance, body 91 composition and energy retention. **British Journal of Nutrition**, v.75, p.195-204, 1996.

GIVISIEZ P. et al. Heat or cold chronic stress affects organ weights and Hsp70 levels in chicken embryos. **Canadian Journal of Animal Science**, v.81, p.83-87, 2001.

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.

GUERTIN, M. J. et al. Drosophila heat shock system as a general model to investigate transcriptional regulation. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v.75, p.1–9, 2011.

GUO J, LING H, WU Q, XU L, QUE Y. The choice of reference genes for assessing gene expression in sugarcane under salinity and drought stresses. **Scientific Reports**, v.4, p.7042, 2014.

GUTIERREZ, L. et al. The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants. **Plant Biotechnology Journal**, v.6, n.6, p. 609–18, 2008.

GUTTERIDGE J.M.C.; Mitchell J. Redox imbalance in the critically ill. **British Medical Bulletin**, v.55, p.49–75, 1999.

HABASHY W.S. et al., Expression of genes that encode cellular oxidant/antioxidant systems are affected by heat stress. **Molecular Biology Reports**, v.45, p.389-394, 2018.

HAIBO YU. et al., Antioxidant defenses of *Onychostoma macrolepis* in response to thermal stress: Insight from mRNA expression and activity of superoxide dismutase and catalase. **Fish and Shellfish Immunology**, v.66, p.50-61, 2017.

HALLIWELL, B. **Oxidants and human disease: some new concepts**. FASEB J., 1. ed., 1987, p. 358-364.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in Biology and Medicine**. Oxford: Clarendon Press, 1989.

HANSEN, P. J. Effects of heat stress on mammalian reproduction. Philosophical transactions of the Royal Society of London. **Biological Sciences**, v.364, n.1534, p.3341–50, 2009.

HAO, Y.; GU X. H. Effects of heat shock protein 90 expression on pectoralis major oxidation in broilers exposed to acute heat stress. **Poultry Science**, v. 93, p.2709–2717, 2014.

HARTL, F.U.; BRACHER, A.; HAYER-HARTL, M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. **Nature**, v.475, p. 324-32, 2011.

HASHEIMI, S.R. et al., Dietary supplementation of Zingiber officinale and Zingiber zerumbet to heat-stressed broiler chickens and its effect on heat shock protein 70 expression, blood parameters and body temperature. **Journal Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.97, p.632–638, 2012.

HELDMAIER, G.; ORTMANN, S.; ELVERT, R. Natural hypometabolism during hibernation and daily torpor in mammals. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v.141, n.3, p.317–329, 2004.

HOLOVSKÁ Jr. et al., Antioxidant enzyme activities in liver tissue of chickens fed diets supplemented with various forms and amounts of selenium. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v.12, p.143-152, 2003.

HORWICH, A. L.; FENTON, W. A. Chaperonin-mediated protein folding: using a central cavity to kinetically assist polypeptide chain folding. **Quarterly Review of Biophysics**, v.42, p.83-116, 2016.

INOUE, 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**, v.23, n.16, p.5882–5895, 2003.

ISLAM A. et al. Tissue-specific upregulation of HSP72 in mice following short-term administration of alcohol. **Cell Stress Chaperones**, v.18, p.215-222, 2013.

JAATTELA M.; WISSING D. Emerging role of heat shock proteins in biology and medicine. **Annals of Medicine**, v.24, p.249-58, 1992.

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.

JULIAN, R.J. The effect of increased sodium in the drinking water on right ventricular hypertrophy, right ventricular failure and ascites in broiler chickens. **Avian Pathology**, v.16, p.61-71, 1987.

KAWAZOE Y. et al., HSF3 is a major heat shock responsive factor during chicken embryonic development. **European Journal of Biochemistry**, v.265, p. 688-697, 1999.

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.

KOHL, M. SLqPCR: **Functions for analysis of real-time quantitative PCR data at SIRS-Lab GmbH**, 2010. Disponível em: <<https://rdr.io/bioc/SLqPCR/>>. Acesso em: 20 jan. 2017.

KOIVULA, M.J.; EEVA, T. Metal-related oxidative stress in birds. **Environmental Pollution**, v.58, p.2359 - 2370, 2010.

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

LAGANÁ, C. **Otimização da produção de frango de corte em condições de estresse por calor**. 2005. 180F. Tese (Doutorado em Zootecnia)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS.

LEDUR, M. C.; NONES, K. O Uso de Marcadores Moleculares na Produção de Aves. In: BRIDI, A. M.; FONSECA, N. A. N. **A zootecnia frente a novos desafios**. Universidade Estadual de Londrina, Londrina: 2007. p.457-482.

LEI, L. et al. Effects of acute heat stress on gene expression of brain-gut neuropeptides in broiler chickens (*Gallus gallus domesticus*). **Journal of Animal Science**, v.91, n.11, p.5194–5201, 2014.

