UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ANA CARINA ALVES PEREIRA DE MIRA GERALDO

**Termotolerância em fêmeas bovinas: abordagens celular e
fisiológica**

Pirassununga

2013

ANA CARINA ALVES PEREIRA DE MIRA GERALDO

Termotolerância em fêmeas bovinas: abordagens celular e fisiológica

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dr. Evaldo Antonio Lencioni Titto

Co-orientador: Prof. Dr. Joaquim Fernando Moreira da Silva

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo

G354t Geraldo, Ana Carina Alves Pereira de Mira
Termotolerância em fêmeas bovinas: abordagens celular
e fisiológica / Ana Carina Alves Pereira de Mira
Geraldo. -- Pirassununga, 2013.
93 f.
Tese (Doutorado) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.
Departamento de Ciências Básicas.
Área de Concentração: Qualidade de Produtividade
Animal.
Orientador: Prof. Dr. Evaldo Antonio Lencioni Titto.

1. HSP 2. Linfócitos 3. Tolerância ao calor
4. Vacas. I. Título.

*Aos meus sobrinhos Ico, Di e Mia, pelos seus sorrisos e
abraços maravilhosos.*

Dedico.

Vida

*- musgo de ecos nos poços onde o sonho acaba,
sempre com a mesma estrela repetida
nos olhos dos amantes
e na baba
dos ruminantes."*

José Gomes Ferreira

AGRADECIMENTOS

Academicamente uma tese é um trabalho individual, mas esta, a minha, é sem dúvida o resultado do trabalho de muitas pessoas, não apenas as que ajudaram diretamente nos trabalhos, mas também as que literalmente me aturaram durante este período de pós-graduação. Cada uma da sua maneira, no seu tempo e intensidade, mas todas elas foram importantes e imprescindíveis.

Agradeço aos meus pais, Paizão e Mãezinha, pelo simples facto de serem meus! Considero-me uma pessoa com sorte por ter herdado os vossos genes e por serem o meu “porto seguro”.

Aos meus irmãos, avós, tia e cunhados, pela compreensão pela minha ausência e carinho aquando da minha presença.

Ao Prof. Dr. Titto pelo convite para realizar este projeto sob sua orientação e assim me ter proporcionado uma estadia única por Terras de Vera Cruz.

Ao Prof. Dr. Moreira da Silva por ter aceite ser o meu co-orientador, e tão bem me receber no seu laboratório e grupo de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Alfredo Pereira por me ter conseguido transmitir o “bichinho da ciência” logo nas suas aulas de graduação, pela sua amizade e infundável paciência, e principalmente, por ser o Mestre que é.

Ao Prof. Dr. Flávio Meirelles, Prof. Dr. Luís Filipe Prada e Silva e Prof. Dr.^a Rosário Félix, por gentilmente cederem os seus laboratórios para que eu pudesse realizar as minhas análises.

À Dr.^a Arlete Colussi pela simpatia com que me recebeu na Fazenda São Leopoldo Mandic.

Ao Eng. Fernando Luís Vasconcelos pela amizade e também confiança, que assim proporcionou a utilização de animais da Herdade do Bussalfão.

Ao Prof. Dr. Carlos Bettencourt pela sua simpatia, ajuda e disponibilidade em trabalhar com os animais da Herdade da Abóbada.

À Associação de Criadores de Bovinos Mertolengos, em especial ao Eng. Nuno Henriques por ter sido tão prestável.

Aos Prof. Dr. Paulo Infante e Prof. Dr. Júlio Balieiro pela abissal ajuda na análise estatística.

A todos os funcionários do Setor de Bovinos de Leite da Coordenadoria do Campus de Pirassununga, por estarem sempre disponíveis a “aturar a Portuga-Vampira”.

Aos funcionários da Fazenda São Leopoldo Mandic, Herdade do Bussalfão e Herdade da Abóbada, por me ajudarem com as colheitas e no manejo com os animais.

Aos amigos que fiz no LABE – Pa'Tata, Bettah, Cacau, Dri, Fanti, Rê e Minie, pela ajuda nos experimentos e partilha de todas as aventuras que isso acarreta.

À Lilian Oliveira e Rodrigo Barreto por terem sido literalmente os meus “pais de laboratório”. Sei que a tarefa foi difícil e que sou uma “filha laboratorial” deveras complicada e estressada...

Às minhas estagiárias 01 e 02, *aka* Giovana e Júlia, por toda a ajuda no laboratório, pela companhia e pelas inúmeras risadas. Vocês serão sempre as “bebés”.

Aos amigos da Universidade dos Açores, em especial à Xana e à Joannabela, por cuidarem de mim e das minhas amostras.

Aos amigos de toda a FZEA, FMVZ, Pirassununga e arredores - Roberta, Cláudia, Débora, Mari, Miltão, Arroz, Juan Fofo, Carol, Newton, Mel, Aline, Iaçanã, Gi, Moana, Saara, Igor e Ivo, Ássuka, Lina, Núbia, Martini, Perla, Ju Pires, Fred, Thales, Marcela, Ucha e Gustavo Pagoto.

Às minhas amigas Amanda, Alemã, Ju Mega, Lari e Mi, por terem conseguido ser minhas colegas de casa e assim aturar o meu humor matinal.

À Ju Diniz por ser a amiga que é, pelos “puxões de orelhas” e “chamadas à realidade” que só ela sabe dizer à minha pessoa.

Aos amigos de Portugal por tornarem “o longe” mais perto – Primita, Buga, Viga, Ângela Mary, Cat, Sist, Manas Capoulas, Patron, Pirosinha, Rita Martins, Marisa Abéia, Patite, Caruncho, Joana Prima, Yuri, Maria, Sónia e Lumi.

À Zuka, ao Mingau e também à Zoé, que com as suas brincadeiras, “ron-rons” e muitos arranhões, tornam os dias mais agradáveis e reconfortantes.

As vacas, por serem animais tão maravilhosos e únicos, que cada dia me fascinam mais e mais.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro para a realização deste projeto.

RESUMO

GERALDO, A. C. A. P. M. **Termotolerância em fêmeas bovinas: abordagens celular e fisiológica**. 2013, 97p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, 2013.

Este estudo teve como objetivo a compreensão dos efeitos desencadeados pelas temperaturas elevadas na expressão gênica de proteínas de choque térmico, nomeadamente da HSPA1A e HSP90AA1, em linfócitos de fêmeas bovinas de diferentes raças e origens. Parte do projeto foi desenvolvida em Portugal, onde foram utilizadas 20 novilhas da raça Limousine e 22 da raça Mertolenga. A parte desenvolvida no Brasil decorreu com 11 novilhas da raça Holstein Frísia e 20 da raça Brahman. Os animais da raça Holstein participaram do Experimento I no qual foram coletados 4 tubos de sangue para posterior choque térmico *in vitro*, onde cada tubo de sangue foi submetido a diferentes temperaturas: 40 °C e 42 °C (ambos através de banhos-maria), 23 °C (mantido a temperatura ambiente) e 10 °C (na geladeira), durante duas horas. Todos os animais de todas as raças participaram no Experimento II, onde foram sujeitos ao teste de tolerância ao calor, tendo sido aferidas a temperatura retal e a frequência respiratória, e coletado sangue (após os tratamentos sombra e sol). A todas as amostras de ambos os experimentos foi realizada a lise das hemácias de modo a obter o *buffy-coat*. O RNA foi isolado através do método do TRIzol e a RT-PCR realizada com SuperScript III após digestão com DNase I. A PCR em tempo real decorreu no aparelho 7500 Fast Real Time, utilizando TaqMan Gene Expression Assays para os genes alvo HSPA1A e HSP90AA1, e ACTB e PPIA como genes endógenos. Foram calculados os ΔCt ($Ct_{\text{alvo}} - Ct_{\text{endógeno}}$) assim como a expressão gênica através do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. A análise estatística foi realizada através de modelos lineares mistos, recorrendo ao programa R Software Project (versão 3.0.1). No Experimento I foi atestada a qualidade da relação para ambos os endógenos nas relações que estabelecem com o mRNA-HSPA1A e o mRNA-HSP90AA1, através de uma análise de regressão *pairwise*. Tal como era esperado os valores de expressão gênica a uma temperatura de 23 °C foram os menores, seguidos 10 °C (estresse por frio), 40 °C e 42 °C para o gene HSPA1A. No caso da HSP90AA1, foi a 40 °C que se verificou uma maior expressão gênica. No Experimento II verificou-se uma variação intra-raça algo acentuada para valores de frequência respiratória,

permitindo supor que o esforço termorregulatório dos animais de uma mesma raça possa ter sido diferente. Em relação à temperatura retal a raça Brahman apresentou valores significativamente diferentes das restantes raças para a situação sol. As diferenças observadas foram provavelmente consequência dos diferentes níveis de estresse aos quais os animais estiveram sujeitos. As diferenças observadas nos ΔC_t não foram muito expressivas e apenas se observaram diferenças significativas na expressão gênica relativa na raça Mertolenga entre as situações sombra e sol. Podemos concluir que o aumento planejado da temperatura de linfócitos bovinos leva a diferentes expressões gênicas relativas de HSPA1A e HSP90AA1. A expressão de mRNA-HSPA1A é tanto maior quanto maior o estresse térmico, quer por frio quer por calor. As expressões gênicas relativas de HSPA1A e HSP90AA1 exibidas por animais com diferentes capacidades termolíticas são também elas diferentes, existindo uma variabilidade individual na expressão gênica relativa de proteínas de choque térmico.

Palavras-chave: HSP, linfócitos, tolerância ao calor, vaca

ABSTRACT

GERALDO, A. C. A. P. M. **Thermotolerance in cows: cellular and physiological approaches.** 2013, 97p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, 2013.

The present study aimed to understand the effects triggered by high temperatures in heat shock proteins gene expression, HSPA1A and HSP90AA1, in cow lymphocytes from different breeds and origins. Part of the project was developed in Portugal, where 20 Limousin and 22 Mertolenga breed heifers were used and the second part was developed in Brazil with 11 Holstein Friesian and 20 Brahman heifers. The Holstein animals participated in Experiment I in which four blood samples were collected for subsequent *in vitro* heat shock, where each one of the blood samples was submitted to different temperatures: 40 °C and 42 °C (through water baths), 23 °C (kept at room temperature) and 10 °C (in refrigerator) for two hours. All animals from all breeds participated in Experiment II, where they were subjected to the heat tolerance test, where rectal temperature and respiratory rate were measured, and blood samples were collected (after shadow and after sun treatments). In all samples of both experiments was carried out the erythrocytes lysis so as to obtain the buffy-coat. The RNA was isolated by the TRizol method and RT-PCR performed with SuperScript III after digestion with DNase I. The real-time PCR apparatus took place in 7500 Real Fast Time, using TaqMan Gene Expression Assays for HSPA1A and HSP90AA1 target genes, ACTB and PPIA as endogenous genes. The ΔCt ($Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{endogenous}}$) were calculated as well as gene expression through the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Statistical analysis was performed using linear mixed models, using the program R Project Software (version 3.0.1). In Experiment I it was attested the quality of the relationship for both endogenous with the mRNA-HSPA1A and mRNA-HSP90AA1 through a pairwise regression analysis. As expected values, gene expression at a temperature of 23 °C were lower, followed by 10 °C (cold stress), 40 °C and 42 °C for the HSPA1A gene. In the case of HSP90AA1 the higher gene expression was found at 40 °C. In Experiment II, there was a slightly pronounced intra-race variation for respiratory rate values, allowing the assumption that the thermoregulatory effort of animals of the same breed may have been different. Regarding the rectal temperature, in Brahman breeds it was significantly different from the other breeds in the sun treatment. The differences observed

were probably a result of different levels of stress to which the animals were subjected. The differences observed in ΔC_t were not very expressive and significant differences were only observed in relative gene expression of Mertolenga breed between shade and sun treatments. We conclude that planned increasing temperature in bovine lymphocytes leads to different relative gene expression of HSPA1A and HSP90AA1. The mRNA-HSPA1A expression is greater in higher thermal stress, either by cold or by heat. The HSPA1A and HSP90AA1 relative gene expressions exhibited by animals with different thermolytic capabilities, are also different, existing an individual variability in relative gene expression of heat shock proteins.

Keywords: cow, HSP, heat tolerance, lymphocytes

Índice de figuras

Figura 1. Trinômio ambiente/bem-estar/produtividade e sua relação com o animal.....	19
Figura 2. Função celular de proteínas de choque térmico - o destino de proteínas com configurações não funcionais após a exposição a um estresse pode ser a re-obtenção da configuração funcional, agregação com outras proteínas ou a sua degradação (adaptado de SØRENSEN et al., 2003).....	31
Figura 3. Mecanismo de aumento de HSPs induzido por estresse (adaptado de KIANG & TSOKOS, 1998)	32
Figura 4. Animal da raça Holstein Frísia.....	39
Figura 5. Animal da raça Limousine.....	39
Figura 6. Animal da raça Mertolenga	39
Figura 7. Animal da raça Brahman.....	39
Figura 8. Esquema do teste de capacidade termolítica	41
Figura 9. Aferição da temperatura retal.....	41
Figura 10. Lise de hemácias: A) Tudos de sangue após centrifugação; B) Retirada do <i>buffy coat</i> ; C) Colocação da solução de lise; D) Pormenor do <i>pellet</i> de linfócitos	42
Figura 11. <i>Eppendorf</i> com <i>pellet</i> de linfócitos e com reagente TRIzol	43
Figura 12. Colocação da amostra no espectrofotômetro	44
Figura 13. Banhos-maria utilizados para choque térmico <i>in vitro</i> : A) Aparelho a 42 °C; B) Aparelho a 40 °C; C) Pormenor dos tubos de sangue em banho-maria.....	52
Figura 14. Análise de regressão entre ΔCt HSP90AA1 e ΔCt HSPA1A para os genes ACTB e PPIA	54
Figura 15. <i>Box plots</i> dos ΔCt para cada tratamento: à esquerda com ACTB como gene endógeno; à direita com PPIA como gene endógeno	55
Figura 16. Valores médios e desvios padrão dos ΔCt de cada gene em estudo para cada um dos tratamentos.....	56
Figura 17. Valores médios e desvios padrão da expressão gênica relativa para cada tratamento: à esquerda para HSPA1A; à direita para HSP90AA1	58
Figura 18. Colheita de sangue na veia abdominal subcutânea	65
Figura 19. <i>Box plot</i> da frequência respiratória para cada raça na sombra e no sol.....	68

Figura 20. Valores médios e desvios padrão da frequência respiratória de cada raça na sombra e no sol.....	69
Figura 21. <i>Box plot</i> da temperatura retal para cada raça na sombra e no sol.....	70
Figura 22. Valores médios e desvios padrão da temperatura retal de cada raça na sombra e no sol.....	71
Figura 23. Valores médios e desvios padrão da temperatura de globo negro para o período experimental de cada raça, na sombra e no sol	72
Figura 24. <i>Box plots</i> dos ΔC_t para o gene HSPA1A para a sombra e o sol: à esquerda com ACTB como gene endógeno; à direita com PPIA como gene endógeno	74
Figura 25. <i>Box plots</i> dos ΔC_t para o gene HSP90AA1 para a sombra e o sol: à esquerda com ACTB como gene endógeno; à direita com PPIA como gene endógeno	74
Figura 26. <i>Box plots</i> da expressão gênica relativa do HSPA1A para a sombra e o sol: à esquerda com ACTB como gene endógeno; à direita com PPIA como gene endógeno	75
Figura 27. <i>Box plots</i> da expressão gênica relativa do HSP90AA1 para a sombra e o sol: à esquerda com ACTB como gene endógeno; à direita com PPIA como gene endógeno	76
Figura 28. Valores médios e desvios padrão da expressão gênica relativa para cada raça para a sombra e o sol.....	77

Índice de tabelas

Tabela 1. Valores médios e desvios padrões dos ΔC_t de cada gene em estudo para cada um dos tratamentos (unidades arbitrárias).....	56
--	----

Abreviaturas, Símbolos e Siglas

ACTB	β -actina
°C	Graus Celsius
cDNA	DNA complementar
Ct	<i>Cycle threshold</i>
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DRA-AL	Direção Regional de Agricultura do Alentejo
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FZEA	Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
g	Gramas
g	Força-g
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
HSC	Proteína cognata de choque térmico (<i>heat shock cognate</i>)
HSF	Fator de choque térmico (<i>heat shock factor</i>)
HSP	Proteína de choque térmico (<i>heat shock protein</i>)
HSPA1A	Proteína de choque térmico de 70 kDa 1 A
HSP90AA1	Proteína de choque térmico de 90 kDa α (citossólica) classe A membro 1
H₂O_{MiliQ}	Água Mili-Q (água deionizada)
ICAAM	Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas
ITC	Índice de tolerância ao calor
kDa	Kilodaltons
L	Litros
m	Metros
mL	Mililitros
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro

N	Norte
nm	Nanómetros
PBS	Tampão fosfato-salino (<i>phosphate buffer saline</i>)
PPIA	Peptidilprolil isomerase A (ciclofilina A)
PUSP-P	Perfeitura do Campus USP de Pirassununga
RNA	Ácido ribonucleíco
ROS	Espécies reativas de oxigénio (<i>reactive oxygen species</i>)
S	Sul
S24	Proteína ribossomal S24
sHSP	Pequena proteína de choque térmico (<i>small heat shock protein</i>)
TGN	Temperatura de globo negro
TR1	Temperatura retal 1
TR2	Temperatura retal 2
U	Unidade
USP	Universidade de São Paulo
vs	<i>Versus</i>
W	Oeste (<i>west</i>)
YWAHZ	Polipeptídeo zeta da proteína ativadora de tirosina 3-monooxigenase/triptofano 5-monooxigenase
µg	Microgramas
µL	Microlitros
~	Aproximadamente

Índice

1. Introdução.....	19
2. Hipóteses.....	21
3. Objetivos	22
3.1 Objetivo geral	22
3.2 Objetivos específicos.....	22
4. Revisão bibliográfica	23
4.1 Produção animal e Condicionantes ambientais.....	23
4.2 Estresse térmico	24
4.3 Termotolerância e Aclimação	26
4.4 Proteínas de choque térmico - HSPs	29
4.4.1 Proteínas de choque térmico de 70 kDa.....	35
4.4.2 Proteínas de choque térmico de 90 kDa.....	36
5. Material e Métodos	38
5.1 Locais e laboratórios	38
5.2 Animais.....	38
5.3 Fase experimental	40
5.3.1 Capacidade termolítica	40
5.3.2 Avaliação da expressão de proteínas de choque térmico em linfócitos	41
5.4 Análise estatística.....	47
6. Experimento I: Avaliação da expressão gênica de HSPA1A e HSP90AA1 em linfócitos de bovinos após aumento planejado das temperaturas realizado <i>in vitro</i>	48
6.1 Introdução.....	50
6.2 Material e Métodos.....	51
6.2.1 Animais e coleta de sangue	51
6.2.2 Tratamento de choque térmico.....	51

6.2.3	Separação dos linfócitos	52
6.2.4	Isolamento do RNA total e RT-PCR	52
6.2.5	Análise estatística	53
6.3	Resultados e Discussão	54
6.4	Conclusão	60
7.	Experimento II: Expressão gênica de HSP em fêmeas bovinas de diferentes raças, com base nos armazenamentos de calor originados pela exposição à radiação solar <i>in vivo</i>	61
7.1	Introdução	63
7.2	Material e Métodos.....	64
7.2.1	Animais.....	64
7.2.2	Teste de capacidade termolítica e coleta de sangue.....	65
7.2.3	Separação dos linfócitos	65
7.2.4	Isolamento do RNA total e RT-PCR	66
7.2.5	Análise estatística	66
7.3	Resultados e Discussão	67
7.3.1	Parâmetros fisiológicos.....	67
7.3.2	Parâmetros celulares	73
7.4	Conclusão	78
8.	Discussão geral e Perspectivas futuras	79
9.	Referências bibliográficas	82

1. Introdução

A bovinocultura é uma das atividades econômicas mais importantes em muitos países, ocupando frequentemente o papel de principal atividade agro-pecuária. Como “arte de criar bovinos” é fundamental o conhecimento quer do animal, quer do ambiente no qual ele se insere.

