

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL E PASTAGENS

DIVERSIDADE GENÉTICA E ASSOCIAÇÃO DO GENE DO
CHOQUE TÉRMICO (HSP-70.1) AO DESEMPENHO
PRODUTIVO EM VACAS LEITEIRAS NO SEMIÁRIDO

Autor: Maria das Dores Silva Araújo
Orientador: Prof. Dr. Kleber Régis Santoro

GARANHUNS – PE
Estado de Pernambuco
Fevereiro - 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL E PASTAGENS

DIVERSIDADE GENÉTICA E ASSOCIAÇÃO DO GENE DO
CHOQUE TÉRMICO (HSP-70.1) AO DESEMPENHO
PRODUTIVO EM VACAS LEITEIRAS NO SEMIÁRIDO

Autor: Maria das Dores Silva Araújo
Orientador: Prof. Dr. Kleber Régis Santoro

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIA ANIMAL E PASTAGENS, no programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Pastagens da Universidade Federal de Pernambuco – Área de Concentração: Produção de Ruminantes.

GARANHUNS – PE
Estado de Pernambuco
Fevereiro – 2015

Ficha Catalográfica
Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Setorial UFRPE/UAG

A663d Araújo, Maria das Dores Silva
Diversidade genética e associação do gene do choque térmico (HSP-70.1) ao desempenho produtivo em vacas leiteiras no semiárido/Maria das Dores Silva Araújo.-
Garanhuns, 2015.

65fs.

Orientador: Kleber Régis Santoro
Dissertação (Ciência Animal e Pastagens)
Universidade Federal Rural de Pernambuco –
Unidade Acadêmica de Garanhuns, 2015.
Inclui anexo e referências

CDD: 576.5

1. Genética
 2. Bovino Melhoramento Genético
 3. Choque térmico - HSP-70.1
- I. Santoro, Kleber Régis
- II. Título

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL E PASTAGENS

DIVERSIDADE GENÉTICA E ASSOCIAÇÃO DO GENE DO
CHOQUE TÉRMICO (HSP-70.1) AO DESEMPENHO
PRODUTIVO EM VACAS LEITEIRAS NO SEMIÁRIDO

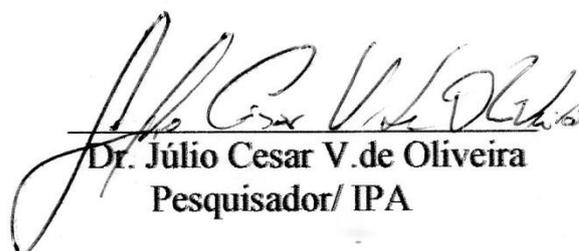
Autor: Maria das Dores Silva Araújo
Orientador: Prof. Dr. Kleber Régis Santoro

TITULAÇÃO: Mestre em Ciência Animal e Pastagem
Área de Concentração: Produção de Ruminantes

APROVADA em 27 de fevereiro de 2015



Dr. Sebastião Inocêncio Guido
Pesquisador/ IPA



Dr. Júlio Cesar V. de Oliveira
Pesquisador/ IPA



Prof. Dr. Omer C. de Almeida
PPGCAP/UFRPE



Prof. Dr. Kleber Régis Santoro
(Orientador)

"Pelo que sinto prazer nas fraquezas, nas injúrias, nas necessidades, nas perseguições, nas angústias, por amor de Cristo. Porque quando sou fraco, então é que sou forte."

II Coríntios 12:10

Á minha filha **Lorena Gabriela**, por
ser a razão e o grande amor da minha
vida...

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao meu amado Deus, por todo seu amor e misericórdia, por estar comigo em todos os momentos. Te agradeço e ofereço a Ti a felicidade deste momento.

Á minha mãe Lenilda, por ter acreditado em mim e na realização deste sonho.

Ao meu esposo Elthon por me apoiar durante todos esses anos.

Ao professor Kleber Régis Santoro, pela orientação e ensinamentos acadêmicos durante esta jornada.

Aos professores da graduação e pós-graduação pela fundamental participação na minha formação.

Aos doutores Júlio César Vieira de Oliveira e Sebastião Inocêncio Guido do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) pela disponibilidade, acesso aos animais e aos dados.

Ao CNPQ pelo fomento dispensado a esta pesquisa, a FACEPE pela concessão de bolsa, a UFRPE/UAG pela estrutura e apoio.

Ao amigo Edyjoelson pela enorme contribuição na execução da pesquisa.

Ao amigo Wellison por estar sempre disponível para me ajudar.

Á minha amiga Suelane por compartilhar comigo sonhos, alegrias e tristezas.

Ao amigo Fernando Guedes pelo respeito, ajuda e palavras de incentivo.

Á minha amiga virtual Daniele Souza, por toda ajuda prestada.

Á todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

BIOGRAFIA

MARIA DAS DORES SILVA ARAÚJO, filha de Domingos Bernardino da Silva e Lenilda Alexandre de Souza, nasceu no município de Jurema-Pernambuco, em 31 de março de 1987.

Ingressou no curso de Zootecnia no ano de 2006, na Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Garanhuns – UFRPE/ UAG, obtendo o diploma de Bacharel em Zootecnia em janeiro de 2012.

Em janeiro de 2013, ingressou no mestrado em Ciência Animal e Pastagens na Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Garanhuns – UFRPE/UAG, concentrando seus estudos na área de produção de ruminantes, tendo em 27 de fevereiro de 2015, submetido à defesa da presente dissertação.

ÍNDICE

| | Página |
|---|--------|
| LISTA DE TABELAS..... | viii |
| LISTA DE FIGURAS | ix |
| LISTA DE ANEXO..... | x |
| RESUMO..... | xi |
| ABSTRACT | xii |
| INTRODUÇÃO GERAL | 3 |
| REVISÃO DE LITERATURA | 5 |
| Proteínas de choque térmico – HSPs..... | 10 |
| CITAÇÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 17 |
| CAPÍTULO I..... | 24 |
| Resumo | 24 |
| Introdução..... | 25 |
| Material e Métodos..... | 26 |
| Resultados e Discussão..... | 27 |
| Conclusões..... | 31 |
| Referências | 32 |
| CAPÍTULO II..... | 35 |
| Resumo | 35 |
| Introdução..... | 36 |
| Material e Métodos..... | 37 |
| Resultados e Discussão..... | 38 |
| Conclusões..... | 42 |
| Referências | 43 |

| | |
|----------------------------|----|
| CONSIDERAÇÕES FINAIS | 45 |
| ANEXOS | 47 |

LISTA DE TABELAS

Página

REVISÃO DE LITERATURA

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Evolução das pesquisas voltadas ao estudo do gene HSP-70.1 em animais ruminantes..... | 16 |
|---|----|

CAPÍTULO I

| | |
|---|----|
| Tabela 1-Índice de diversidade padrão para o gene HSP-70.1 em rebanhos leiteiros Holandês, Girolando (5/8 H-G) e Sindi no Estado de Pernambuco..... | 28 |
| Tabela 2- AMOVA para as populações Holandês, Girolando (5/8 H-G) e Sindi para os polimorfismos do gene HSP-70.1..... | 29 |

CAPÍTULO II

| | |
|--|----|
| Tabela 1- Estatísticas descritivas para produção de leite em bovinos Holandês e Girolando, segundo o polimorfismo do gene HSP-70.1..... | 39 |
| Tabela 2- Análise de variância para os efeitos do padrão genético (polimorfismo) e variáveis climáticas sobre a produção de leite (l/dia)..... | 40 |
| Tabela 3- Médias produtivas (l/dia) para os padrões do gene HSP-70.1em rebanho leiteiro Holandês e Girolando, no estado de Pernambuco..... | 40 |

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|--|--------|
| REVISÃO DE LITERATURA | |
| Figura 1. Localização do Semiárido Brasileiro | 5 |
| Figura 2. Representação esquemática da Zona de Termoneutralidade | 7 |
| Figura 3 Estrutura da HSP-70..... | 12 |
| Figura 4. Representação esquemática do mecanismo de ativação gênica HSF-HSE..... | 13 |
| CAPÍTULO I | |
| Figura 1- Padrões de digestão para identificação dos polimorfismos do gene HSP-70.1 em rebanhos leiteiros Holandês, Girolando (5/8 H-G) e Sindi no Estado de Pernambuco..... | 27 |
| Figura 2- Dendrograma dos padrões PCR-RFLP e respectivas frequências (%) encontradas para o gene HSP-70.1 em rebanhos leiteiros Holandês, Girolando (5/8 H-G) e Sindi no Estado de Pernambuco..... | 28 |
| Figura 3- Dendrograma com a distância entre as raças Holandês, Girolando (5/8 H-G) e Sindi no Estado de Pernambuco. | 29 |
| CAPÍTULO II | |
| Figura 1- Padrões de digestão para identificação dos polimorfismos do gene HSP-70.1 em rebanhos leiteiros Holandês e Girolando (5/8 H-G) no Estado de Pernambuco | 38 |
| Figura 2- Médias climáticas de precipitação, temperatura e umidade nas cidades de São Bento do Una (A) e Arcoverde (B) entre os anos de 2006 a 2014. | 39 |

LISTA DE ANEXO

| | Página |
|---|--------|
| ANEXO A – Normas para publicação na revista Caatinga..... | 47 |

RESUMO

O estresse térmico é um dos fatores que mais contribui para a redução da produtividade de vacas leiteiras em todo o mundo. A busca por animais adaptados a produzirem melhor em ambientes que apresentam temperaturas que podem levar ao estresse térmico é um aspecto de grande relevância para a produção leiteira do Brasil. O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade genética do gene HSP-70.1 e associar os polimorfismos encontrados ao desempenho produtivo de vacas leiteiras no semiárido brasileiro. O trabalho foi realizado com animais puro das raças Holandês, Girolando (5/8H-G) e Sindi, pertencentes a rebanhos administrados pelo Instituto Agronômico de Pernambuco, Estação Experimental de São Bento do Una e de Arcoverde e Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Petrolina, respectivamente. Inicialmente realizou-se as coletas do material biológico, em seguida extração do DNA, amplificação do gene, digestão com enzimas de restrição (EcoRII) seguidos por eletroforese e fotodocumentação. Avaliou-se a variabilidade genética, o índice de diversidade padrão e a análise de variância molecular entre e dentro dos rebanhos. Em seguida foi verificada a associação dos polimorfismos sobre as características de produção de leite. Os resultados permitiram a identificação de sete polimorfismos com alguns padrões sendo compartilhados entre os rebanhos. As maiores semelhanças foram encontradas entre os padrões dos rebanhos Holandês e Sindi. O índice de diferenciação genética observou altos níveis de diferenciação tanto entre, quanto dentro dos rebanhos. Através da análise de variância identificou-se os fatores que influenciaram nas médias de produção. Diferenças significativas para a variável produção de leite foram observadas através do teste de comparação múltipla de médias, com os rebanhos apresentando padrões de polimorfismos superiores diferentes. O conhecimento da variabilidade genética do gene HSP-70.1 vem a contribuir grandemente com a bovinocultura de leite do Estado, apoiando a elevação do padrão racial dos rebanhos e possibilitando a exploração das diferentes respostas apresentadas sob condições de estresse térmico por calor.

ABSTRACT

Heat stress is a factor that contributes to the reduction of productivity of dairy cows around the world. The demand for animals adapted to produce best in environments that present temperatures which can lead to heat stress is an aspect of great importance for dairy production in Brazil. The objective of this study was to evaluate the genetic diversity of HSP-70.1 gene and associated polymorphisms found for production performance of dairy cows in the Brazilian semiarid region. The study was conducted with purebred Holstein, Girolando (5/8 H-G) and Sindi, belonging to herds managed by the Agronomic Institute of Pernambuco, Experimental station of São Bento do Una and Arcoverde and the Brazilian Agricultural Research Corporation - Petrolina respectively. Initially was held the collects of biological material, then the extraction of DNA, gene amplification, digestion with restriction enzymes (EcoRII) followed by electrophoresis and photo documentation. We evaluated the genetic variability, the standard diversity index and the analysis of molecular variance between and within herds. Then it verified the association of polymorphisms on milk production traits. The results allowed the identification of seven polymorphisms with some standards being shared among the herds. The greatest similarities were found between the standards of the Holstein and Sindi cattle. The genetic differentiation index observed high levels of differentiation both between and within herds. Through variance analysis identified the factors that influenced in average production. Significant differences for the variable milk production were observed through the multiple comparison test of means, with the herds presenting different patterns of higher polymorphisms. Knowledge of the genetic variability of HSP-70.1 gene is to greatly contribute to the state of cattle milk, supporting the rise of racial pattern of herds and enabling the exploitation of the different responses provided under conditions of heat stress.

INTRODUÇÃO GERAL

O clima é um dos componentes ambientais que exerce efeito mais pronunciado sobre o bem-estar e, por consequência, sobre a produção animal, com isso ele pode ser considerado como fator regulador ou mesmo limitador da exploração animal para fins econômicos.

Dois terços do território brasileiro estão situados em região tropical, na qual predominam temperaturas elevadas, sendo o fator térmico um grande empecilho à produção animal no país. Na bovinocultura de leite, em especial, o clima interfere na produção principalmente pela dificuldade de adaptação das raças introduzidas ao clima nacional, causando impactos negativos no potencial econômico das fazendas produtoras de leite.

Nos últimos anos o Brasil vem se destacando mundialmente em relação ao efetivo de bovinos, assim como em relação à produção de carne bovina, no entanto, em se tratando de produção de leite, o país exibe baixos índices de produtividade.

A região Nordeste apresentou na última década expressivo crescimento na participação leiteira nacional com o estado de Pernambuco destacando-se entre os demais. Apesar de que, grande parte dessa região esta localizada na área semiárida brasileira, e encontra dificuldades na produção de leite frente às condições ambientais prevalecentes que se caracterizam principalmente pelas altas temperaturas e baixos índices de precipitação.

No semiárido brasileiro, as condições climáticas são apontadas como a principal barreira para melhorar a produtividade leiteira, isto porque a partir delas inúmeras respostas fisiológicas, comportamentais e celulares são desencadeadas pelos animais. Neste sentido, a compreensão aprofundada dos aspectos adaptativos relacionados à tolerância ao calor em bovinos de leite se torna cada vez mais relevante.

É oportuno afirmar que os ganhos de produtividade estão diretamente relacionados ao uso de tecnologias capazes de melhorar a eficiência dos fatores de produção, com os programas de seleção e melhoramento genético destacando-se como principais aliados.

Diversos estudos têm sido desenvolvidos no sentido de conhecer as diferentes respostas apresentadas pelos animais perante situações de estresse. Respostas essas que vão além das mudanças fisiológicas e comportamentais, levando a mecanismos celulares dentre os quais se encontram a expressão das proteínas de choque térmico (*Heat Shock Protein – HSP*).