LEI, L.; YU, J.; BAO, E. Expression of heat shock protein 90 (Hsp90) and transcription of its corresponding mRNA in broilers exposed to high temperature. **British Poultry Science**, v.50, n.4, p.504–11, 2009.

LIANG, P.; PARDEE, A. B. Differential display of eucariotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science**, v.257, p.967–971, 1992.

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

LINHARES, S.; GEWANDSZNAJDE, F. **Biologia**. São Paulo: Ática, 2008.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v.25, n.4, p.402–8, 2001.

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

MAGER W.H., KRUIJFF A.J. Stress-induced transcriptional activation. **Microbiology Review**, v.59, p.506-31, 1995.

MALLICK N., MOHN F. H. Reactive oxygen species: response of algal cells. **Journal of Plant Physiology**, v.157, p.183-193, 2000.

MANOLI, I. et al., Mitochondria as key components of the stress response. **Trends Endocrinology & Metabolism**, v.18, n.5, p.190–198, 2007.

MARIANTE, A. S. et al. Present status of the conservation of livestock genetic resources in Brazil ☆. **Livestock Science**, v.120, n.3, p.204–212, 2009.

MAZZI C.M. et al. Polymorphism analysis of the hsp70 stress gene in broiler chickens (*Gallus gallus*) of different breeds. **Genetics and Molecular Biology**, v.26, n.3, p.275-281, 2003.

McCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). **Journal Biology Chemistry**, v.244, p. 6049-6055, 1969.

MEYER, T. N. AND DA SILVA, A. L. Resposta celular ao estresse. **Revista da Associação médica brasileira**, v.45, p.181-188, 1999.

MILLER, C. et al. Dynamic transcriptome analysis measures rates of mRNA synthesis and decay in yeast. **Molecular Systems Biology**, v.7, n.458, p.458, 2011.

MINOWADA, G.; WELCH W. I. Clinical Implications of the stress response. **Journal of Clinical Investigation**. v.95, p.3-12, 1995.

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

MUJAHID, A. et al., Mitochondrial oxidative damage in chicken skeletal muscle induced by acute heat stress. **Poultry Science**, v.44, p.439–445, 2007.

MUJAHID, A.; YOSHIKI, Y.; AKIBA, Y.; TOYOMIZU, M. Superoxide radical production in chicken skeletal muscle induced by acute heat stress. **Poultry Science**. v.84, p.307–314, 2005.

NAGAYA, S. et al. The HSP terminator of arabidopsis thaliana increases gene expression in plant cells. **Plant and Cell Physiology**, v.51, n.2, p.328–332, 2010.

NAKAMURA M.; MORITA M.; KURIHARA H.; MITARAI S. Expression of hsp70, hsp90 and hsf1 in the reef coral *Acropora digitifera* under prospective acidified conditions over the next several decades. **Biology Open**, v.1, p.75-81, 2012.

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.

NEIDHARDT, F. C.; VANBOGELEN, R. A.; VAUGHN, V. The Genetics and Regulation of Heat-Shock Proteins. **Annual Review of Genetics**, v.18, n.1, p.295–329, 1984.

NI, L. et al. Dynamic and complex transcription factor binding during an inducible response in yeast. **Genes and Development**, v.23, n.11, p.1351–1363, 2009.

NOVER L., et al. Arabidopsis and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need? **Cell Stress & Chaperone**, v.6, n.3, 177–189, 2001.

O'CONNOR, C. M.; ADAMS, J. U. **Essentials of Cell Biology**. Online ed. NPG Education, 2010. Disponível em: <https://www.nature.com/scitable/ebooks/essentials-of-cell-biology-14749010>> Acesso em: 13 Jan. 2016.

PEARL, L. H. Hsp90 and Cdc37 - a chaperone cancer conspiracy. **Current Opinion in Genetics & Development**, v.15, p.55-61, 2005.

PEETERMANS W.E. Heat shock proteins in medicine. **Acta Clinica Belgica**, v.50, p.131-6, 1995.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RTPCR. **Nucleic Acids Research**, v.29, n.9, p.e45, 2001.

PFAFFL, M. W. et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology Letters**, v.26, n.6, p.509–15, 2004.

PIRKKALA, L.; NYKÄNEN, P.; SISTONEN, L. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v.15, n.7, p.1118–1131, 2001.

PROSSER, C. L.; HEATH, J. E. **Temperature**. In: **C. Ladd Prosser (Ed.) . Comparative Animal Physiology, Environmental and Metabolic Animal Physiology**. 4. ed. New York: John Wiley & Sons, 1991. p. 109–166.

QUEITSCH, C., SANGSTER, T.A., LINDQUIST, S. Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation. **Nature**, v.417, p.618-624, 2002.

