

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITO DO ESTRESSE SOBRE A EXPRESSÃO DE HSP70 EM
EMBRIÕES E A RESPOSTA IMUNE PÓS-ECLOSÃO EM
FRANGOS DE CORTE**

Denise Fontana Figueiredo

Orientador: Prof. Dr. Marcos Macari

Co-orientadora: Prof^a . Dr^a . PatríciaGivisiez

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal-UNESP, como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Zootecnia, Área de Concentração em Produção Animal.

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Março de 2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

DENISE FONTANA FIGUEIREDO - nasceu em Maringá - PR, ao dia 6 de Dezembro de 1977. Graduou-se em Zootecnia na Universidade Estadual de Maringá (UEM) em Março de 2002. Durante o curso de graduação, foi bolsista de iniciação científica do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Iniciou o Mestrado em Março de 2002 na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Campus de Jaboticabal, em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal, sob orientação do Prof. Dr. Marcos Macari. Em Junho de 2003, mediante processo interno de seleção, foi selecionada para continuar seus estudos na mesma instituição em nível de Doutorado, sem a necessidade de defender o Mestrado. Contemplada com bolsa do Programa de doutorado no País com Estágio no Exterior (PDEE) da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) de Março de 2005 a Agosto de 2005, período em que permaneceu na Katholieke Universiteit Leuven, em Leuven, Bélgica, sob orientação do Prof. Dr. Eddy Decuypere. Em Março de 2006 submeteu sua Tese de Doutorado à banca examinadora.

“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

A Deus,
por Seu amor e misericórdia supremos,
pelas bênçãos derramadas dia após dia,
pelas provações impostas,
pela força para superá-las,
por mostrar quão ínfimos somos sem Sua presença.

Agradeço.

Aos meus pais, Marcio e Marlene,
pelo amor incondicional,
pelo exemplo de vida,
pelo incentivo, compreensão e paciência,
por todas as lágrimas derramadas,
por serem meu porto seguro,
por nunca me deixarem naufragar.

Dedico.

Aos meus irmãos, Guilherme e Bruno,
pelo amor e carinho,
pela convivência,
pela compreensão durante a falta de convivência,
por serem minhas eternas crianças.

Ofereço.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marcos Macari, pela orientação, exemplo profissional, ensinamentos e esforços dispensados no decorrer dos últimos anos.

Ao Prof. Dr. Eddy Decuypere, pela oportunidade oferecida, por me receber e orientar em seu laboratório na Bélgica.

À Prof^a. Dr^a. Patrícia Emília Naves Givisiez, pela co-orientação, ensinamentos, paciência, generosidade, dedicação, amizade e acima de tudo, pelo exemplo de ser humano.

À Prof^a. Dr^a. Alice Eiko Murakami, por ter me ensinado os primeiros passos na pesquisa científica e pela amizade.

Ao Prof. Dr. João Martins Pizauro Jr., por ter aberto as portas de seu laboratório para realização de parte das análises, pela participação na banca examinadora do exame de qualificação, por seus ensinamentos, pela agradável convivência, apoio e amizade.

À Prof^a. Dr^a. Isabel Cristina Boleli e à Prof^a. Dr^a. Maria Inês Tiraboschi Ferro, pela participação na banca examinadora do exame de qualificação, sugestões e demais auxílios prestados ao longo do curso.

Ao Prof. Dr. Renato Luís Furlan, pela leitura crítica dos manuscritos, ensinamentos, sugestões e amizade.

Ao Prof. Dr. Hélio José Montassier, pela cessão do laboratório para realização de parte das análises e pelos ensinamentos.

Aos amigos do Departamento de Fisiologia, Clara, Damares, Euclides e Shirley; e àqueles que se tornaram quase irmãos, Brenda, Daniel Emygdio, Daniel Mendes, Karoll, Paulo Rosa e Tiago, e todos outros, pela convivência.

Às técnicas de laboratório e anjos da guarda de plantão, Fátima Harnich e Lurdinha Tamanini, por todo o apoio no decorrer da realização das análises, carinho e amizade.

Aos amigos conquistados durante a pós-graduação, Bete Pelicano, Celso, Cibele, Frank, Gisele, Luís Daniel, Maria Cristina, Maria Marta, Maria Luiza, Ramon, Tânia Mara, Vanessa e Prof^a. Dr^a. Vera Moraes, por tudo o que vocês significam individualmente, pela ajuda que vocês talvez nem saibam que prestaram e por serem, no mínimo, surpreendentes.

Aos amigos da Bélgica, Anneleen, Bart, Christine, Evelyne, Flip, Johan, Kristof, Leopoldo, Lieve, Maíra, Nadia, Okanlawon, Paulo, Pieter, Quirine, Tom, Tona, Verlee, muito obrigada pelo carinho, pelas cervejas e por tornarem a distância suportável.