As proteínas de choque térmico constituem uma família de proteínas que tem sua síntese aumentada no intuito de proteger a célula quando esta é submetida a algum tipo de estresse, neste caso, o estresse térmico por calor. A família é agrupada em diferentes subfamílias de acordo com seu peso molecular, destacando-se a família de 70 kDa, que embora ainda não tenha todas as suas funções completamente identificadas, sabe-se que é responsável pelo arranjo de proteínas em vários compartimentos intracelulares, pelo dobramento de proteínas deformadas, pela prevenção da agregação proteica e degradação de proteínas instáveis.

Por questões evolutivas a família HSP-70 gerou diferentes formas para o gene, dentre os quais a HSP-70.1 tem sido indicada em diferentes regiões e em diferentes espécies, como principal responsável pela adaptabilidade ao calor e melhoria na produção leiteira.

Considerando que a severidade dos impactos causados pelo estresse térmico de igual magnitude depende principalmente do genótipo animal, pode-se referir que a seleção genética para a estabilidade de temperatura corporal durante o estresse térmico é uma interessante abordagem que pode possibilitar a redução da magnitude dos efeitos do estresse térmico sobre a produção animal. Além do que, a variação da expressão genética das HSPs-70.1 em diferentes raças, submetidas a diferentes graus de estresse térmico poderá possibilitar a eventual identificação de um marcador de termotolerância, gerando perspectivas viáveis para o aumento da produtividade leiteira de fêmeas bovinas sob estas condições.

Neste sentido, faz-se necessário o desenvolvimento de estudos que venham a contribuir para a melhoria da produtividade leiteira de rebanhos em ambientes tropicais. Assim, este trabalho teve como objetivo detectar os polimorfismos do gene HSP-70.1 e associá-los á aspectos produtivos em vacas leiteiras do estado de Pernambuco a fim de que este possa auxiliar na seleção de animais adaptados, e conseqüentemente, contribuir para um melhor desempenho produtivo dos rebanhos estaduais.

REVISÃO DE LITERATURA

Nas últimas três décadas, a produção mundial de leite aumentou em mais de 50% (FAYE; KONUSPAYEVA, 2012), com os países em desenvolvimento aumentando significativamente sua participação na produção leiteira mundial, apesar da alimentação de baixa qualidade, baixo potencial genético dos animais e clima desfavoráveis para a produção leiteira figurarem como os principais fatores limitantes observados nesses países (FAO, 2014).

Mundialmente o Brasil ocupa a quarta posição na produção de leite (USDA, 2014). A região Nordeste do país tem apresentado crescimento na participação leiteira nacional. Em 2014 a região contribuiu com 5,7% dessa produção, com todos os estados apresentando aumento na aquisição de leite, sendo os maiores volumes registrados nos Estados da Bahia, Ceará e Pernambuco (BRASIL, 2014).

Apesar do destaque, a maior parte da região Nordeste está inserida na área semiárida brasileira (Figura 1) o que dificulta a produção de leite pelas condições climáticas apresentadas.

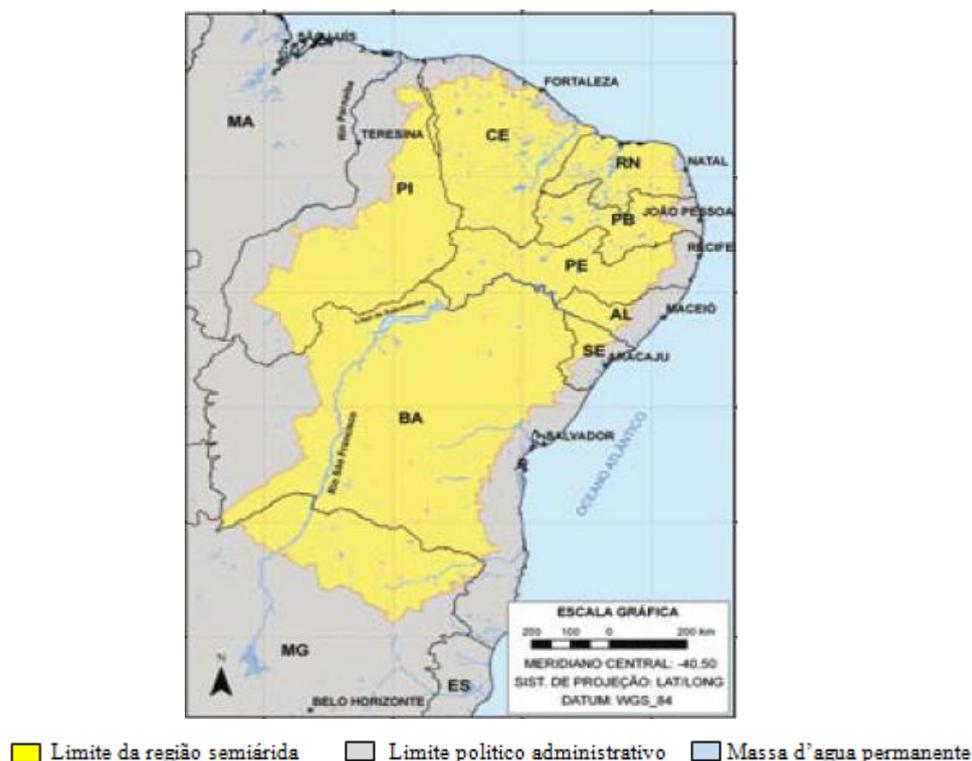


Figura 1. Localização do Semiárido Brasileiro

Fonte: MOURA et al., 2007

A área semiárida ocupa uma superfície de 1.560 milhões de km² (18,2% do território nacional) e se caracteriza por possuir precipitações pluviais irregulares, com médias anuais de 300 mm a 800 mm, ocorrência de secas periódicas com durabilidade média de 18 meses consecutivos de estiagem, temperaturas elevadas que variam entre 24 °C a 29 °C, baixa umidade relativa do ar com médias de 50 a 60% e elevada evaporação, cerca de 2000 mm/ano (MOURA et al., 2007).

Historicamente as secas prolongadas no semiárido brasileiro acontecem há séculos, todavia, elas não aparecem de forma uniforme ao longo do território. Observa-se que em alguns anos a seca foi total com efeitos verificados em todas as áreas da região semiárida brasileira, em outros a seca foi parcial e os problemas foram percebidos em apenas alguns Estados.

Diversos trabalhos na literatura relatam a seca ao longo dos anos, a mais recente e prolongada estiagem ocorreu entre os anos de 2011 a 2013 a qual prejudicou seriamente o cenário de produção da pecuária brasileira. Em 2012 a variação anual da produção de leite no Nordeste apresentou queda de 14,8%. Dos Estados, Pernambuco foi um dos mais afetados com redução de 72% da produção de leite e prejuízos da ordem de R\$ 1,5 bilhão (CNM, 2014).

Trabalhos realizados em todo o mundo relacionam a redução da fertilidade e da produtividade leiteira ao estresse térmico por calor. Quanto maior a capacidade produtiva do animal, maior a ingestão de alimentos e conseqüentemente maior a produção de calor metabólico, o qual aliado às condições ambientais desfavoráveis resultam em estoque de calor corpóreo excedente requerendo eficazes mecanismos termorregulatórios para a manutenção da homeostase fisiológica (KADZERE et al., 2002).

A interação entre animal e ambiente deve ser considerada na busca de maior eficiência na exploração de bovinos de leite. O conhecimento das variáveis climáticas e sua ação sobre as respostas comportamentais e fisiológicas dos animais são preponderantes na adequação desse sistema de produção, com isso, a busca por animais mais adaptados e produtivos em ambientes que apresentam temperaturas elevadas que podem levar ao estresse calórico, é um aspecto de grande relevância para a produção leiteira, principalmente em regiões semiáridas.

Segundo Bernabucci et al (2010), o estresse térmico por calor é definido como a condição fisiológica que ocorre quando a temperatura corporal excede a sua gama específica para atividade normal, resultando em uma carga total de calor que excede a capacidade de dissipação, solicitando respostas fisiológicas e comportamentais de modo a reduzir a tensão.

Animais de produção têm sua capacidade produtiva máxima dentro da zona de termoneutralidade (ZTN) (Figura 2), que consiste em uma faixa de temperatura que confere o máximo conforto térmico. Dentro dessa zona de conforto o gasto de energia para manutenção é constante e a retenção de energia da dieta é máxima, consequentemente direcionando-a para os processos produtivos. Contudo, alguns fatores devem ser considerados ao se determinar a zona de termoneutralidade, dos quais alguns inerentes ao animal como: peso, idade, estado fisiológico, genética, e outros inerentes ao ambiente como: temperatura, velocidade do vento e umidade relativa do ar.

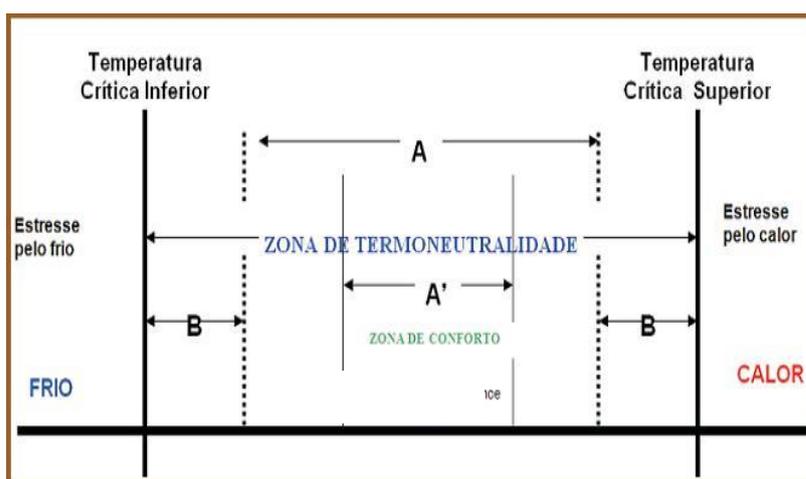


Figura 2. Representação esquemática da zona de termoneutralidade
Fonte: HAFEZ, 1973

Vários trabalhos relataram os efeitos negativos do estresse térmico por calor para animais de produção (SILVA et al., 2005 ; DELFINO et al., 2012). É senso comum que em ambientes estressantes respostas fisiológicas (frequência respiratória, temperatura corporal, taxa de sudorese), comportamentais (procura por sombra, maior ingestão de água, menor ingestão de alimentos) e, mais recentemente, mecanismos celulares (expressão de proteínas de choque térmico) são provocadas ao animal (RONCHI, et al., 2001; HANSEN, 2004) .

Em zootecnia pode-se afirmar que o ambiente, notadamente o clima, é o principal regulador da produção animal, visto que ele afeta diretamente a manifestação do fenótipo, agindo sobre a exteriorização da herança, mais especificadamente no genótipo dos animais, permitindo ou limitando a sua manifestação principalmente no que se refere às atividades produtivas.

Neste contexto, é crescente a busca por alternativas que venham a minimizar os efeitos causados pelo clima na resposta fisiológica e, por consequência, à produção animal, diante da dificuldade de modificá-lo. Existem duas linhas de combate ao estresse térmico por calor,

uma delas é mudar o ambiente aos quais os animais estejam submetidos, a outra é a seleção por animais adaptados ao ambiente (HANSEN; ARECHIGA, 2003).

Sob o primeiro aspecto, alguns artifícios têm sido testados para melhorar o conforto térmico dos animais. Construções zootécnicas que possuem equipamentos de refrigeração e ventilação como: nebulizadores, ventiladores, sistemas de ar condicionado, podem ser bastante eficientes para melhorar as condições térmicas dos abrigos para os animais.

Um estudo realizado por Almeida et al (2010) com vacas Girolando no semiárido de Pernambuco avaliou os efeitos da climatização no curral de espera sobre o acondicionamento térmico ambiental e os efeitos na produção de leite e observou que a exposição dos animais a climatização pelo sistema de resfriamento adiabático evaporativo antes da ordenha, possibilitou melhor acondicionamento térmico ambiental, com os animais apresentando como resposta, menores valores para as variáveis fisiológicas: temperatura retal, frequência respiratória e temperatura do pelame, além do aumento de 4,35% na produção total de leite.

A respeito do segundo, existem diferenças entre as raças quanto à resistência ao estresse térmico por calor. Animais zebuínos (*Bos indicus*) têm maior tolerância quando comparados a animais de raça taurina (*Bos taurus*). Segundo Hansen (2004), as adaptações sofridas ao longo do tempo levaram os animais zebuínos a desenvolverem propriedades como: cor de pele, espessura de pelo, maior densidade de glândulas sudoríparas, maior taxa de respiração, menor taxa metabólica o que proporcionam maior capacidade de perda de calor para esses animais.

Há evidências de que bovinos que evoluíram em climas quentes adquiriram genes que protegem as células a partir de ações prejudiciais de temperatura elevada. No momento, pouco se sabe sobre a base molecular para a melhoria da resistência celular a temperatura elevada em bovinos termotolerantes (HANSEN, 2004). Segundo Li et al., (2011) a termotolerância é uma característica quantitativa controlada por vários genes.

Trabalhos demonstram diferenças genéticas na resistência celular a temperaturas elevadas entre bovinos, supondo que diferentes genes responsáveis pela termotolerância estejam presentes em diferentes genótipos (MAGEE et al., 2002; HERNÁNDEZ-CERÓN et al., 2004). A identificação dos genes que conferem tolerância térmica celular oferece a possibilidade de identificar e selecionar esses genes para as raças mais sensíveis ao calor, melhorando todos os sistemas fisiológicos comprometidos pela hipertemia.

Cada vez mais pesquisas têm sugerido a proteína de Choque Térmico HSP-70.1 como principal gene candidato responsável pela resistência térmica e revelado que polimorfismos

associados a este gene têm relação direta com a viabilidade produtiva em diferentes raças e cruzamentos (MARÓTI-AGÓTS et al., 2011; HANSEN, 2004; DIKMEN et al., 2013).

Contudo, ainda são inexistentes informações sobre os polimorfismos do gene HSP-70.1 nos rebanhos nacionais, o possível distanciamento oriundo de diferentes cruzamentos, a frequência de seus alelos e a sua associação com as respostas produtivas em regiões semiáridas.

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. O pesquisador italiano Ritosa, em um estudo com glândulas salivares de *Drosophila busckii* verificou que a função de determinados genes sofriam alterações quando estes eram submetidos a um choque térmico. Este trabalho foi o primeiro a descrever a reprogramação da expressão gênica de rotina para uma “resposta ao estresse celular”.