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

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

RITOSSA. F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP I *Drosophila*. **Experientia**, v.13, p.571-573, 1962.

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

RUTLEDGE, R. G.; CÔTÉ, C. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. **Nucleic Acids Research**, v.31, n.16, p.93e–93, 2003.

SAGRILO, E. et al. **Agricultura Familiar - Galinha Caipira**. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/AgriculturaFamiliar/RegiaoMeioNorteBrasil/GalinhaCaipira/index.htm>>. Acesso em: 19 jan. 2018.

SANGSTER, T. A.; QUEITSCH, C. The HSP90 chaperone complex, an emerging force in plant development and phenotypic plasticity. **Current Opinion in Plant Biology**, v.8, p.86-92, 2005.

SANGSTER, T.A. et al., HSP90 affects the expression of genetic variation and developmental stability in quantitative traits. **Proceedings of the Academy National Academy Science**, v.105, p.2963-2968, 2008.

SANTORO, M.G. Heat shock factors and the control of the stress response. **Biochemical Pharmacology**, v.59, p.55-63, 2000.

SCANDALIOS J. G. Oxygen stress and superoxide dismutase. **Plant Physiology**, v.101, p.7-12, 1993.

SHIH-HAN, W. et al. Differential gene expressions in testes of L2 strain Taiwan country chicken in response to acute heat stress. **Theriogenology**, v.79, p.374–382, 2013.

SILVER, N. et al. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. **BMC Molecular Biology**, v.7, n.1, p.33, 2006.

SONNA, L. A. et al. Invited review: Effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. **Journal of applied physiology**, v.92, n.4, p.1725–42, abr. 2002.

SOLEIMANI, A.F., ZULKIFLI, I., OMAR, A.R., RAHA, A.R. Physiological responses of 3 chicken breeds to acute heat stress. **Poultry Science**, v.90, p.1435–1440, 2011.

SONG, Z., CHENG, K., ZHANG, L., WANG, T. 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.

SOUSA F. C. B. **Seleção de gene de referência para normalização da expressão gênica em tecidos de codornas**. 2016. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) Universidade Federal do Piauí, Piauí.

STEIBEL, J. P. et al. A powerful and flexible linear mixed model framework for the analysis of relative quantification RT-PCR data. **Genomics**, v.94, n.2, p.146–152, 2009.

SURAI P.F. Selenium in poultry nutrition - 1. Antioxidant properties, deficiency and toxicity. **World's Poultry Science Journal**, v.58, p.333–47, 2002.

SZABÓ, A.; FÉBEL, H.; MÉZES, M.; HORN, P.; BALOGH, K.; ROMVÁRI, R. Differential utilization of hepatic and myocardial fatty acids during forced molt of laying hens. **Poultry Science**. v.84, p.106–112, 2005.

TAN, G.Y.; YANG, L.; FU, Y.Q.; FENG, J.H.; ZHANG, M.H. Effects of different acute high ambient temperatures on function of hepatic mitochondrial respiration, antioxidative enzymes, and oxidative injury in broiler chickens. **Poultry Science**. v.89, p.115–122, 2010.

TANABE M.; NAKAI A.; KAWAZOE Y.; NAGATA K. Different thresholds in the responses of two heat shock transcription factors, HSF1 and HSF3. **Journal Biology Chemical**, v.272, p.15389-15395, 1997.

TEAM, R. C. **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing Vienna. Disponível em: <http://www.r-project.org/>, 2015.

TEIXEIRA, M. P. F. **Vitamina C em ração para frangos de corte estressados por calor**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade Universidade Federal do Piauí, Piauí.

TEMIM, S. et al. Chronic heat exposure alters protein turnover of three different skeletal muscles in finishing broiler chickens fed 20 or 25% protein diets. **The Journal of Nutrition**, v.130, n.4, p.813–9, 2000.

TERLECKY S.P. Hsp70 and lysosomal proteolysis. **Experientia**, v.50, p.1.021-25, 1994.

TINOCO, I. F. F. Avicultura industrial: novos conceitos de materiais, concepções e técnicas construtivas disponíveis para galpões avícolas brasileiros. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.3, n.1, p.1- 26, 2001.

TIROLI-CEPEDA, A.O.; RAMOS, C.H. An Overview of the Role of Molecular Chaperones in Protein Homeostasis. **Protein & Peptide Letters**, v.18, p.101-109, 2011.

TREPEL, J.; MOLLAPOUR, M.; GIACCONE, G.; NECKERS, L. Targeting the dynamic HSP90 complex in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v.10, p.537-549, 2010.

VELCULESCU, V. E. et al. Serial Analysis of Gene Expression. **Science**, v.270, n.5235, p.484–487, 1995.

VIERLING, E. The roles of heat shock proteins in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.42, p.579–620, 1991.