Às queridas amigas paranaenses Carla Valéria, Denize, Emiliana, Juliana e Marcia Rizzo, por compartilharem durante anos alegrias e tristezas, vitórias e derrotas, pela cumplicidade e pela amizade que o tempo e a distância só fazem aumentar.

Aos meus tios, Roseli e David, pelo amor, apoio e aconselhamento em todos os momentos.

À D. Carmem e Sr. Delvecchio, pelo imenso carinho e por me acolherem em sua família como a uma filha.

Aos funcionários da FCAV, em especial aos funcionários da Seção de Pós-graduação e da Biblioteca.

Ao CNPq e a Capes, pela bolsa concedida no país e durante o Programa PDEE, e pelo financiamento da pesquisa.

A todos que fizeram parte desta caminhada e que não foram citados aqui, por esquecimento, minhas sinceras desculpas e muito obrigada.

SUMÁRIO

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE TABELAS.....	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
CAPÍTULO 1 – ESTRESSE TÉRMICO E RESPOSTAS HORMONAIS E MOLECULARES EM FRANGOS DE CORTE.....	01
Introdução.....	01
Histórico.....	03
Estrutura molecular da hsp70.....	04
Promotores gênicos de choque térmico.....	06
a. Elementos de choque térmico (HSE).....	06
b. Fatores de choque térmico (HSF).....	07
c. Interações HSF-HSE.....	08
d. Ativação.....	08
e. hsp40.....	10
Funções das hsp70.....	12
hsp70 e função imune.....	15
Estresse embrionário e resposta endócrina.....	20
CAPÍTULO 2 - EXPRESSÃO DE hsp70 NA BURSA CLOACAL E CONCENTRAÇÃO DE CORTICOSTERONA EM PLASMA DE EMBRIÕES SUBMETIDOS A TRATAMENTO TÉRMICO INTERMITENTE MODERADO E RESPOSTA IMUNE PÓS-ECLOSÃO EM FRANGOS DE CORTE.....	25
Resumo.....	25
Introdução.....	26
Material e métodos.....	28
Resultados e Discussão.....	33
CAPÍTULO 3 – EXPRESSÃO DE hsp70 NA BURSA CLOACAL E CONCENTRAÇÃO DE CORTICOSTERONA EM PLASMA DE EMBRIÕES SUBMETIDOS A ESTRESSE TÉRMICO AGUDO E RESPOSTA IMUNE PÓS-ECLOSÃO EM FRANGOS DE CORTE.....	41
Resumo.....	41
Introdução.....	42
Material e métodos.....	44
Resultados e Discussão.....	49

CAPÍTULO 4 – EFEITOS DA INJEÇÃO DE DEXAMETASONA E DA HIPÓXIA DURANTE A INCUBAÇÃO SOBRE A EXPRESSÃO DE hsp70 PRÉ E PÓS-ECLOSÃO EM TECIDOS DE FRANGOS DE CORTE.....	57
Resumo.....	57
Introdução.....	58
Material e métodos.....	59
Resultados e Discussão.....	65
CAPÍTULO 5 – IMPLICAÇÕES.....	72
Referências bibliográficas.....	74

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
CAPÍTULO 1 – ESTRESSE TÉRMICO EMBRIONÁRIO E RESPOSTAS HORMONAIIS E MOLECULARES EM FRANGOS DE CORTE.....	1
Figura 1 – Estrutura molecular da hsp70 e hsc70 humanas (extraído de KIANG & TSOKOS, 1998).....	5
Figura 2 – Modelo de regulação do HSF (extraído de MORIMOTO <i>et al.</i> , 1994).....	9
Figura 3 – Modelo proposto de dois modos de interação entre DnaJ (hsp40) e DnaK(hsp70) (extraído de SUH <i>et al.</i> , 1999).....	11
Figura 4 - Esquema de desenvolvimento da função das adrenais em poedeiras (extraído de AVRUTINA <i>et al.</i> , 1985).....	23
CAPÍTULO 2 - EXPRESSÃO DE hsp70 NA BURSA CLOACAL E CONCENTRAÇÃO DE CORTICOSTERONA EM PLASMA DE EMBRIÕES SUBMETIDOS A ESTRESSE TÉRMICO INTERMITENTE MODERADO E RESPOSTA IMUNE PÓS-ECLOSÃO EM FRANGOS DE CORTE.....	25
Figura 1 - Membrana de “Western blotting” com bandas de hsp70 em bursa de embriões expostos ao tratamento por frio ou calor aos 14 dias de incubação.....	33
Figura 2 – Médias \pm erro-padrão dos níveis de hsp70 em bursa de embriões de frangos de corte submetidos a tratamento térmico embrionário moderado, aplicado dos 13 aos 19 dias de incubação.....	34
Figura 3 – Médias ajustadas da expressão de hsp70 em bursa de embriões de frangos de corte submetidos a tratamento térmico moderado, para efeito de dia de incubação.....	35
Figura 4 – Médias \pm erro-padrão dos níveis de corticosterona no plasma de embriões de frangos de corte submetidos a tratamento térmico embrionário moderado aplicado dos 13 aos 19 dias de incubação.....	36
Figura 5 – Médias ajustadas dos níveis de corticosterona no plasma de embriões de frangos de corte submetidos a tratamento térmico moderado, para efeito de dia de incubação.....	37

