



ESTUDO DE CARACTERÍSTICAS LIGADAS AO ESTRESSE TÉRMICO EM TOUROS JOVENS DA RAÇA GIR LEITEIRO

Claudeci Quirino de Souza¹, Aníbal Eugênio Vercesi Filho², Luciandra Macedo de Toledo³, João Alberto Negrão⁴, André Rabelo Fernandes⁵

Nº 18712

RESUMO– As HSP_s (Heat Shock Proteins) são uma família de proteínas com diferentes pesos moleculares que desempenham papel fundamental na proteção celular contra agentes estressantes, entre eles o estresse térmico. Este projeto objetivou verificar a existência de variação individual para a expressão das HSP₇₀ e HSP₉₀ antes e após a exposição à condições de estresse térmico em touros jovens da raça Gir Leiteiro. Três grupos de touros foram avaliados em épocas diferentes nos anos de 2016-2017. Os animais foram levados ao curral de manejo em dois períodos: logo pela manhã (sem estresse - período1) e depois submetidos ao sol durante o período de duas horas (de 11:00 às 13:00 hs – período 2). Após a identificação dos animais, foram coletadas amostras de sangue periférico por período (antes e após a exposição ao sol) para análise da expressão das HSP_s. Para as análises da expressão das HSP_s o material genético foi extraído de leucócitos. Verificou-se elevada variação individual para a expressão das proteínas estudadas, o que permitirá estudos para investigação de possíveis polimorfismos para os alelos que codificam essas proteínas na raça Gir Leiteiro. Nos três grupos de touros, a expressão da HSP₇₀ e HSP₉₀ foi significativamente superior ($p < 0,05$) no período 2 o que comprova resposta dos animais ao efeito do estresse térmico.

Palavras-chaves: HSP₇₀, HSP₉₀, Zebu Leiteiro

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação Medicina Veterinária, UNIFAJ, Jaguariúna-SP; claudecimedvet@gmail.com
2.Orientador: Pesquisador do Centro de Bovinos de Leite do Instituto de Zootecnia Nova Odessa-SP; anibal@iz.sp.gov.br
3 Colaborador: Pesquisador do Centro de Bovinos de Leite do Instituto de Zootecnia Nova Odessa-SP;
4 Colaborador: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA-USP) – Pirassununga – SP
5- Colaborador: Associação Brasileira de Criadores de Gir Leiteiro



ABSTRACT – *The HSPs (Heat Shock Proteins) are a family of proteins with different molecular weights that play a key role in cell protection against stressors, including thermal stress. This project aimed to verify the existence of individual variation for the expression of HSP₇₀ and HSP₉₀ before and after exposure to thermal stress conditions in young bulls of the Dairy Gyr breed. Three groups of bulls were evaluated at different times in the years 2016-2017. The animals were taken to the cattle shed in two periods: early in the morning (without stress – period 1 and after submitted to the sun during two hours (from 11:00 to 13:00hs – period 2). Following identification, blood samples for HSP_s expression analyzes were collected, by period (before and after exposure to the sun). For analysis of the expression of HSPs, the genetic material was extracted from leukocyte. There was a high individual variation for the expression of the proteins studied, which will allow studies to investigate possible polymorphisms for the alleles that encode these proteins in the Dairy Gyr breed. In the three groups of bulls, the expression of HSP₇₀ and HSP₉₀ was significantly higher ($p < 0.05$) in period 2, which confirms the animals' response to the effect of thermal stress.*

Keywords: HSP₇₀, HSP₉₀, Dairy Zebu

1. INTRODUÇÃO

O Estresse Térmico é definido como sendo o resultado da inabilidade do animal em dissipar calor suficiente para manter a sua homeotermia. (WEST, 1999). O estresse calórico é causado por uma combinação de fatores ambientais, como a temperatura e umidade relativa do ar, radiação solar, velocidade do ar e precipitação são os principais (BOHMANOVA et al., 2007). Assim, o estresse é definido como um conjunto de alterações fisiológicas que ocorrem no animal quando o animal é submetido a desafios agudos ou crônicos, e resultam em redução da expressão do potencial produtivo e reprodutivo. Em animais domésticos, temperaturas extremas são causa frequente de estresse e causam aumento de temperatura corporal, das frequências cardíaca e respiratória (DONEY et al., 1973, FERREIRA et al., 2006 e DALTRO, 2014).