WALSH, D. et al. Heat shock and the role of the HSPs during neural plate induction in early mammalian CNS and brain development. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.53, n.2, p.198–211, 1997.

WANG, Q. et al. Stability of endogenous reference genes in postmortem human brains for normalization of quantitative real-time PCR data: comprehensive evaluation using geNorm, NormFinder, and BestKeeper. **International Journal of Legal Medicine**, v.126, n.6, p.943–52, 2012.

WASSMANN, S.; WASSMANN, K.; NICKENIG, G. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. **Hypertension**, v.44, p.381-386, 2004.

WATERS, E.R.; LEE G.J.; VIERLING, E. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. **Journal of Experimental Botany**, v.47, p.325–338, 1996.

WEAKE, V. M.; WORKMAN, J. L. Inducible gene expression: diverse regulatory mechanisms. **Nature Reviews Genetics**, v.11, n.6, p.426–437, 2010.

WELCH W.J. Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. **Physiology Review**, v.72, p.1.063-81,1992.

WELCH, W.J. BROWN, C.R. Influence of molecular and chemical chaperones on protein folding. **Cell Stress Chaperones**, v.1, p.109-115, 1996.

WILLEMSEN, H.J. et al., Effects of dietary supplementation of methionine and its hydroxy analog dl-2-hydroxy-4-methylthiobutanoic acid on growth performance, plasma hormone levels, and the redox status of broiler chickens exposed to high temperatures. **Poultry Science**, v.90, p.2311–2320, 2011.

WONG, M. L.; MEDRANO, J. F. Real-time PCR for mRNA quantitation. **BioTechniques**, v.39, n.1, p.75–85, 2005.

WYNN R.M.; DAVIE JR.; COX R.P.; CHUANG D.T. Molecular chaperones: heat-shock proteins, foldases and matchmakers. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.124, p.31-6, 1994.

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**, v.9, n.7, p. e102204, 2014.

YAKUBU; UGBO, S.B. An assessment of biodiversity in morphological traits of Muscovy ducks in Nigeria using discriminant analysis. **International Conference on Biology, Environment and Chemistry**, v.1, p.389-391, 2011.

YEH, F. L.; HSU, T. Differential regulation of spontaneous and heat-induced HSP 70 expression in developing zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Experimental Zoology**, v.293, n.4, p.349–359, 2002.

YU, J. et al. Expression and localization of Hsps in the heart and blood vessel of heat-stressed broilers. **Cell Stress and Chaperones**, v.13, n.3, p.327–335, 2008.

ZHANG, Z.Y. et al., Effects of constant and cyclic heat stress on muscle metabolism and meat quality of broiler breast fillet and thigh meat. **Poultry Science**, v.91, p.2931–2937, 2012.

ZHANG, T. W. T.; LI Y.; CHENG X. A eukaryotic expression plasmid carrying chicken interleukin-18 enhances the response to Newcastle disease virus vaccine. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.22, n.1, p.56–64, 2014.

ZHANG J. et al., Selection of housekeeping genes for quantitative gene expression analysis in yellow-feathered broilers. **Italian Journal of Animal Science**, v.17, p.540-556, 2017.

6. Considerações finais

À partir das análises de expressão dos genes de referência, foi possível notar a importância da escolha do gene mais adequado para a normalização da expressão relativa dos genes alvos relacionados ao estresse térmico e oxidativo de grupos genéticos divergentes, bem como a importância de traçar um perfil de expressão em diferentes tecidos do ecotipo Peloco submetidos à altas temperaturas, uma vez que esse trabalho é pioneiro e traz informações que servem como ponto de partida para futuras pesquisas com esse ecotipo de frango.

Além disso, de acordo com os resultados obtidos foi possível perceber que existe variação de expressão dos genes em estudo, inclusive os genes de referência, confirmando que esses podem sofrer variação dependendo do tratamento, espécie ou tecido, bem como, o uso adequado dos algoritmos BestKeeper, GeNorm e NormFinder. E dessa forma, uma correta normalização, torna-se indispensável, uma vez que é preciso levar em consideração a relevância biológica das amostras de diferentes espécies e/ou tecidos, bem como as condições experimentais.

Outro fator importante é a expressão relativa nas aves Peloco. Embora alguns genes de estresse térmico e oxidativo tenham revelado aumento de expressão nos tecidos dos animais submetidos ao calor elevado, durante o experimento foi possível notar que a Peloco é mais adaptada à alta temperatura, pois durante a situação de estresse térmico foi observado que essas estavam menos desconfortáveis com tal situação quando comparada com a linhagem comercial. Diante disso, reforça-se a necessidade de investigação molecular mais detalhada desse ecotipo, para verificar seu perfil gênico, bem como conservar determinadas características que colaboram com o baixo custo de criação para o pequeno produtor na agricultura familiar.