Figura 6 – Peso à eclosão de pintainhos submetidos a tratamento térmico moderado aplicado dos 13 aos 19 dias de incubação e aos 7 dias de idade.....	38
Figura 7 – Médias \pm erro-padrão da relação S/P (absorbância a 650 nm) no soro das aves submetidas a tratamento térmico embrionário moderado do 13 ^o ao 19 ^o dia de incubação, criadas em termoneutralidade e vacinadas aos 7 dias contra o vírus da Doença de Newcastle, para efeito de tratamento.....	39
Figura 8 – Médias \pm erro-padrão da relação S/P (absorbância a 650 nm) no soro das aves submetidas a tratamento térmico embrionário moderado do 13 ^o ao 19 ^o dia de incubação, criadas em termoneutralidade e vacinadas aos 7 dias contra o vírus da Doença de Newcastle, para efeito de idade.....	39
CAPÍTULO 3 – EXPRESSÃO DE hsp70 NA BURSA CLOACAL E CONCENTRAÇÃO DE CORTICOSTERONA EM PLASMA DE EMBRIÕES SUBMETIDOS A ESTRESSE TÉRMICO AGUDO E RESPOSTA IMUNE PÓS-ECLOSÃO EM FRANGOS DE CORTE.....	41
Figura 1 – Membrana de “Western blotting” com bandas de hsp70 em bursa de embriões expostos ao tratamento por frio ou calor.....	49
Figura 2 - Desdobramento da interação entre dia de incubação e tratamentos para a concentração de hsp70 na bursa cloacal de embriões de frangos de corte que sofreram estresse térmico embrionário agudo dos 13 aos 19 dias de incubação.....	50
Figura 3 – Desdobramento da interação entre dia de incubação e tratamentos para a concentração de corticosterona no plasma de embriões de frangos de corte que sofreram estresse térmico embrionário agudo dos 13 aos 19 dias de incubação.....	52
Figura 4 – Desdobramento da interação entre tratamentos e dia de incubação para peso da bursa cloacal (mg) relativo ao peso de embriões de frangos de corte submetidos a estresse agudo embrionário dos 13 aos 19 dias de incubação.....	53
Figura 5 - Médias \pm erro-padrão da relação S/P (absorbância a 650 nm) em soro de frangos de corte submetidos a estresse térmico embrionário agudo de acordo com o dia de incubação.....	54
Figura 6 – Desdobramento da interação entre tratamentos e idade para relação S/P (absorbância a 650 nm) em soro de frangos de corte submetidos a episódios de estresse agudo embrionário entre o 13 ^o e 19 ^o dia de incubação.....	55

CAPÍTULO 4 – EFEITOS DA INJEÇÃO DE DEXAMETASONA E DA HIPÓXIA DURANTE A INCUBAÇÃO SOBRE A EXPRESSÃO DE hsp70 PRÉ E PÓS-ECLOSÃO EM TECIDOS DE FRANGOS DE CORTE.....	57
Figura 1 - Produto final da real-time PCR (35 ciclos) para hsp70 obtidos a partir de 2 µg de RNA total de músculo peitoral de embriões de frangos de corte (eclosão), analisados em gel de agarose (2%).....	63
Figura 2 - Produto final da real-time PCR (35 ciclos) para 18S obtidos a partir de 2 µg de RNA total de músculo peitoral de embriões de frangos de corte (IP), analisados em gel de agarose (2%).....	63
Figura 3 – Expressão da hsp70 em relação ao tratamento Co/Ve em fígado de embriões no estágio de “internal pipping”.....	67
Figura 4 – Expressão da hsp70 em relação ao tratamento Co/Ve em fígado de embriões na eclosão.....	67
Figura 5 – Expressão da hsp70 em relação ao tratamento Co/Ve em fígado de pintainhos aos 7 dias de idade.....	68
Figura 6 – Expressão da hsp70 em relação ao tratamento Co/Ve em músculo peitoral de embriões no estágio de “internal pipping”.....	69
Figura 7 – Expressão da hsp70 em relação ao tratamento Co/Ve em músculo peitoral de embriões na eclosão.....	69
Figura 8 – Expressão da hsp70 em relação ao tratamento Co/Ve em músculo peitoral de pintainhos aos 7 dias.....	70