Alguns mecanismos celulares são ativados durante o processo de stress térmico. A tolerância celular ao stress térmico é mediada por um grupo de proteínas denominado Heat Stress Proteins (HSP). Dentre as HSPs, a mais abundante e sensível à temperatura são as HSP₇₀



(HSP_{70.1} e HSP_{70.2}). Essas proteínas atuam na proteção celular contra a temperatura, prevenindo a desnaturação protéica e bloqueando a apoptose (BASIRICÒ et al., 2011).

Inicialmente as HSPs foram identificadas como proteínas induzidas pelo estresse térmico (RITOSSA, 1962), contudo, fazem parte da grande família das proteínas conhecidas como chaperonas moleculares, assim chamadas por possuir a capacidade de interagir de forma reversível com outras proteínas, auxiliando na formação, dobramento e transporte trans-membrana (KARP, 2005).

Em 1962, descobriu-se que a exposição de células de glândulas salivares de *Drosophila busckii* ao calor, dinitrofenol ou salicilatos produzia a síntese de proteínas (RITOSSA, 1962). O estresse térmico ou químico induzia a expressão de genes que sintetizavam uma determinada classe de proteínas que foram chamadas de *Heat Shock Proteins* (HSP), ou proteínas do choque térmico. Esta resposta é caracterizada por um aumento extremamente rápido na expressão das HSPs, o que não ocorre apenas após exposição ao calor, mas também quando as células são expostas a diversos outros desafios metabólicos (WELCH, 1992).

Após experiências com outras fontes de estresse, verificou-se que a exposição de células de mamíferos a temperaturas elevadas estimula várias cascatas de sinalização que condicionam o destino final da célula. Se as cascatas de sobrevivência prevalecerem, as células vão desenvolver um estado de resistência ao estresse a que foram submetidas; caso contrário, serão as cascatas de morte celular a prevalecer determinando a sua morte (GABAI e SHERMAN, 2002). A primeira cascata de sinalização de sobrevivência referida é a de indução das proteínas de choque térmico. Em todos os organismos estudados até ao momento, desde bactérias até ao homem, em resposta a um aumento de temperatura observa-se a síntese em grande escala de HSP, à custa da paragem da síntese de outras proteínas (NEUER et al., 2000).

As HSPs também fornecem subsídio às células para identificar e facilitar o redobramento de proteínas danificadas ou destiná-las a um sistema proteolítico adequado, facilitando a eliminação de proteínas cujos danos não são passíveis de restauração (MEYER e BUKAU, 2005).

As HSPs têm duas grandes funções: a primeira consiste na sua função em condições fisiológicas ou normais, em que as HSPs têm um papel de chaperonas, estando envolvidas na mediação da estrutura nativa e transporte de outras proteínas intracelulares, facilitando a definição da estrutura terciária e/ou quaternária destas moléculas, além de cumprirem um papel na manutenção de proteínas em estado inativo e prevenção da sua degradação protéica. A segunda função está associada à sua indução e ação como resposta a estímulos de stress celular, tal como resposta a temperaturas elevadas, à formação de radicais livres, a infecções virais ou bacterianas, à acumulação de metais pesados ou etanol e à isquemia, de entre outros (NEUER et al., 2000).



O aumento de HSPs nas células lesadas, além de auxiliar no reparo de proteínas, apresenta um importante papel na manutenção da viabilidade uma vez que inibe a apoptose. Já foi demonstrado que as HSP₇₀ interagem diretamente com elementos da via apoptótica, seja ela intrínseca ou extrínseca, inibindo a cascata de eventos que culminam com a morte celular (MOSSER et al., 1997).