A distribuição dos animais pelos diferentes ecótipos é influenciada pelas características do meio ambiente natural (principalmente temperatura, umidade e altitude) e pelas necessidades humanas (YOUSEF et al., 1973). Com o decorrer dos tempos tem-se assistido a uma maior e mais impactante demanda de produtos de origem animal, influenciando cada vez mais a distribuição dos animais, e tornando-se assim necessário tentar contornar ou contrariar os potenciais efeitos adversos do ambiente.

Outro aspecto que tem vindo a adquirir mais importância e que se tornou cada vez mais presente no âmbito da bovinocultura é o bem-estar animal, colocando em ênfase a senciência e procurando responder a questões referentes ao conforto físico e emocional dos animais *versus* a sua produtividade, e buscando ferramentas que possibilitem entender estes parâmetros de forma a tomar opções mais informadas.

Atualmente, para conseguirem bons resultados na bovinocultura é necessário obter uma resposta equilibrada do trinômio ambiente/bem-estar/produtividade animal (figura 1).

Figura 1. Trinômio ambiente/bem-estar/produtividade e sua relação com o animal

Um dos fatores mais estressantes para bovinos é o clima. No Brasil, em que o clima tropical determina uma temperatura elevada na maior parte do ano, os níveis de bem-estar

são potencialmente diminuídos com o crescente nível de estresse térmico. Em Portugal, que tem um clima mediterrânico prevalece a sazonalidade climática bastante acentuada, registando-se no verão temperaturas que interferem negativamente no desempenho dos animais, devido ao elevado nível de estresse térmico. Por isso, a compreensão aprofundada dos aspectos adaptativos, nomeadamente a tolerância ao calor dos animais nestes contextos climáticos, é cada vez mais importante, visto que a falta de raças termotolerantes é um entrave produtivo em vários países (GAUGHAN et al., 2010).

Vários estudos têm sido desenvolvidos no sentido de conhecer as diferentes respostas dos animais perante situações de estresse, e concomitantemente avaliar a sua fisiologia relacionada com a termorregulação e com a termotolerância. Essas respostas incluem características fisiológicas (frequência respiratória, temperatura, taxa de sudção...), comportamentais e mais recentemente mecanismos celulares e características genéticas, entre as quais a expressão das proteínas de choque térmico (*heat shock protein* - HSP).

Uma questão central neste âmbito tem como foco a premissa de que os animais adaptados a ambientes pouco estressantes têm uma resposta ao estresse diferente em relação a animais adaptados a ambientes bastante estressantes. Baseada nesta lógica, a hipótese deste trabalho assenta no pressuposto de que animais de diferentes raças têm diferentes capacidades termolíticas, assim como diferentes valores de HSPA1A e HSP90AA1.

Deste modo, um estudo alargado sobre a variação da expressão genética de proteínas de choque térmico em animais de diferentes origens poderá possibilitar a eventual identificação de um marcador de termotolerância e consequentemente, perspectivas viáveis para o aumento da produtividade de fêmeas bovinas sob condições de estresse térmico, uma vez que as proteínas de choque térmico são frequentemente referidas como adaptações que decorreram da seleção natural para o estresse em geral e em particular para o estresse térmico.

2. Hipóteses

- I. O aumento planificado da temperatura dos linfócitos poderá determinar diferentes expressões gênicas das HSPA1A relativamente às HSP90AA1.
- II. Os animais com diferentes capacidades termolíticas exibem diferentes expressões gênicas de HSPA1A e HSP90AA1.
- III. Raças com o mesmo nível de estresse térmico são susceptíveis de exibir diferentes expressões gênicas de HSPA1A e HSP90AA1.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

O presente estudo tem como objetivo nuclear a compreensão dos efeitos desencadeados pelas temperaturas elevadas na expressão gênica de proteínas de choque térmico, nomeadamente da HSPA1A e HSP90AA1, em linfócitos de fêmeas bovinas de diferentes raças e origens.

3.2 Objetivos específicos

- Experimento I: Avaliação da expressão gênica de HSPA1A e HSP90AA1 em linfócitos de bovinos após aumento planificado das temperaturas realizado *in vitro*;
- Experimento II: Expressão gênica de HSP em fêmeas bovinas de diferentes raças, com base nos armazenamentos de calor originados pela exposição à radiação solar *in vivo*.

4. Revisão bibliográfica

4.1 Produção animal e Condicionantes ambientais

A produtividade animal pode ser vista com o *output* de processos metabólicos para a síntese de leite, carne, lã, etc – processos estes, que devido à sua ineficiência funcional são geradores de calor. Portanto, a produtividade pode ser incluída num processo termodinâmico de permuta de calor em que os animais através do seu metabolismo produzem trabalho do qual resulta calor que é permutado com o ambiente (BERMAN, 2011).

A seleção de animais de elevada *performance* decorreu em ambientes temperados/frios em que a sua elevada atividade metabólica e consequente produção de calor era facilmente escoada para o ambiente. Quando esses animais se encontram em ambientes quentes, a dificuldade de eliminar o calor metabólico é maior, penalizando a produtividade.

Tal como Collier et al. (2002) referiram, o cenário ideal para a produção animal seria uma seleção simultânea para o aumento da produção e também da tolerância ao calor, pensando ainda em questões relacionadas com o bem-estar animal. Estes dois objetivos são aparentemente contraditórios uma vez que um aumento de produtividade requer um aumento da taxa metabólica e consequente produção de calor. Neste contexto, o recurso à biometeorologia poderá ser fundamental na gestão racional da pecuária, uma vez que fornece a ponte entre as respostas biológicas dos animais e a produção agrícola (NIENABER & HAHN, 2007).

De acordo com McDowell (1972) todas as modificações dos processos fisiológicos para regular as trocas de calor, podem ser complementadas com modificações de comportamento. Alterações de postura, de atividade física, diminuição da ingestão de alimentos, aumento da ingestão de água, são comportamentos que de algum modo podem diminuir a produção e também aquisição de calor. Os estudos sobre o comportamento adaptativo das espécies podem revelar os níveis de bem-estar dos animais, tornando-se

ferramentas úteis no estudo dos diferentes aspectos de termorregulação (MARTIN & BATESON, 1986).

É, portanto necessária a manutenção de um equilíbrio térmico entre o meio e o animal, e neste contexto a capacidade deste em realizar essas trocas de calor com o meio ambiente, tem uma participação direta neste equilíbrio (TITTO, 1998). Segundo McDowell (1972) uma prova de tolerância ao calor deve manter uma elevada correlação com a produtividade, de modo a que seja possível prever através de medidas pontuais a adaptabilidade dos animais à situação imposta, bem como prever o seu desempenho produtivo.

Em contraste com habitantes de climas temperados, espécies que habitam ambientes quentes (tanto áridos como úmidos) podem refletir adaptações especiais para a vida nestes *habitats*, devido a pressões evolutivas (HOROWITZ, 2001).

4.2 Estresse térmico

Ao introduzirem-se animais domésticos de raças de regiões temperadas em países tropicais e subtropicais, estes tendem a registrar de uma série de alterações em resposta ao clima quente. Estas alterações são causadas pelo estresse térmico prolongado, levando a transtornos no metabolismo da água, balanços negativos de nitrogênio, energia e minerais (BAÑUELOS-VALENZUELA & SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, 2005).

O estresse é bastante penalizante para a produtividade. Porém, permite também evidenciar a capacidade dos animais em ultrapassar as condicionantes negativas impostas pelo ambiente e conseqüentemente, a sua capacidade para se reproduzirem e manterem o seu desempenho (MÜLLER, 1989). Estresse térmico por calor foi definido por Bernabucci et al. (2010) como a condição fisiológica que ocorre quando a temperatura corporal de determinadas espécies excede a sua gama específica para atividade normal, o que resulta de uma carga total de calor (de produção interna e do ambiente) que excede a capacidade de dissipação de calor, solicitando respostas fisiológicas e comportamentais de modo a reduzir a tensão. É importante salientar que o estresse térmico além de uma determinada

intensidade pode ter durações muito variáveis, as quais vão condicionar as respostas dos animais (estresse agudo vs estresse crônico), nomeadamente a aclimação.

A maioria dos efeitos negativos do estresse térmico sob o desempenho animal ou são consequência das adaptações fisiológicas a que os homeotérmicos estão sujeitos de modo a regular a temperatura corporal, ou então são consequências adversas face à tentativa falhada de regular a temperatura corporal (HANSEN, 2004). Por sua vez, a severidade dos impactos causados pelo estresse térmico de igual magnitude depende principalmente do genótipo (MARÓTI-AGÓTS et al., 2011). Deste modo, podemos referir que seleção genética para a estabilidade da temperatura corporal durante o estresse térmico poderá ser uma abordagem interessante de modo a reduzir a magnitude dos efeitos do estresse térmico sobre a produção e reprodução (DIKMEN et al., 2012).

A produtividade animal diminui durante o estresse térmico uma vez que muitas das adaptações que o animal sofre de modo a reduzir a temperatura do corpo podem comprometer as funções fisiológicas importantes para a produção, e também porque o aumento da temperatura corporal que ocorre quando essas adaptações não evitam completamente a tensão à qual o animal está sujeito e podem comprometer a função celular (HANSEN, 2011).

As respostas dos animais variam de acordo com o tipo de desafio térmico ao qual são sujeitos: alterações adaptativas de curto prazo nas funções comportamentais, fisiológicas e imunológicas (orientadas para a sobrevivência) são consideradas como respostas iniciais a eventos agudos; enquanto que em desafios a longo prazo, as respostas estão relacionadas com o desempenho do animal (por exemplo, diminuição consolidada da ingestão alimentar e redução da taxa metabólica, afetando o crescimento e a reprodução) (NIENABER & HAHN, 2007).

De acordo com Moberg (2000) praticamente todas as funções biológicas são afetadas pelo estresse, incluindo a competência imunológica, a reprodução, o metabolismo e o comportamento. Os comportamentos adaptativos como resposta ao estresse térmico incluem elevação da temperatura corporal e inibições das funções vegetativas, tais como alimentação e reprodução (TEIXEIRA et al., 2008).

Vacas sob estresse térmico apresentam fertilidade reduzida (EALY et al., 1993; HANSEN & ARÉCHIGA, 1999; McDOWELL, 1972; RIVIERA & HANSEN, 2001), verificando-se alterações no cio (menor duração e intensidade), no desenvolvimento folicular e no

desenvolvimento embrionário (JORDAN, 2003; JU, 2005; McDOWELL, 1972; STOTT & WILLIAMS, 1962; WILSON et al., 1998). Vasconcelos (2001) afirma que são observados efeitos do estresse térmico no ovário, que podem afetar a capacidade das vacas ficarem prenhes. Contudo, os efeitos sobre os embriões são ainda mais intensos. Em vacas sujeitas a estresse térmico ocorre uma diminuição do fluxo sanguíneo para o útero e um aumento da temperatura uterina, o que leva a uma inibição do desenvolvimento embrionário, aumentando por isso as mortes precoces embrionárias e reduzindo a taxa de sucesso das inseminações artificiais (DE RENSIS & SCARAMUZZI, 2003).

O estresse térmico afeta a produtividade pecuária, no entanto a compreensão dos mecanismos de resposta celular dos animais a esse estresse é bastante insuficiente, sendo que esta poderá ser um importante mecanismo na manutenção de integridade celular face ao estresse térmico (GUERRIERO & RAYNES, 1990). Redes de genes dentro e entre células e tecidos, respondem a elevados armazenamentos de calor resultantes da manutenção dos animais acima da zona termoneutra e através de sinais intra e extracelulares coordenam o metabolismo celular e por consequência a taxa metabólica de todo o animal (COLLIER et al., 2008).

A manutenção da *performance* de vacas em ambientes quentes, irá com certeza, requerer uma maior e/ou melhor capacidade de resfriamento, avanços na nutrição, e avanços genéticos que deverão incluir seleção para tolerância ao calor (LI et al., 2010).

Uma possível abordagem para reduzir o impacto do estresse térmico na produtividade de bovinos é a adequação de programas genéticos que selecionem animais também de acordo com a sua termotolerância (BASIRICÒ et al., 2011).

4.3 Termotolerância e Aclimação

Uma vez que a produção animal nos trópicos é limitada em boa parte pelo estresse térmico de longa duração, torna-se imperativo o conhecimento da capacidade de adaptação das espécies e raças exploradas no Brasil, bem como a determinação dos sistemas de criação e práticas de manejo que permitam uma produção pecuária sustentável, sem prejudicar o bem-estar dos animais (SOUZA et al., 2007). De acordo com Kregel (2002) o

fenômeno da aquisição de termotolerância é transiente na natureza e depende primeiramente do grau de severidade do estresse térmico.

As reações de estresse resultam do esforço adaptativo, uma vez que a resposta ao elemento estressor, selecionada a partir dos componentes cognitivo, comportamental e fisiológico (caso consiga solucionar a situação estressora) provocará a diminuição da cascata fisiológica ativada (TEIXEIRA et al., 2008).

A adaptabilidade pode ser medida ou avaliada pela habilidade que o animal aparenta por se ajustar às condições médias adversas do ambiente, com a mínima perda no desempenho e conservando alta taxa reprodutiva, resistência às doenças e baixo índice de mortalidade (HAFEZ, 1973).

Em 1997, Moseley referiu que a adaptação ao calor pode ser dividida entre termotolerância e aclimatização. A termotolerância é a adaptação celular causada por uma única e severa (mas não letal) exposição ao calor. Esta resposta permite que o organismo tenha melhores condições de sobreviver a um posterior evento de estresse térmico mais intenso. A aclimatização refere-se à habilidade de um organismo manter uma atividade normal no calor devido a melhorias ocorridas ao longo de um determinado período que possibilitou uma melhor dissipação de calor. O processo de aclimatização é provocado por repetidas e persistentes elevações da sua temperatura nuclear, podendo esta ser mantida por períodos suficientemente longos.

No glossário de termos de fisiologia térmica (BLIGH & JOHNSON, 1973), são sugeridas as seguintes definições:

- Aclimação: mudanças fisiológicas e/ou comportamentais que ocorrem durante a vida de um organismo, que reduzem a tensão ou aumentam a resistência a esta. Essa tensão é descrita como alterações de estresse induzidas experimentalmente num ambiente controlado, em particular fatores ambientais, tais como temperatura ambiente;

- Aclimatização: mudanças fisiológicas e/ou comportamentais que ocorrem durante a vida de um organismo em resposta a mudanças no seu ambiente natural (como mudanças sazonais ou geográficas);

- Adaptação: alterações que reduzem o esforço fisiológico produzido por componentes estressantes do ambiente total. Esta alteração pode ocorrer durante a vida de um organismo (fenotípica) ou ser o resultado de seleção genética numa espécie ou subespécie (genotípica).

Aclimação ao calor refere-se, portanto a adaptações biológicas que reduzem tensões fisiológicas (tais como frequência cardíaca e temperatura corporal), promovem conforto e melhoram a capacidade física depois de repetidos dias de exposição ao calor (McCLUNG et al., 2008). O mesmo autor define termotolerância adquirida como as alterações celulares induzidas por repetida exposição ao calor, e que conferem citoproteção contra subsequentes, mais extremas e potencialmente letais, exposições ao calor.

Aclimatização é um processo que decorre ao longo da vida, no qual um estresse persistente melhora a capacidade de um indivíduo para tolerar esse estresse. Normalmente este processo envolve alterações na expressão de características pré-existentes que são benéficas ao organismo num determinado ambiente, e envolve mudanças a todos os níveis da organização corporal, incluindo reprogramação da expressão genética (HOROWITZ, 2001).

A termotolerância é uma característica quantitativa, por isso os fatores genéticos são importantes para o fenótipo de termotolerância (LI et al., 2010). A exposição prolongada ao estresse interfere com o eficiente funcionamento da célula, com consequências negativas sobre as propriedades bioquímicas das proteínas que, em condições ideais, existem em estados termodinamicamente estáveis. Em ambientes que determinam desvios à homeostasia celular, as proteínas podem-se desdobrar, perder a sua configuração funcional ou agregarem-se (MORIMOTO, 1998). Nestas situações de estresse, a síntese da maioria das proteínas diminui, enquanto há um grupo de proteínas é rapidamente sintetizado – as proteínas de choque térmico (HSP) (ZULKIFLI et al., 2010).

A exposição de células a elevadas temperaturas provoca uma série de anomalias nas funções celulares (SONNA et al., 2002) que incluem a inibição da síntese proteica, defeitos na estrutura e função de proteínas, alterações morfológicas devido a rearranjos no citoesqueleto, alterações na estrutura e fluidez da membrana celular e diminuição da proliferação celular (COLLIER et al., 2008).