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO 4 – EFEITOS DA INJEÇÃO DE DEXAMETASONA E DA HIPÓXIA DURANTE A INCUBAÇÃO SOBRE A EXPRESSÃO DE hsp70 PRÉ E PÓS-ECLOSÃO EM TECIDOS DE FRANGOS DE CORTE.....	57
Tabela 1 – Pares de iniciadores para hsp70 e 18S.....	63
Tabela 2. Tabela para cálculo da expressão de hsp70 pelo método comparativo, utilizando-se o 18S como calibrador.....	64
Tabela 3 – Quantificação relativa usando o método do Ct comparativo para amostras de músculo no estágio de “internal pipping”.....	65

EFEITO DO ESTRESSE SOBRE A EXPRESSÃO DE HSP70 EM EMBRIÕES E A RESPOSTA IMUNE PÓS-ECLOSÃO EM FRANGOS DE CORTE

RESUMO

Foram realizados dois experimentos com o objetivo de avaliar os efeitos da alteração da temperatura durante a incubação sobre a expressão de hsp70 na bursa cloacal de embriões de frangos de corte e sobre a posterior resposta imune humoral das aves após a eclosão. No primeiro experimento se utilizou de tratamento por frio e por calor no terço final do período embrionário. Foram observadas diferenças entre tratamentos, sendo que o tratamento por frio levou a menor expressão de hsp70. Não foram observadas diferenças entre tratamentos para a resposta imune humoral. No segundo experimento aplicou-se estresse agudo por frio ou calor do 13º ao 19º dia de incubação. Os parâmetros avaliados foram os mesmos descritos acima. O estresse agudo embrionário aumentou a síntese de hsp70 na bursa e provocou melhora na resposta imune humoral das aves. O terceiro experimento compreende o trabalho realizado na Katholieke Universiteit Leuven como parte do Estágio de Doutorando, financiado pela CAPES. Aplicou-se, nos dez primeiros dias de incubação, um tratamento por ausência de ventilação (hipóxia), e posteriormente, um segundo tratamento pela injeção de dexametasona (DEX) aos 16 ou 18 dias de incubação. Avaliou-se a expressão de hsp70 em fígado e músculo peitoral de embriões nos estágios de “internal pipping” (IP), eclosão e pintainhos aos 7 dias de idade, utilizando-se para tanto a técnica de real-time PCR. Os resultados sugerem que o fígado seja mais sensível aos efeitos da hipóxia quando comparado ao músculo peitoral, bem como à injeção de DEX, principalmente durante o período de IP.

Palavras-chave: corticosterona, estresse térmico embrionário, frangos de corte, incubação, proteínas de choque térmico, resposta imune

EFFECT OF EMBRYONIC STRESS ON HSP70 EXPRESSION IN EMBRYOS AND ON POST-HATCH IMMUNE RESPONSE IN BROILER CHICKENS

ABSTRACT

Two assays were performed aiming to evaluate the effects of temperature changing during incubation on hsp70 expression in the bursa of Fabricius of broiler chicken embryos and on the humoral immune response of post-hatch birds. On the first assay we tested cold and heat treatments during the final third of embryonic period. We observed differences among treatments, where the cold treatment induced to a smaller hsp70 expression. There were no differences among treatments for humoral immune response. On the second assay was performed by utilizing acute stress by cold or heat treatment, from day 13 to day 19 of incubation. The evaluated parameters were the same as described on the previously. Acute embryonic stress was increased hsp70 synthesis on bursa and improved the humoral immune response on broilers. Third assay was conducted at Katholieke Universiteit Leuven as a part of an interchange programme granted by CAPES. It was applied, on the first ten incubation days, a treatment by ventilation absence (hypoxia), and later, a second treatment by dexamethasone (DEX) injection at 16 or 18 incubation days. We evaluated the hsp70 expression on embryos liver and breast muscle at the stages of internal pipping (IP), hatching and on 7 days chicks, using the real-time PCR method. The results suggests that liver is more sensitive to hypoxia effects if compared to breast muscle, as well as to DEX injection, mainly during IP stage.