Atualmente se sabe que todo tipo de estresse se suficientemente intenso, induz à expressão das proteínas do choque térmico e que várias HSPs são expressas mesmo em células não estressadas, demonstrando seu importante papel 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 por exemplo: temperatura elevada, hipóxia, isquemia, metais pesados, privação de glicose, câncer, inflamação, infecção microbiana, luz ultra-violeta, estimulação hormonal (CRAIG; GROSS, 1991; KIANG; TSOKOS, 1998; LEPOCK, 2005; YÁNIZ et al., 2009).

A temperatura está entre os fatores mais importantes que influenciam a rede celular de interações catalíticas e regulatórias, sendo a resposta ao choque térmico rápida e transitória, com reprogramação de todas as atividades celulares a fim de proteger as estruturas sensíveis contra os danos causados pelo calor e garantir a rápida recuperação após o período de estresse (NOVER, 1989).

As HSPs estão presentes no citosol, mitocôndria, retículo endoplasmático e núcleo e, em geral, possuem uma meia-vida relativamente longa (48 hs em células humanas) (KIANG; TSOKOS, 1998). A indução da expressão dessas proteínas, geralmente ocorre quando células ou organismos são expostos a temperaturas de 5 a 10 °C superiores à temperatura fisiologicamente normal (MORIMOTO, 1998).

Rapidamente após início do estresse térmico ocorre um acréscimo que se pode prolongar até várias horas, sendo o grau de indução dependente do nível e da duração da exposição ao estresse. Esse aumento tem como principais funções manter a homeostase

celular, a conformação das proteínas intracelulares, bem como evitar a desnaturação e má formação de proteínas durante sua síntese (FEHRENBACH; NIESS, 1999).

A família das HSPs é separada em diferentes sub-famílias de acordo com suas massas moleculares: HSP-100, HSP-90, *HSP-70*, HSP-60, HSP-40 e HSP-10, com o principal grupo sendo representado pelas que apresentam peso molecular de aproximadamente 70 kDa (PILON; SCHEKMAN, 1999). Genes que induzem a síntese da proteína HSP-70 têm sido identificados em uma ampla variedade de espécies: humanos (SARGENT et al., 1989), ratos (WURST et al., 1989), caprinos (CAMERON et al., 1990), bovinos (GROSZ et al., 1992), cães (KANO et al., 2004) e apresentam alto grau de homologia.

Em bovinos o gene que sintetiza a proteína HSPs-70 foi localizado na parte central do cromossomo 23 (BTA23) (GALLAGHER et al., 1993). Dentro da família HSP, o HSP-70 é o primeiro a ser induzido em resposta a fatores estressante, comumente associada ao início e duração da tolerância à temperatura. Apesar dos mecanismos de ação das HSP-70 ainda não serem totalmente compreendidos, sabe-se que elas atuam na montagem, transporte e regulação da atividade de proteínas num processo regulado por ATP, interferindo diretamente na morte celular programada e contribuindo para a resposta imune celular (PARCELLIER et al., 2003; MOSELEY, 2000).

A HSP-70 é composta por um domínio ATPase (NBD) e um domínio de ligação a peptídeos (SBD) (Figura 3). O domínio SBD localiza-se na região C-terminal cujo acesso ao substrato é controlado por uma tampa que expõe o sítio de ligação aos peptídeos. Por meio de uma ligação hidrofóbica o domínio SBD é unido ao domínio NBD com atividade ATPase (KAMPINGA et al., 2003). A ATPase é uma classe de enzimas que catalisam a decomposição do trifosfato de adenosina (ATP) em adenosina difosfato (ADP) e um íon de fosfato livre. Nessa reação, a energia desfosforilada é liberada e aproveitada pela enzima para conduzir outras reações (LENINGHER, 2002).

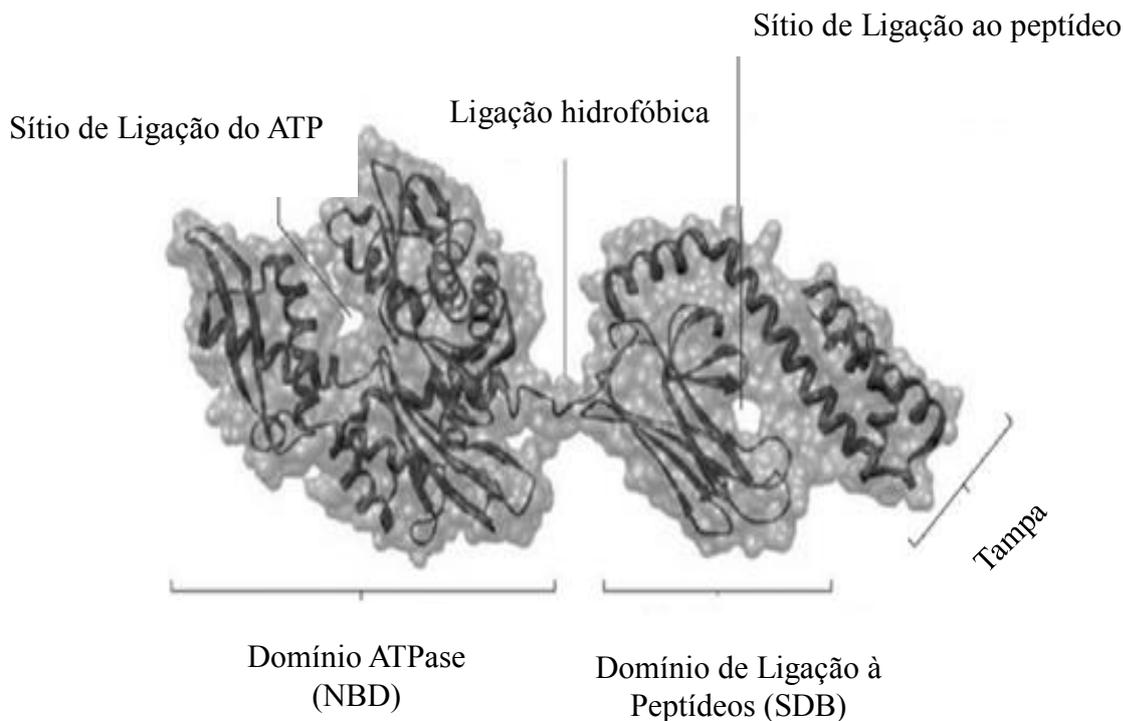


Figura 3 Estrutura da HSP-70
 Fonte: CASTRO et al., 2013

O domínio SBD é responsável pela ligação ao substrato, interagindo de forma reversível com proteínas ou cadeias polipeptídicas recém-sintetizadas. Assim, as HSP-70 em células submetidas a condições adversas evitam que proteínas desnaturadas formem agregados citoplasmáticos que ponham em risco a integridade da célula, guiando a renaturação de proteínas e, quando não for possível conduzindo às proteínas desnaturadas a degradação pelos proteossomos (BEERE et al, 2000).

Em situações de estresse metabólico, a ativação dos genes codificantes das HSPs-70 iniciam-se pela ativação de um fator específico de transcrição chamado *Heat Shock Factor* (HSF). O HSF está presente na forma de um monômero inativo no citoplasma de células não estressadas. Em resposta a algum tipo de estresse este fator é ativado, vinculando-se a outros HSFs e formando trímeros que se translocam para o núcleo e ligam-se a uma sequência de nucleotídeos específicos chamados de *Heat Shock Element* (HSE). Os HSEs estão localizados dentro da região promotora dos genes que codificam as HSPs, resultando dessa forma, num alto nível de transcrição dos genes de choque térmico (Figura 4) (SANTORO, 2000).

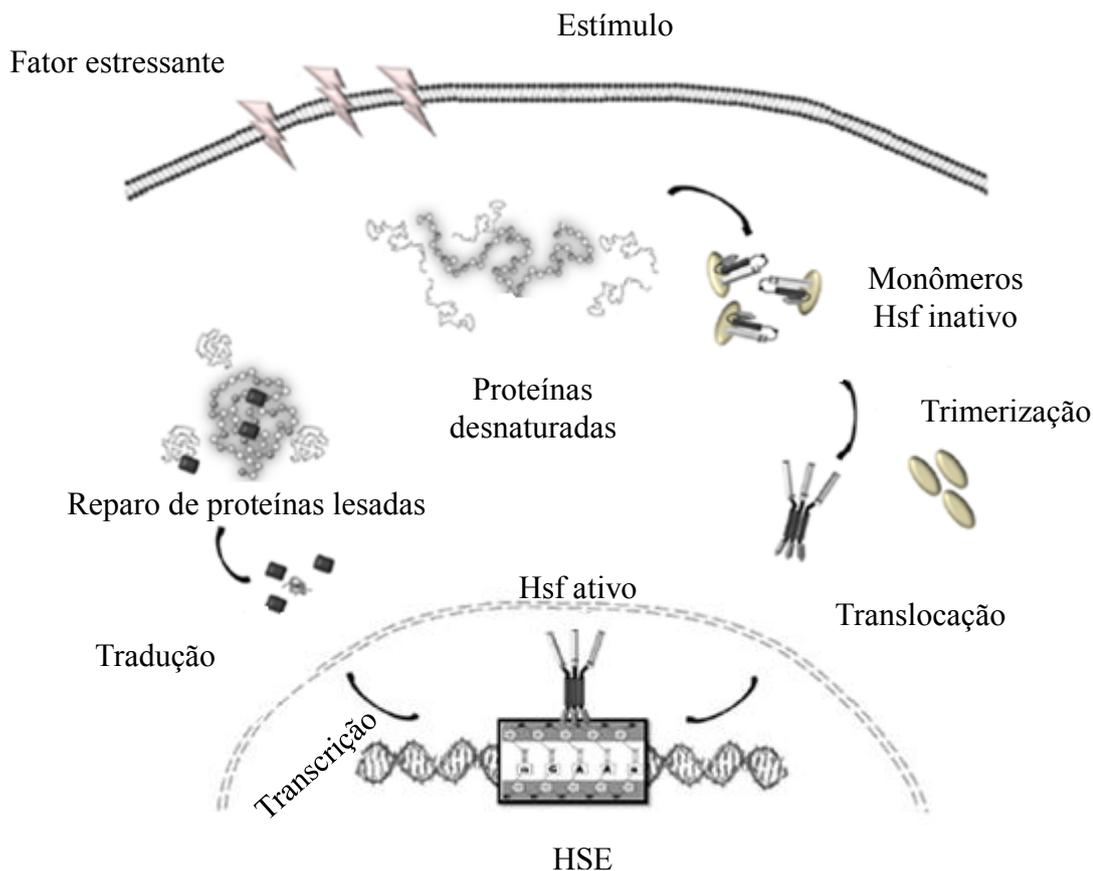


Figura 4. Representação esquemática do mecanismo de ativação gênica HSF-HSE
 Fonte: CASTRO et al., 2013

O elevado nível de HSP-70 em células submetidas ao estresse orienta no dobramento de proteínas recém-sintetizadas, atuam na renaturação de proteínas danificadas e apresentam importante papel na manutenção da viabilidade celular pela interação com as vias apoptóticas (MEYER; BUKAU, 2005).

Proteínas funcionais intracelulares estão presentes normalmente em suas formas nativas, completamente dobradas. Entretanto, processos vitais da biogênese proteica requerem que ela exista, temporariamente, em conformação desdobrada ou parcialmente dobrada. Polipeptídeos corretamente dobrados têm as porções hidrofóbicas de seus aminoácidos voltadas para o interior da molécula, ao passo que os componentes hidrofílicos se voltam para o exterior, possibilitando a solubilidade em meio aquoso e impedindo a agregação de proteínas. As HSPs influenciam o dobramento de proteínas orientado a renaturação e prevenindo a agregação proteica por meio da interação com as partes hidrofóbicas expostas da proteína mal dobrada (MOSSER; MORIMOTO, 2004).

Células acometidas por algum tipo de dano podem seguir diferentes caminhos: responder ao estresse amenizando os danos ou sinalizando para a apoptose, uma forma de

morte celular programada que remove células lesadas sem desencadear processos inflamatórios (FERREIRA et al, 2004).

As HSP-70 têm a capacidade de modular a susceptibilidade das células a estímulos nocivos pela interação com elementos diretamente envolvidos na via apoptótica (BEERE et al, 2000). Ademais, níveis elevados de HSPs-70 aumentam a rapidez de remoção de proteínas, marcando-as e permitindo que a célula identifique as proteínas anormalmente dobradas e encaminhe para a degradação através do complexo enzimático denominado proteossomo. Os proteossomos são complexos de diferentes proteases que digerem proteínas marcadas para destruição através de sua união com o polipeptídeo ubiquitina (DE ROBERTIS, 1983).

A história evolutiva e a organização do genoma da família do gene da HSP-70 é particularmente intrigante. Estudos demonstram que ocorreu uma diversificação nos genes dessa família, gerando isoformas com largo espectro de funções celulares.

O primeiro estudo que observou variações na família HSP-70 foi realizado por Hunt e Morimoto (1985), em um trabalho que comparou a sequência nucleotídica do gene HSP-70 de *Drosophila* e *Escherichia coli* com a sequência de humanos. Os autores observaram que 73% da sequência de *Drosophila* e 50% da sequência de *Escherichia coli* eram idênticas as de humanos, demonstrando alto grau de conservação que pode ser explicado em virtude das espécies compartilharem um ancestral comum e/ou pelo significado funcional para a estrutura do gene e conseqüentemente dos transcritos. Entretanto, esse trabalho permitiu uma análise evolutiva que se estendeu através de vertebrados superiores e revelou que em uma região, a sequência humana divergia extensivamente sugerindo substituições silenciosas ocorridas em função dos anos que poderiam afetar ou não a degenerância do código genético.

Posteriormente, trabalhos independentes confirmaram a presença de múltiplos locais autossômicos para HSP-70 no genoma humano (WU et al., 1985; HARRISON et al., 1987). A partir dessas informações vários estudos foram realizados no intuito do completo entendimento desse gene. Sargent et al (1989) identificou durante a caracterização do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), mais especificamente na região de classe III, o *locus* onde se localiza o gene HSP-70 e suas diferentes formas em humanos : HSP-70, HSP-70 .1 e HSP-70.2.

A análise da sequência de nucleotídeos dos genes HSP-70 HSP-70.1 e HSP-70.2 mostrou que eles codificam um produto de proteínas idênticas, no entanto o HSP-70.1 é expresso em níveis elevados quando induzido por choque térmico, enquanto os outros membros são expressos constitutivamente (MILNER; CAMPBELL, 1990).