Segundo Lepock (2005) muitas das alterações das funções celulares que levam a um estado de termotolerância envolvem a ativação transcripcional de genes para proteínas de choque térmico e de outras proteínas. A termotolerância induzida é um fenômeno que se baseia no princípio de que a exposição a um choque térmico moderado pode provocar a expressão de proteínas de choque térmico e de outras alterações celulares, tornando as

células mais resistentes a um choque térmico subsequente e mais severo (AL-KATANANI & HANSEN, 2002).

De acordo com Moseley (1997), independentemente dos estímulos, as características de termotolerância são: 1) sobrevivência da célula ou organismo exposto a um estresse térmico que de outro modo seria letal; 2) síntese de HSPs; e 3) duração relativamente curta do estado de termotolerância (horas a dias) que se relaciona com a elevada presença de HSPs e que vai diminuindo com o decréscimo de HSPs. Para o mesmo autor o requisito de HSPs para a termotolerância e o papel das HSPs no enrolamento, conformação e transporte de proteínas, suportam a hipótese de que o estado de tolerância térmica é dependente de uma ou de todas essas funções das HSPs, especialmente através da gestão das proteínas desnaturadas e dos fragmentos de proteína parcialmente sintetizados.

A intensidade do estresse térmico pode ser sazonal ou geográfico. Em certos casos, quer a expressão de HSPs quer a termotolerância aumentam durante as estações mais quentes (FEDER & HOFMANN, 1999). Estes autores concluíram também que mesmo quando após a aclimação decorrente das alterações sazonais são controladas, os indivíduos dentro de uma população ou de uma espécie, podem variar na expressão de HSPs e/ou genes que a determinam.

Como Moseley (1997) referiu, a termotolerância refere-se à capacidade de um organismo para sobreviver a um estresse térmico, que poderia ser letal, a partir de uma prévia exposição ao calor, suficiente para provocar o acúmulo celular de HSPs; por isso estas proteínas são fundamentais para compreender a termotolerância e quiçá o papel celular na aclimação.

4.4 Proteínas de choque térmico - HSPs

Apesar de pertencerem ao grupo de proteínas mais antigas e mais bem conservadas, o primeiro registro da atividade das proteínas de choque térmico data de 1962, trabalho do pesquisador italiano Ritosa, num estudo com glândulas salivares de *Drosophila busckii*. Nesse estudo Ritosa (1962) verificou que a função de determinados genes sofriam

alterações quando submetidos a choque térmico. Este trabalho foi o primeiro a descrever a “reprogramação” da expressão gênica de “rotina” para uma “resposta ao estresse celular” (AUFRICHT, 2005).

Atualmente sabe-se que todo o tipo de estresse, se suficientemente intenso, induz a expressão de proteínas de choque térmico (LOCKE et al., 1990; WELCH, 1992; CLARK & PECK, 2009), e que várias HSPs são expressas mesmo em células não estressadas, desempenhando um papel importante na fisiologia celular (SONNA et al., 2002).

As HSPs são proteínas ubíquas, estando presentes em todos os organismos, desde bactérias, leveduras até aos humanos (KREGEL, 2002). O aumento da expressão destas proteínas ocorre devido a diferentes tipos de estímulos potencialmente estressantes, que podem ser fisiológicos, patológicos ou ambientais. Como exemplos podem referir-se: temperatura elevada, hipóxia, isquemia, metais pesados, privação de glicose, câncer, inflamação, infecção microbiana (LEPOCK, 2005; YÁNIZ et al., 2009), luz ultra-violeta, ataque de radicais livres, aminoácidos análogos (CRAIG & GROSS, 1991; WELCH, 1992), estimulação hormonal, diferenciação celular, fatores de crescimento (KIANG & TSOKOS, 1998).

Ao contrário da maioria das proteínas, a síntese de proteínas de choque térmico aumenta com o aumento de temperatura e diminui com o decréscimo desta (CRAIG & GROSS, 1991). A sua síntese é induzida quando uma variação ambiental perturba o sistema fisiológico da célula, de tal modo que pode ocorrer uma desnaturação proteica (TOMANEK & SANFORD, 2003). Normalmente, a indução da expressão deste tipo de proteínas ocorre quando células ou organismos são expostos a temperaturas 5 a 10 °C superiores à temperatura fisiologicamente normal (MORIMOTO et al., 1994). Alguns minutos após início do estresse térmico ocorre um acréscimo que se pode prolongar até várias horas depois (SONNA et al., 2002). De acordo com Kiang & Tsokos (1998) o grau de indução está dependente do nível e duração da exposição ao estresse. Os mesmos autores referem ainda que a taxa máxima de síntese de HSP ocorre entre 3 a 5 horas após o choque térmico e cessa após 8 horas.

Existem aproximadamente 20 genes afetados pelo estresse por frio, e cerca de 100 genes cuja expressão é afetada pelo estresse térmico pelo calor, nos quais se incluem as HSPs (SONNA et al., 2002; SØRENSEN et al., 2003). A expressão desses genes é regulada por fatores de transcrição, denominados como fatores de choque térmico (*heat shock factor* -

HSF), considerados como a primeira resposta após um aumento de temperatura celular (ÅKERFELT et al., 2007).

As proteínas de choque térmico pertencem a um subgrupo de chaperonas que são classificadas de acordo com o seu peso molecular (LACETERA et al., 2006). Variam entre 10-150 kDa (PATIR & UPADHYAY, 2010) e de acordo com o seu peso molecular são constituídas as famílias, exceto para as denominadas *small* HSPs (sHSPs), cujos pesos estão abaixo de 30 kDa (SØRENSEN et al., 2003). Segundo Welch (1993) as famílias com pesos moleculares de 72 kDa, 73 kDa e 90 kDa correspondem às maiores classes de proteínas de estresse expressas pelo organismo, sendo as famílias mais estudadas em mamíferos as de peso molecular de 60, 70, 90 e 110 kDa. Estas HSPs são expressas a temperaturas corporais eutérmicas ($\sim 37^{\circ}\text{C}$) e ocorrem em condições de estresse (estresse térmico), tendo distintas localizações e propriedades funcionais (KREGEL, 2002).

Proteínas que funcionam como chaperonas moleculares, são proteínas que interagem com outras proteínas e deste modo minimizam a probabilidade destas interagirem com outras de forma inapropriada – figura 2 (FEDER & HOFMANN, 1999; SØRENSEN et al., 2003).

Figura 2. Função celular de proteínas de choque térmico - o destino de proteínas com configurações não funcionais após a exposição a um estresse pode ser a re-obtenção da configuração funcional, agregação com outras proteínas ou a sua degradação (adaptado de SØRENSEN et al., 2003)

As HSPs estão presentes no citoplasma, mitocôndrias, retículo endoplasmático e núcleo. HSP10, 60, 75 e 78 encontram-se maioritariamente em organelos, enquanto que as HSP20, 72, 73, 90 e 110 são detectadas no citoplasma e no núcleo (KIANG & TSOKOS, 1998).

Em condições não estressantes as HSPs encontram-se conectadas a HSFs que residem no citoplasma de células de mamíferos. Quando ocorre uma situação de estresse, como por exemplo, um aumento de temperatura, os HSFs separam-se das HSPs, e são fosforilados pela proteína quinase C ou por outra proteína serina-treonina quinase, formando uma estrutura homo-trimérica (figura 3). Os trímeros entram no núcleo da célula e são depois fosforilados pelas HSF quinases. Tem então início a transcrição por intermédio do mRNA, seguida da tradução. As HSPs recém-sintetizadas ligam-se aos HSFs para prevenir a futura síntese de HSPs (KIANG & TSOKOS, 1998), e assim estarem aptas a atuar numa nova situação de estresse.

Figura 3. Mecanismo de aumento de HSPs induzido por estresse (adaptado de KIANG & TSOKOS, 1998)

As HSPs aparentam desempenhar um papel na proteção das células contra danos provocados por uma variedade de estressores, sendo que uma das primeiras funções fisiológicas associada com a acumulação de HSPs induzidas pelo estresse parece ser a termotolerância (KREGEL, 2002). O papel protetor das HSPs caracteriza-se na capacidade para a reparação de danos que ocorrem nas proteínas. A sobre-expressão de uma ou mais HSPs em procariotas, plantas ou animais, é muitas vezes suficiente para proteger células e tecidos contra exposições a diversas tensões ambientais que de outro modo seriam letais

(tais como peróxido de hidrogênio e outros oxidantes, produtos químicos tóxicos, temperaturas extremas, e toxicidade induzida por etanol) (MORIMOTO, 1998).

As HSPs para além de intervirem na tolerância térmica e na salvaguarda da estrutura essencial à mesma, estão também envolvidas em vários processos essenciais para as funções celulares e em diferentes aspectos reprodutivos de várias espécies (SØRENSEN et al., 2003; ADAMOWICZ et al., 2005; ROSENKRANS JR. et al., 2010), destacando-se num contexto reprodutivo as HSP60 e as HSP70 (NEUER et al., 2000).

As HSPs podem desempenhar várias funções na célula: manter a estabilidade proteica, melhorar a tolerância face a vários agentes estressantes, e permitir a sua normalidade fisiológica funcional (LI et al., 2010). Desempenham um papel na regulação da apoptose e atuam como chaperonas moleculares intracelulares, facilitando o enrolamento, biogênese e configuração de proteínas (MORIMOTO et al., 1994; SONNA et al., 2002). As HSP27, HSP70 e HSP90 são proteínas predominantemente anti-apoptóticas, enquanto a HSP60 é pro-apoptótica (KREGEL, 2002).

A maioria dos estudos comparativos entre várias espécies tiveram como foco três aspectos da resposta ao estresse: limiares das temperaturas mínima e máxima nas quais as HSPs são expressas e/ou estão presentes nas células, concentração de HSPs nas células e a diversidade de HSPs específicas que são expressas. No geral, o limiar de temperatura de indução de HSPs está relacionado com as temperaturas típicas do ambiente em que a espécie habita (FEDER & HOFMANN, 1999) sendo, portanto uma resposta relativa.

A acumulação de HSPs que ocorrem por via do estresse desempenha um papel importante na habilidade de tolerar o estresse fisiológico (ZULKIFLI et al., 2010). Por isso as proteínas de choque térmico são extremamente importantes na proteção e adaptação do metabolismo celular. A qualidade dessa resposta ao estresse térmico está dependente da quantidade dessas proteínas, que por sua vez está positivamente relacionada com a quantidade de mRNA sintetizado (MARÓTI-AGÓTS et al., 2011).

Embora uma quantidade substancial do que se conhece sobre o papel das HSPs é resultado de estudos *in vitro*, existem provas suficientes de que a indução de HSPs ocorre igualmente *in vivo* em resposta a uma grande variedade de estressores (KREGEL, 2002). Guerriero & Raynes (1990) e Agnew & Colditz (2008) constataram que linfócitos de animais de várias espécies, incluindo ovelhas e vacas, após choque térmico *in vitro* aumentaram a síntese de proteínas de choque térmico. De acordo com Bañuelos-Valenzuela & Sánchez-

Rodríguez (2005) é possível que exista uma relação entre a adaptação a elevadas temperaturas e a expressão da HSP70, ou seja, animais de raças com maior capacidade de adaptação ao calor terão uma maior capacidade de resposta a agentes estressores, logo uma maior capacidade de síntese de HSP. Estes autores realizaram um estudo em que submeteram linfócitos de bovinos a diferentes temperaturas e verificaram um aumento na síntese de HSP70 quando a temperatura era de 40°C e de 42°C, e uma diminuição a 44°C.

Segundo Baraja-Vásquez et al. (2005) a quantidade de HSPs expressa nos linfócitos de caprinos é função da magnitude do estresse calórico, sendo que os animais que demonstraram menos alterações na fisiologia e comportamentos normais são aqueles que expressam mais HSPs.

Sørensen et al. (2003) sugerem que o nível de expressão de HSPs em cada espécie pode ser considerado como um balanço entre custos e benefícios, visto que a sobre-expressão de HSPs pode causar um efeito negativo no crescimento, taxa de desenvolvimento e fertilidade. Uma maneira de separar os custos dos benefícios é através da caracterização detalhada do período de tempo de resposta de aclimação, e, em seguida, tentar fazer a separação entre custos e benefícios distintos, alterando os tratamentos de aclimação (SØRENSEN et al., 2003). De acordo com Feder & Hofmann (1999) os custos associados à expressão de HSPs surgem devido à interrupção das funções celulares normais durante a resposta ao estresse, uma vez que o uso intensivo de energia e os efeitos tóxicos causados pelas altas concentrações de HSP interferem com a função celular normal.

Elevados níveis de HSPs representam um cenário de um “ambiente positivo” durante e depois de condições estressantes, proporcionando alterações favoráveis a uma recuperação eficaz (AUFRICHT, 2005).

Em ambientes terrestres o estresse térmico é acompanhado da expressão de HSP. Normalmente envolve limitações na mitigação de extremos térmicos pelo movimento e os conflitos entre a termorregulação e outras necessidades (FEDER & HOFMANN, 1999).

As previsões sobre o papel ecológico da resposta de choque térmico que são feitas a partir de comparações laboratoriais de espécies que ocupam ambientes térmicos muito diferentes, não foram testados em condições naturais (TOMANEK & SANFORD, 2003).

O uso de HSPs como biomarcadores é especialmente útil uma vez que a sua indução é muito mais sensível ao estresse que os tradicionais índices, tais como os inibidores de crescimento (FEDER & HOFMANN, 1999).

4.4.1 Proteínas de choque térmico de 70 kDa

Em vários organismos a HSP70 é considerada como a maior família de HSPs (PARSELL & LINDQUIST, 1993; SØRENSEN et al., 2003), sendo que múltiplos estímulos podem induzir o seu acúmulo *in vivo*: hipertermia, isquemia-reperfusão, hipóxia, depleção de energia, acidose, formação ROS (KREGEL, 2002).

A família das HSP70 é a mais sensível à temperatura e também a mais bem conservada. A indução de HSP70 foi associada ao desenvolvimento de tolerância a uma variedade de estímulos estressores, mas as funções precisas das HSPs da família HSP70 ainda não foram completamente identificadas. No entanto, o seu elevado grau de conservação entre as espécies juntamente com a sua importância na sobrevivência da célula em várias situações, sugere que estas sejam fundamentais quer para um funcionamento celular normal, como para a sua posterior sobrevivência após estresse (KREGEL, 2002). Segundo Kiang & Tsokos (1998) as HSP70 parecem desempenhar um papel crucial na sobrevivência dos organismos, uma vez que a sua presença nas células em condições normais e patológicas é ubíqua e a sua estrutura é evolutivamente conservada.

Foram atribuídas às HSPs e, em particular à família HSP70 várias funções citoprotetoras importantes, tais como: o arranjo de proteínas em vários compartimentos intracelulares; a manutenção de proteínas estruturais; o re-enrolamento de proteínas deformadas, a translocação de proteínas através de membranas e para vários compartimentos celulares; a prevenção da agregação proteica e a degradação de proteínas instáveis (KREGEL, 2002).

As HSP70 desempenham, portanto, um papel essencial na biogênese, transporte e degradação de proteínas (MORANO, 2007). De acordo com Li et al. (2010) a sua principal função consiste na participação da configuração de outras proteínas e no aceleração da síntese proteica.

Segundo Aufricht (2005) as HSP70 são fundamentais para a sobrevivência celular, uma vez que as células e por consequência os animais que sofreram *knockout* para HSP70 não são viáveis.

Dentro da família das HSP70 existem duas formas: as constitutivas, sempre presentes, como é o exemplo das cognatas de choque térmico (*heat shock cognate* - HSC); e as induzidas, que são expressas em resposta a um estímulo externo (CLARK & PECK, 2009). Dentro das HSP70 constitutivas existem dois membros, HSPA1A e HSPA1B, que são rapidamente induzidos em resposta a vários estressores e que desempenham um papel direto na proteção das células, uma vez que inibem a apoptose induzida por estresse (BARRIER et al., 2009).

De acordo com Sharma et al. (2012) a HSPA1A é um gene altamente conservado e com um papel importante no crescimento de oócitos e desenvolvimento de embriões de búfalos, sugerindo a possibilidade de ser utilizado como um biomarcador de estresse durante o desenvolvimento embrionário.

4.4.2 Proteínas de choque térmico de 90 kDa

HSP90 é a proteína de choque térmico de 90 kDa mais abundante no citoplasma de vários tipos de células quer em condições normais quer em condições de estresse (YAHARA, 1999).

Tal como HSP70 é uma proteína chaperona, também interage e forma complexos com fatores de transcrição e proteínas de transdução de sinal, em células que cresceram em condições normais (YAHARA, 1999). De acordo com o mesmo autor, as HSP90 funcionam como chaperona para proteínas anormais ou que sofreram mutações, permitindo-lhes um funcionamento idêntico ao de proteínas normais.

As HSP90 em situações normais encontram-se num estado latente, mas adquirem a atividade de chaperonas após um período de incubação sob temperaturas elevadas (YONEHARA et al., 1996).

Até à data apenas foi identificada uma HSP90 em procariotas, e a sua função não foi considerada essencial nem mesmo em situações de estresse. Já em eucariotas existem várias HSP90, podendo estar presentes no citoplasma ou em organelos específicos, sendo

que as citoplasmáticas são consideradas proteínas *pivot*, uma vez que interagem com proteínas chaperonas moleculares, co-chaperonas e proteínas reguladoras (SILVA & RAMOS, 2011).

Existem duas isoformas citoplasmáticas de HSP90 consideradas principais, que surgiram por duplicação de genes, HSP90 α ou HSP90AA1 (forma induzida) e HSP90 β ou HSP90AB1 (forma constitutiva) (SILVA & RAMOS, 2011; ONER et al., 2012), ambas induzidas pelo aumento de temperatura (CHEN et al., 2005).

5. Material e Métodos

5.1 Locais e laboratórios

O projeto decorreu no Brasil e em Portugal, com experimentos no campo e em laboratório.

Em Portugal foram realizados dois experimentos com novilhas das raças Mertolenga e Limousine. O primeiro experimento foi conduzido no Centro Experimentação do Baixo Alentejo - Herdade da Abóbada, pertencente à Direção Regional de Agricultura do Alentejo (DRA-AL), nas coordenadas 37°57'23''N e 7°25'21''W, com animais da raça Mertolenga. O segundo experimento foi realizado com animais de raça Limousine pertencentes à Herdade do Bussalfão, situada em Vila-Nova de Milfontes (37°46'36''N e 8°44'18''W).