Key words: broiler chicken, corticosterone, embryonic heat or cold stress, heat shock proteins, immune response, setting

CAPÍTULO 1 – ESTRESSE TÉRMICO E RESPOSTAS HORMONAIS E MOLECULARES EM FRANGOS DE CORTE

Introdução

Durante as duas últimas décadas verificou-se avanço significativo na seleção genética de frangos de corte, levando ao rápido crescimento e aumento na eficiência alimentar, fornecendo, dessa forma, à indústria avícola, aves terminadas em curto período de tempo. Tal desenvolvimento requer aumento paralelo no tamanho dos sistemas viscerais; no entanto, o subdesenvolvimento de alguns desses sistemas tem levado a capacidade relativamente baixa das aves de se confrontarem com condições estressantes (YAHAV, 2000), resultando em perdas econômicas importantes.

As aves são animais homeotérmicos e, como tais, são capazes de manter sua temperatura corporal dentro de um estreito espectro de variação. A fim de manter a homeotermia e evitar conseqüências deletérias do estresse térmico, duas respostas diretas são desencadeadas nas aves: a resposta rápida ao choque térmico e a aclimação. Manipulações térmicas em estágios muito precoces da vida das aves, enquanto sua regulação da temperatura corporal e mecanismos de “feedback” ainda estão imaturos, causam alterações no limite da resposta termorregulatória (ARJONA *et al.*, 1988, YAHAV, 2000). Assim sendo, a aplicação de tais manipulações durante a incubação provavelmente culminaria em alterações específicas sobre os mecanismos termorregulatórios do embrião e do pintainho recém-eclodido dependendo da duração e da severidade dessa manipulação (LAY & WILSON, 2002; YAHAV *et al.*, 2004).

A exposição das células a um aumento na temperatura resulta na elevação da síntese de um grupo específico de proteínas, as quais são denominadas proteínas de choque térmico (hsp). Esse fenômeno tem sido chamado de resposta ao choque térmico, muito embora estressores de diferentes naturezas também induzam à síntese dessas proteínas, tais como análogos de aminoácidos e de glicose, metais pesados, estimuladores de proteína quinase C, isquemia, infecções microbianas, óxido nítrico, hormônios, antibióticos, anóxia, hipóxia e etanol (CRAIG, 1985; KIANG & TSOKOS,

1998); dessa forma, parece mais adequado denominar tal fenômeno como resposta ao estresse.

Todas as formas de vida respondem a mudanças nas condições ambientais no sentido de manter a homeostase. Inúmeros fatores podem levar ao desequilíbrio na manutenção da homeostase e podem provir de estímulos externos, como temperaturas extremas ou do próprio animal. O estresse não é uma condição absoluta, uma vez que estímulos estressores para determinado organismo pode não ser para outro, e ainda, diversos fatores podem exercer grande influência sobre a resposta ao estresse, como severidade, duração, variabilidade genética entre ou dentro de espécies ou a condição imune do animal hospedeiro (DOHMS & METZ, 1991; SIEGEL, 1995). Os processos regulatórios podem ser categorizados em específicos e inespecíficos. Processos específicos são aqueles em que uma condição particular inicia respostas relacionadas a essa condição, enquanto que processos inespecíficos ocorrem quando, independente do estressor, o animal responde de uma maneira geral. Esses processos regulatórios não são mutuamente exclusivos, podendo ocorrer simultaneamente, um pode ter efeito sobre o outro, e cada um pode responder ou ser limitado pelo potencial genético do animal (SIEGEL, 1995).

A resposta ao estresse mediada pelas hsps é uma das respostas adaptativas mais altamente conservadas. Em organismos unicelulares, a resposta ao estresse confere tolerância a uma variedade de perturbações que alteram a síntese protéica (MOSELEY, 2000). Este fenômeno de tolerância é também extremamente importante em organismos multicelulares, resultando em termotolerância e em resistência a diferentes tipos de estresse.

As hsps estão presentes no citosol, mitocôndria, retículo endoplasmático e núcleo e em geral possuem uma meia-vida relativamente longa (48h em células epidermóides humanas) (KIANG & TSOKOS, 1998). A proteção conferida pelas hsps se deve provavelmente à sua capacidade de agir como "chaperone" molecular, prevenindo a agregação inadequada de proteínas e mediando o transporte de proteínas imaturas às organelas-alvo para empacotamento final, degradação ou reparo. Muitas das proteínas de choque térmico e "chaperones" moleculares são representados como

grandes famílias que possuem homólogos funcionais em cada compartimento celular (WELCH, 1992; MORIMOTO *et al.*, 1994a).