Grosz et al., (1992) identificaram os genes da família HSP-70 em bovinos no braço curto do cromossomo 23 e observou que para esta espécie eles se apresentam em quatro formas: HSP-70.1, HSP-70.2, HSP-70.3 e HSP-70.4, sendo o gene HSP-70.1 o componente chave da família.

Assim como em humanos, estes genes fazem parte do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC). O MHC é um elemento fundamental do sistema imunitário, envolvido em diversos processos fisiológicos e bioquímicos relacionados ao sistema imunológico da maioria das espécies de animais vertebrados (EDWARDS; HEDRICK, 1998). Esta região é um alvo potencial na identificação de genes candidatos nos estudos da variação molecular em animais de produção, em razão de sua influência sobre características relacionadas à saúde animal e, conseqüentemente, características produtivas, uma vez que indivíduos que apresentam melhores condições de saúde apresentam-se mais produtivos.

Ao longo dos anos estudos investigaram o gene HSP-70.1 em ruminantes, alguns apresentam aspectos genéticos observados na espécie, outros caracterizam os polimorfismos e os associam a características de produção. Assim, a Tabela 1 apresenta a evolução das pesquisas realizadas no mundo voltadas ao estudo do gene HSP-70.1 em animais ruminantes.

Tabela 1. Evolução das pesquisas voltadas ao estudo do gene HSP-70.1 em animais ruminantes

| REFERÊNCIA | ESPÉCIE | OBJETIVO |
|----------------------------|----------------|--|
| Gunther e Walter (1994) | Vertebrados | Aspectos genéticos da família multi-gênica da HSP-70 em vertebrados. |
| Schwerin et al (2003) | Bovinos | Predisposição genética para a vida produtiva associada ao gene HSP-70.1 em gado. |
| Camargo et al (2007) | Bovinos | Expressão do gene HSP-70.1 em vacas leiteiras de ambiente tropical. |
| Gade et al (2010) | Caprinos | Caracterização molecular do gene HSP-70.1 em caprinos. |
| Basirico et al (2011) | Bovinos | Tolerância celular associada ao gene HSP-70.1 em gado de leite. |
| Pawar et al (2012) | Búfalos | Caracterização molecular do gene HSP-70.1 em búfalos. |
| Xiong et al (2013) | Bovinos | Associação do gene HSP-70.1 com tolerância ao calor em vacas holandesas. |

Apesar dos estudos realizados, mais pesquisas são necessárias abordando este gene, visto que ele apresenta grande importância fisiológica além da relação direta com a produtividade animal. No Brasil não existem relatos de trabalhos que caracterizem o gene HSP-70.1 em bovinos leiteiros e o associem com características de produção.

Assim, esta dissertação será composta de dois capítulos escritos na forma de artigos científicos que seguirão as normas estabelecidas pela Revista Caatinga (Anexo A).

Capítulo 1 – POLIMORFISMOS DO GENE HSP-70.1 EM REBANHOS BOVINOS LEITEIROS DA REGIÃO SEMIÁRIDA BRASILEIRA

Capítulo 2 – PERFIS PRODUTIVOS DE VACAS LEITEIRAS NO SEMIÁRIDO BRASILEIRO E SUA ASSOCIAÇÃO COM POLIMORFISMOS DO GENE HSP-70.1

CITAÇÃO BIBLIOGRÁFICA

ALMEIDA, G.L. et al. Investimento em climatização na pré-ordenha de vacas girolando e seus efeitos na produção de leite. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.14, n.12, p.1337–1344, oct. 2010.

BASIRICO, L. et al. Cellular thermotolerance is associated with heat shock protein 70.1 genetic polymorphisms in Holstein lactating cows. **Cell Stress and Chaperones**, v. 16, p. 441–448, jan. 2011.

BEERE, H.M. et al. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. **Nature Cell Biology**, v. 2, n. 8, p. 469-75, aug. 2000.

BERNABUCCI, U. et al. Metabolic and hormonal acclimation to heat stress in domestic ruminants. **Animal**, v.4, n.7, p.1167-1183, jul. 2010.

BRASIL. Indicadores IBGE- **Estatística da Produção Pecuária**, 2014. 50 p.

CAMARGO, L.S. et al. Developmental competence and expression of the Hsp 70.1 gene in oocytes obtained from *Bos indicus* and *Bos taurus* dairy cows in a tropical environment. **Theriogenology**, v. 68, p. 626–632, marc. 2007.

CAMERON, P.U. et al. Conservation of the central MHC genome: PFGE mapping and RFLP analysis of complement HSP-70.1, and TNF genes in the goat. **Immunogenetics**, v.31, p. 253-264, abr. 1990.

CASTRO, S.V. et al. Heat shock protein HSP-70.1: structure and action in response to cellular stress. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.7, n. 4, p.261-271, oct. 2013.

CONFEDERAÇÃO NACIONAL DOS MUNICÍPIOS - CNM: **Análise sobre a seca do Nordeste**. v. 6, p. 160-176, 2014.

CRAIG, E. A; GROSS, C. A. Is HSP-70.1 the cellular thermometer? **Trends in Biochemical Science**, v. 16, n.4, p. 135-40, abr. 1991.

DE ROBERTIS, J. R. **Bases da Biologia Celular e Molecular: O citosol**. 3. Ed. Rio de Janeiro. GUANABARA KOOGAN, 1983, 418 p.

DELFINO, L. J. et al. Influência de diferentes ambientes de pré-ordenha sobre os valores hematológicos de vacas Pardo-suíças em sistema biodinâmico de produção. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 8, n.2, p.08-15, jun. 2012.

DIKMEN, S. et al. Genome-wide association mapping for identification of quantitative trait loci for rectal temperature during heat stress in Holstein cattle. **Plos One**, v. 7, pag 6920-6931, jul.2013.

EDWARDS, S. V.; HEDRICK, P.W. Evolution and ecology of MHC molecules: from genomics to sexual selection. **Trends in Ecology & Evolution**, vol. 13, p. 305–311. aug.1998.

FAYE, B.; KONUSPAYEVA, G. The sustainability challenge for the dairy sector. The growing importance of non - production of dairy cattle worldwide. **International Journal Dairy**, v. 24, n. 2 p. 50-56, jun. 2012.

FEHRENBACH, E.; NIESS, A. Role of heat shock protein in the exercise response. **Exercise Immunology Review**, n.5, p.57-77, mai.1999.

FERREIRA R. et al. Atrofia muscular esquelética. Modelos experimentais, manifestações teciduais e fisiopatologia. **Revista Portuguesa de Ciência do Desporto**. v.4, n. 3, p. 94-111, 2004.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO : **Production and dairy products**. Disponível em <http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/milk-production/en/#.VFPRj_nF9qU>. Acesso em: 31 dec. 2014.

GADE, N. et al. Molecular Characterization of Heat Shock Protein 70-1 Gene of Goat (*Capra hircus*). **Molecular Biology International**, v. 7, p. 1-7, abri. 2010.

GALLAGHER, D. et al. Chromosomal localization of HSP-70.1 genes in cattle. **Mammalian Genome** v.4, p. 388-390, abr. 1993.

GROSZ, M. D.; WOMACK, J. E.; SKOW, L.C. Syntenic Conservation of HSP-70.1 Genes in Cattle and Humans. **Genomics**. v. 14, p. 863-868, aug.1992.

GUNTHER, L.; WALTER L. Genetic aspects of the HSP-70.1 multigene family in vertebrates. **Immunogenetics**. v.50, p. 987-1001, 1994.

HAFEZ, E.S. **Adaptacion de los animales domésticos**. Barcelona, LABOR, 1973. 963p.

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

HANSEN, P.J; ARÉCHIGA, C.F. Estratégias para reduzir os efeitos do estresse térmico na eficiência reprodutiva. In: NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS, 2003, Uberlândia – MG. **Anais...** Uberlândia: 2003. p. 77-97.

HARRISON, G.S. et al. Chromosomal location of the human genes encoding major heat-shock protein HSP-70.1. **Somatic Cell and Molecular Genetics**, v.13,n.2, p. 119-130, mar 1987.

HERNÁNDEZ-CERON, J.; CHASE, C.C.; HANSEN, P.J. Differences in heat tolerance between preimplantation embryos from brahman, romosinuano and angus breeds. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.53-8, 2004.

HUNT, C.; MORIMOTO, R. Conserved features of eukaryotic hsp70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human hsp70. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 82, p. 6455-6459, jun. 1985.

KADZERE, C.T. et al. Heat stress in lactating dairy cows: a review. **Livestock Production Science**, v.77, p. 59-91, dec. 2002.

KAMPINGA H. et al. Over expression of the cochaperone CHIP enhances HSP-70.1-dependent folding activity in mammalian cells. **Molecular and Cellular Biology**, v.23, n. 14, p. 4948–4958, jul. 2003.

KANO, R.; ABE, K.; HASEGAWA, U. Cdna of canine heat shock protein 70 (HSP-70). **Veterinarian Research Communications**, v. 28, n. 5, p. 395-405, jul. 2004.

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

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

LENINGHER, A. L. **Princípios de Bioquímica: Aminoácidos, peptídeos e proteínas**. 6. Ed, São Paulo, SARAIVA, 2002. 1304 p.

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

LI, Q. et al. Novel SNPs in HSP-70.1A1A 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, abr.2011.

MAGEE D.A. et al. A partial african ancestry for the creole cattle populations of the Caribbean. **Herd Immunity Journal**, v.93, p.429-432. 2002.

MARÓTI-AGÓTS, Á. et al. Possible genetic sign of heat stress adaptation in Hungarian Grey Bos taurus breed. **Acta Biologica Hungarica**. v. 62, p. 65–72. 2011.

MEYER M.P.; BUKAU B. Chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v.62, n.6, p.670-684, mar.2005.

MILNER, C.M; CAMPBELL, D. Structure and expression of the three MHC-linked HSP-70.1 genes. **Immunogenetics**, v. 32, n.4, p. 242-251, 1990.

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 e Development**, v. 12, n. 24, p. 3788–3796, dec.1998.

MOSELEY, P. Stress proteins and the immune response. **Immunopharmacology**. v.48, n.3, p. 299-302, jul. 2000.

MOSSER D.D.; MORIMOTO R.I. Molecular chaperones and the stress of oncogenesis. **Oncogene**. v. 23, p.2907-2918, 2004.

MOURA, M.S. et al. **Clima e água no semiárido**: Descrição Climática. Petrolina: EMBRAPA SEMIÁRIDO, 2007. 59 p.

NOVER L. 125 years of experimental heat shock research: historical roots of a discipline. **Genome**, v. 31, v.2, p. 668-670, 1989.

PARCELLIER, A. et al. Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. **Biochemical Communications**, v.304, n. 3, p.304-505, mai. 2003.

PAWAR, H. et al. Molecular and Immunological Characterization of Heat Shock Protein 70 (HSP-70.1) Gene from Buffalo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, sep. 2012.

PILON, M.; SCHEKMAN, R. Protein translocation how HSP-70.1 pulls it off. **Cell**, v. 97, n.6, p.679–682, jun.1999.

RONCHI, B. et al. Influence of heat stress or feed restriction on plasma progesterone, oestradiol-17, LH, FSH, prolactin and cortisol in Holste in heifers. **Livestock Production Science**, v. 68, p.231-241, feb. 2001.

SANTORO M. G. Heat shock factors and the control of the stress response. **Biochemical Pharmacology**. v.59, n.1, p. 55-63, jan 2000.

SARGENT, C.A. et al. Human major histocompatibility complex contains genes for the major heat shock protein HSP-70.1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, p.1968-72, mar. 1989.

SCHEWERIN, M. et al. Genetic predisposition for productive life is associated with functional inactivation of a AP2-binding site in the promoter of the stress protein 70.1-encoding gene in cattle. **Biochimica e Biophysica Acta**, v. 46, p. 177-185, sep. 2003.

SILVA, G.A. et al. Efeito das épocas do ano e de turno sobre os parâmetros fisiológicos e seminais de caprinos no semiárido paraibano. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v.1, p. 07-14, 2005.

SONNA, L.A. et al. Invited review: Effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. **Journal of Applied Physiology**, v. 92, p. 1725– 1742, 2002.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - USDA: **Cows Milk Production and Consumption: Summary For Selected Countries** . Disponível em: <<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/psdReport.aspx?hidReportRetrievalName=Cows+Milk+Production+and+Consumption%3a++Summary+For+Selected+Countries++++++++&hidReportRetrievalID=1275&hidReportRetrievalTemplateID=7>>. Acesso em: 12 feb. 2015.

WU, B.; HUNT, C.; MORIMOTO, R. Structure and expression of the Human gene encoding Major Heat Shock Protein HSP-70. **Molecular and cellular Biology**, v. 5, n.2, p. 330-341, feb.1985.

WURST, W. et al. Localization of heat shock protein 70 genes inside the major histocompatibility complex close to class III genes. **Immunogenetics**, v.30, p.46-49,1989.

XIONG, Q. et al. Association analysis of HSP-70.1A1A haplotypes with heat tolerance in Chinese Holstein cattle. **Cell Stress and Chaperones**, v. 18, p. 711-718, mar. 2013.

YÁNIZ, J.L. et al. 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. 1041–6, nov. 2009.

CAPÍTULO I

POLIMORFISMOS DO GENE HSP-70.1 EM REBANHOS BOVINOS LEITEIROS DA REGIÃO SEMIÁRIDA BRASILEIRA

RESUMO- O presente trabalho objetivou avaliar a variabilidade genética do gene HSP-70.1 em bovinos leiteiros em virtude da sua importância em proteger células sob condições de estresse térmico, conferir também adaptabilidade ambiental. Foram avaliados rebanhos das raças Holandesa, Girolando e Sindi. O DNA foi extraído a partir de amostras de sangue total, posteriormente submetido à amplificação por PCR e digestão com a enzima de restrição EcoRII. A variabilidade genética foi avaliada pela frequência gênica, índice de diversidade padrão e estrutura genética populacional entre e dentro dos rebanhos. A distância genética foi determinada utilizando o coeficiente de Jaccard e a análise de agrupamento conforme o método de agrupamento (UPGMA). Os resultados permitiram a identificação de sete polimorfismos com alguns padrões sendo compartilhados entre os rebanhos. Maiores semelhanças foram observadas entre os padrões dos rebanhos Holandês e Sindi. Através do índice de diferenciação genética observaram-se altos níveis de diferenciação entre e dentro dos rebanhos. O conhecimento da variabilidade genética do gene HSP-70.1 vem a contribuir grandemente com a bovinocultura de leite do Estado, possibilitando a exploração das diferentes respostas apresentadas sob condições de estresse térmico por calor.

Palavras-chave: Biologia Molecular, Produção de leite, Estresse por calor.