O trabalho laboratorial foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal da Universidade dos Açores, e no Laboratório de Virologia Vegetal do Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas (ICAAM), situado na Universidade de Évora.

No Brasil, o experimento com animais da raça Holstein Frísia decorreu no Setor de Bovinicultura de Leite da Perfeitura do Campus USP de Pirassununga (PUSP-P), localizado a uma altitude de 597 m, nas coordenadas 21°57'06''S e 47°27'01''W. Os animais da raça Brahman pertenciam à Fazenda São Leopoldo Mandic, situada em Descalvado (SP), a uma altitude de 648 m e com as coordenadas 21°57'05''S e 47°37'26''W.

Todas as análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Morfofisiologia e Desenvolvimento, da FZEA/USP.

5.2 Animais

Para este estudo foram utilizadas fêmeas em idade reprodutiva de cada uma das raças a ser utilizada.

O experimento com 20 animais da raça Brahman decorreu nos meses de Setembro de 2010 e Fevereiro de 2011.

As colheitas realizadas em Portugal tiveram início no mês de Julho de 2011 no experimento com 22 novilhas Mertolengas, e em Agosto com 20 animais de raça Limousine.

Nos meses de Novembro e Dezembro de 2011 decorreu o experimento com 11 animais Holstein Frísia, onde foram colhidas amostras de sangue para o estudo *in vivo* e também *in vitro*.

Todos os animais se encontravam sob um sistema de pastoreio, com água *ad libitum* e suplementados com alimento concentrado adequado às suas exigências nutricionais.

Figura 4. Animal da raça Holstein Frísia

Figura 5. Animal da raça Limousine

Figura 6. Animal da raça Mertolenga

Figura 7. Animal da raça Brahman

5.3 Fase experimental

Os animais foram sujeitos ao teste de tolerância ao calor com o objetivo de estudar a sua capacidade termolítica. Durante esse experimento decorreu também a colheita de material biológico para posterior avaliação da expressão de proteínas de choque térmico em linfócitos de bovinos.

Foi também realizado um estudo de choque térmico *in vitro* em linfócitos de animais da raça Holstein Frísia, para avaliação da expressão gênica de HSPs.

5.3.1 Capacidade termolítica

Foi realizado o teste de capacidade termolítica, desenvolvido por Baccari Jr. et al. (1986) e modificado por Titto et al. (1999), em todas as fêmeas do estudo, num período de três dias típicos de verão. O teste consiste em aferir a temperatura retal individual dos animais (TR1) após permanecerem à sombra durante duas horas sem acesso a água e alimento. Posteriormente os animais são expostos ao sol por uma hora, retornando depois à sombra por mais uma hora. No final deste período é efetuada uma nova medição da temperatura retal (TR2), tal como esquematizado na figura 8.

No momento de aferição da temperatura retal a frequência respiratória foi também determinada.

Figura 8. Esquema do teste de capacidade termolítica

Figura 9. Aferição da temperatura retal

5.3.2 Avaliação da expressão de proteínas de choque térmico em linfócitos

5.3.2.1 Lise das hemácias

Para este procedimento foi utilizada uma solução de lise de hemácias contendo:

- 3,7 g ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA);
- 80,2 g cloreto de amónia (NH_4Cl);

- 8,4 g bicarbonato de sódio (NaHCO_3);
- 1 L de água destilada

Após a colheita do sangue, procedeu-se à sua centrifugação a 2.500 r.p.m. ($960 \times g$), durante 20 minutos a uma temperatura de 20 °C. Foi transferida para um *ependorf* a camada leucocitária do sangue (*buffy coat*) de cada animal (aproximadamente 1 mL) e o volume do microtubo foi completado com a solução de lise de hemácias. Em seguida, o material foi novamente centrifugado a 10.000 r.p.m. ($15.420 \times g$) a 20 °C, por 5 minutos, e no final foi descartado o sobrenadante por inversão do microtubo. As lavagens foram repetidas até que o *pellet* de linfócitos se apresentasse branco (sem hemácias). Posteriormente, foi realizada uma última lavagem com uma solução tampão fosfato-salino - PBS (10.000 r.p.m., 20 °C, por 5 minutos), onde o sobrenadante foi também descartado, para que a amostra fosse então armazenada a uma temperatura de -80 °C.

Figura 10. Lise de hemácias: A) Tubos de sangue após centrifugação; B) Retirada do *buffy coat*; C) Colocação da solução de lise; D) Pormenor do *pellet* de linfócitos

5.3.2.2 Extração de RNA

A extração de RNA foi feita com *TRIzol® Reagent* (Invitrogen), reagente que causa ruptura celular mas mantém a integridade do RNA. A cada amostra foi adicionado 1 mL do reagente, e a lise das células foi feita através de múltiplas pipetagens, seguindo as recomendações do fabricante. O homogenado foi então centrifugado a 12.000 r.p.m. ($22.210 \times g$) durante 10 minutos a uma temperatura de 4 °C. Após transferir a amostra para um novo microtubo, a centrifugação foi repetida.

Figura 11. *Eppendorf* com *pellet* de linfócitos e com reagente TRIzol

Depois de um período de incubação de 5 minutos a temperatura ambiente, foram adicionados 200 μ L de clorofórmio a cada amostra de modo a dar início à separação da fase aquosa da fase orgânica. Seguiu-se outra incubação por 5 minutos, também a temperatura ambiente. As amostras foram então centrifugadas a 12.000 r.p.m. durante 15 minutos a 4 °C. Aproximadamente 600 μ L da fase aquosa (sobrenadante) de cada amostra foram transferidos para novos microtubos, onde se adicionaram 50 μ L de álcool isopropílico. Após agitação em vórtex, os microtubos foram incubados por 5 minutos à temperatura ambiente. Nesta fase decorreu a precipitação do RNA, formando-se um *pellet* na lateral ou no fundo do *eppendorf*.

Foi realizada uma centrifugação a 12.000 r.p.m., durante 10 minutos a 4 °C, em seguida cada amostra foi transferida para um novo microtubo e adicionaram-se 500 μ L de álcool isopropílico. Depois de 5 minutos à temperatura ambiente, as amostras foram novamente centrifugadas (12.000 r.p.m., 10 minutos, a 4 °C).

O sobrenadante do RNA foi removido (por inversão do microtubo) e o *pellet* de RNA formado foi lavado com 1 mL de álcool etílico 75%, e centrifugado a 12.000 r.p.m., durante 5 minutos a 4 °C – este passo foi realizado duas vezes.

Após remoção do sobrenadante, o *pellet* foi seco a temperatura ambiente por 10 minutos. No final, ressuspendeu-se o RNA em 30 μ L de água tratada com dietilpírocarbonato (DEPC), e incubado em banho seco a 55-60 °C por 10 minutos.

5.3.2.3 Leitura em espectrofotômetro

Este procedimento foi realizado com o objetivo de conhecer a concentração do RNA extraído e a razão na qual se encontra.

A quantificação do RNA foi determinada através de leitura no espectrofotômetro *Nano Drop 2000* (Thermo Scientific). Foi utilizado 1 μL de amostra, e como referência para leitura utilizou-se água Mili-Q ($\text{H}_2\text{O}_{\text{miliQ}}$). Registaram-se vários comprimentos de onda, nomeadamente A230, A260, A280, a razão 260/280 e a concentração em $\mu\text{g/mL}$ (figura 12).

Figura 12. Colocação da amostra no espectrofotômetro

Considerando que uma unidade de DO260 equivale a 40 $\mu\text{g/mL}$ de RNA, foi realizado o cálculo da razão entre a DO em 260 e 280 nm para estimar a contaminação por proteínas (sendo que a razão deve estar entre 1,6 e 1,8).

5.3.2.4 Síntese e determinação da quantidade relativa de DNA

Para síntese de cDNA foi utilizado o *kit* de transcrição reversa *Superscript III® Reverse Transcriptase* (Invitrogen), após digestão da amostra com *DNase I (Deoxyribonuclease I Amplification Grade - Invitrogen)*. A etapa de digestão com *DNase I* é de extrema importância, para que não haja comprometimento do cDNA a ser produzido, com o DNA do material a ser amplificado. A reação de transcrição reversa é a responsável pela transcrição do RNA em cDNA.

Em microtubos de 0,2 mL foram adicionados: 1,0 µg de amostra RNA, 1,0 µL de 10X *DNase I Reaction Buffer*, 1,0 µL de *DNase I Amplification Grade* (1 U/µL), 1,0 µL de *RNaseOut™* e 10 µL de água DEPC. Em seguida os microtubos foram incubados a 25 °C por 15 minutos. Após adição de 1,0 µL de EDTA (solução 25 mM), e incubaram-se as amostras a 65 °C durante 10 minutos, de modo a inativar a *DNase I*, e depois a 4 °C por 2 minutos.

Em seguida foram adicionados 1,0 µL de *pd(N)₆ Random Hexamer* (13,25 µg/µL) (Qiagen). As amostras foram então incubadas a 65 °C durante 5 minutos e depois resfriadas a 4 °C. Foi preparada uma solução *mix* com: 4,0 µL 5X *Buffer*, 2,0 µL de DTT, 1,0 µL de dNTPs (10 mM cada), 1,0 µL de *RNaseOut™*, e 1,0 µL de *Superscript III® RT*. Foram adicionados a cada microtubo 9,4 µL desta solução *mix*, e em seguida incubados por 8 minutos a uma temperatura de 25 °C, depois por 1 hora a 60 °C, e 15 minutos a 70°C. Posteriormente os microtubos foram resfriados a 4 °C e armazenados a -20 °C.

5.3.2.5 Delineamento dos *primers*

Inicialmente optou-se por usar *primers* desenhados com o programa *Primer Express®* (Applied Biosystem) a partir de sequências obtidas no banco de dados do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). As sequências desses *primers* eram:

	<i>Foward 5'-3'</i>	<i>Reverse 5'-3'</i>
HSP70 bovino	AGGAATCCTCCCTGGATTGCTCA	GCTGATGGCTGATGAAAGGCAGAT
GAPDH bovino	AAGGCCATCACCATCTTCCA	CCACTACATACTCAGCACCAGCAT

No entanto, com o decorrer do projeto, entendeu-se que a inclusão de mais um gene alvo, nomeadamente o HSP90AA1, seria de enorme importância.

Da mesma forma, foi decidido que a utilização de dois genes constitutivos ao invés de um, poderia ser uma mais valia, uma vez que a finalidade do uso destes genes em diagnósticos moleculares é o aumento da confiabilidade da técnica, eliminando a possibilidade de ocorrerem resultados falso-negativos por contaminação ou por erro de pipetagem.

A escolha dos genes endógenos foi baseada no trabalho de pesquisa realizado por Spalenza et al. (2010), onde os autores concluem que dos genes que analisaram, o PPIA, S24 e YWAHZ, foram os que apresentaram resultados mais estáveis como *housekeeping*. Houve também a oportunidade de realizar alguns testes usando o gene ACTB e o GAPH, nos quais se obtiveram resultados bastante satisfatórios para o ACTB. Como tal foi decidido usar como endógenos os genes: PPIA, que catalisa a isomerização cis-trans de peptídeos entre prolinas em oligopeptídeos e acelera o enrolamento das proteínas; e ACTB, proteína componente do citoesqueleto, envolvida na motilidade, estrutura e integridade celular (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene).

Optou-se por adquirir ensaios comerciais *TaqMan® Gene Expression Assays* (Applied Biosystems) baseados na amplificação com sequências iniciadoras ou *primers*, dos quatro genes a serem estudados. Os ensaios de expressão gênica *TaqMan®* apresentam eficiências de amplificação de 100 %, consequentemente ao usar estes ensaios não é necessário medir a eficiência da reação (Applied Biosystems, 20...).

5.3.2.6 Reação da polimerase em cadeia em tempo real (q-PCR)

As amplificações em PCR em tempo real foram realizadas com o objectivo de quantificar a expressão gênica relativa dos genes candidatos, HSPA1A e HSP90A1, e como referência endógena, os genes ACTB e PPIA.

A quantificação do cDNA foi realizada utilizando a metodologia de PCR em tempo real, através do equipamento *7500 Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems® - Life Technologies do Brasil).

Após padronização as reações foram definidas como: 7,5 µL de *TaqMan® Gene Expression Master Mix*, 0,75 µL de *primers*, 3 µL de cDNA (amostra) e 3,75 µL de H₂O_{MiliQ}, perfazendo um volume final de 15 µL. As reações foram preparadas em triplicatas, e em todas as placas foram utilizados controles negativos, contendo H₂O_{MiliQ} em substituição à amostra.

Foi utilizado o programa padrão para ensaios *TaqMan®*: *holding stage* - 1 ciclo de 95 °C por 10 minutos, cuja função é inativar a enzima uracil-N-glicosilase (UNG), que degrada

DNA fita dupla contendo uracila; seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos e anelamento a 60 °C por 1 minuto.

5.4 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas recorrendo ao R Software Project (versão 3.0.1) usando os pacotes *car*, *nortest*, *ggplot2*, *lme4* e *multcomp*.

Em função das características dos delineamentos experimentais, os modelos adotados encontram-se explicados em cada um dos capítulos.

6. Experimento I: Avaliação da expressão gênica de HSPA1A e HSP90AA1 em linfócitos de bovinos após aumento planejado das temperaturas realizado *in vitro*

Resumo

A exposição de organismos vivos a temperaturas elevadas provoca várias alterações, inclusive alterações a nível celular. Essas alterações conduzem a um aumento na expressão de proteínas de choque térmico. Este estudo objetivou a avaliação da resposta de HSPs de diferentes famílias (HSPA1A e HSP90AA1) em linfócitos de fêmeas bovinas, após serem submetidos a estresse térmico *in vitro*. Foram utilizados 9 animais pertencentes à FZEA-USP, dos quais foram colhidos 4 tubos de sangue por venopunção. Cada tubo de sangue foi submetido a diferentes temperaturas: 40 °C e 42 °C (ambos através de banhos-maria), 23 °C (mantido a temperatura ambiente) e 10 °C (na geladeira), onde permaneceram por duas horas. Em seguida foi realizada a lise das hemácias de modo a obter o *buffy-coat*. O RNA foi isolado através do método do TRIzol e a RT-PCR realizada com SuperScript III após digestão com DNase I. A PCR em tempo real decorreu no aparelho 7500 Fast Real Time, utilizando TaqMan Gene Expression Assays para os genes alvo HSPA1A e HSP90AA1, e ACTB e PPIA como genes endógenos. Foram calculados os ΔCt ($Ct_{\text{alvo}} - Ct_{\text{endógeno}}$) assim como a expressão gênica através do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. A análise estatística foi realizada através de modelos lineares mistos, recorrendo ao programa R Software Project (versão 3.0.1). Foi atestada a qualidade da relação para ambos os endógenos nas relações que estabelecem com o mRNA-HSPA1A e o mRNA-HSP90AA1, através de uma análise de regressão *pairwise*. Tal como era esperado os valores de expressão gênica a uma temperatura de 23 °C foram os menores, seguidos 10 °C (estresse por frio), 40 °C e 42 °C para o gene HSPA1A. No caso da HSP90AA1, foi a 40 °C que se verificou uma maior expressão gênica. A resposta das HSPs estudadas não é igual, o que permite sugerir que a HSP90AA1 é menos discriminatória quando à intensidade do estresse térmico que a HSPA1A, uma vez que a expressão de mRNA-HSPA1A é tanto maior quanto maior o estresse.

Palavras-chave: ambiente controlado, Holstein Frísia, HSP

Experiment I: Evaluation of HSPA1A and HSP90AA1 gene expression in cattle lymphocytes after planned temperature increase performed *in vitro*

Abstract

The exposure of living organisms to high temperatures causes several changes, including at the cellular level. These changes lead to an increased expression of heat shock proteins. This study aimed to evaluate the response of different families of HSPs (HSPA1A and HSP90AA1) in cow lymphocytes, after being subjected to *in vitro* heat stress. Nine animals belonging to FZEA-USP were used, to which 4 blood samples were collected by venipuncture). Each one of the blood samples was submitted to different temperatures: 40 °C and 42 °C (through water baths), 23 °C (kept at room temperature) and 10 °C (in the refrigerator) for two hours. In all samples the erythrocytes lysis was carried out so as to obtain the buffy-coat. The RNA was isolated by the TRIzol method and RT-PCR was performed with SuperScript III after digestion with DNase I. The real-time PCR apparatus took place in 7500 Real Fast Time, using TaqMan Gene Expression Assays for HSPA1A and HSP90AA1 target genes, ACTB and PPIA as endogenous genes. The ΔC_t ($C_{t_{\text{target}}} - C_{t_{\text{endogenous}}}$) were calculated as well as gene expression through the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. Statistical analysis was performed using linear mixed models, using the program R Project Software (version 3.0.1). The quality of the relationship was attested for both endogenous genes with the mRNA-HSPA1A and mRNA-HSP90AA1 through a pairwise regression analysis. As expected, gene expression at a temperature of 23 °C was lower, followed by 10 °C (cold stress), 40 °C and 42 °C for the HSPA1A gene. In the case of HSP90AA1 the highest gene expression was found at 40 °C. The response of the studied HSPs is not equal, which may suggest that HSP90AA1 is less discriminatory to the intensity of thermal stress than HSPA1A, since the expression of mRNA-HSPA1A is greater the higher the stress is.

Keywords: controlled environment, Holstein Friesian, HSP

6.1 Introdução

Um recorrente problema na produção de gado assenta na dificuldade que os animais têm em enfrentar situações de estresse térmico, problema que interfere de forma negativa e significativa na produtividade animal.

Quando organismos vivos são expostos a estresse térmico, sofrem várias alterações inclusive ao nível celular. Uma dessas alterações consiste na diminuição da síntese da maioria das proteínas, mas existe um grupo de proteínas que é rapidamente sintetizado em situações de estresse térmico – as HSP (ZULKIFLI et al., 2010). As HSPs são importantes na relação à resistência ao estresse e a adaptação ao ambiente, sendo a sua regulação influenciada quer por fatores de estresse ambientais, quer genéticos (SØRENSEN et al., 2003).