A temperatura está entre os fatores mais importantes que influenciam profundamente a rede celular de interações catalíticas e regulatórias. A resposta ao choque térmico é uma rápida, porém transitória, reprogramação de todas as atividades celulares a fim de proteger as estruturas sensíveis contra os danos causados pelo calor e garantir a recuperação rápida e completa após o período de estresse (NOVER, 1989). Uma mudança na temperatura corporal pode ser imposta pelo ambiente ou internamente, ajustando-se o "set-point" termorregulatório. Quando fora da faixa ótima de temperatura, ocorre massivo acúmulo tanto de proteínas recém-sintetizadas quanto de proteínas pré-existentes (MORIMOTO *et al.*, 1994a).

As hsps estão presentes tanto em células procarióticas como eucarióticas. Sua estrutura altamente conservada sugere que elas exerçam papel fundamental nos processos celulares. Como o nome sugere, as hsps são induzidas em células expostas a um choque térmico subletal (KIANG & TSOKOS, 1998). Embora a agregação e a má estruturação de proteínas aumentem com o estresse, sendo necessário o aumento correspondente nos níveis intracelulares de "chaperones", é importante ressaltar que nem todos os "chaperones" pertencem à classe de hsps, bem como nem todas as hsps funcionam como "chaperones" moleculares (MORIMOTO *et al.*, 1994a).

Histórico

Em 1864 o fisiologista vegetal Julius Sachs publicou na revista *Flora* um artigo sobre a temperatura limite superior em vegetais. Através do aquecimento de plantas inteiras ou parte delas a 45-51°C, ele observou um bloco transitório de fluido protoplásmico e mudanças na permeabilidade da membrana. Esses resultados foram interpretados como evidências de que o aumento da temperatura supera "forças moleculares" que mantêm a organização interna das células (NOVER, 1989).

O primeiro relato a respeito das hsps aconteceu em dezembro de 1962, quando o geneticista italiano Ferruccio Ritossa publicou na revista *Experientia* um artigo

intitulado: “A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*” (FEIGE & MOLLENHAUER, 1992). Esse pesquisador descobriu que uma pequena elevação na temperatura, bem como o tratamento com determinadas substâncias químicas, produziam um novo padrão de formação de pufes no cromossomo de glândula salivar de *Drosophila*: um pequeno número de novos pufes surgiu, enquanto a maioria dos pufes presentes antes do choque térmico regrediu e desapareceu totalmente.

Em 1974, TISSIÈRES *et al.* observaram a indução de um grupo de proteínas quando da exposição ao choque térmico e nos anos seguintes constatou-se que os pufes encontrados por Ritossa eram locais de vigorosa transcrição de RNA e que uma grande parte desses RNAs eram traduzidos em proteínas com massas moleculares de 70 e 26 kD. Essas proteínas foram então denominadas proteínas de choque térmico.

Existem hsps com diferentes pesos moleculares e estas são divididas em famílias, sendo que as mais estudadas são as proteínas são as que apresentam pesos moleculares de 60, 70, 90 e 110 kD, que por serem encontradas em ampla variedade de organismos, são denominadas hsps principais (KIANG & TSOKOS, 1998). Além dessas, dois outros grupos se destacam: as hsps de baixo peso molecular (inferior a 20kD) e as hsps secundárias, dentro das quais se encontra a família da hsp40, de importância fundamental para a regulação gênica da hsp70.

Estrutura molecular da hsp70

Os genes de hsp70 e as proteínas por eles codificadas estão presentes em uma ampla variedade de espécies. As hsp70 são altamente conservadas e demonstram uma identidade de bases entre 60 e 78% entre células eucarióticas e uma identidade de 40 a 60% entre células eucarióticas e DnaK de *E. coli* (CRAIG, 1985; LINDQUIST, 1986; PARSELL & LINQUIST, 1994). Além de tal homologia encontrada nas proteínas em geral, certas regiões mantêm um alto grau de homologia entre espécies; esses segmentos conservados provavelmente representam regiões funcionalmente importantes da proteína.

Todas as hsp70 ligam-se a ATP. O fragmento de 44 kD localizado na região N-terminal (Figura 1) contém quatro domínios formando dois lobos com uma fenda profunda entre eles, na qual o Mg-ATP e Mg-ADP se ligam. O domínio de ligação de peptídeos de 18 kD consiste de 4 β -conformações antiparalelas e uma única α -hélice, sendo essa última o local mais provável de ligação de peptídeos configurados e desconfigurados. O fragmento C-terminal de 10 kD parece ser uma α -hélice, seguida por um segmento rico em Gly-Pro próximo a uma seqüência terminal Glu-Glu-Val-Asp (EEVD) altamente conservada. Esses quatro aminoácidos terminais estão presentes em todas as hsp70 eucarióticas e afetam a quantidade de RNAm traduzido durante o choque térmico (KIANG & TSOKOS, 1998; FINK, 1999). Somente cinco resíduos da proteína substrato mantêm contato significativo com a hsp70, explicando sua especificidade por peptídeos curtos, com uma forte preferência por resíduos hidrofóbicos como a leucina (Leu) na região central e forte interação com resíduos carregados negativamente.