POLYMORPHISMS GENE HSP 70.1 LIVESTOCK IN DAIRY CATTLE IN THE STATE OF PERNAMBUCO

ABSTRACT- This study aimed to evaluate the genetic variability of HSP-70.1 gene in dairy cattle because of its importance in protecting cells under conditions of heat stress, also check environmental adaptability. We evaluated herds of Holstein, Girolando and Sindi. DNA was extracted from whole blood samples subsequently subjected to PCR amplification and digestion with EcoRII restriction enzyme. Genetic variability was assessed by gene frequency, pattern diversity index and population genetic structure within and between herds. The genetic distance was determined using the coefficient of Jaccard and cluster analysis as the clustering method (UPGMA). The results allowed the identification of seven polymorphisms with some standards being shared among the herds. The highest variability was observed within the herds. Phylogenetic analysis demonstrated the formation of five groups between the patterns found. Knowledge of the genetic variability of HSP-70.1 gene has to contribute greatly for the dairy cattle of state, enabling the exploration of the different responses provided under conditions of heat stress.

Keywords: Molecular Biology, Milk production, Heat stress.

INTRODUÇÃO

O estresse por calor é considerado o principal responsável pela redução da produtividade animal em regiões tropicais o que tem gerado graves consequências econômicas para a agropecuária global (BERNABUCCI et al., 2010). No Brasil, tem sido observado crescimento na produção leiteira nos últimos anos, apesar dos fatores climáticos dificultarem a produção em algumas regiões do país, resultando em diminuição da imunidade e desempenho produtivo e reprodutivo (BERMAN, 2011).

No Nordeste brasileiro, que comporta a maior área semiárida do país, o principal entrave para a bovinocultura de leite ocorre em função dos longos períodos de estiagens aliados às elevadas temperaturas, que resultam em carga total de calor que excede a capacidade de dissipação dos animais e gera respostas fisiológicas, comportamentais e celulares que comprometem a produção (DELFINO et al., 2012) e reprodução de vacas leiteiras (LIMA et al., 2013).

Trabalhos na literatura relatam diferenças adaptativas entre zebuínos e taurinos quando se trata de estresse por calor (HANSEN, 2004; CAMARGO et al., 2007; SODHI, 2013). Segundo Bradley et al., (1996), apesar de terem surgido a partir de um ancestral comum, estas duas subespécies foram submetidas a diferentes condições ambientais que levaram a distintos graus de evolução, dentre os quais a seleção por genes que protegem as células de animais submetidos a temperatura elevada.

As proteínas de choque térmico (HSPs) fazem parte de um conjunto de proteínas altamente conservadas com diferentes pesos moleculares e que desempenham papéis importantes na proteção contra vários mecanismos estressores. As HSP-70 fazem parte de uma grande família das HSPs com peso molecular de 70 kDa e funcionam como chaperonas moleculares modulando a resposta ao estresse térmico e minimizando o dano celular (CASTRO et al., 2013). Elas têm sido indicadas como principais responsáveis pela termotolerância destacando-se as HSP-70.1 sendo as mais abundantes e sensíveis à temperatura (MARÓTI-AGÓTS et al., 2011).

Em bovinos os genes que codificam as HSP-70.1 estão localizados na parte central do cromossomo 23 (BTA 23) nas imediações do Complexo Principal de Histocompatibilidade e apresentam 1.926 nucleotídeos (GROSZ et al., 1992). O mecanismo de ação das HSP-70.1 ainda não foi totalmente esclarecido (LACETERA et al., 2006), entretanto a caracterização desse gene já foi realizada para algumas espécies de animais de produção como suínos

(NUNES et al., 1993), caprinos (GADE et al., 2010), bubalinos (PAWAR et al., 2012) e bovinos (GROSZ et al., 1992).

A HSP-70.1 tem demonstrado sua ação de proteção celular pela maior termotolerância e habilidade em apoiar a sobrevivência da célula ao estresse térmico. A identificação de polimorfismos desse gene possibilita além da melhoria na resistência térmica, melhoria na produção e em outros sistemas fisiológicos comprometidos pelo estresse térmico. (ADAMOWICZ et al., 2005).

Assim, diante da importância do gene em conferir melhores condições de termotolerância, o presente artigo visa avaliar os polimorfismos do gene HSP-70.1, observando as semelhanças e diferenças dentro e entre rebanhos bovinos leiteiros de Pernambuco.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 213 animais, dos quais: 65 Holandês, 106 Girolando (5/8 H-G), 42 Sindi pertencentes ao Instituto Agrônomo de Pernambuco, nas Estações Experimentais de São Bento do Una e Arcoverde e Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Petrolina, respectivamente.

Destes, foram coletadas alíquotas de 4,5 ml de sangue por meio de punção venosa da jugular em *vacutainer* com anticoagulante (EDTA). As amostras foram imediatamente acondicionadas em recipiente contendo gelo e posteriormente armazenadas sob refrigeração a -20°C.

A extração de DNA foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular da Unidade Acadêmica de Garanhuns - UFRPE, por meio do Kit de extração *Axy Prep™ Blood Genomic DNA Miniprep Kit*[®] (Axygen), segundo as recomendações do fabricante. A qualidade do material extraído foi avaliada em gel de agarose a 1% corado com SYBR GREEN[®] (Invitrogen) visualizado em luz ultravioleta e fotodocumentado (Gel Logic 112[®], Kodak).

Para a amplificação do gene HSP-70.1 bovino, utilizou-se os primers descritos por Schwerin et al. (2003), a saber: *Forward*: 5'- GTCGCCAGGAAACCAGAGAC-3' e *Reverse*: 5'-GGAACACCCCTACGCAGGAG-3'. A reação totalizou um volume de 50 µL: 5 µL de tampão 1X, 5 mM de MgCl₂, 0,4 mM de dNTP, 0,2 unidades de taq DNA polimerase (*Invitrogen*) e 100 ng de DNA, sendo submetida aos seguintes parâmetros de termociclagem: desnaturação inicial a 94 °C por 5', 40 ciclos: 94 °C por 1', 63 °C por 1', 72 °C por 2' e

extensão final por 5' a 72 °C. As reações foram realizadas em termociclador e o produto da amplificação foi posteriormente visualizado por eletroforese em gel de agarose a 5%.

Em seguida foi realizada digestão com a enzima de restrição EcoRII para identificação dos polimorfismos. A reação totalizou um volume final de 30 µL, sendo composta por 12 µL do produto da PCR, 15 µL de H₂O deionizada e autoclavada, 2 µL de Buffer 0 e 1 µL da enzima de restrição. A digestão foi realizada a 37 °C por 5 horas, sendo os fragmentos visualizados após eletroforese em gel de poliacrilamida a 8%.

Os polimorfismos foram identificados pelo padrão de bandas observado no gel, os quais foram utilizados para determinar a variabilidade genética pela frequência gênica e índice de diversidade padrão nos rebanhos. A avaliação da estrutura genética populacional entre e dentro dos rebanhos foi realizada através da análise molecular de variância (AMOVA) por meio do *software* Arlequin versão 3.5.1.2. (EXCOFFIER; LISCHER, 2010).

Para a construção das árvores filogenéticas, utilizou-se o Coeficiente de Jaccard (1908) com agrupamento pelo algoritmo UPGMA, através do *software* SAS.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A digestão do produto da PCR gerou dezessete diferentes bandas, em um total de sete padrões de polimorfismos: A; B; C; D; E; F; G (Figura 1).

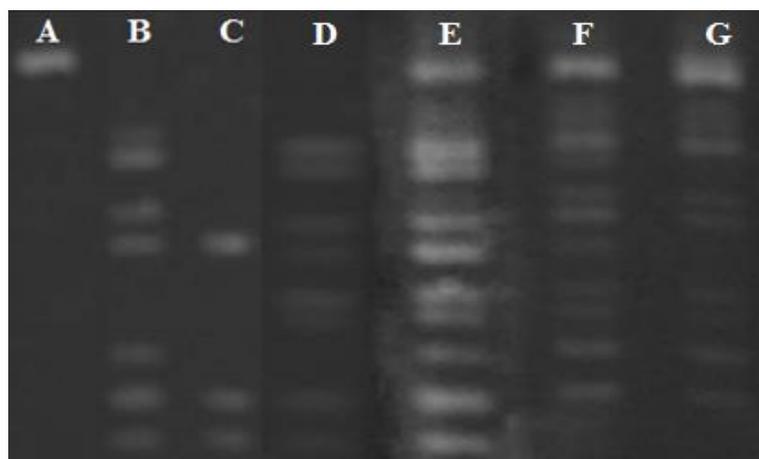


Figura 1- Padrões de digestão para identificação dos polimorfismos do gene HSP-70.1 em rebanhos leiteiros Holandês, Girolando (5/8 H-G) e Sindi no Estado de Pernambuco.

Entre os padrões apresentados, apenas três (B, D e E) estão presentes em todos os rebanhos, com frequências de: 22,44%, 8,97% e 51,92%, respectivamente. Os padrões A, F e G não foram compartilhados, enquanto o padrão C foi comum aos rebanhos Holandês e Sindi.

Os padrões identificados na amostra estudada foram utilizados para construção da árvore filogenética (Figura 2). Sua observação demonstrou a presença de cinco grupos principais (*clusters*), com a distância máxima observada entre os padrões sendo de 1,2908 assumindo 40% dessa distância (0,5163) para a formação de grupos.

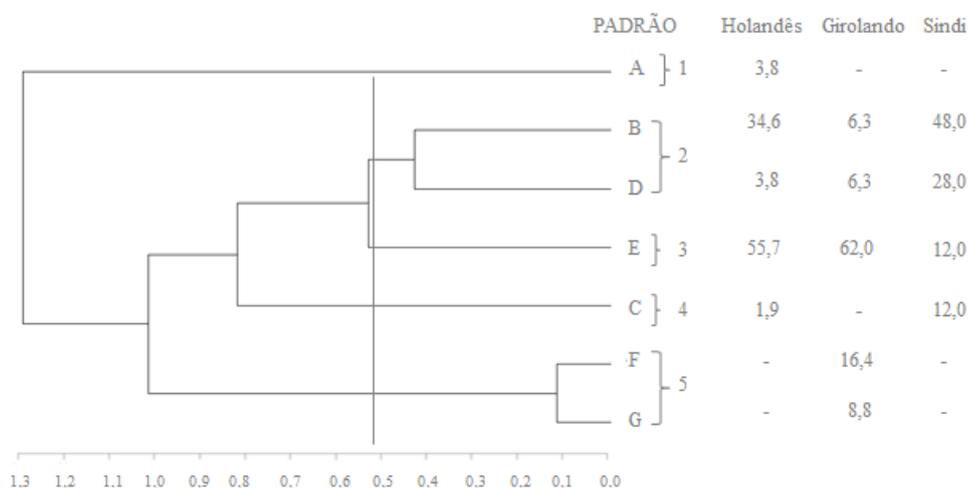


Figura 2- Dendrograma dos padrões PCR-RFLP e respectivas frequências (%) encontradas para o gene HSP-70.1 em rebanhos leiteiros Holandês, Girolando (5/8 H-G) e Sindi no Estado de Pernambuco (Distância de Jaccard, Método UPGMA).

O índice de diversidade padrão revelou maior diversidade entre os animais do rebanho Sindi quando comparado aos demais (Tabela 1).

Tabela 1-Índice de diversidade padrão para o gene HSP-70.1 em rebanhos leiteiros Holandês, Girolando (5/8 H-G) e Sindi no Estado de Pernambuco.

| Grupo genético | Índice de diversidade padrão |
|----------------|------------------------------|
| Holandês | 0.5769 ± 0.0468 |
| Girolando | 0.5797 ± 0.0561 |
| Sindi | 0.6900 ± 0.0642 |

A análise de variância molecular (AMOVA) demonstrou grande variação genética entre e dentro dos rebanhos, com a maior parte da variação ocorrendo dentro dos rebanhos para todos os grupos avaliados (Tabela 2). Este fato foi confirmado pelo índice de diferenciação genética (F_{ST}), que apresentou de níveis moderados a muito altos de diferenciação quando comparou-se as frequências dos padrões nos grupos genéticos (raças).

Tabela 2- AMOVA para as populações Holandês, Girolando (5/8 H-G) e Sindi para os polimorfismos do gene HSP-70.1.

| Grupo Genético | FV | CV | %V | FST** |
|--------------------------------|---------------------|------------|-------|---------|
| Holandês Girolando Sindi | Entre rebanhos | 0.46350 Va | 18.41 | 0.18413 |
| | Dentro dos rebanhos | 2.05368 Vb | 81.59 | |
| Holandês Girolando | Entre rebanhos | 0.32149 Va | 12.86 | 0.12857 |
| | Dentro dos rebanhos | 2.17902 Vb | 87.14 | |
| Holandês Sindi | Entre rebanhos | 0.30850 Va | 16.87 | 0.16874 |
| | Dentro dos rebanhos | 1.51981 Vb | 83.13 | |
| Girolando Sindi | Entre rebanhos | 0.86099 Va | 27.34 | 0.27344 |
| | Dentro dos rebanhos | 2.28772 Vb | 72.66 | |

FV: Fonte de variação; CV: Componentes de Variância; %V: Percentual de Variação ;

** Significativo a 1% ($p < 0,01$) para todas as comparações.

A árvore filogenética com a distância entre as raças (Figura 3) demonstra a presença de três diferentes grupos (*clusters*) com a distância máxima observada sendo de 1,1371, assumindo 40% dessa distância (0,4548) para a formação dos grupos. Observa-se que apesar das diferenças, a raça Holandesa aparece mais próxima à raça Girolando, demonstrando a participação genética do gado Holandês na formação do gado Girolando.

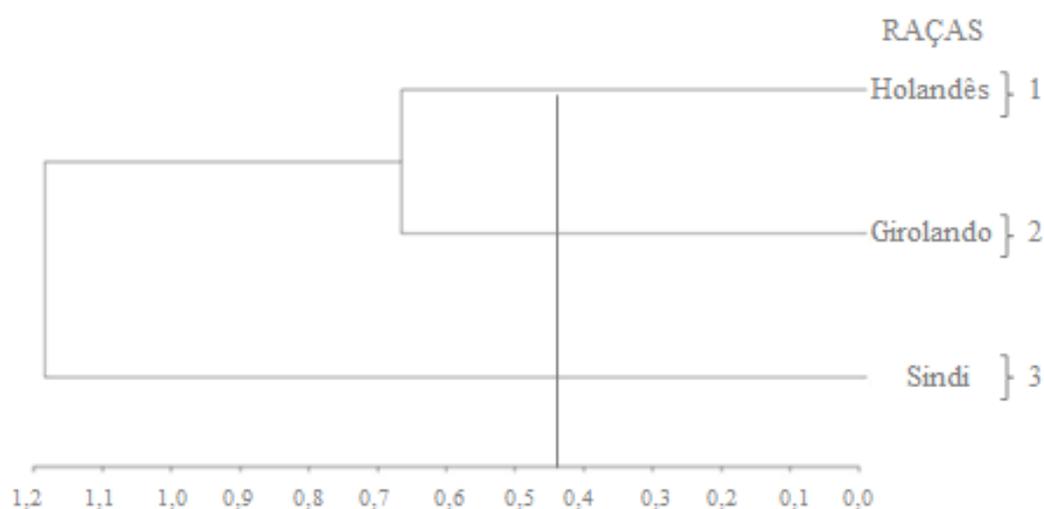


Figura 3- Dendrograma com a distância entre as raças Holandês, Girolando (5/8 H-G) e Sindi no Estado de Pernambuco (Distância de Jaccard, Método UPGMA).