Os estudos estruturais e funcionais das HSPs definiram a sua capacidade de funcionar como chaperonas moleculares em processos como a maturação e degradação de proteínas. A sua expressão gênica é provocada por estímulos fisiológicos, intrusos patológicos e estressores ambientais (KIANG & TSOKOS, 1998).

O estresse térmico leva a um aumento inicial no nível plasmático de glucocorticóides, que ao entrar no citoplasma provocam a libertação de HSP70 e HSP90 citoplasmático, proteínas que estão vinculadas ao receptor de glucocorticóides. Estas HSPs pré-formadas constituem a primeira linha de defesa contra estresse térmico uma vez que as proteínas já se encontram no citoplasma não sendo necessária a sua síntese (COLLIER et al., 2008).

Com este estudo pretendeu-se avaliar a resposta de proteínas de choque térmico de diferentes famílias (HSPA1A e HSP90AA1) em linfócitos bovinos, após serem submetidos *in vitro* a diferentes variações planificadas de temperatura.

6.2 Material e Métodos

6.2.1 Animais e coleta de sangue

Foram seleccionadas nove novilhas Holstein Frísia pertencentes ao Setor de Bovinicultura de Leite da Perfeitura do Campus USP de Pirassununga (PUSP-P). Os animais foram mantidos em sistema de pastoreio, suplementados com concentrado e com disponibilidade de água *ad libitum*.

As amostras de sangue que foram posteriormente submetidas a tratamento térmico foram coletadas através de venopunção da veia mediana caudal. A cada um dos animais foram coletados quatro tubos de sangue (~ 8 mL de cada) com ACD (ácido cítrico, citrato de sódio e dextrose) da BD Vacutainer®.

6.2.2 Tratamento de choque térmico

De acordo com Agnew & Colditz (2008) existe diferença na expressão de HSPs entre amostras de sangue recém-coletadas e amostras refrigeradas. Desde modo, o choque térmico foi realizado logo após a colheita de sangue.

Para a realização de choque térmico foram utilizados dois aparelhos de banho-maria, um calibrado para uma temperatura de 40 °C e outro para 42 °C (figura 13). Em cada um dos banhos-maria foi colocado um tubo de sangue de cada animal, onde permaneceram por 2 horas, de acordo com os procedimentos referidos por Wang et al. (2003). O terceiro tubo foi colocado na geladeira (~ 10 °C), simulando uma situação de choque térmico por frio, e o quarto tubo foi mantido a temperatura ambiente (~ 23 °C).

Figura 13. Banhos-maria utilizados para choque térmico *in vitro*: A) Aparelho a 42 °C; B) Aparelho a 40 °C; C) Pormenor dos tubos de sangue em banho-maria

6.2.3 Separação dos linfócitos

Após o choque térmico, os todos de sangue foram centrifugados, e, em seguida, a camada leucocitária (*buffy coat*) de cada amostra foi transferida para um microtubo (~ 1 mL) e o volume foi completado com solução de lise de hemácias. O material foi novamente centrifugado e em seguida o sobrenadante foi descartado por inversão do microtubo. A lavagem foi repetida até que o *pellet* de linfócitos se apresentasse branco.

6.2.4 Isolamento do RNA total e RT-PCR

O RNA total foi isolado utilizando o reagente *TRIzol*® (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante. O RNA foi precipitado a partir da porção aquosa, por mistura com álcool isopropílico. Após centrifugação, o *pellet* foi lavado com etanol a 75% e posteriormente, seco. Recorrendo ao espectrofotômetro *NanoDrop 2000* (Thermo Scientific) determinou-se a concentração de RNA de cada uma das amostras.

A síntese de cDNA foi realizada usando *pd(N)₆ Random Hexamer* (Qiagen) e transcriptase reversa *Superscript III*® (Invitrogen), após digestão com *DNAse I*. As amostras foram depois armazenadas a -20 °C.

Utilizaram-se ensaios comerciais *TaqMan*® *Gene Expression Assays* (Applied Biosystems) com base nos *primers* de amplificação dos genes a serem estudados: HSPA1A, HSP90AA1 (genes alvo) e ACTB e PPIA (como genes endógenos).

A PCR em tempo real foi realizada utilizando a *TaqMan® Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems) com o aparelho *7500 Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems® - Life Technologies do Brasil).

6.2.5 Análise estatística

Os dados foram normalizados através do cálculo do ΔCt , sendo este calculado pela diferença entre o Ct do gene alvo e o Ct do gene controle. Foi também realizado o cálculo da expressão gênica relativa, através do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001), onde o tratamento a 23 °C foi considerado como tratamento controle.

A análise estatística foi realizada através de modelos lineares mistos (GALECKI & BURZYKOWSKI, 2013) com *random intercepts* e *slopes* aleatórios.

O modelo utilizado é apresentado abaixo:

Modelo: $Y_i = \beta_{i0} + \beta_{i1} X_{i1} + \beta_{i2} X_{i2} + \beta_{i3} X_{i3} + \varepsilon_i$, $i=1, \dots, m$

Em que,

Y_i – resposta do animal i ;

X_{ij} – variável binária (*dummy*) representando o tratamento j no animal i , sendo o tratamento de referência o T23 tem-se T40 em $j=1$, T42 em $j=2$ e T10 em $j=3$;

B_{ij} – coeficientes do modelo (com distribuição normal com média B e matriz de covariância D definida positiva);

ε_i – erro experimental associado (com distribuição normal de média nula e variância σ^2).

Para todos os casos este modelo revelou-se melhor via *Likelihood ratio test*, que o modelo com apenas *random intercepts*, apresentando também valores de AIC (critério de informação de Akaike) consideravelmente mais baixos. Como fator de efeitos fixos foi considerado a temperatura, e o animal como fator de efeitos aleatórios (variando não só no seu nível basal de resposta, mas também em termos de alterações na sua resposta ao longo de cada animal).

O pressuposto da normalidade foi verificado recorrendo essencialmente a gráficos *Q_plot*, embora nos casos que apresentaram dúvidas se tenha testado usando o teste de Shapiro-Wilk e avaliando o afastamento dos coeficientes de assimetria e achatamento.

Foi também avaliado o pressuposto da homogeneidade de variâncias, representando graficamente os valores ajustados (*fitted values*) vs os resíduos standardizados (*standardized residuals*).

6.3 Resultados e Discussão

Para analisar o comportamento relativo dos genes endógenos, foram realizadas duas análises de regressão *pairwise* para cada um dos genes HSPA1A e HSP90AA1, com base nos genes endógenos ACTB e PPIA. Tal como pode ser visualizado na figura 14 as proporcionalidades das respostas entre os genes endógenos foram semelhantes, apresentando declives iguais (ACTB = 0,394; PPIA = 0,343; $P > 0,05$) e graus de dispersão similares. Os limites de variação do mRNA-HSPA1A foram superiores ao de mRNA-HSP90AA1, embora a proporcionalidade se tenha mantido ao longo da gama de variação das expressões. O valor de R^2 foi igual para ambas as retas ($R^2 = 0,78$), atestando a qualidade de relação para ambos os endógenos nas relações que estabelecem com o mRNA-HSPA1A e o mRNA-HSP90AA1. A regressão linear entre os genes HSPA1A e HSP90AA1 para ambos os genes endógenos reforça a ideia que a proporção entre as expressões gênicas são semelhantes numa vasta gama de variações.

Figura 14. Análise de regressão entre $\Delta Ct \text{ HSP90AA1}$ e $\Delta Ct \text{ HSPA1A}$ para os genes ACTB e PPIA

A figura 15 é bastante ilustrativa, ficando bem explícita a resposta em função do endógeno. Em ambos os gráficos da figura 15, os valores observados para o tratamento de 23 °C são claramente distintos dos observados nos outros tratamentos, o que reflete as diferenças significativas encontradas. Se analisarmos o gráfico relativo ao PPIA (direita), verificamos que a dispersão existente entre os valores da expressão relativa de HSPA1A é muito mais elevada que os da HSP90AA1, o que neste caso corresponde a uma resposta mais coerente. Isto poderá ser indicativo de que o PPIA, dentro das nossas condições experimentais, parece ter sido o endógeno mais adequado, devido às menores dispersões verificadas.

Figura 15. Box plots dos ΔCt para cada tratamento: à esquerda com ACTB como gene endógeno; à direita com PPIA como gene endógeno

Os gráficos da figura 15 permitem identificar que os níveis de dispersão dos valores foram superiores no endógeno PPIA. Esta maior magnitude de dispersão não impediu a coerência entre os valores apresentados pelos dois genes endógenos. A dispersão foi bastante menor no tratamento T23 enquanto que se observaram maiores dispersões para o T40 e principalmente no T10. Esta maior dispersão nestes tratamentos é particularmente exacerbante no endógeno ACTB.

Tal como esperado ocorreu maior expressão de mRNA-HSPA1A e mRNA-HSP90AA1 nos linfócitos de bovinos em todas as temperaturas consideradas como tratamentos.

Tabela 1. Valores médios e desvios padrões dos ΔCt de cada gene em estudo para cada um dos tratamentos (unidades arbitrárias)

Temp.	ΔCt			
	HSPA1A		HSP90AA1	
	ACTB	PPIA	ACTB	PPIA
10°C	5,04 $\pm$ 4,11 ^a	-0,87 $\pm$ 3,22 ^a	4,35 $\pm$ 2,26 ^a	-1,55 $\pm$ 1,38 ^a
23°C	10,01 $\pm$ 0,98 ^b	5,59 $\pm$ 0,42 ^b	6,46 $\pm$ 1,17 ^b	2,00 $\pm$ 0,64 ^b
40°C	0,54 $\pm$ 1,56 ^c	-4,02 $\pm$ 1,58 ^{c*}	2,55 $\pm$ 1,55 ^a	-1,86 $\pm$ 0,70 ^a
42°C	-0,83 $\pm$ 1,09 ^d	-5,72 $\pm$ 0,49 ^{d*}	3,28 $\pm$ 0,72 ^a	-1,61 $\pm$ 0,13 ^a

a, b, c, d Médias na mesma coluna, seguidas da mesma letra, não diferem estatisticamente entre si ao nível de 1% de significância e valores com * diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de significância.

Na tabela 1 estão expressos os valores médios dos ΔCt (diferença entre o gene alvo e o gene controle) e seus respectivos desvios padrão para cada uma das temperaturas (tratamentos). É de salientar que ao comparar os valores iniciais do Ct de dois genes alvo em determinada amostra, aquele que apresentar o menor valor deverá ser o que teve maior amplificação e consequentemente, o mesmo apresenta maior expressão ou abundância na amostra (ver figura 16).

Ao colocarmos os linfócitos a uma temperatura de 23 °C pretendia-se representar uma situação menos desafiadora para a estabilidade celular, enquanto que as outras temperaturas representam situações de estresse térmico por frio (10 °C) e estresse térmico por calor (40 e 42 °C).

Figura 16. Valores médios e desvios padrão dos ΔCt de cada gene em estudo para cada um dos tratamentos

Como podemos verificar, para 23 °C os valores de mRNA-HSPA1A e mRNA-HSP90AA1 foram significativamente mais elevados dos valores encontrados para os outros três tratamentos. Significa que neste tratamento a abundância de transcritos foi a mais baixa, situação que era esperada, uma vez que se trata de uma temperatura que pretende representar uma condição menos estressante.

Comparando os dados referentes à temperatura de 10 °C com os de 23 °C, verificamos que existe uma diminuição nos valores de ΔC_t , ou seja, numa situação de frio as células tiveram necessidade de uma maior concentração de HSPs, de modo a combater os efeitos da diminuição de temperatura. Estes dados corroboram a hipótese de que muitos dos efeitos fisiológicos a nível celular após estresse por frio são similares aos observados em situações de estresse por calor, nomeadamente: aumento na desnaturação e desagregação das proteínas, alterações no ciclo celular, diminuição da síntese proteica e alterações de membrana e de elementos citoesqueléticos (SONNA et al., 2002), no entanto contrariam Craig & Gross (1991) que referem que as HSP diminuem com a diminuição da temperatura.

Comparando os valores de 10 °C com as situações de estresse térmico por calor, verificamos que os valores são significativamente diferentes para o caso da HSPA1A, mas semelhantes para a HSP90AA1. Este resultado poderá ser explicado com base no fato que de as HSP90 tendem a exercer um papel mais passivo que as HSP70, embora ambas desempenhem funções na prevenção da desnaturação proteica durante o estresse (BARAJA-VÁSQUEZ et al., 2005). Esta ideia é também apoiada através da análise dos valores encontrados para os 40 °C relativamente aos dos 42 °C. Observou-se um aumento da expressão de ambos os genes, mas também existem apenas diferenças significativas para a HSPA1A. Outra explicação plausível poderá dever-se ao fato de que os níveis basais de HSP90 na célula serem elevados, ou porque a HSP90 não está especificamente envolvida neste mecanismo de proteção celular, e por isso o aumento das HSP70 nestas condições de tempo e temperatura ser superior ao destas (KIANG & TSOKOS, 1998). Será lícito supor que a HSP90AA1 é uma proteína mais eficiente na identificação de existência ou não de situações térmicas estressantes, mas, que não será tão discriminatória quanto à intensidade desse estresse como a HSPA1A.

Os dados referentes à proteína da família 70 kDa (ver figura 17), estão de acordo com vários estudos *in vitro*, nomeadamente: Haque et al. (2012) que após submeterem

linfócitos de búfalos a elevadas temperaturas verificaram que o valor máximo de HSP70 ocorreu aos 42 °C, após 3 horas de choque térmico; Collier et al. (2006) usando linfócitos de bovinos, verificaram que o pico de expressão do gene da HSP70 ocorria após 2 horas de estimulação térmica a 42 °C. Agnew & Colditz (2008) observaram que a temperatura na qual a maior expressão de HSP70 em linfócitos de bovinos e de ovinos é a 43,5 °C. Bañuelos-Valenzuela & Sánchez-Rodríguez (2005) corroborando os resultados anteriores, evidenciaram que existe um aumento na quantidade de HSP70 dos 38 °C até aos 42 °C, mas que a uma temperatura de 44 °C a expressão dessas proteínas diminui, referindo que provavelmente a essa temperatura existe uma elevada quantidade de proteínas desnaturadas às quais as HSP70 se unem, passando assim de solúveis a insolúveis.

a, b, c Médias na mesma linha, seguidas da mesma letra, não diferem estatisticamente entre si ao nível de 0,1% de significância e valores com * diferem estatisticamente entre si ao nível de 1% de significância.

Figura 17. Valores médios e desvios padrão da expressão gênica relativa para cada tratamento: à esquerda para HSPA1A; à direita para HSP90AA1

No caso deste experimento o fator tempo de exposição ao estresse térmico não foi tido em consideração. Tal foi devido aos resultados observados num estudo prévio, realizado utilizando esta mesma metodologia. Nesse teste-piloto foram consideradas duas situações diferentes: a) incubação a 40 °C e a 42 °C em banho-maria por 4 horas; b) estresse agudo (sangue colocado de forma imediata a 40 °C) e estresse gradual (a temperatura do

banho-maria foi subindo dos 38 aos 40 °C), tendo sido o tempo de incubação de 2 h. Nesse estudo quando o tempo de incubação foi de 4 h os valores de ΔC_t eram muito superiores aos da situação de termoneutralidade (para ambas as temperaturas, HSPs e também genes endógenos) (dados não publicados), fato que nos levou a assumir que provavelmente o maior período de incubação levou à desnaturação das proteínas, uma vez que o maior problema que se verifica após a exposição das células a altas temperaturas ou outros fatores estressantes é a instabilidade proteica (BARAJA-VÁSQUEZ et al., 2005; LINDQUIST, 1986; MORIMOTO et al., 1994). Para a segunda situação onde foram simuladas situações de estresse agudo e de estresse gradual, verificamos que houve diferença significativa ($P < 0,05$) para ambos os mRNA-HSPs quando o gene controle foi o PPIA e para mRNA-HSP90AA1 com o ACTB como endógeno. No caso do mRNA-HSPA1A com ACTB, esse valor não foi significativo mas houve uma tendência ($P = 0,06$). Estes resultados parecem ser relevantes para estudos futuros, uma vez que nos sugerem que além do tempo e intensidade de exposição ao estresse, o tipo desse estresse (gradual ou agudo/imediato) pode ter um efeito sobre a expressão de proteínas de choque térmico.

No entanto a relação entre tempo e a temperatura na expressão gênica de HSPs é contraditória. Kamwanja et al. (1994) relataram que a exposição *in vitro* durante 3 horas de linfócitos bovinos a uma temperatura de 45 °C diminuiu o número de células viáveis. Agnew & Colditz (2008) também verificaram que a 44,5 °C ocorre uma diminuição da expressão de HSP70 – ambos os autores corroboram no pressuposto de que a expressão gênica de proteínas de choque térmico é diretamente afetada pela intensidade da temperatura de choque térmico assim como pela duração desse estímulo. Porém, Lepock (2005) afirma que o fator determinante na resposta celular ao estresse térmico é a quantidade de proteínas desnaturadas e agregadas induzidas pelo calor e não o tempo a uma determinada temperatura.

6.4 Conclusão

Numa situação *in vitro* na qual linfócitos de bovinos da raça Holstein Frísia são submetidos a diferentes temperaturas, nomeadamente 10, 23, 40 e 42 °C, verifica-se uma diferença na expressão de mRNA-HSPA1A e mRNA-HSP90AA1.

O aumento da temperatura de linfócitos bovinos leva a diferentes expressões gênicas relativas de HSPA1A e HSP90AA1.

A expressão de mRNA-HSPA1A é tanto maior quanto maior o estresse térmico, quer por frio quer por calor.

A expressão de mRNA-HSP90AA1 não é proporcional ao aumento do estresse térmico, o que nos permite sugerir que esta proteína é menos discriminatória quanto à intensidade do estresse térmico que a HSPA1A.