Estudos recentes têm demonstrado que alelos das HSPs estão ligados à maior termo tolerância o que conseqüentemente leva à maior produção (BASIRICÓ et al., 2011; CHAROENSOOK et al., 2012 e Bhat et al., 2016), o que poderia justificar a sua inclusão em programas de melhoramento genético que objetivam incrementar a termo-tolerância.

Dentre as raças bovinas, as zebuínas, por terem evoluído em ambiente tropical, apresentam melhor resposta ao estresse térmico do que raças taurinas (BEATTY et al., 2006; HANSEN, 2004).

A raça Gir Leiteiro apresenta o mais antigo Programa de seleção de uma raça zebuína para leite no mundo, tendo iniciado a seleção de reprodutores através do teste de progênie no Brasil em 1985. Constitui-se na raça que mais produz e exporta sêmen para fins de leite no Brasil sendo a maior parte desse sêmen exportado para países localizados nas regiões tropicais do planeta (ASBIA, 2014). É também a base genética zebuína mais utilizada nos esquemas de cruzamento com raças taurinas para a produção de matrizes mestiças, que são responsáveis pela maior parte do leite produzido no país (MADALENA et al., 2001).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Animais e Área experimental

Foram utilizados 106 tourinhos jovens da raça Gir Leiteiro, candidatos ao Teste de Progênie conduzido pela ABCGIL/EMBRAPA representativos das linhagens existentes da raça Gir Leiteiro no Brasil nos anos de 2016 e 2017. Os animais foram lotados na fazenda-escola das Faculdades Associadas de Uberaba (FAZU), no município de Uberaba-MG. As normais climatológicas históricas obtidas na Estação Experimental Getulio Vargas indicam precipitação de 1.445,4 mm e temperatura média anual de 21,9 °C (INEMET-EPAMIG, 2008). O solo da área é mantido com média de 80% de saturação por bases e recebe adubações para alojar 7UA/ha na primavera-verão e 2 UA/ha no outono-inverno (AGUIAR et al., 2005). A área do pastejo era formada com o capim *Panicum sp.* e manejado em sistema intensivo de pastejo com lotação rotacionada. Na área de lazer encontram-se bebedouro, cocho coberto para suplementação mineral, cocho para suplementação com concentrados e área de sombreamento artificial (3m²/cabeça). Todos os animais receberam o mesmo manejo alimentar com oferta de 4% MS (matéria seca)/100kg PV (peso vivo) durante o



período experimental. A oferta de suplemento mineral foi à vontade no cocho saleiro, enquanto a suplementação concentrada teve um consumo controlado para garantir o escore corporal adequado à prova.

2.2 – Coleta de dados e material biológico

Os tourinhos experimentais foram conduzidos ao curral de manejo logo pela manhã e permaneceram à sombra em curral coberto (período 1 - manhã); b) ao sol em piquete anexo sem disponibilidade de sombra, água e alimentação (entre 11:00 am e 13:00 pm – período2 - tarde). Todas as colheitas experimentais foram realizadas em curral com tronco coberto após cada período experimental.

Ao término de cada período duas amostras de sangue de cada tourinho experimental foram colhidas da veia caudal: a) uma à sombra; e, b) imediatamente após 2 horas de exposição ao sol; e armazenados em tubos heparinizados e em tubos com EDTA sendo mantidos em gelo. Logo após a colheita do sangue, os tubos foram centrifugados para obtenção do plasma e separação dos leucócitos. O plasma foi acondicionado em tubos e estocado a -20 °C para posterior análise de cortisol plasmático e logo após sua separação, os leucócitos foram extraídos com o reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) para obtenção do RNA total, sendo então, estocados a -80 °C até ser realizada a reação de transcrição reversa e PCR (RT-PCR).