O conhecimento da variabilidade genética entre populações aparece como peça fundamental para o melhoramento genético, a partir dele é possível tomar medidas adaptativas frente às mudanças ocasionadas pelo desenvolvimento dos sistemas de produção.

Apesar de surgirem de um ancestral comum, o gado europeu (*Bos taurus*) e o gado indiano (*Bos indicus*) submeteram-se a processos de evolução separados em função das migrações pré-históricas as quais contribuíram para a formação das muitas raças observadas atualmente que divergem geneticamente devido às adaptações sofridas ao longo do tempo (BRADLEY et al., 1996; JORGE, 2013).

Entretanto, a maior semelhança gênica observada neste estudo entre os padrões dos rebanhos Holandês e Sindi é um resultado fora do esperado, visto que maiores semelhanças deveriam ocorrer entre os rebanhos Holandês/Girolando ou Sindi/Girolando em função da participação das raças puras na formação da raça cruzada.

Verificou-se que a diversidade entre os rebanhos foi menor que a diversidade dentro do rebanho. Esta diversidade pode ser justificada em função do manejo reprodutivo adotado nas estações experimentais que utiliza a inseminação artificial. O uso de sêmen dos diversos touros disponíveis no mercado diminuem as chances de endogamia e fixação de alelos.

O gene HSP-70.1 apresenta papel vital na resposta ao estresse térmico e o conhecimento da variabilidade genética deste, vem a contribuir grandemente como a bovinocultura de leite do Estado, possibilitando a exploração das diferentes respostas apresentadas pelos animais em condições de estresse por calor.

Cada vez mais os produtores estão cientes de que o estresse térmico em bovinos leiteiros deve ser minimizado a fim de se manter a saúde, otimizar a produção e reduzir as perdas econômicas no rebanho (WOLFENSON et al., 2000).

CONCLUSÕES

A técnica PCR-RFLP mostrou-se eficiente na detecção de polimorfismos do gene HSP-70.1 permitindo a identificação de sete polimorfismos.

Diferentes graus de diversidade ocorreram entre os rebanhos avaliados, com alguns polimorfismos sendo comuns entre as raças, enquanto outros aparecem particularmente distribuídos.

As menores semelhanças observadas entre os padrões dos rebanhos Holandês e Girolando não eram esperadas diante da participação da raça pura na formação da raça cruzada.

Foi observada maior diversidade genética dentro dos rebanhos, com o índice de diferenciação genética apresentando níveis muito altos de diferenciação.

O conhecimento da variabilidade genética do gene HSP-70.1 vem a contribuir grandemente com a bovinocultura de leite do Estado, possibilitando a exploração das diferentes respostas apresentadas sob condições de estresse térmico por calor.

REFERÊNCIAS

ADAMOWICZ, T.; PERS, E.; LECHNIAK, D. A new SNP in the 3'-UTR of the HSP-70.1-1 Gene in *Bos taurus* and *Bos indicus*. **Biochemical Genetics**, v. 43, p.623–627, dec. 2005.

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, jan.2011.

BERNABUCCI, U. et al. Metabolic and hormonal acclimation to heat stress in domestic ruminants. **Animal**, v.4, n.7, p.1167-1183, jul. 2010.

BRADLEY, D.G. et al. Mitochondrial diversity and the origins of African and European cattle. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 93, n. 10, p. 5131-5135, may.1996.

CAMARGO, L.S. et al. Developmental competence and expression of the Hsp 70.1 gene in oocytes obtained from *Bos indicus* and *Bos taurus* dairy cows in a tropical environment. **Theriogenology**, v. 68, p. 626–632, marc. 2007.

CASTRO, S.V. et al. Heat shock protein HSP-70.1: structure and action in response to cellular stress. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.7, n. 4, p.261-271, oct. 2013.

DELFINO, L. J. et al. Influência de diferentes ambientes de pré-ordenha sobre os valores hematológicos de vacas Pardo-suíças em sistema biodinâmico de produção. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 8, n.2, p.08-15, jun. 2012.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. Arlequin suíte ver 3.5: Uma nova série de programas para realizar análises de genética de populações sob Linux e Windows. **Moleculares Ecology Resources**. v. 10, p. 564-567, 2010.

GADE, N. et al. Molecular Characterization of Heat Shock Protein 70-1 Gene of Goat (*Capra hircus*). **Molecular Biology International**, v. 7, p. 1-7, abri. 2010.

GROSZ, M. D.; WOMACK, J. E.; SKOW, L.C. Syntenic Conservation of HSP-70.1 Genes in Cattle and Humans. **Genomics**. v. 14, p. 863-868, aug.1992.

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

JACCARD, P. Nouvelles recherches sur la ditribution florale. **Bulletin de la Societe Vaudoise des Sciences Naturelles**. v. 44, p.223-270, 1908.

JORGE, W. A genômica bovina – Origem e evolução de taurinos e zebuinos. **Veterinária e Zootecnia**. v. 20, n. 2, p. 217-237, jun. 2013.

LACETERA, N. et al. 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, jul.2006.

LIMA, R. S. et al. Alterações celulares induzidas pelo estresse térmico em embriões bovinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 50, n. 4, p. 257-264, oct. 2013.

MARÓTI-AGÓTS, Á. et al. Possible genetic sign of heat stress adaptation in Hungarian Grey Bos taurus breed. **Acta Biologica Hungarica**. v. 62, p. 65–72. 2011.

NUNES, M. et al. Isolation of four *HSP-70.1* genes in the pig and localization on Chromosomes 7 and 14. **Mammalian Genome**. v.4, p. 247-251, jan. 1993.

PAWAR, H. et al. Molecular and Immunological Characterization of Heat Shock Protein 70 (HSP-70.1) Gene from Buffalo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, sep. 2012.

SODHI, M. et al. Novel polymorphisms in UTR and coding region of inducible heat shock protein 70.1 gene in tropically adapted Indian zebu cattle (*Bos indicus*) and riverine buffalo (*Bubalus bubalis*).**Gene**, v. 527, n.2, p. 606-615, sep. 2013

WOLFENSON, D.; ROTH, D.; MEIDAN, R. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. **Animal Reproduction Science**. v.60, n.2, p. 535–547, jul. 2000.

CAPÍTULO II

PERFIS PRODUTIVOS DE VACAS LEITEIRAS NO SEMIÁRIDO BRASILEIRO E SUA ASSOCIAÇÃO COM POLIMORFISMOS DO GENE HSP-70.1

RESUMO - As HSP-70.1 constituem a fração predominante da síntese de proteínas em células estressadas, agindo como chaperonas moleculares e desempenhando papel central na proteção celular. Polimorfismos encontrados para este gene apontam diferentes respostas adaptativas e conseqüentemente produtivas frente ao estresse celular. Assim, este trabalho objetivou associar os polimorfismos do gene HSP-70.1 a características produtivas em bovinos leiteiros do Estado de Pernambuco. O DNA foi extraído a partir de amostras de sangue total e foi utilizado para amplificação por PCR do gene HSP-70.1, em seguida realizou-se a digestão com Enzimas de restrição EcoRII. A associação entre o efeito dos polimorfismos sobre as características de produção de leite foi realizada pelo procedimento GLM do SAS 9.3, com as diferenças entre os valores dos perfis médios dos padrões sendo testadas por meio do teste t (LSD) a 5% de probabilidade. Sete polimorfismos foram identificados, sendo três destes compartilhados entre os rebanhos. A análise de variância demonstrou os fatores que influenciaram nas médias de produção. No teste de comparação múltipla de médias, diferenças significativas foram observadas para a variável produção de leite, com os rebanhos apresentando padrões de polimorfismos superiores diferentes. A fixação da característica de termotolerância vem a apoiar a elevação do padrão racial dos rebanhos, possibilitando a melhoria da exploração leiteira regional.

Palavras-chave: Produção de leite, PRC-RFLP, Termotolerância.

PROFILES PRODUCTION OF DAIRY COWS IN SEMIARID BRAZILIAN AND THEIR ASSOCIATION WITH GENE POLYMORPHISMS HSP-70.1

ABSTRACT - The HSP 70.1 constitute the predominant fraction of the synthesis of proteins in stressed cells, acting as molecular chaperones and to play a central role in cellular protection. Polymorphisms found for this gene suggest different adaptive responses and consequently productive forward to cellular stress. Thus, this study aimed to associate the polymorphisms of HSP-70.1 gene production characteristics in dairy cattle in the State of Pernambuco. DNA was extracted from whole blood samples and was used for PCR amplification of HSP 70.1 gene, then held EcoRII digestion with restriction enzymes. The association between polymorphisms of the effect on the milk production traits was conducted by the SAS procedure GLM 9.3, with differences between the average values of the profiles of patterns being tested by the t-test (LSD) at 5% probability. Seven polymorphisms were identified, three of them shared among the herds. Analysis of variance showed the factors that influenced in average production. In the multiple comparison of means test, significant differences were observed for the variable production of milk, with different herds patterns having higher polymorphisms. Fixing the thermotolerance feature comes to support raising the racial pattern of herds, enabling the improvement of regional dairy farm.

Keywords: Milk production, PRC-RFLP, Thermotolerance.

INTRODUÇÃO

O estresse térmico por calor é tido como um dos principais responsáveis pela redução da produção leiteira, dentre os vários fatores que contribuem para diminuição do desempenho produtivo, principalmente em regiões tropicais (BERNABUCCI et al., 2010).

Uma possível abordagem para redução desse impacto é melhorar geneticamente os rebanhos, selecionando animais com maior termotolerância (ROSENKRANS Jr., 2010; BASIRICO et al., 2011). Estudos demonstram diferenças genéticas favoráveis para a melhor adaptação térmica, com reflexos em níveis fisiológicos e celulares, confirmando as diferenças genéticas entre subespécies, raças, além de diferenças individuais que enaltecem a termotolerância (SODHI et al., 2013; XIONG et al., 2013).

A tolerância ao estresse por calor é mediada por uma família de proteínas denominadas proteínas de choque térmico (HSP), as quais tem sua síntese estimulada e agem como chaperonas moleculares quando as células são submetidas a diversos estímulos de estresse como o oxidativo, hipóxia, inflamação, térmico por calor ou frio (BASIRICO et al., 2011).

A família das HSP-70 aparece como principal responsável pela proteção celular sob condições de estresse, sobressaindo-se as HSP-70.1, consideradas as mais abundantes e sensíveis à temperatura (BECKHAM et al., 2004). A síntese de HSP-70.1, induzida pelo estresse térmico, representa um mecanismo molecular generalizado exibido por quase todas as células animais, mas diferenças individuais são observadas modificando a capacidade da célula de gerir contra o estresse (CAMARGO, 2007).

Um estudo realizado por Schewerin et al (2003) associou os polimorfismos encontrados em bovinos de leite ao valor genético estimado para “tempo produtivo de vida” e observou que animais que apresentavam o polimorfismo AP2 eram caracterizados por uma maior tolerância ao estresse, apresentando maior e melhor vida produtiva.

Outro estudo realizado com bovinos leiteiros associou os polimorfismos da região de codificação do gene HSP-70.1 ao escore de células somáticas (SCS), e observou que os animais com o genótipo CC apresentavam escores significativamente menores quando comparado aos outros genótipos avaliados, sugerindo-o como marcador molecular para melhorar o fenótipo anti-mastite daqueles animais (CHENG et al., 2009).

Recentemente, polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) de regiões de codificação não traduzidas do gene HSP-70.1 foram associados à tolerância ao calor em vacas holandesas. Os resultados revelaram diferenças significativas para a maioria das características de

tolerância dos animais que apresentaram o polimorfismo 1, recomendando sua utilização como marcador genético para a tolerância ao calor em bovinos de leite (XIONG, 2013).

No Brasil, a associação de polimorfismos do gene HSP-70.1 á características de produção em gado de leite é ainda desconhecida. Desta forma, o objetivo do presente estudo é avaliar a associação entre os polimorfismos do gene HSP-70.1 com características produtivas em vacas leiteiras do Estado de Pernambuco, na região semiárida.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 131 animais, sendo 52 da raça Holandesa e 79 da raça Girolando (5/8 H-G) pertencentes ao Instituto Agrônômico de Pernambuco - Estação Experimental de São Bento do Una e Arcoverde, localizados nas mesorregiões do Agreste Meridional e Sertão do Moxotó, respectivamente. Destes, foram coletadas alíquotas de 4,5 ml de sague por meio de punção venosa da jugular externa por meio do *vacutainer* com anticoagulante (EDTA) com as amostras sendo imediatamente acondicionadas em recipiente contendo gelo e posteriormente armazenadas sob refrigeração a - 20°C.

A extração de DNA foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular da Unidade Acadêmica de Garanhuns - UFRPE, por meio do Kit de extração *Axy Prep™ Blood Genomic DNA Miniprep Kit*[®] (Axygen), segundo as recomendações do fabricante. A qualidade do material extraído foi avaliado em gel de agarose a 1% corado com SYBR GREEN[®] (Invitrogen) visualizado em luz ultravioleta e fotodocumentado (Gel Logic 112[®], Kodak).

Para a amplificação do gene HSP-70.1 bovino, utilizou-se os primers descritos por Schwerin et al. (2003), a saber: *Forward*: 5'- GTCGCCAGGAAACCAGAGAC-3' e *Reverse*: 5'-GGAACACCCCTACGCAGGAG -3'. A reação totalizou um volume de 50 µL: 5 µL de tampão 1X, 5 mM de MgCl₂, 0,4 mM de dNTP, 0,2 unidades de taq DNA polimerase (*Invitrogen*) e 100 ng de DNA, sendo submetida aos seguintes parâmetros de termociclagem: desnaturação inicial a 94 °C por 5', 40 ciclos: 94 °C por 1', 63 °C por 1', 72 °C por 2' e extensão final por 5' a 72 °C. As reações foram realizadas em termociclador e o produto da amplificação foi posteriormente visualizado por eletroforese em gel de agarose a 5%.