7. Experimento II: Expressão gênica de HSP em fêmeas bovinas de diferentes raças, com base nos armazenamentos de calor originados pela exposição à radiação solar *in vivo*

Resumo

O estresse térmico é bastante penalizante para a produtividade animal. A exposição de animais à hipertermia ou hipotermia está associada a modificações morfológicas e fisiológicas. Com este estudo pretendeu-se identificar se animais de diferentes capacidades termolíticas exibem diferentes expressões gênicas de HSPA1A e HSP90AA1. Foram utilizadas fêmeas bovinas das raças Holstein Frísia e Brahman no Brasil e Limousine e Mertolenga em Portugal. Os animais foram sujeitos ao teste de tolerância ao calor, tendo sido aferidas a temperatura retal e a frequência respiratória, e coletado sangue (após a sombra e após o sol). Em seguida foi realizada a lise das hemácias de modo a obter o *buffy-coat*. O RNA foi isolado através do método do TRIzol e a RT-PCR realizada com SuperScript III após digestão com DNase I. A PCR em tempo real decorreu no aparelho 7500 Fast Real Time, utilizando TaqMan Gene Expression Assays para os genes alvo HSPA1A e HSP90AA1, e ACTB e PPIA como genes endógenos. Foram calculados os ΔCt ($Ct_{\text{alvo}} - Ct_{\text{endógeno}}$) assim como a expressão gênica através do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. A análise estatística foi realizada através de modelos lineares mistos, recorrendo ao programa R Software Project (versão 3.0.1). Para a frequência respiratória foi observada uma variação intra-raça algo acentuada, permitindo supor que o esforço termorregulatório dos animais de uma mesma raça possa ter sido diferente. Em relação à temperatura retal a raça Brahman apresentou valores significativamente diferentes das restantes raças para a situação sol. As diferenças observadas foram provavelmente consequência dos diferentes níveis de estresse aos quais os animais estiveram sujeitos. As diferenças observadas nos ΔCt não foram muito expressivas e apenas se observaram diferenças significativas na expressão gênica relativa na raça Mertolenga entre as situações sombra e sol. Também na resposta celular a variabilidade individual foi elevada. O nível de estresse térmico ao qual o animal é sujeito tem consequências diretas nas suas respostas fisiológicas e celulares.

Palavras-chave: frequência respiratória, HSPA1A, HSP90AA1, temperatura retal

Experiment II: HSP gene expression in cows of different breeds, based on heat stores from *in vivo* exposure to solar radiation

Abstract

Heat stress is quite tough on animal productivity. The exposure of animals to hyperthermia or hypothermia is associated with morphological and physiological modifications. This study aimed to identify whether animals of different thermolytic capacities exhibit different HSPA1A and HSP90AA1 gene expressions. In Brazil were used cows of Holstein Friesian and Brahman breeds, and in Portugal of Mertolenga and Limousin breeds. The animals were subjected to the heat tolerance test, where rectal temperature and respiratory rate were measured, and blood samples were collected (after shadow and after sun treatments). In all samples was carried out the erythrocytes lysis so as to obtain the buffy-coat. The RNA was isolated by the TRIzol method and RT-PCR performed with SuperScript III after digestion with DNase I. The real-time PCR apparatus took place in 7500 Real Fast Time, using TaqMan Gene Expression Assays for HSPA1A and HSP90AA1 target genes, ACTB and PPIA as endogenous genes. The ΔCt ($Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{endogenous}}$) were calculated as well as gene expression through the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Statistical analysis was performed using linear mixed models, using the program R Project Software (version 3.0.1). There was a slightly pronounced intra-race variation for respiratory rate values, allowing the assumption that the thermoregulatory effort of animals of the same breed may have been different. Regarding the rectal temperature, in Brahman breeds it was significantly different from the other breeds in the sun treatment. The differences observed were probably a result of different levels of stress to which the animals were subjected. The differences observed in ΔCt were not very expressive and significant differences were only observed in relative gene expression of Mertolenga breed between shade and sun treatments. Also in the cellular response to individual variability was high. The level of thermal stress to which the animal is subject has direct consequences in their stress response.

Keywords: HSPA1A, HSP90AA1, rectal temperature, respiratory rate

7.1 Introdução

A seleção de animais domésticos para a tolerância ao estresse térmico pode ser contraproducente, visto que a aclimação envolve a redução ou desvio de energia metabolizável da produção para equilibrar o ganho ou perda de calor (COLLIER et al., 2006). Todavia, se essa seleção tiver como base a maior capacidade de termólise, então os efeitos nefastos da aclimação podem atenuar-se.

Estresse pode ser definido como a condição que um animal apresenta, resultante da ação de um ou mais estressores e que podem ter origem externa ou interna (von BORELL, 2001). Particularmente em mamíferos, a exposição à hipotermia ou à hipertermia está associada a modificações morfológicas e fisiológicas (DANGI et al., 2012). De acordo com Bernabucci et al. (2010) perante uma situação em que se verifica um aumento na carga de calor, as respostas imediatas por parte do animal são: aumento da frequência respiratória, diminuição do consumo alimentar e aumento na ingestão de água. Moseley (1997) acrescenta que após uma exposição ao calor suficientemente intensa, ocorrem respostas ao nível celular, nomeadamente a acumulação de HSPs. A temperatura corporal é um excelente indicador sobre a capacidade térmica de um animal (MADER, 2003; MADER et al., 2006). Uma prova da sua utilidade é a utilização do teste de tolerância ao calor, que por sua vez já demonstrou a existência de uma elevada correlação positiva com o ganho de peso em animais de produção de carne, mostrando-se um teste efetivo e útil para avaliação de desempenho de bovinos de carne em condições tropicais (TITTO et al., 1999; TITTO et al., 2006).

Em alguns mamíferos, a frequência respiratória pode servir como um alerta precoce e antecipado do aumento do estresse térmico, ou como mecanismo termorregulador aumentando a termólise evaporativa. A frequência respiratória aumenta acentuadamente a partir de um determinado limiar à medida que os animais tentam manter homeotermia através da dissipação do excesso de calor. Quando esse limiar é ultrapassado, verifica-se uma marcada tendência para hipertermia que é o resultado da incapacidade do animal em dissipar o excesso de calor à velocidade adequada - aumento da termólise. Em geral, as adaptações encontradas em raças bovinas de clima quente não são apenas maior

capacidade de dissipação de calor, mas principalmente a diminuição da tensão climática induzida pela diminuição dos níveis metabólicos e da produção (BERMAN, 2011).

De acordo com Hansen (2004) a capacidade termorreguladora superior que os zebus apresentam quando comparados com raças europeias, é resultado da menor produção de calor, da elevada capacidade de dissipação de calor para o ambiente, ou resulta de uma combinação das duas. O mesmo autor acrescenta que entre as adaptações genéticas que se desenvolveram em zebuínos durante a sua evolução, uma de elevada relevância tem sido a aquisição de genes para termotolerância.

As diferenças genéticas na termotolerância estendem-se até ao nível celular, uma vez que os efeitos deletérios da temperatura elevada sobre as funções celulares são superiores em células de animais das raças Angus e Holstein que em células de animais da raça Brahman (PAULA-LOPES et al., 2003).

Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que vários estressores aumentam a produção de HSPs (KIANG & TSOKOS, 1998). Dentro das várias famílias de HSPs as HSP70 aparentam desempenhar um papel geral nas vias de transdução de sinal, que levam a adaptações das células e organismos a condições estressantes (GABAI et al., 1997).

Com este estudo pretendeu-se identificar se animais com diferentes capacidades termolíticas exibem diferentes expressões gênicas de HSPA1A e HSP90AA1.

7.2 Material e Métodos

7.2.1 Animais

Este experimento decorreu no Brasil e em Portugal, tendo sido utilizados animais de quatro raças, Holstein Frísia (Setor de Bovinicultura de Leite da PUSP-P) e Brahman Fazenda São Leopoldo Mandic no Brasil, e Mertolenga (Herdade da Abóbada - Centro Experimentação do Baixo Alentejo da DRA-AL) e Limousine (Herdade do Bussalfão) em Portugal. Todos os animais eram mantidos a pasto, com fornecimento diário de concentrado e água à disposição.

7.2.2 Teste de capacidade termolítica e coleta de sangue

A colheita de sangue foi realizada em três dias de acordo com os eventos e procedimentos referidos no teste de capacidade termolítica (TITTO et al., 2011). Neste teste, os animais são colocados à sombra, onde permanecem por duas horas, sendo depois aferida a sua temperatura retal (TR1). Em seguida, os animais são expostos ao sol por uma hora, retornando depois à sombra por mais uma hora, altura em que a temperatura retal é novamente coletada (TR2). Nos momentos de colheita da temperatura retal foi também aferida a frequência respiratória (FR1 e FR2).

As coletas de sangue foram realizadas no momento de aferição da temperatura retal (TR1 e TR2), por de venopunção em tubos com ACD (ácido cítrico, citrato de sódio e dextrose) da BD Vacutainer®.

Figura 18. Colheita de sangue na veia abdominal subcutânea

7.2.3 Separação dos linfócitos

Após o choque térmico, os tubos de sangue foram centrifugados, e, em seguida, a camada leucocitária (*buffy coat*) de cada amostra foi transferida para um microtubo (~ 1 mL) e o volume foi completado com solução de lise de hemácias. O material foi novamente centrifugado e em seguida o sobrenadante foi descartado por inversão do microtubo. A lavagem foi repetida até que o *pellet* de linfócitos se apresentasse branco.

7.2.4 Isolamento do RNA total e RT-PCR

O RNA total foi isolado utilizando o reagente *TRIzol*[®] (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante. O RNA foi precipitado a partir da porção aquosa, por mistura com álcool isopropílico. Após centrifugação, o *pellet* foi lavado com etanol a 75% e posteriormente, seco. Recorrendo ao espectrofotômetro *NanoDrop 2000* (Thermo Scientific) determinou-se a concentração de RNA de cada uma das amostras.

A síntese de cDNA foi realizada usando *pd(N)₆ Random Hexamer* (Qiagen) e transcriptase reversa *Superscript III*[®] (Invitrogen), após digestão com *DNAse I*. As amostras foram depois armazenadas a -20 ° C.

Utilizaram-se ensaios comerciais *TaqMan*[®] *Gene Expression Assays* (Applied Biosystems) com base nos *primers* de amplificação dos genes a serem estudados: HSPA1A, HSP90AA1 (genes alvo) e ACTB e PPIA (como genes endógenos).

A PCR em tempo real foi realizada utilizando a *TaqMan*[®] *Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems) com o aparelho *7500 Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems[®] - Life Technologies do Brasil).

7.2.5 Análise estatística

Numa primeira abordagem optou-se por estudar o comportamento da frequência respiratória (FR) e da temperatura retal (TR) dos animais das diferentes raças, para as situações sombra (medições após duas horas na sombra) e sol (após uma hora de sol e uma de sombra).

Foi também analisada a expressão gênica relativa, calculada através do método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001), considerando os dados do primeiro dia de observações no tratamento sombra como tratamento controle.

Para ambas as abordagens foi adotado um modelo linear misto (GALECKI & BURZYKOWSKI, 2013) onde o tratamento (sombra e sol) e raça foram considerados como efeitos fixos e o animal como efeito aleatório.

O modelo utilizado é apresentado abaixo:

Modelo: $Y_{ik} = \beta_{i0} + \beta_1 X_{i1k} + \beta_2 X_{i2k} + \beta_3 X_{i3k} + \beta_4 W_{ik} + \beta_5 W_{ij1} X_{i1k} + \beta_6 W_{ij1} X_{i2k} + \beta_7 W_{ij1} X_{i3k} + \varepsilon_i$, $i = 1, \dots, m$; $j = 0, \dots, 3$; $k = 0, 1$

Em que,

Y_{ik} – resposta do animal i submetido ao tratamento k ;

X_{ijk} – variável *dummy* representando a raça j do animal i no tratamento k ; sendo a raça de referência a Brahman, tem-se Hoslstein em $j = 1$, Limousine em $j = 2$ e Mertolenga em $j = 3$;

W_{ik} – variável dicotômica que assume o valor zero para o tratamento “Sombra” do animal i da raça j e o valor 1 para o tratamento “Sol” do animal i da raça j ;

$W_{ik} X_{ijk}$ – interação entre tratamento e raça;

β – coeficientes de regressão do modelo: são iguais para todos os animais, excepto a ordenada de origem que é diferente para cada animal, assumindo-se que estes coeficientes que definem a ordenada da origem têm distribuição normal;

ε_i – erro experimental associado (com distribuição normal de média nula e variância σ^2).

7.3 Resultados e Discussão

7.3.1 Parâmetros fisiológicos

Na análise da frequência respiratória para cada um dos tratamentos e para cada uma das raças, podemos admitir os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias depois de fazer a transformação logarítmica. A distribuição não é normal, mas os coeficientes de assimetria e de achatamento permitem concluir que não se afasta muito da normalidade e consequentemente supomos que os resultados são pouco afetados.

Não foi observada interação significativa *tratamento x raça* ($P \geq 0,05$) e não se verificaram diferenças significativas entre os tratamentos ($P \geq 0,05$), mas observaram-se diferenças significativas entre as raças ($P \leq 0,01$).

Os valores de frequência respiratória observados em todas as raças evidenciaram esforços termorregulatórios moderados. As frequências respiratórias médias observadas apresentaram valores que revelam que os animais estavam longe dos valores observados

quando os níveis de estresse são elevados, acima de 60 movimentos por minuto (HAHN et al., 1997).

Foi observada uma variação intra-raça algo acentuada. Esta dispersão permite supor que o esforço termorregulador dos animais de uma mesma raça possa ter sido diferente (figura 19). Esta dispersão foi particularmente acentuada na raça Holstein Frísia.

Figura 19. Box plot da frequência respiratória para cada raça na sombra e no sol

Verificou-se uma tendência para valores mais baixos nos animais da raça Brahman relativamente às outras raças (figuras 19 e 20). Além da raça Brahman apresentar valores de frequência respiratória mais baixos, é também aquela que apresenta uma menor dispersão de valores. No caso da raça Holstein, o seu comportamento é o oposto, apresentando os valores mais elevados e também uma maior dispersão. Este resultado está de acordo com Pereira et al. (2008) que afirmam que animais da raça Holstein Frísia tendem a apresentar elevada polipneia, atingindo mais de 105 movimentos por minuto.

É de salientar que a frequência respiratória dos Brahman apresentava valores tendencialmente inferiores às demais raças, tanto os valores ao sol como à sombra ($P \leq 0,01$). Ao contrário do que é frequente, os valores de frequência respiratória obtidos após uma hora ao sol não diferiram estatisticamente e apresentaram valores médios muito

semelhantes aos observados antes da permanência ao sol. Esta situação parece refletir que o ambiente térmico não foi suficientemente desafiador para desencadear respostas termorreguladoras mais acentuadas.

Figura 20. Valores médios e desvios padrão da frequência respiratória de cada raça na sombra e no sol

Relativamente à análise dos dados referentes à temperatura retal dos animais, podemos admitir os pressupostos da normalidade e homogeneidade de variâncias. Não ocorreu interação significativa entre o tratamento e a raça ($P \geq 0,05$), assim como não se revelaram diferenças significativas entre os tratamentos ($P \geq 0,05$). Porém, verificaram-se diferenças significativas ($P \leq 0,05$) nas raças.

A dispersão individual dentro de cada raça, apesar de elevada é inferior à observada na frequência respiratória. Em relação à dispersão de dados, podemos afirmar que o comportamento das quatro raças foi praticamente idêntico, sendo a raça Holstein a que apresentou uma maior dispersão.

A raça Brahman exibiu valores médios superiores às restantes raças. Estas diferenças foram particularmente notórias nos valores registrados ao sol, onde se verificaram diferenças significativas ($P \leq 0,05$).

Os valores superiores nas temperaturas retais na raça Brahman, são algo surpreendente. Atendendo ao tipo de animal, adaptado às regiões tropicais, seria esperado

que os valores de temperatura retal não fossem superiores ao das restantes raças. Esta situação é ainda mais relevante quando estas diferenças forem obtidas após o sol, onde se deveria ter verificado uma perda de calor mais rápida nesta raça.

Em sentido contrário devem registrar-se os valores observados nas raças Holstein e Limousine. Estas raças apresentam com frequência níveis de armazenamento de calor que decorrem de alguma incapacidade de perder calor a uma velocidade adequada. Isso traduz-se em incrementos relevantes na frequência respiratória que não impedem todavia aumentos variáveis na temperatura retal (Pereira et al., 2008). A inexistência de aumentos de temperatura retal ao sol relativamente à sombra sugere que os índices de estresse térmico impostos pelo ambiente foram moderados.

Figura 21. Box plot da temperatura retal para cada raça na sombra e no sol

A frequência respiratória e a temperatura retal são consideradas como bons indicadores de estresse térmico (BROWN-BRANDL et al., 2003). A transferência de calor que ocorre durante a respiração é um processo eficiente de troca de calor entre o animal e o ambiente (McMANUS et al., 2009), permitindo assim ao animal a manutenção da sua temperatura corporal. No entanto, nos grandes mamíferos a frequência respiratória é um mecanismo termolítico menos eficiente, devido essencialmente à relação entre a perda de

calor possível de ocorrer nas vias respiratórias e a massa corporal dos animais. Nestes casos, a frequência respiratória serve como mecanismo antecipado de hipertermia (HAHN et al., 1997) e como coadjuvante de suduação quando ocorrem armanezamentos de calor relevantes. Por sua vez, temperatura retal é um parâmetro fisiológico que nos permite aferir sobre a eficiência termorreguladora do animal, uma vez que uma temperatura constante reflete a capacidade do animal em manter o balanço entre produção de calor e troca de calor com o ambiente (BROWN-BRANDL et al., 2003).

Se analisarmos o caso da raça Brahman podemos verificar que apesar de apresentar valores mais elevados quando comparada com as outras raças, foi a que apresentou os valores mais baixos de frequência respiratória, o que poderá significar que os animais não tiveram necessidade de aumentar a troca de calor pela via pulmonar para manter a temperatura corporal. Esta situação sugere que a Brahman terá recorrido a níveis de suduação superiores, que possibilitaram a manutenção de moderados níveis de armanezamento de calor e de frequência respiratória.

Por outro lado, os animais da raça Holstein apresentaram os valores mais baixos de temperatura retal (figura 22), mas a frequência respiratória mais elevada, sugere uma situação contrária aos dos Brahman, em que tiveram necessidade de realizar polipneia para manutenção da termoneutralidade, tal poderá ter sido devido provavelmente a valores inferiores de suduação, assim como é referido por Pereira et al. (2008).