2.3 – Análises laboratoriais e estatísticas

2.3.1- Análise da expressão gênica pela reação em cadeia da polimerase (PCR)

Após a extração do RNA e a síntese do cDNA, as amostras foram submetidas à reações em cadeia da polimerase (PCR) e posterior análise dos fragmentos gênicos amplificados. Os níveis de expressão dos genes de interesse nos diferentes períodos, foram determinados por PCR usando os genes das HSP₇₀, HSP₉₀ e GAPDH (referência) cujos oligonucleotídeos iniciadores estão descritos na Tabela 1. Cada gene foi amplificado em uma reação separada e cada reação foi realizada em triplicata. Cada 10 µL de reação continha 20 ng cDNA para a análise dos genes da HSP₇₀ e HSP₉₀ e do gene constitutivo GAPDH, 0,3 µM de cada primer, 0,2 mM de dNTPs, 0,05 U taq DNA polimerase (Invitrogen), 1X tampão da taq e 3,0 mM MgCl₂.



Tabela 1: Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores dos genes HSP₇₀, HSP₉₀ e GAPDH.

Gene	Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores (5' → 3')	Código no GenBank	Fragmento (pb)
HSP ₇₀ Direto Reverso	5'-AACAAAGATCACCATCACCAACG-3' 5'-TCCTTCTCCGCCAAGGTGTTG-3'	U09861	275
HSP ₉₀ Direto Reverso	5'-GCATTCTCAGTTCATTGGCTATCC-3' 5'-GTCCTTCTTCTCTTCCTCCTCTTC-3'	NM_001012670	190
GAPDH Direto Reverso	5'-GGTGATGCTGGTGCTGAG-3' 5'-TGACAATCTTGAGGGTGTG-3'	AJ431207	181

Todos os procedimentos laboratoriais, bem como as técnicas de dosagem de cortisol e de expressão de RNAm das HSP₇₀ e HSP₉₀ das amostras após as colheitas, foram executados no Laboratório de Fisiologia Animal (LAFa), do Departamento de Ciências Básicas da FZEA, USP, Campus de Pirassununga, SP.

2.3.2- Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o procedimento GENMOD (SAS, 2013) para as característica HSP₇₀ que não apresentou distribuição normal e o procedimento MIXED (SAS, 2013), para a HSP₉₀. Para todas as características os efeitos incluídos no modelo foram: as classes grupo de touros (três grupos de coleta) e período de coleta (manhã e tarde), como efeitos fixos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número de touros mensurados, a média, desvio padrão e valor máximo e mínimo para as características avaliadas são apresentadas na tabela 2.

Com excessão da coleta 1, as demais apresentaram o pico da temperatura do ar quando os animais foram expostos ao sol, acima de 40°C, o que provocou estresse térmico nos animais. Como se pode verificar, houve uma grande variabilidade na resposta individual dos touros em relação à expressão das HSPs, nos três grupos mensurados, o que pode ser comprovado pelo desvio padrão apresentado para essas carcterísticas. Já existem relatos na literatura de polimorfismos para esses genes nas raças Holandesa (HSP₇₀ – BASIRICÓ et al, 2011), Thai



12º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2018
01 a 03 de agosto de 2018 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-145-5

(HSP₉₀ – CHAROENSOOK et al., 2012), Sahiwal (HSP₉₀ – SÁLIO et al., 2012) e Tharparkar (HSP₇₀ – BHAT et al., 2016) sendo que em todas são descritos genótipos com efeitos favoráveis na termo tolerância e produção. Com esses resultados, estudos na raça Gir Leiteiro para investigação de polimorfismo também devem ser realizados visto que Santana Jr et al. (2015) relataram perda da termo tolerância nesta raça, resultante do ganho genético para produção de leite.

Tabela 2. Número de touros, média, desvio padrão e valor máximo e mínimo para as características avaliadas.