Em seguida foi realizada digestão com a enzima de restrição EcoRII para identificação dos polimorfismos. A reação totalizou um volume final de 30 µL, sendo composta por 12 µL do produto da PCR, 15 µL de H₂O deionizada e autoclavada, 2 µL de Buffer 0 e 1 µL da enzima de restrição. A digestão foi realizada a 37 °C por 5 horas, sendo os fragmentos visualizados após eletroforese em gel de poliacrilamida a 8%.

Os polimorfismos foram identificados pelo padrão de bandas observado no gel e a partir deles realizou-se o estudo de associação entre o efeito dos polimorfismos sobre as características de produção de leite.

Os dados foram analisados por meio do modelo:

$$y_{ijk} = \mu + P_j + A_k + M_l + A_k * M_l + T_i + U_i + P_i + \epsilon_{ij}$$

onde: y_{ijk} é a i -ésima produção de leite (litros) por dia, μ é uma constante comum a todas as observações, P_j é o efeito do j -ésimo polimorfismo genético, A_k é o efeito do k -ésimo ano, M_l é o efeito do l -ésimo mês, $A_k * M_l$ é a interação do k -ésimo ano com o l -ésimo mês, T_i é a temperatura média diária ($^{\circ}\text{C}$), U_i é a umidade relativa média diária (%), P_i é a pluviosidade total diária (mm), ϵ_{ij} é o erro aleatório associado as observações, assumido com distribuição normal $N(0; \sigma^2_{\epsilon})$ e i.i.d. Os efeitos da temperatura, umidade relativa e pluviosidade foram considerados contínuos e os demais discretos.

Foram utilizadas 3.019 observações, obtidas entre os anos de 2006 a 2014. As análises foram realizadas utilizando o procedimento GLM do SAS 9.3, as diferenças entre os valores dos perfis médios dos padrões foram testadas por meio do teste t (LSD) a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se a formação de sete diferentes padrões de polimorfismos para o gene avaliado, a saber: A; B; C; D; E; F; G. O rebanho Holandês apresentou os padrões A, B, C, D, E enquanto no rebanho Girolando os padrões observados foram B, D, E, F e G (Figura 1).

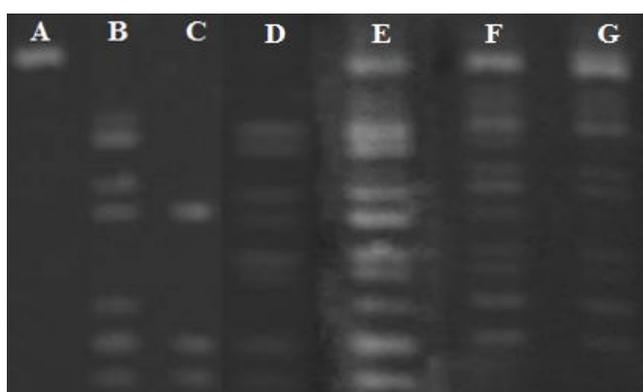


Figura 1- Padrões de digestão para identificação dos polimorfismos do gene HSP-70.1 em rebanhos leiteiros Holandês e Girolando (5/8 H-G) no Estado de Pernambuco.

As estatísticas descritivas para produção de leite estão sumarizadas na Tabela 1, e para os dados climáticos na Figura 2.

Tabela 1- Estatísticas descritivas para produção de leite em bovinos Holandês e Girolando, segundo o polimorfismo do gene HSP-70.1.

| Raça | Estatística | Polimorfismos | | | | | | |
|-----------|--------------|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | A | B | C | D | E | F | G |
| Holandês | Mínimo | 6,40 | 3,00 | 8,00 | 2,00 | 3,30 | | |
| | Média | 22,50 | 21,02 | 20,42 | 20,82 | 20,83 | | |
| | Máximo | 36,00 | 51,60 | 35,40 | 50,80 | 49,80 | | |
| | Desv. Padrão | 5,30 | 7,82 | 5,24 | 8,47 | 7,10 | | |
| | Coef. Var. | 23,50 | 37,10 | 25,66 | 40,68 | 34,01 | | |
| Girolando | Mínimo | | 4,00 | | 2,80 | 1,00 | 2,40 | 1,00 |
| | Média | | 8,49 | | 9,30 | 9,39 | 9,13 | 8,65 |
| | Máximo | | 18,00 | | 19,00 | 37,40 | 21,00 | 22,80 |
| | Desv. Padrão | | 2,62 | | 3,28 | 5,24 | 3,40 | 4,30 |
| | Coef. Var. | | 30,90 | | 35,33 | 55,86 | 37,24 | 49,72 |

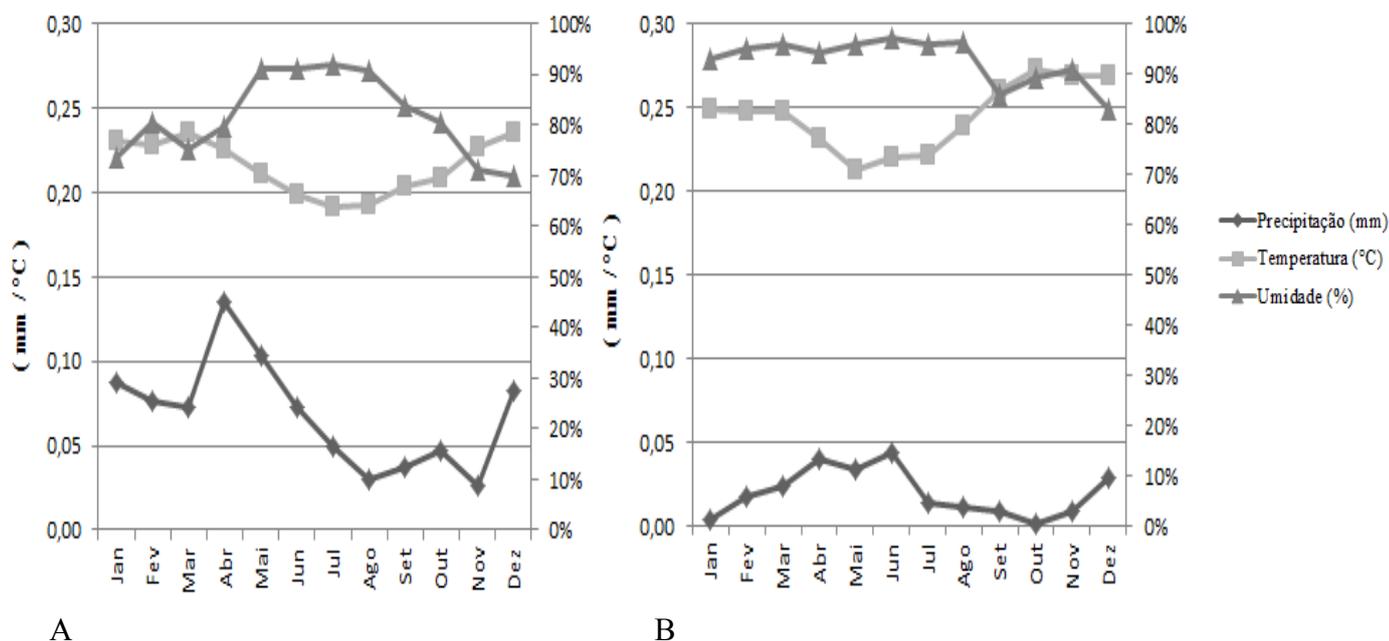


Figura 2- Médias climáticas de precipitação, temperatura e umidade nas cidades de São Bento do Una (A) e Arcoverde (B) entre os anos de 2006 a 2014.

A análise de variância demonstrou a significância dos efeitos sobre a variável produção de leite (Tabela 2), e foram observadas diferenças de produção em função dos padrões para ambos os rebanhos (Tabela 3).

Tabela 2- Análise de variância para os efeitos do padrão genético (polimorfismo) e variáveis climáticas sobre a produção de leite (l/dia).

| Fatores | Holandês | | Girolando | |
|--------------|-------------|---------|-------------|---------|
| | F calculado | P > F | F calculado | P > F |
| Padrão | 12,59 | <0,0001 | 3,24 | 0,0117 |
| Ano | 17,10 | <0,0001 | 39,60 | <0,0001 |
| Mês | 7,77 | <0,0001 | 0,65 | 0,7910 |
| Ano*Mês | 4,40 | <0,0001 | 2,10 | <0,0001 |
| Precipitação | 0,17 | 0,6762 | 0,01 | 0,9162 |
| Temperatura | 0,74 | 0,3914 | 2,89 | 0,0891 |
| Umidade | 1,29 | 0,2555 | 2,03 | 0,1541 |

Tabela 3- Médias produtivas (l/dia) para os padrões do gene HSP-70.1 em rebanho leiteiro Holandês e Girolando, no estado de Pernambuco.

| Padrão | Holandês | Girolando |
|--------|--------------------|--------------------|
| A | 24,35 ^a | |
| B | 17,64 ^b | 8,50 ^b |
| C | 23,06 ^a | |
| D | 18,74 ^b | 9,31 ^a |
| E | 17,22 ^b | 9,40 ^a |
| F | | 9,15 ^{ab} |
| G | | 8,65 ^{ab} |

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste t (LSD) a 5% de probabilidade.

Entre os padrões apresentados apenas três: B, D e E foram compartilhados entre os rebanhos. De acordo com as estatísticas descritivas, as maiores médias de produção foram obtidas pelos animais que apresentaram o padrão A no rebanho Holandês, e padrão E no rebanho Girolando (Tabela1), entretanto grandes diferenças são observadas entre as médias dos rebanhos o que possivelmente ocorre em função das diferenças raciais, visto que a raça Holandesa é especializada em produção de leite (ZANELA et al., 2006), assim como em função das condições climáticas apresentadas pelos locais onde os animais estão submetidos. Para obter-se incremento de produtividade em regiões que apresentam temperaturas elevadas, se faz necessário, além da utilização de genótipos mais produtivos, o oferecimento de um ambiente compatível com o requerimento do animal (FAÇANHA et al., 2013).

Apesar de ambas as cidades pertencerem à região semiárida brasileira, a cidade de São Bento do Una se encontra na mesorregião Agreste Meridional e apresenta condições climáticas mais amenas quando comparadas à cidade de Arcoverde, situada na mesorregião

do Sertão do Moxotó. Segundo Azevedo et al (2005) a zona de termoneutralidade para bovinos leiteiros situa-se entre 5 e 25°C, com isso, torna-se evidente o nível de estresse ao qual o rebanho Girolando estava sendo submetido, visto que temperaturas superiores ao nível crítico indicado pela literatura são observadas em boa parte do ano, além dos elevados valores de umidade relativa do ar e ínfimas médias de precipitação.

Os resultados da análise de variância demonstraram que o efeito dos polimorfismos apresentou maior relevância para o rebanho Holandês ($P < 0,0001$), apesar deste também influenciar os níveis produtivos dos animais Girolando ($P < 0,0117$) o que provavelmente ocorre em função da origem genética das raças. Os bovinos taurinos evoluíram em clima temperado e não foram expostos aos desafios presentes nas regiões tropicais, enquanto os zebuínos evoluíram nos trópicos na presença de elevadas cargas de calor resultando em raças que possuem boa adaptação ao estresse térmico (JORGE, 2013).

As variáveis climáticas não apresentaram influência para os rebanhos, visto que estes já possuem algumas décadas de seleção, enquanto os efeitos dos fatores ano, mês e a interação ano * mês foram significativos para ambos os rebanhos. Apesar das condições climáticas divergirem entre as mesorregiões do Estado, quando ocorrem longos períodos de estiagens, seus efeitos causam transtornos para toda a região e desencadeiam consequências severas que influenciam diretamente no manejo alimentar adotado nas propriedades, sendo a acentuada redução na oferta e qualidade da forragem durante as estações secas o fator determinante para redução dos níveis produtivos (SILVA et al. 2010).

Ao realizar-se o teste de comparação múltipla de médias, diferenças significativas para a variável produção de leite foram observadas em função dos padrões apresentados, para ambos os rebanhos (Tabela 3). Nos animais provenientes de São Bento do Una, os padrões A e C foram superiores e mostraram-se estatisticamente diferentes dos demais padrões observados nesse rebanho. Em contrapartida, nos animais Girolando foram os padrões E e D que destacaram-se apesar destes, não apresentarem diferenças significativas frente aos padrões F e G. Nesse rebanho as médias de produção para os polimorfismos do gene HSP-70.1 apresentaram-se mais uniformes, porventura o manejo conduzido neste rebanho que não apresenta nenhum artifício para redução do estresse térmico dos animais possa ter colaborado com os resultados apresentados.

CONCLUSÕES

O gene HSP-70.1 apresentou polimorfismos comuns entre as raças Holandesa e Girolando, entretanto polimorfismos particulares também foram observados.

Os rebanhos avaliados apresentaram padrões de polimorfismos superiores diferentes, no entanto ambos podem ser utilizados como indicadores de termotolerância desde que sejam levadas em consideração as diferenças raciais assim como as condições climáticas apresentadas na região onde os animais estejam localizados.

A fixação da característica de termotolerância vem a apoiar a elevação do padrão racial dos rebanhos, e possibilita a exploração leiteira regional.

REFERÊNCIAS

AZEVEDO, M. et al. Estimativa de níveis críticos superiores do índice de temperatura e umidade para vacas leiteiras^{1/2}, ^{3/4} e ^{7/8} Holandês-Zebu em lactação. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 34, p. 2000-2008, dec. 2005.

BASIRICO, L. et al. Cellular thermotolerance is associated with heat shock protein 70.1 genetic polymorphisms in Holstein lactating cows. *Cell Stress and Chaperones*, v. 16, p. 441–448, jan. 2011

BECKHAM, J.T. et al. Assessment of cellular response to thermal laser injury through bioluminescence imaging of heat shock protein. *Photochemistry and Photobiology*, v. 79, p.76-85, jan 2004.

BERNABUCCI, U. et al. Metabolic and hormonal acclimation to heat stress in domestic ruminants. *Animal*, v.4, n.7, p.1167-1183, jul. 2010.

CHENG W.J. et al. Genetic polymorphism of HSP-70.1 gene and its correlation with resistance to mastites in chinese Holstein. *Yi chuan= Hereditas/Zhongguo yi chuan xue hui bian ji*, v. 31, p. 169-174, jun. 2009.

