

ESTRESSE TÉRMICO E A EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO EM VACAS HOLANDÊS E JERSEY¹

Izabelly Perdoncini Telles², André Thaler Neto³, Adriana Hauser⁴, Marciél França⁴, Angélica Scheid⁴, Luiz Nepomuceno⁴, Laiz Perazzoli⁵, Bruna Paula Bergamaschi Mendes⁵, Luiz Cláudio Miletto⁶

¹ Vinculado ao projeto “Efeito do estresse térmico sobre o consumo, indicadores bioquímicos, proteínas de choque térmico, produção e qualidade do leite de vacas Holandês e Jersey”

² Acadêmico (a) do Curso de Medicina Veterinária – CAV – Bolsista PIVIC/UDESC

³ Orientador, Departamento de Produção Animal e Alimentos – CAV – andre.thaler@udesc.br

⁴ Acadêmico do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal – CAV

⁵ Acadêmico (a) do Curso de Medicina Veterinária – CAV- Bolsista PIBIC/CNPq

⁶ Professor de Bioquímica, Departamento de Produção Animal e Alimentos – CAV

Vacas sob estresse térmico, reduzem o exercício e a ingestão de matéria seca, aumentam a ingestão de água e busca por sombra durante o dia. Assim, o desempenho produtivo e reprodutivo reduz, como consequência do acionamento dos mecanismos termo regulatórios, interferindo diretamente na qualidade do leite, diminuindo produção e alterando a composição. A proteína de choque térmico 70 (HSP-70) é uma das mais importantes chaperonas e protege as células de danos térmicos, além de inibir a apoptose. Essas proteínas fazem parte da manutenção da homeostase celular através do processo de dobramento das proteínas nascentes. Considerando que as proteínas de choque térmico fazem parte do mecanismo de adaptação das vacas frente a situações de estresse, especialmente o calor, a ação dessas proteínas, quando presentes, pode auxiliar na elucidação dos mecanismos de alterações da qualidade do leite e da saúde de vacas em condições de estresse térmico. Portanto, objetivou-se analisar a presença e ação das proteínas de choque térmico em vacas leiteiras submetidas a estresse pelo calor.

O experimento foi realizado em uma propriedade comercial leiteira no município de Itapiranga em SC, com sistema de confinamento tipo *Compost Barn*. O ensaio ocorreu no verão sob condições ambientais de temperatura média e umidade relativa do ar de 24,2°C e 83,2%, respectivamente. Dezesesseis vacas (oito Holandês e oito Jersey) foram confinadas e divididas homogeneamente em dois grupos: grupo 1: VA - ventilação em todo o galpão e aspersão de água na linha do cocho e grupo 2: SVA – sem ventilação e aspersão, expostas a insolação solar das 12h até as 15h, porém com acesso à água e a comida. Cada tratamento era composto por oito animais, sendo quatro de cada raça. O experimento teve 14 dias de adaptação e 3 dias de estresse térmico. No período de adaptação todos os animais tinham acesso a ventilação e aspersão, e no período de estresse térmico apenas os animais do grupo 1 continuaram com esse acesso.

Coletou-se amostras compostas de leite da ordenha da tarde e manhã no dia 0 (último dia de adaptação) e no dia 1 e 3 do período de estresse térmico. As amostras foram mantidas resfriadas em caixas isotérmicas até seu processamento. Centrifugou-se alíquotas de 15mL de leite por 10min a 4000g e em seguida, removeu-se, com auxílio de um espátula, a fração de gordura de cada amostra. As amostras foram congeladas a -20°C até a realização das demais análises. O teor de proteína foi analisado pelo método de Bradford utilizando 5µL de leite diluído em água Mili Q (1:20) e 250µL do reagente Bradford (Scienco, Lages, SC, Brasil), utilizando albumina sérica bovina, (Sigma, EUA) como padrão para a curva de calibração de 0; 250; 500; 750 e 1500 µg/mL.

Formou-se 4 pools de amostras de leite das vacas do experimento, considerando os tratamentos e raças: pool VAJ (grupo com ventilação e aspersão formado por vacas Jersey), pool VAH (grupo com ventilação e aspersão formado por vacas Holandês), pool SVAJ (grupo sem ventilação e aspersão formado por vacas Jersey) e pool SVAH (grupo sem ventilação e aspersão formado por vacas Holandês). Para SDS-PAGE e Western Blot, utilizou-se uma amostra de cada pool contendo 30µg de proteína misturada com 10 microlitros de tampão de amostra, aquecida a 96°C por 10min e separada em gel SDS-PAGE a 12%, (Figura 1). As amostras separadas no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose usando 400 mA de corrente constante por 2h. A membrana foi incubada em solução de PBS-Tween 20/leite desnatado Molico 0,5% em pó molico e o anticorpo primário, Anti-HSP-70, produzido em coelhos diluído 1:500 (SAB21010931, Sigma, EUA) por 2h em temperatura ambiente. Na sequência, a membrana foi lavada três vezes com PBS-Tween 20 e incubada com PBS-Tween 20/leite desnatado Molico 0,5% e o anticorpo secundário, Anti-IgG Anti-Mouse Fosfatase, produzido em coelho na diluição (Sigma, EUA) por 1h em temperatura ambiente, seguido pela mesma etapa de lavagem. À membrana adicionou-se uma solução cromógena de NBT/BCIP como substrato para a visualização do imunoblot.

A HSP-70 foi detectada na amostra do pool VAH no dia 0 e 3, (Figura 2). Os resultados preliminares indicam que as vacas Holandês podem ser mais sensíveis ao calor e o tratamento com ventilação e aspersão pode não ter atenuado completamente condições ambientais adversas de estresse térmico.



Figura 1. Perfil eletroforético de pools de amostras de leite do dia 0 (a) e Western Blot de pools de amostras de leite do dia 0 e 3: a) M (marcador de massa molecular VAJ (ventilação e aspersão Jersey); VAH (ventilação e aspersão Holandês); SVAJ (sem ventilação e aspersão Jersey) e SVAH (sem ventilação e aspersão Holandês).

Palavras-chave: HSP-70. Vacas Holandês. Western Blot.