Figura 22. Valores médios e desvios padrão da temperatura retal de cada raça na sombra e no sol

A raça Mertolenga foi a que apresentou valores mais elevados para ambos os parâmetros fisiológicos. Neste caso devem-se referir aos níveis de temperatura retal antes da permanência ao sol, onde os valores médios de 39 °C foram anormalmente elevados. Esta situação é algo surpreendente e parece estar em desacordo com os resultados de Pereira et al. (2008) onde esta raça exibiu uma elevada capacidade na manutenção da homeotermia, aumentando a frequência respiratória em situações de estresse térmico, mas mantendo constante a temperatura retal. Na verdade esta contradição poderá ser apenas aparente, uma vez que esta raça apresenta valores de temperatura retal após o sol inferiores, o que demonstra uma elevada capacidade de perder calor.

A raça Mertolenga está adaptada a regimes sazonais onde ocorrem verões quentes e secos, e a estabilidade da temperatura corporal está de acordo com os valores obtidos por Pereira et al. (2008). As características da pelagem possibilitam uma menor aquisição de calor (Pereira et al., 2012) enquanto que a termólise evaporativa é bastante superior às encontradas em muitas raças *Bos taurus* (Pereira et al., 2011).

No entanto, este resultado poderá ser justificado pelos valores de temperatura de globo negro (TGN) obtidos em Portugal terem sido significativamente mais elevados que os restantes observados durante a fase experimental (figura 23).

Figura 23. Valores médios e desvios padrão da temperatura de globo negro para o período experimental de cada raça, na sombra e no sol

Visto que o experimento decorreu em diferentes momentos, não tendo sido os animais sujeitos às mesmas condições ambientais, é lícito supor que o nível de estresse ao

qual os animais estiveram sujeitos não terá sido igual em todas as situações. Pela figura 23 verificamos que as TGN médias foram mais elevadas nos períodos experimentais relativos à raça Holstein e à raça Mertolenga. Tendo em conta que a raça Holstein apresenta valores de frequência respiratória tendencialmente superiores e de temperatura retal inferiores ao da raça Mertolenga, podemos afirmar que a raça Mertolenga parece ter uma maior participação de sudação, que pode ter influenciado a dinâmica de perda de calor.

Pelos dados apresentados podemos supor que provavelmente a raça Limousine foi a que esteve sujeita a um nível de estresse menos severo. As ligeiras alterações tanto na frequência respiratória como na temperatura retal, sugerem que a fraca intensidade do estresse térmico não foi suficiente para impor níveis de desconforto suficientes que determinassem armazenamentos de calor relevantes ou respostas termolíticas mais expressivas.

7.3.2 Parâmetros celulares

Na análise dos valores de ΔC_t dos genes HSPA1A e HSP90AA1 para ambos os genes endógenos (ACTB e PPIA), é notória a dispersão nas respostas da raça Mertolenga em ambos os tratamentos (figuras 24 e 25). Esta dispersão mantém-se para ambos os endógenos e para ambas as HSPs. Este fato pode ser resultado da variabilidade individual dentro da raça. A raça Limousine apresentou um comportamento de dispersão idêntico ao da raça Mertolenga, mas em menor escala.

Aparentemente, existe uma diminuição da abundância de transcritos de HSPA1A e principalmente HSP90AA1 quando corrigidos com ambos os genes endógenos, nos animais da raça Brahman e raça Holstein.

Figura 24. *Box plots* dos ΔC_t para o gene HSPA1A para a sombra e o sol: à esquerda com ACTB como gene endógeno; à direita com PPIA como gene endógeno

Tal como se antevia em função das variações de temperatura retal observadas, as diferenças observadas nos ΔC_t não foram muito expressivas. Atendendo ao fato de que as respostas genéticas estarão associadas a níveis de armanezamentos de calor elevados e à duração da hipertermia transitória, então não seria expectável que os valores dos ΔC_t exibissem grandes expressões, tão pouco diferenças muito acentuadas entre as raças.

Figura 25. *Box plots* dos ΔC_t para o gene HSP90AA1 para a sombra e o sol: à esquerda com ACTB como gene endógeno; à direita com PPIA como gene endógeno

Relativamente aos valores encontrados para a expressão gênica relativa de HSPA1A e HSP90AA1 quer considerando o endógeno ACTB quer o PPIA, com base numa transformação logarítmica é possível admitir o pressuposto da normalidade e a homogeneidade de variâncias. A covariável temperatura não se revelou significativa, nem nenhuma interação com fatores tratamento e raça, pelo que foi excluída do modelo.

Quando considerado o ACTB como gene endógeno, foi encontrada significância na interação *tratamento x raça*. O mesmo já não aconteceu para o gene PPIA, mas foi mantida no modelo, de modo a permanecer idêntico ao obtido para o ACTB.

Figura 26. Box plots da expressão gênica relativa do HSPA1A para a sombra e o sol: à esquerda com ACTB como gene endógeno; à direita com PPIA como gene endógeno

Através das figuras 26 e 27 é possível observar que o comportamento dos endógenos foi idêntico para ambos os genes em estudo, HSPA1A e HSP90AA1.

Figura 27. *Box plots* da expressão gênica relativa do HSP90AA1 para a sombra e o sol: à esquerda com ACTB como gene endógeno; à direita com PPIA como gene endógeno

Apenas na raça Mertolenga ambos os endógenos apresentam coerência nos valores obtidos. Nas raças Brahman e Holstein as variações nas expressões gênicas relativas vão no sentido contrário. Enquanto que com o ACTB a expressão ao sol é inferior à observada à sombra, quando o gene endógeno é o PPIA a expressão ao sol é superior.

Um problema na comparação de expressão de HSPs entre espécies reside na interpretação dos padrões observados que são frequentemente confundidos com questões filogenéticas e estatísticas (FEDER & HOFMANN, 1999).

As diferenças que se verificaram entre as raças devem-se principalmente aos baixos valores de expressão gênica da raça Mertolenga à sombra, sendo inferior às restantes expressões gênicas das outras raças e também inferior à expressão gênica que ela própria expressou ao sol.

Figura 28. Valores médios e desvios padrão da expressão gênica relativa para cada raça para a sombra e o sol

Nas restantes raças não se registraram diferenças significativas entre o sol e a sombra. Esta resposta celular está de acordo com as respostas fisiológicas que se verificam quando ocorre apenas um estresse térmico moderado e transitório. As diferenças na expressão de HSP70 poderão ser o reflexo das diferenças de termorregulação entre espécies (AGNEW & COLDITZ, 2008).

Estas diferenças entre raças estão de acordo com Feder & Hofmann (1999), segundo os quais a expressão de HSPs exibe variação genética entre indivíduos da mesma espécie, estando normalmente esta variação relacionada com a resistência ao estresse. Já foi demonstrado o efeito da raça sobre a resposta celular ao estresse térmico (KAMWANJA et al., 1994; LACETERA et al., 2006; PAULA-LOPES et al., 2003). Por outro lado, de acordo com Bambou et al. (2011) a sobrevivência de linfócitos sujeitos a estresse térmico, está dependente do tempo e intensidade desse estresse, mas é independente da raça.

A expressão gênica relativa basal nos Mertolengos (sendo que foi considerada como basal a situação de sombra) como se pode verificar pelas figuras 26 e 27, é uma situação que deve ser tida em consideração. Atendendo ao fato da temperatura retal antes do sol

apresentar valores anormalmente elevados (39 °C), esta menor expressão gênica parece querer indicar que as respostas celulares ao estresse térmico nesta raça parecem iniciar-se mais tarde. Todavia, perante uma diminuição da temperatura retal após o sol, seria expectável que a expressão gênica pudesse permanecer inalterável, o que não aconteceu. Esta situação terá sido o corolário de um período de hipertermia transitória após a permanência ao sol, que terá desencadeado uma resposta termolítica que culminou com a dissipação completa do calor armazenado, mas em que os resultados celulares permitem evidenciar uma relevante expressão gênica.

Animais mais adaptados ao estresse térmico são aqueles que expressam mais HSPs, uma vez que a concentração destas proteínas é função do estresse térmico (BARAJA-VÁSQUEZ et al., 2005).

7.4 Conclusão

Animais com diferentes capacidades termolíticas também apresentam diferentes expressões gênicas relativas de HSPA1A e HSP90AA1.

Existe uma variabilidade individual na expressão gênica relativa de proteínas de choque térmico.

O nível de estresse térmico ao qual o animal é sujeito tem consequências diretas nas suas respostas fisiológicas e celulares.

8. Discussão geral e Perspectivas futuras

Este estudo teve como um dos principais propósitos conhecer as variações na expressão gênica relativa de proteínas de choque térmico perante situações diferentes, nomeadamente *in vitro* e *in vivo*, e em animais de diferentes raças.

As razões subjacentes ao estudo devem-se ao fato das expressões gênicas perante acréscimos de temperatura poderem ser diferentes consoante estes sejam aplicados diretamente nos linfócitos ou por oposição, aplicados no animal interagindo com as características adaptativas inerentes a cada indivíduo de cada raça.

Ficou claro que a utilização da HSPA1A e da HSP90AA1 não é indiferente. A capacidade de avaliar respostas a diferentes temperaturas *in vitro* e *in vivo* e a combinação com diferentes endógenos que estas duas HSPs apresentam são suficientemente diferentes. Tal fato requer estudos adicionais delineados de forma a que a variação de temperatura deverá ser mais precisa, bem como o tempo de exposição ao fator estressante. Lindquist (1986) refere que a gama de temperaturas para uma resposta transitória pode ser muito estreita, em alguns organismos, mas muito ampla em outros. De acordo com o mesmo autor a indução de HSPs ocorre alguns minutos após a exposição ao calor, mas as temperaturas máximas de indução variam entre organismos, estando relacionadas com a gama normal de exposição ambiental. Tal fato é observado nos mais variados organismos, tais como anfípodos (BEDULINA et al., 2013), bichos-da-seda (LI et al., 2012)... Todavia, nos mamíferos superiores, com diferentes graus de adaptabilidade, verifica-se uma falta de conhecimento, e consequentemente uma grande variabilidade de resultados.

A variabilidade individual dentro das raças é claramente ampliada nas respostas celulares, tanto na HSPA1A como na HSP90AA1. Essa variabilidade individual e a capacidade potencial de a registrar nas respostas da HSPA1A e da HSP90AA1, poderá contribuir para o desenvolvimento de uma via potencialmente útil para o melhoramento genético para a tolerância ao calor.

Parece existir diferença na capacidade discriminatória entre os endógenos escolhidos, permanecendo assim a ideia de que a utilização de endógenos requer mais estudos com maior detalhe, de modo a identificar qual o mais ajustado, quer para o tipo de

tecido quer para o tipo de tratamento. O fato de neste estudo o tratamento ter sido a temperatura, este fator específico poderá ter algum efeito sobre os genes que foram considerados como endógenos. LI et al. (2010) estudaram níveis de mRNA-HSP70 em diferentes tecidos e verificaram diferenças significativas entre alguns. Uma questão que se poderá colocar é se os linfócitos serão o material biológico mais indicado para realizar estudos desta natureza e com estes objetivos, principalmente quando estamos a falar de colheitas *in vivo*, uma vez que o sangue é um tecido com um papel bastante importante na termorregulação. Sørensen (2010) afirma que análises de HSP tendo o sangue como tecido de amostra, além de ser menos invasiva é mais fácil de colher no campo, no entanto a sua resposta pode ser diferente da obtida com outros tecidos.

No entanto, Agnew & Colditz (2008) referem que a expressão de HSP em linfócitos pode ser um indicador útil sobre a adaptação dos organismos ao estresse ambiental ou fisiológico. O aumento da concentração de HSP70 pode servir como um rápido mecanismo de proteção da homeostasia celular contra o estresse térmico (PATIR & UPADHYAY, 2007). Basiricò et al. (2011) utilizaram linfócitos de animais de diferentes genótipos a um estresse térmico de 43 °C durante uma hora, tendo observado um aumento na expressão do gene HSP70.1 em todos os genótipos.

O calor é um dos principais fatores estressantes em ambientes áridos, e em resposta a essas temperaturas elevadas, todos os organismos produzem proteínas de choque térmico das famílias HSP70 e HSP90, sobretudo os organismos mais tolerantes ao calor (BARAJA-VÁSQUEZ et al., 2005). De acordo com os mesmos autores, o fato de existir uma variação individual entre os níveis de resistência a uma gama de agentes estressores, a seleção para uma maior resistência a determinado estressor pode aumentar a resistência a outros – por exemplo, a seleção de animais que mais se adaptam ao calor, pode levar também à seleção de animais com metabolismos energético e hídrico mais favoráveis a situações de escassez. Assim a análise comparativa da expressão de proteínas de choque térmico pode explicar o mecanismo subjacente à termotolerância (LI et al., 2012).

Os resultados obtidos neste estudo permitiram concluir que estudos seguintes devem ser delineados tendo por base critérios diferentes dos seguidos neste estudo. Na verdade, os estudos *in vitro* devem servir como base para os estudos *in vivo*. Perante condições controladas, o material biológico coletado de um animal que apresente respostas diferenciadas, deve ser aquele que deverá ser avaliado *in vivo*. Esta metodologia

possibilitará não apenas estabelecer um paralelismo com os resultados *in vitro*, mas também agregar as respostas fisiológicas individuais que estão associadas à eficiência termorreguladora. A constatação de correlações entre as diferentes variáveis associadas à tolerância ao calor poderá perspectivar a sua utilização em programas de melhoramento genético.

9. Referências bibliográficas

ADAMOWICZ, T.; PERS, E.; LECHMIAK, D. A new SNP in the 3'-UTR of the hsp 70-1 gene in *Bos taurus* and *Bos indicus*. **Biochemical Genetics**, v. 43, p. 623-627, 2005.

AGNEW, L. L.; COLDITZ, I. G. Development of a method of measuring cellular stress in cattle and sheep. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 123, p. 197–204, 2008.

ÅKERFELT, M.; TROUILLET, D.; MEZGER, V.; SISTONEN, L. Heat shock factors at a crossroad between stress and development. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1113, p. 15–27, 2007.

AL-KATANANI, Y. M.; HANSEN, P. J. Induced thermotolerance in bovine two-cell embryos and the role of heat shock protein 70 in embryonic development. **Molecular Reproduction and Development**, v. 62, n. 2, p. 174–180, 2002.

APPLIED BIOSYSTEMS. PCR Quantitativo em Tempo Real - Apostila Texto. **Centro de Treinamento Applied Biosystems**, 20...

AUFRICT, C. Heat-shock protein 70: molecular supertool? **Pediatric Nephrology**, v. 20, n. 6, p. 707–713, 2005.

BACCARI JÚNIOR, F.; POLASTRE, R.; FRÉ, C. A.; ASSIS, P. S. Um novo índice de tolerância ao calor para bubalinos: correlação com o ganho de peso. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 23, 1986, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1986. p. 316.

BAMBOU, J.-C.; GOURDINE, J.-L.; GRONDIN, R.; VACHIERY, N.; RENAUDEAU, D. Effect of heat challenge on peripheral blood mononuclear cell viability: comparison of a tropical and temperate pig breed. **Tropical animal health and production**, v. 43, n. 8, p. 1535–1541, 2011.

BAÑUELOS-VALENZUELA, R.; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, S. H. La proteína de estrés calórico Hsp70 funciona como un indicador de adaptación de los bovinos a las zonas áridas. **Revista Electrónica de Veterinaria REDVET**, v. VI, n. 3, 2005.

Disponível em: <www.veterinaria.org/revistas/redvet/n030305.html>. Acesso em: 21 Out. 2009.

BARAJA-VÁSQUEZ, G. E.; BALDWIN-SEVILLA, C.; CISNEROS, B.; YADIRA, O.; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, S. H. Las proteínas de estrés calórico Hsp60, 70 y 90 participan en la adaptación de los caprinos a las zonas áridas. **Revista Electrónica de Veterinaria REDVET**, v. VI, n. 3, 2005. Disponível em: <www.veterinaria.org/revistas/redvet/n030305.html>. Acesso em: 21 Out. 2009.

BARRIER, M.; DIX, D. J.; MIRKES, P. E. Inducible 70kDa heat shock proteins protect embryos from teratogen-induced exencephaly: analysis using Hspa1a/a1b knockout mice. **Birth Defects Research**, v. 85 (Part A), p. 732-740, 2009.

BASIRICÒ, L.; MORERA, P.; PRIMI, V.; LACETERA, N.; NARDONE, A.; BERNABUCCI, U. Cellular thermotolerance is associated with heat shock protein 70.1 genetic polymorphisms in Holstein lactating cows. **Cell Stress & Chaperones**, v. 16, n. 4, p. 441-448, 2011.

BEDULINA, D. S.; EVGEN'EV, M. B.; TIMOFEYEV, M. A.; PROTOPOPOVA, M. V.; GARBUZ, D. G.; PAVLICHENKO, V. V.; LUCKENBACH, T.; SHATILINA, Z. M.; AXENOV-GRIBANOV, D. V.; GURKOV, A. N.; SOKOLOVA, I. M.; ZATSEPINA, O. G. Expression patterns and organization of the hsp70 genes correlate with thermotolerance in two congener endemic amphipod species (*Eulimnogammarus cyaneus* and *E. verrucosus*) from Lake Baikal. **Molecular ecology**, v. 22, n. 5, p. 1416-1430, 2013.

BERMAN, A. Invited review: Are adaptations present to support dairy cattle productivity in warm climates? **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 5, p. 2147-2158, 2011.

BERNABUCCI, U.; LACETERA, N.; BAUMGARD, L. H.; RHOADS, R. P.; RONCHI, B.; NARDONE, A. Metabolic and hormonal acclimation to heat stress in domesticated ruminants. **Animal**, v. 4, n. 7, p. 1167-1183, 2010.

BLIGH J.; JOHNSON, K. G. Glossary of terms for thermal physiology. **Journal of Applied Physiology**, v. 35, n. 6, p. 941-961, 1973.

BROWN-BRANDL, T. M.; NIENABER, J. A.; EIGENBERG, R. A.; HAHN, G. L.; FREETLE, H. Thermoregulatory responses of feeder cattle. **Journal of Thermal Biology**, v. 28, p. 149-157, 2003.

CHEN, B.; PIEL, W. H.; GUI, L.; BRUFORD, E.; MONTEIRO, A. The HSP90 family of genes in the human genome: insights into their divergence and evolution. **Genomics**, v. 86, p. 627-637, 2005.

CLARK, M. S.; PECK, L. S. HSP70 heat shock proteins and environmental stress in Antarctic marine organisms: a mini-review. **Marine Genomics**, v. 2, n. 1, p. 11–18, 2009.