Coleta 1	Variável	N	Média ± dp	Mínimo	Máximo
Período 1	Temperatura do ar (°C)	21	26,43 ± 1,63	23,90	29,40
	Umidade relativa do ar (%)	21	75,42 ± 6,65	60,80	86,00
	HSP ₇₀	21	15,32 ± 12,77	1,16	50,44
	HSP ₉₀	21	4,79 ± 1,95	1,65	9,90
Período 2	Temperatura do ar (°C)	21	33,57 ± 2,08	31,50	37,60
	Umidade relativa do ar (%)	21	49,96 ± 5,58	39,50	56,70
	HSP ₇₀	21	19,40 ± 16,70	3,67	66,21
	HSP ₉₀	21	5,59 ± 2,19	2,95	11,70
Coleta 2	Variável	N	Média ± dp	Mínimo	Máximo
Período 1	Temperatura do ar (°C)	53	25,05 ± 1,90	22,40	28,30
	Umidade relativa do ar (%)	53	71,64 ± 7,73	56,50	82,50
	HSP ₇₀	49	25,98 ± 16,22	3,10	62,07
	HSP ₉₀	46	7,38 ± 6,95	1,21	38,29
Período 2	Temperatura do ar (°C)	53	40,30 ± 1,37	37,20	43,00
	Umidade relativa do ar (%)	53	30,92 ± 2,38	27,50	36,00
	HSP ₇₀	52	98,91 ± 240,88	1,00	1269,81
	HSP ₉₀	52	9,96 ± 7,58	1,28	44,86
Coleta 3	Variável	N	Média ± dp	Mínimo	Máximo
Período 1	Temperatura do ar (°C)	32	23,44 ± 1,97	20,80	26,70
	Umidade relativa do ar (%)	32	75,73 ± 7,69	64,00	83,50
	HSP ₇₀	28	62,60 ± 125,42	3,36	645,01
	HSP ₉₀	27	10,40 ± 13,85	1,00	67,56
Período 2	Temperatura do ar (°C)	32	37,13 ± 4,17	28,80	40,90
	Umidade relativa do ar (%)	32	39,47 ± 12,93	29,00	69,00
	HSP ₇₀	28	83,12 ± 87,74	8,48	309,98
	HSP ₉₀	26	16,06 ± 13,34	1,52	48,44

Na tabela 3 estão descritas as médias estimadas por quadrados mínimos e respectivos erros padrão para a expressão das HSP₇₀ e HSP₉₀ nos períodos experimentais (1- manhã e 2 – tarde).



Tabela 3. médias estimadas por quadrados mínimos e respectivos erros padrão para a expressão das HSP₇₀ e HSP₉₀ nos períodos experimentais (1- manhã e 2 – tarde).

Características	Período 1	Período 2
HSP ₇₀	26,25 ± 0,21 a	59,72 ± 0,17 b
HSP ₉₀	6,27 ± 1,03 a	9,17 ± 1,02 b

As médias da expressão das HSP₇₀ e HSP₉₀ foram maiores no período 2 ($p < 0,001$). Isso comprova que os touros foram acometidos por estresse térmico durante o período de exposição ao sol. Kumar et al. (2015) relataram diferenças no padrão de expressão das HSPs em zebuínos e búfalos avaliados em diferentes estações do ano, sendo que o maior nível de expressão para essas proteínas ocorreu no verão, época com temperaturas mais elevadas.

4. CONCLUSÃO

Houve grande variação individual na expressão das HSP₇₀ e HSP₉₀, o que sugere a possibilidade de diferenças genéticas entre os animais em resposta ao estresse térmico.

A expressão das HSP₇₀ e HSP₉₀ foi significativamente maior no período de exposição dos animais ao sol, o que comprova a resposta deste mecanismo de defesa celular ao estresse térmico nos touros da raça Gir Leiteiro.

5. AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela bolsa de iniciação científica concedida a Claudeci . Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo FAPESP projeto 2015/25758-9 e Associação Brasileira de Criadores de Gir Leiteiro (ABCGIL).

6. REFERÊNCIAS

ASBIA, Associação Brasileira de Inseminação Artificial (2014). **Relatório estatístico de importação, exportação e comercialização de sêmen.** Disponível em: <<http://www.asbia.org.br/novo/upload/mercado/index2014.pdf>>. Acesso em: 21/01/2017.



- BASIRICÒ, L.; MORERA, P.; PRIMI, V.; et al. Cellular thermotolerance is associated with heat shock protein 70.1 genetic polymorphisms in Holstein lactating cows. **Cell Stress and Chaperones**16:441–448. 2011.
- BEATTY, D.T.; BARNES, A.; TAYLOR, E. Physiological responses of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle to prolonged, continuous heat and humidity. **Journal of Dairy Science**, v.84, p.972–985, 2006.
- BHAT S. KUMAR P. KASHYAP N. et al. 2016 Effect of heat shock protein 70 polymorphism on thermotolerance in Tharparkar cattle. **Veterinary World** 9(2): 113-117.
- BOHMANOVA, J.; MISZTAL, I.; COLE, J. B. Temperature-humidity indices as indicators of milk production losses due to heat stress. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 4, p. 1947-1956, 2007.
- DALTRO, S. D. Uso da termografia infravermelha para avaliar a tolerância ao calor em bovinos de leite submetidos ao estresse térmico. 2014. 66f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, 2014.
- DONEY, J. M.; GUNN, R. G.; GRIFFITHS, J. G. The effects of pre-mating stress on the onset of oestrus and on ovulation rate in Scottish blackface ewes. **Journal of Reproduction and Fertility**.v.35, p.381-384, 1973.
- FERREIRA, F.; PIRES, M.F.A.; MARTINEZ, M.L.; et al. Parâmetros fisiológicos de bovinos cruzados submetidos ao estresse calórico. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, p.732-738, 2006.
- GABAI, V. L.; SHERMAN, M. Y. Interplay between molecular chaperones and signaling pathways in survival of heat shock. **Journal of Applied Physiology**, v.92, p.1743-1748, 2002.
- HANSEN, P.J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. **Animal Reproduction Science**, v.82–83, p.349–360, 2004.
- KARP G. **Biologia celular e molecular: conceitos e experimentos**. 3a Ed. Editora Manole, São Paulo, p.832. 2005.
- KUMAR, A., ASHRAF, S., SRIDHAR, G., et al. Expression profiling of major heat shock proteins genes during different seasons in cattle (*Bos indicus*) and buffalo (*Bubalus bubalis*) under tropical climatic conditions. **Journal of Thermal Biology**. 51, 55-64, 2015.
- MADALENA F.E., et al. **Produção de Leite e Sociedade**. Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte – MG. p.532, 2001.
- MEYER M P.; BUKAU B. Hsp70 Chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. **Cellular and Molecular Life Sciences**. 62(6): 670-684, 2005.
- MOSSER D. D.; CARON A. W.; BOURGET L.; DENISLAROSE C.; MASSIE B. Role of the human heat shock protein HSP70 in protection against stress induces apoptosis. **Molecular and Cellular Biology**.17: 5317-5327, 1997.
- NEUER, A.; SPANDOFER, S.D.; GIRALDO, P.; et al. The role of heat shock proteins in reproduction, **Human Reproduction Update** 6(2), 149-159, 2000.
- RITOSSA, F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. **Experientia**, v.18 p.571-3, 1962.
- WELCH, W.J. Mammalian stress response. Cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. **Physiol Ver**, v.72, p.1.063-81, 1992.



12º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2018
01 a 03 de agosto de 2018 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-145-5

WEST, J.W. Nutritional strategies for managing the heat-stressed dairy cow. **Journal of Dairy Science**, v.82, p.21-35, 1999.