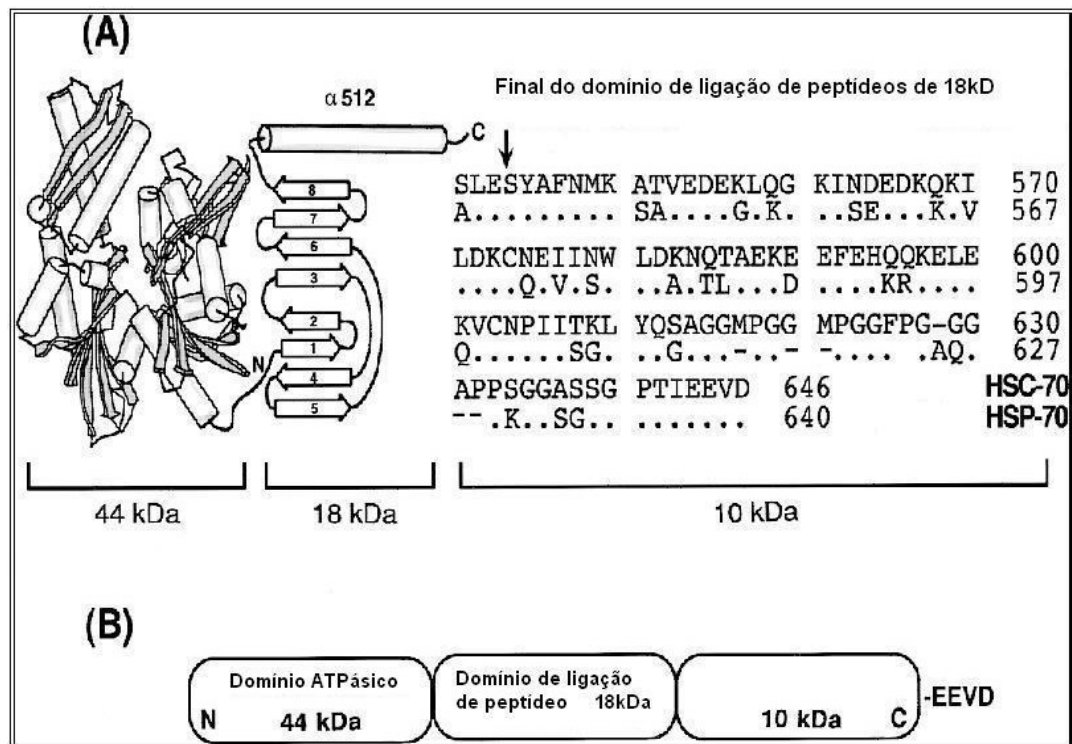


Figura 1 – Estrutura molecular da hsp70 e hsc70 humanas (extraído de KIANG & TSOKOS, 1998).

A rápida cinética de ligação de proteínas substrato à hsp70-ATP sugere que essa é a forma primária que inicia a interação com substratos para a atividade de “chaperone”. Os complexos hsp70-ATP-substrato resultantes, no entanto, são também caracterizados pela rápida dissociação do substrato ligado, mas podem ser estabilizados pela hidrólise do ATP. A dissociação ATP-induzida do complexo hsp70-proteína resulta de uma mudança conformacional causada na hsp70 pela ligação do ATP. Essa mudança conformacional reduz a afinidade da hsp70 por proteínas substratos não-nativas e leva à sua dissociação (FINK, 1999).

Promotores gênicos de choque térmico

a. Elementos de choque térmico (HSE)

A ativação transcricional dos genes de choque térmico ocorre quando da ligação de fatores de choque térmico (HSFs) ativados aos elementos de seqüência de DNA “upstream” comumente chamados elementos de choque térmico (HSE). O HSE foi primeiramente identificado como uma seqüência necessária para a indução por calor do gene da hsp70 de *Drosophila*. Análises posteriores levaram à definição de um HSE como um arranjo repetido de seqüências de 5 pares de bases (pb) 5'-nGAAn-3' (◇). Todos os promotores de choque térmico, de diferentes genes e organismos, possuem os mesmos blocos construtores de 5 pb. O número de unidades de 5 pb em um HSE funcional pode variar, mas normalmente oscila entre três a seis. O número de HSEs associados com diferentes genes de choque térmico também pode variar, bem como a distância entre esses HSEs (FERNANDES *et al.*, 1994; MORIMOTO *et al.*, 1994a).