CAMARGO, L.S. et al. Developmental competence and expression of the Hsp 70.1 gene in oocytes obtained from *Bos indicus* and *Bos taurus* dairy cows in a tropical environment. *Theriogenology*, v. 68, p. 626–632, marc. 2007.

FAÇANHA, D. A.E. et al. Tendências metodológicas para avaliação da adaptabilidade ao ambiente tropical. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v. 14, p. 91-103, mar. 2013.

JORGE, W. A genômica bovina – Origem e evolução de taurinos e zebuínos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 20, p. 217-237, jun. 2013.

ROSENKRANS Jr. et al. Calving traits of crossbred Brahman cows are associated with heat shock protein 70 genetic polymorphisms. **Animal Reproduction Science**, v. 119, p.178-182, feb. 2010.

SCHEWERIN, M. et al. Genetic predisposition for productive life is associated with functional inactivation of a AP2-binding site in the promoter of the stress protein 70.1-encoding gene in cattle. **Biochimica e Biophysica Acta**, v. 46, p. 177-185, sep. 2003.

SILVA, T.G.F. et al. Cenários de mudanças climáticas e seus impactos na produção leiteira em estados nordestinos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, p.863-870, mar. 2010.

SODHI, M. et al. Novel polymorphisms in UTR and coding region of inducible heat shock protein 70.1 gene in tropically adapted Indian zebu cattle (*Bos indicus*) and riverine buffalo (*Bubalus bubalis*). **Gene**, v. 527, n.2, p. 606-615, sep. 2013

XIONG, Q. et al. Association analysis of HSP70A1A haplotypes with heat tolerance in Chinese Holstein cattle. **Cell Stress and Chaperones**, v.18, p. 711-718, mar. 2013.

ZANELA, M. B. et al. Qualidade do leite em sistemas de produção na região Sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 153-159, jan. 2006.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante da importância da pecuária de leite para a região Nordeste do país, cada vez mais torna-se indispensável estudos que venham possibilitar a melhoria das condições térmicas dos animais, conseqüentemente proporcionando melhoria na produção.

A técnica utilizada neste estudo mostrou-se eficiente para a detecção de polimorfismos do gene HSP-70.1 e permitiu a identificação de polimorfismos com diferentes graus de diversidade ocorrendo entre os rebanhos.

Alguns polimorfismos foram comuns entre as raças, enquanto outros apresentaram-se particularmente distribuídos.

É importante o conhecimento da variabilidade genética do gene HSP-70.1, visto que este pode contribuir para a exploração das diferentes respostas apresentadas sob condições de estresse térmico por calor.

Condições climáticas distintas exercem efeitos diferenciados e podem influenciar a produção de leite nos rebanhos tropicais.

Alguns padrões apresentaram superioridade nas médias de produção sugerindo que podem ser utilizados como indicadores para termotolerância em programas de melhoramento genético que busquem melhorar esta característica.

Diante das condições climáticas observadas na região semiárida do estado de Pernambuco, a fixação da característica de termotolerância vem a apoiar a elevação do padrão racial dos rebanhos, possibilitando a melhoria da exploração leiteira regional.

ANEXOS

ANEXO A – Normas para publicação na revista Caatinga.

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

· **Digitação:** o texto deve ser composto em programa Word (DOC ou RTF) ou compatível e os gráficos em programas compatíveis com o Windows, como Excel, e formato de imagens: Figuras (GIF) e Fotos (JPEG). Deve ter no máximo de 20 páginas, A4, digitado em espaço 1,5, fonte Times New Roman, estilo normal, tamanho doze e parágrafo recuado por 1 cm. Todas as margens deverão ter 2,5 cm. Páginas e linhas devem ser numeradas; os números de páginas devem ser colocados na margem inferior, à direita e as linhas numeradas de forma contínua. Se forem necessárias outras orientações, entre em contato com o Comitê Editorial ou consulte o último número da Revista Caatinga. As notas devem apresentar até 12 páginas, incluindo tabelas e figuras. As revisões são publicadas a convite da Revista. O manuscrito não deverá ultrapassar 2,0 MB.

· **Estrutura:** o artigo científico deverá ser organizado em título, nome do(s) autor(es), resumo, palavras-chave, título em inglês, abstract, keywords, introdução, material e métodos, resultados e discussão, conclusão, agradecimentos (opcional), e referências.

· **Título:** deve ser escrito em maiúsculo, negrito, centralizado na página, no máximo com 15 palavras, não deve ter subtítulo e abreviações. Com a chamada de rodapé numérica, extraída do título, devem constar informações sobre a natureza do trabalho (se extraído de tese/dissertação) e referências às instituições colaboradoras. O nome científico deve ser indicado no título apenas se a espécie for desconhecida. Os títulos das demais seções da estrutura (resumo, abstract, introdução, material e métodos, resultados e discussão, conclusão, agradecimentos e referências) deverão ser escritos em letra maiúscula, negrito e justificado à esquerda.

· **Autores(es):** nomes completos (sem abreviaturas), em letra maiúscula, um após o outro, separados por vírgula e centralizados na linha. Como nota de rodapé na primeira página, indicar, para cada autor, afiliação completa (departamento, centro, instituição, cidade, país), endereço completo e e-mail do autor correspondente. Este deve ser indicado por um “*”. Só serão aceitos, no máximo, cinco autores. Caso ultrapasse esse limite, os autores precisam comprovar que a pesquisa foi desenvolvida em regiões diferentes.

Na primeira versão do artigo submetido, os nomes dos autores e a nota de rodapé com os endereços deverão ser omitidos. Para a inserção do(s) nome(s) do(s) autor(es) e do(s)

endereço(s) na versão final do artigo deve observar o padrão no último número da Revista Caatinga (<http://caatinga.ufersa.edu.br/index.php/sistema>).

- **Resumo e Abstract:** no mínimo 100 e no máximo 250 palavras.
- **Palavras-chave e Keywords:** em negrito, com a primeira letra maiúscula. Devem ter, no mínimo, três e, no máximo, cinco palavras, não constantes no Título/Title e separadas por ponto (consultar modelo de artigo).

Obs. Em se tratando de artigo escrito em idioma estrangeiro (Inglês ou Espanhol), o título, resumo e palavras-chave deverão, também, constar em Português, mas com a seqüência alterada, vindo primeiro no idioma estrangeiro.

- **Introdução:** no máximo, 550 palavras, contendo citações atuais que apresentem relação com o assunto abordado na pesquisa.
- **Citações de autores no texto:** devem ser observadas as normas da ABNT, NBR 10520 de agosto/2002. Ex: Torres (2008) ou (TORRES, 2008); com dois autores, usar Torres e Marcos Filho (2002) ou (TORRES; MARCOS FILHO, 2002); com mais de três autores, usar Torres et al. (2002) ou (TORRES et al., 2002).
- **Tabelas:** serão numeradas consecutivamente com algarismos arábicos na parte superior. Não usar linhas verticais. As linhas horizontais devem ser usadas para separar o título do cabeçalho e este do conteúdo, além de uma no final da tabela. Cada dado deve ocupar uma célula distinta. Não usar negrito ou letra maiúscula no cabeçalho. Recomenda-se que as tabelas apresentem 8,2 cm de largura, não sendo superior a 17 cm (consulte o modelo de artigo), acessando a página da Revista Caatinga (<http://periodico.caatinga.ufersa.edu.br/index.php/sistema>).
- **Figuras:** gráficos, fotografias ou desenhos levarão a denominação geral de **Figura** sucedida de numeração arábica crescente e legenda na parte inferior. Para a preparação dos gráficos deve-se utilizar “softwares” compatíveis com “Microsoft Windows”. A resolução deve ter qualidade máxima com pelo menos 300 dpi. As figuras devem apresentar 8,5 cm de largura, não sendo superior a 17 cm. A fonte empregada deve ser a Times New Roman, corpo 10 e não usar negrito na identificação dos eixos. As linhas dos eixos devem apresentar uma espessura de 1,5 mm de cor preta. A Revista Caatinga reserva-se ao direito de não aceitar tabelas e/ou figuras com o papel na forma “paisagem” ou que apresentem mais de 17 cm de largura. Tabelas e Figuras devem ser inseridas logo após à sua primeira citação.

· **Equações:** devem ser digitadas usando o editor de equações do Word, com a fonte Times New Roman. As equações devem receber uma numeração arábica crescente. As equações devem apresentar o seguinte padrão de tamanho:

Inteiro = 12 pt

Subscrito/sobrescrito = 8 pt

Sub-subscrito/sobrescrito = 5 pt

Símbolo = 18 pt

Subsímbolo = 14 pt

Estas definições são encontradas no editor de equação no Word.

· **Referências:** devem ser digitadas em espaço 1,5 cm e separadas entre si pelo mesmo espaço (1,5 cm). Precisam ser apresentadas em ordem alfabética de autores, Justificar (Ctrl + J) - NBR 6023 de agosto/2002 da ABNT.

UM PERCENTUAL DE 60% DO TOTAL DAS REFERÊNCIAS DEVERÁ SER ORIUNDO DE PERIÓDICOS CIENTÍFICOS INDEXADOS COM DATA DE PUBLICAÇÃO INFERIOR A 10 ANOS.

O título do periódico não deve ser aperiado e recomenda-se um total de 20 a 30 referências. EVITE CITAR RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS E PUBLICADOS EM CONGRESSOS E SIMILARES. REGRAS DE ENTRADA DE AUTOR

Até 3 (três) autores

Mencionam-se todos os nomes, na ordem em que aparecem na publicação, separados por ponto e vírgula.

Ex: TORRES, S. B.; PAIVA, E. P. PEDRO, A. R. Teste de deterioração controlada para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de jiló. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 0, n. 0, p. 00-00, 2010.

Acima de 3 (três) autores

Menciona-se apenas o primeiro nome, acrescentando-se a expressão **et al.**

Ex: BAKKE, I. A. et al. Water and sodium chloride effects on *Mimosa tenuiflora* (Willd.) poiret seed germination. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 19, n. 3, p. 261-267, 2006.

Grau de parentesco

HOLANDA NETO, J. P. **Método de enxertia em cajueiro-anão-precoce sob condições de campo em Mossoró-RN**. 1995. 26 f.

Monografia (Graduação em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura de Mossoró, Mossoró, 1995.

MODELOS DE REFERÊNCIAS:

a) Artigos de Periódicos: Elementos essenciais:

AUTOR. Título do artigo. **Título do periódico**, Local de publicação (cidade), n.º do volume, n.º do fascículo, páginas inicial-final, mês (apreviado), ano.

Ex: BAKKE, I. A. et al. Water and sodium chloride effects on *Mimosa tenuiflora* (Willd.) poiret seed germination. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 19, n. 3, p. 261-267, set. 2006.

b) Livros ou Folhetos, no todo: Devem ser referenciados da seguinte forma: AUTOR.

Título: subtítulo. Edição. Local (cidade) de publicação: Editora, data. Número de páginas ou volumes. (nome e número da série)

Ex: RESENDE, M. et al. **Pedologia:** base para distinção de ambientes. 2. ed. Viçosa, MG: NEPUT, 1997. 367 p. OLIVEIRA, A. I.; LEONARDOS, O. H. **Geologia do Brasil**. 3. ed. Mossoró: ESAM, 1978. 813 p. (Coleção mossoroense, 72).

c) Livros ou Folhetos, em parte (Capítulo de Livro):

AUTOR DO CAPÍTULO. Título do capítulo. In: AUTOR DO LIVRO. **Título:** subtítulo do livro. Número de edição. Local de publicação (cidade): Editora, data. Indicação de volume, capítulo ou páginas inicial-final da parte.

Ex: BALMER, E.; PEREIRA, O. A. P. Doenças do milho. In: PATERNIANI, E.; VIEGAS, G. P. (Ed.). **Melhoramento e produção do milho**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. v. 2, cap. 14, p. 595-634.

d) Dissertações e Teses: (somente serão permitidas citações recentes, PUBLICADAS NOS ÚLTIMOS TRÊS ANOS QUE ANTECEDEM A REDAÇÃO DO ARTIGO). Referenciam-se da seguinte maneira: AUTOR. **Título:** subtítulo. Ano de apresentação. Número de folhas ou volumes. Categoria (grau e área de concentração) - Instituição, local.

Ex: OLIVEIRA, F. N. **Avaliação do potencial fisiológico de sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.)**. 2011. 81 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia: Área de Concentração em Tecnologia de Sementes) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2011.

e) Artigos de Anais ou Resumos: (DEVEM SER EVITADOS)

NOME DO CONGRESSO, n.º, ano, local de realização (cidade). Título... subtítulo. Local de publicação (cidade): Editora, data de publicação. Número de páginas ou volumes.

Ex: BALLONI, A. E.; KAGEYAMA, P. Y.; CORRADINI, I. Efeito do tamanho da semente de *Eucalyptus grandis* sobre o vigor das mudas no viveiro e no campo. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 3., 1978, Manaus. **Anais...** Manaus: UFAM, 1978. p. 41-43.

f) Literatura não publicada, mimeografada, datilografada etc.:

Ex: GURGEL, J. J. S. **Relatório anual de pesca e piscicultura do DNOCS**. Fortaleza: DNOCS, 1989. 27 p. Datilografado.

g) Literatura cuja autoria é uma ou mais pessoas jurídicas:

Ex: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023: informação e documentação – referências – elaboração**. Rio de Janeiro, 2002. 24 p.

h) Literatura sem autoria expressa:

Ex: NOVAS Técnicas – Revestimento de sementes facilita o plantio. **Globo Rural**, São Paulo, v. 9, n. 107, p. 7-9, jun. 1994.

i) Documento cartográfico:

Ex: INSTITUTO GEOGRÁFICO E CARTOGRÁFICO (São Paulo, SP). **Regiões de governo do Estado de São Paulo**. São Paulo, 1994. 1 atlas. Escala 1:2.000.

J) Em meio eletrônico (CD e Internet): Os documentos /informações de **acesso exclusivo por computador** (on line) compõem-se dos seguintes elementos essenciais para sua referência:

AUTOR. Denominação ou título e subtítulo (se houver) do serviço ou produto, indicação de responsabilidade, endereço eletrônico entre ossinais < > precedido da expressão – Disponível em: – e a data de acesso precedida da expressão – Acesso em:.

Ex: BRASIL. Ministério da Agricultura e do abastecimento. **SNPC – Lista de Cultivares protegidas**. Disponível em:<<http://agricultura.gov.br/scpn/list/200.htm>>. Acesso em: 08 sep. 2008.

GUNCHO, M. R. A educação à distância e a biblioteca universitária. In: SEMINÁRIO DE BIBLIOTECAS UNIVERSITÁRIAS, 10., 1998, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: Tec Treina, 1998. 1 CD-ROM.