COLLIER, R. J.; KOBAYASHI, Y.; GENTRY, P. The use of genomics in genetic selection programs for environmental stress tolerance in domestic animals. In: 15TH CONFERENCE ON BIOMETEOROLOGY/AEROBIOLOGY AND 16TH INTERNATIONAL CONGRESS OF BIOMETEOROLOGY, 2002, Kansas City, USA. **Anais...** Kansas City, 2002.

COLLIER, R. J.; STIENING, C. M.; POLLARD, B. C.; VANBAALE, M. J.; BAUMGARD, L. H.; GENTRY, P. C.; COUSSENS, P. M. Use of gene expression microarrays for evaluating environmental stress tolerance at the cellular level in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 84, E. Suppl., p. E1-E13, 2006.

COLLIER, R. J.; COLLIER, J. L.; RHOADS, R. P.; BAUMGARD, L. H. Invited review: Genes involved in the bovine heat stress response. **Journal of Animal Science**, v. 91, p. 445-454, 2008.

CRAIG, E. A.; GROSS, C. A. Is hsp70 the cellular thermometer. **Trends in Biochemical Science**, v. 16, n. 4, p. 135-140, 1991.

DANGI, S. S.; GUPTA, M.; MAURYA, D.; YADAV, V. P.; PANDA, R. P.; SINGH, G.; MOHAN, N. H.; BHURE, S. K.; DAS, B. C.; BAG, S.; MAHAPATRA, R.; SHARMA, G. T.; SARKAR, M. Expression profile of HSP genes during different seasons in goats (*Capra hircus*). **Tropical Animal Health and Production**, v. 44, n. 8, p. 1902-1912, 2012.

DE RENSIS, F.; SCARAMUZZI, R. J. Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow - a review. **Theriogenology**, v. 60, p. 1139-1151, 2003.

DIKMEN, S.; COLE, J. B.; NULL, D. J.; HANSEN, P. J. Heritability of rectal temperature and genetic correlations with production and reproduction traits in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 3401-3405, 2012.

EALY, A.D.; DROST, M.; HANSEN, P.J. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. **Journal of Dairy Science**, v.76, p. 2899-2905, 1993.

FEDER, M. E.; HOFMANN, G. E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. **Annual Review of Physiology**, v. 61, p. 243–282, 1999.

GABAI, V. L.; MERIIN, A. B.; MOSSER, D.D.; CARON, A. W.; RITS, S.; SHIFRIN, V. I.; SHERMAN, M. Y. Hsp70 prevents activation of stress kinases. A novel pathway of cellular thermotolerance. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 29, p. 18033-18037, 1997.

GALECKI, A.; BURZYKOWSKI, T. Linear Mixed-Effects Models using R, Springer texts in statistics. New York: Springer, 2013.

GAUGHAN, J. B.; MADER, T. L.; HOLT, S. M.; SULLIVAN, M. L.; HAHN, G. L. Assessing the heat tolerance of 17 beef cattle genotypes. **International Journal of Biometeorology**, v. 54, n. 6, p. 617-627, 2010.

GUERRIERO, V.; RAYNES, D. A. Synthesis of heat stress proteins in lymphocytes from livestock. **Journal of Animal Science**, v. 68, n. 9, p. 2779–2783, 1990.

HAFEZ, E.S.E. **Adaptación de los animales domésticos**. Barcelona: Labor, 1973.

HAHN, G.L.; PARKHURST, A.M.; GAUGHAN, J.B. Cattle respiration rate as a function of ambient temperature. **Transactions of American Society of Agricultural Engineering**, v.40, p. 97-121, 1997.

HANSEN, P. J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 349-360, 2004.

HANSEN, P. J. Heat Stress and Climate Change. **Comprehensive Biotechnology**. Second ed., v. 4, p.477–485, 2011. Elsevier B.V.

HANSEN, P. J.; ARÉCHIGA, C. F. Strategies for Managing Reproduction in the Heat-Stressed Dairy Cow. **Journal of Animal Science**, v. 77, Suppl 2, p. 36–50, 1999.

HAQUE, N.; LUDRI, A.; HOSSAIN, S. A; ASHUTOSH, M. Comparative studies on temperature threshold for heat shock protein 70 induction in young and adult Murrah buffaloes. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 96, n. 5, p. 920–929, 2012.

HOROWITZ, M. Heat acclimation: phenotypic plasticity and cues to the underlying molecular mechanisms. **Journal of Thermal Biology**, v. 26, n. 4-5, p. 357–363, 2001.

JORDAN, E.R. Effects of heat stress on reproduction. **Journal of Dairy Science**, v.86, Suppl. E, p. E104-E114, 2003.

JU, J. C. Cellular responses of oocytes and embryos under thermal stress: hints to molecular signaling. **Animal Reproduction**, v. 2, n. 2, p. 79-90, 2005.

KAMWANJA, L. A; CHASE, C. C.; GUTIERREZ, J. A; et al. Responses of bovine lymphocytes to heat shock as modified by breed and antioxidant status. **Journal of animal science**, v. 72, n. 2, p. 438–44, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8157528>>. .

KIANG, J. G., TSOKOS, G. C. Heat shock protein 70kDa: molecular biology, biochemistry and physiology. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 80, n. 2, p. 183-201, 1998.

KREGEL, K. C. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. **Journal of Applied Physiology**, v. 92, n. 5, p. 2177–2186, 2002.

LACETERA, N.; BERNABUCCI, U.; SCALIA, D.; BASIRICÒ, L.; MORERA, P.; NARDONE, A. Heat stress elicits different responses in peripheral blood mononuclear cells from Brown Swiss and Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 12, p. 4606–4612, 2006.

LEPOCK, J. R. How do cells respond to their thermal environment? **International Journal of Hyperthermia**, v. 21, n. 8, p. 681–687, 2005.

LI, Q.; HAN, J.; DU, F.; JU, Z.; HUANG, J.; WANG, J.; LI, R.; WANG, C.; ZHONG, J. Novel SNPs in HSP70A1A gene and the association of polymorphisms with thermo tolerance traits and tissue specific expression in Chinese Holstein cattle. **Molecular Biology Reports**, v. 38, n. 4, p. 2657-2663. 2010.

LI, J.; MOGHADDAM, S. H. H.; DU, X.; ZHONG, B.-X.; CHEN, Y.-Y. Comparative analysis on the expression of inducible HSPs in the silkworm, *Bombyx mori*. **Molecular Biology Reports**, v. 39, n. 4, p. 3915–3923, 2012.

LINDQUIST, S. The heat-shock response. **Annual Review of Biochemistry**, v. 55, p. 1151–1191, 1986.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LOCKE, M.; NOBLE, E. G.; ATKINSON, B. G. Exercising mammals synthesize stress proteins. **American Journal of Physiology**, v. 258, Suppl. C, p. C723-C729, 1990.

MADER, T. L. Environmental stress in confined beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 81, n. 14, Suppl. E, p. E110-E119, 2003.

MADER, T. L.; DAVIS, M. S.; BROWN-BRANDL, T. Environmental factors influencing heat stress in feedlot cattle. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 721-719, 2006.

MARÓTI-AGÓTS, Á.; BODÓ, I.; JÁVORKA, L.; GYURMÁN, A.; SOLYMOSI, N.; ZENKE, P., SKOGSETH, M.; ZÖLDÁG, L. Possible genetic sign of heat stress adaptation in Hungarian Grey *Bos taurus* breed. **Acta Biologica Hungarica**, v. 62, n. 1, p. 65-72, 2011.

MARTIN, P.; BATESON, P. **Measuring behavior: an introductory guide**. Cambridge: Cambridge University Press, 1986.

MCCLUNG, J. P.; HASDAY, J. D.; HE, J.; MONTAIN, S. J.; CHEUVRONT, S. N.; SAWKA, M. N.; SINGH, I. S. Exercise-heat acclimation in humans alters baseline levels and ex vivo heat inducibility of HSP72 and HSP90 in peripheral blood mononuclear cells. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 294, n. 1, p. 185–191, 2008.

MCDOWELL, R.E. **Bases biológicas de la producción animal en zonas tropicales**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1972.

MCMANUS, C.; PRESCOTT, E.; PALUDO, G. R.; BIANCHINI, E.; LOUVANDINI, H.; MARIANTE, A. S. Heat tolerance in naturalized Brazilian cattle breeds. **Livestock Science**, v. 120, p. 256-264, 2009.

MORANO, K. A. New tricks for an old dog: the evolving world of Hsp70. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1113, p. 1–14, 2007.

MORIMOTO, R. I. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. **Genes & Development**, v. 12, n. 24, p. 3788–3796, 1998.

MOSELEY, P. L. Invited review: Heat shock proteins and heat adaptation of the whole organism. **Journal of Applied Physiology**, v. 83, n. 5, p. 1413–1417, 1997.

MÜLLER, P.B. **Bioclimatologia aplicada aos animais domésticos**. Brasil: Editora Sulina, 1989.

NEUER, A.; SPANDORFER, S. D.; GIRALDO, P.; DIETERLE, S.; ROSENWAKS, Z.; WITKIN, S. S. The role of heat shock proteins in reproduction. **Human Reproduction Update**, v. 6, n. 2, p. 149–159, 2000.

NIENABER, J. A.; HAHN, G. L. Livestock production system management responses to thermal challenges. **International Journal of Biometeorology**, v. 52, n. 2, p. 149–157, 2007.

ONER, Y., CALVO, J. H.; SERRANO, M.; ELMACI, C. Polymorphisms at the 5' flanking region of the *HSP9AA1* gene in native Turkish sheep breeds. **Livestock Science**, v. 150, p. 381–385, 2012.

PARSELL, D. A.; LINDQUIST, S. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. **Annual Review of Genetics**, v. 27, p. 437–496, 1993.

PATIR, H.; UPADHYAY, R. C. Interrelationship between heat shock protein 70 (HSP70) and lymphocyte proliferation in thermal exposed buffalo heifers. **Italian Journal of Animal Science**, v. 6, Suppl. 2, p. 1344–1346, 2007.

PATIR, H.; UPADHYAY, R. C. Purification, characterization and expression kinetics of heat shock protein 70 from *Bubalus bubalis*. **Research in Veterinary Science**, v. 88, p. 258–262, 2010.

PAULA-LOPES, F. F.; CHASE, C. C.; AL-KATANANI, Y. M.; Krininger III, C. E.; RIVERA, R. M.; TEKIN, S.; MAJEWSKI, A. C.; OCON, O. M.; OLSON, T. A.; HANSEN, P. J. Genetic divergence in cellular resistance to heat shock in cattle: differences between breeds developed in temperate versus hot climates in responses of preimplantation embryos, reproductive tract tissues and lymphocytes to increased culture temperatures. **Reproduction**, v. 125, n. 2, p. 285–294, 2003.

PEREIRA, A. M. F.; BACCARI Jr., F.; TITTO, E. A. L.; ALMEIDA, J. A. A. Effect of thermal stress on physiological parameters, feed intake and plasma thyroid hormones concentration in Alentejana, Mertolenga, Frisian and Limousine cattle breeds. **International Journal of Biometeorology**, v. 52, p. 199-208, 2008.

PEREIRA, A. M. F.; TITTO, E. A. L.; BACCARI Jr., F.; ALMEIDA, J. A. A. Variação da intensidade da termólise latente em bovinos *Bos taurus* face a aumentos na temperatura ambiente. In: V Congresso Brasileiro de Biometeorologia, 2011, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Sociedade Brasileira de Biometeorologia, 2011.

PEREIRA, A. M. F.; TITTO, E. A. L.; BACCARI Jr., F.; ALMEIDA, J. A. A. Assessing the heat tolerance of Alentejana and Mertolenga portuguese cattle breeds under influence of solar radiation. In: XXVII World Buiatrics Congress, 2012, Lisboa. **Anais...** Lisboa: World Association for Buiatrics, 2012.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2013. URL <http://www.R-project.org/>.

RITOSA, F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. **Experientia**, v. 18, p. 571-573, 1962.

RIVIERA, R.M.; HANSEN, P.J. Development of cultured bovine embryos alter exposure to high temperatures in the physiological range. **Journals of Reproduction and Fertility**, v. 121, p. 107-115, 2001.

ROSENKRANS JR., C.; BANKS, A.; REITER, S.; LOOPER, M. Calving traits of crossbreed Brahman cows are associated with heat shock protein 70 genetic polymorphisms. **Animal Reproduction Science**, v. 119, p. 178-182, 2010.

SHARMA, G. T.; NATH, A., PRASAD, S., SINGHAL, S., SINGH, N.; GADE, N. E.; DUBEY, P. K., SAIKUMAR, G. Expression and characterization of constitutive heat shock protein 70.1 (*HSPA1A*) gene *in vitro* produced and *in vivo*-derived buffalo (*bubalus bubalis*). **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 6, p. 975-983, 2012.

SILVA, V. C. H.; RAMOS, C. H. I. The network interaction oh the human cytosolic 90 kDa heat shock protein Hsp90: a target for cancer therapeutics. **Journal of Proteomics**, v. 75, p. 2790-2802, 2011.

SONNA, L. A.; FUJITA, J.; GAFFIN, S. L.; LILLY, C. M. Invited review: Effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. **Journal of Applied Physiology**, v. 92, n. 4, p. 1725–1742, 2002.

SØRENSEN, J. G.; KRISTENSEN, T. N.; LOESCHCKE, V. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. **Ecology Letters**, v. 6, p. 1025-1037, 2003.

SØRENSEN, J. G. Application of heat shock protein expression for detecting natural adaptation and exposure to stress in natural populations. **Current Zoology**, v. 56, p. 703-713, 2010.

SOUZA, B. B., et al. Parâmetros fisiológicos e índice de tolerância ao calor de bovinos da raça sindi no semi-árido paraibano. **Ciências e Agrotecnologia**, v. 31, n. 3, p. 883-888, 2007.

STOTT, G.H.; WILLIAMS, R.J. Causes of low breeding efficiency in dairy cattle associated with seasonal high temperatures. **Journal of Dairy Science**, v. 45, p. 1369-1375, 1962.

TITTO, C. G.; TITTO, E. A. L.; VIEIRA, R. V.; GLASER, F. D.; TITTO, R. M.; ABLAS, D. S.; PEREIRA, A. M. F.; LEME, T. M. C.; GATTO, E. G. Tolerância ao calor em bovinos de corte de raças européias utilizadas em cruzamento industrial no Brasil. In: IV Congresso Brasileiro de Biometeorologia, 2006, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Biometeorologia, 2006.

TITTO, C. G.; TITTO, E. A. L.; TITTO, R. M.; MOURÃO, G. B. Heat tolerance and the effects of shade on the behavior of Simmental bulls on pasture. **Animal Science Journal**, v. 82, p. 591-600, 2011.

TITTO, E. A. L.; PEREIRA, A. M. F.; PASSINI, R.; BALIEIRO NETO, G.; FAGUNDES, A. C. A.; LIMA, C. G. Estudo da tolerância ao calor em tourinhos das raças Marchigiana, Nelore e Simental. In: IX CONGRESSO DE ZOOTECNIA, 1999, Porto-Portugal. **Anais...** Porto: APEZ: Porto-Portugal, 1999.

TEIXEIRA, G. R.; MARTINS, O. A.; FIORUCI, B. A.; DE MELLO JÚNIOR, W.; PINHEIRO, P. F. F.; KREMER, R.; MARTINEZ, F. E. Respostas biológicas ao estresse. **Revista Electrónica de Veterinária PUBVET**, v. 3, n. 31, ed. 42, art. 51, 2008.
<www.pubvet.com.br/artigos_det.asp?artigo=51>. Acesso em: 28 Set. 2011.

TOMANEK, L.; SANFORD, E. Heat-shock protein 70 (Hsp70) as a biochemical stress indicator: an experimental field test in two congeneric intertidal gastropods (genus: *Tegula*). **The Biological Bulletin**, v. 205, n. 3, p. 276–284, 2003.

VASCONCELOS, J. L. M. Manejo de vacas leiteiras para melhoria do desempenho reprodutivo durante períodos de estresse calórico - parte 2. 2001. Disponível em:
<<http://www.milkpoint.com.br/?actA=9&erroN=1&areaID=73&referenciaURL=noticiaID=16563|actA=7|areaID=61|secaoID=182>>. Acesso em: 18 Dez. 2009.

VON BORELL, E. H. The biology of stress and its application to livestock housing and transportation assessment. **Journal of Animal Science**, v. 79, Suppl. E, p. E260-E267, 2001.

WANG, S.; DILLER, K. R.; AGGARWAL, S. J. Kinetics Study of Endogenous Heat Shock Protein 70 Expression. **Journal of Biomechanical Engineering**, v. 125, n. 6, p. 794-797, 2003.

WELCH, W. J. Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. **Physiological Reviews**, v. 72, n. 4, p. 1063–81, 1992.

WELCH, W. J. How cells respond to stress. **Scientific American**, v. 268, p. 34-41, 1993.

WILSON, S. J.; MARION, R. S.; SPAIN, J. N; SPIERS, D. E; KEISLER, D. H; LUCY, M. C. Effects of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle – 1. Lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 8, p. 2124-2131, 1998.

YAHARA, I. The role of HSP90 in evolution. **Genes to Cells**, v. 4, n. 7, p. 375–379, 1999.

YÁNIZ, J. L.; LÓPEZ-GATIUS, F.; ALMERÍA, S.; CARRETERO, T.; GARCÍA-ISPIERTO, I.; SERRANO, B.; SMITH, R. F.; DOBSON, H.; SANTOLARIA, P. Dynamics of heat shock protein 70 concentrations in peripheral blood lymphocyte lysates during pregnancy in lactating Holstein-Friesian cows. **Theriogenology**, v. 72, n. 8, p. 1041–1046, 2009.

YONEHARA, M.; MINAMI, Y.; KAWATA, Y.; NAGAI, J.; YAHARA, I. Heat induced chaperone activity of HSP90. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 5., p. 2641-2645, 1996.

YOUSEF, M.K.; HAHN, L.; JOHNSON, H.D. Adaptación del ganado vacuno. In: HAFEZ, E. S. E. **Adaptación de los animales domésticos**. Barcelona: Labor, 1973; p. 317-333.

ZULKIFLI, I.; NORBAIYAH, B.; CHEAH, Y. W.; SOLEIMANI, A. F.; SAZILI, A. Q.; GOH, Y. M.; RAJION, M. A. A note on heat shock protein 70 expression in goats subjected to road transportation under hot, humid tropical conditions. **Animal**, v. 4, n. 6, p. 973–6, 2010.