A localização dos HSEs dentro do promotor é outra variável e pode variar de em torno de 40 bases “upstream” ao sítio inicial transcricional, como para o gene da hsp70, até aproximadamente 270 bases, no caso do gene da hsp27. Os HSEs podem iniciar tanto com uma repetição de 5'-nGAAn ou com seu complemento 5'-nTTCn. Além disso, um HSE pode tolerar uma inserção de 5-pb entre unidades repetidas, contanto que a fase das repetições seja mantida. O G na posição 2 é absolutamente conservado, sendo que uma substituição de bases causa anulação da expressão induzida por calor,

enquanto que os As, nas posições 3 e 4 são menos conservados, e a substituição de bases nesses locais ocorre em alguns HSEs funcionais. Em geral, no entanto, a seqüência de nucleotídeos dos HSE tem sido conservada na evolução entre eucariotos. Convém ressaltar que os HSEs medeiam a resposta não somente ao choque térmico, como também a outras formas de estresse (FERNANDES *et al.*, 1994).

b. Fatores de choque térmico (HSF)

Foram identificados quatro diferentes HSFs em vertebrados: HSF1, HSF2, HSF3 (expresso em aves) (NAKAI & MORIMOTO, 1993) e HSF4 (KIANG & TSOKOS, 1998). O HSF foi identificado em extratos nucleares de *Drosophila melanogaster* tratada por calor como um componente de proteína que poderia ligar especificamente ao sítio regulatório do gene da hsp70 e como uma fração purificada que poderia promover a transcrição *in vitro*. Embora somente um gene que codifique o HSF tenha sido isolado em *Drosophila*, todos os outros eucariotos possuem múltiplos HSFs (dois para ratos e humanos e três para galinha e tomate). Os HSFs se apresentam na forma de trímeros e, portanto, não se encaixam nas categorias conhecidas de proteínas que ligam DNA. Apesar de diferentes HSFs apresentarem grande variação em tamanho e homologia geral limitada de aproximadamente 40% de identidade de aminoácidos, todos possuem duas características altamente conservadas: o domínio de ligação de DNA localizado em posição N-terminal, que é responsável tanto pela ligação à proteína quanto ao HSE, com aproximadamente 100 aminoácidos; e uma região hidrofóbica de repetições de seqüências que promove a trimerização dos HSFs (MORIMOTO, 1993; FERNANDES *et al.*, 1994; MORIMOTO *et al.*, 1994a; b).

Pouco se sabe sobre as propriedades do HSF3; esse é expresso ubiquamente e suas propriedades de ligação ao DNA são negativamente reguladas. No entanto, o HSF3 apresenta suas propriedades de ativação por choque térmico mais lentas para se ligar ao DNA. Em células de vertebrados, múltiplos HSFs são co-expressos, ainda que a atividade de ligação do DNA de cada fator seja negativamente regulada e se torne ativada em resposta a diferentes sinais celulares, sugerindo múltiplos mecanismos

regulatórios para controlar a atividade dos HSFs (MORIMOTO, 1993; MORIMOTO *et al.*, 1994b).

c. Interações HSF-HSE

O trímero de HSF nativo demonstra uma flexibilidade bastante considerável em sua habilidade em interagir com HSEs contendo diferentes números e arranjos de unidades de 5 pb. O menor arranjo que apresenta ligação detectável de HSF de *Drosophila in vitro* contém duas unidades de 5 pb tanto em uma configuração cabeça-cabeça ($\diamond \Downarrow$) ou cauda-cauda ($\Downarrow \diamond$), e o HSF se liga às duas seqüências com afinidade similar. A afinidade de ligação do HSF aumenta conforme aumentam o número de unidades de 5 pb dentro de um HSE. Assim, o HSF se liga cooperativamente às unidades de 5 pb. Essa cooperação leva a uma ligação particularmente mais firme quando o número de unidades de 5 pb em um arranjo é de seis ou mais. Tais complexos HSF-HSE se dissociam após meia-vida de no máximo 48 horas. A ligação cooperativa de HSFs é ainda mais pronunciada a temperaturas de choque térmico, sugerindo que arranjos longos de unidades de 5 pb tenham uma vantagem particularmente distinta em seqüestrar HSFs a essas temperaturas. Uma vez que diferentes membros da família dos genes de choque térmico possuem números variados de unidades de 5 pb, as diversas afinidades por HSF podem em parte estar correlacionadas com suas respostas diferenciadas ao choque térmico (FERNANDES *et al.*, 1994).

d. Ativação

O choque térmico induz a uma rápida ligação dos HSFs a uma região que compreende seqüências de 5 pb 5'-nGAAn-3' denominadas HSEs (Figura 2). Sob condições não estressantes, os HSFs são mantidos em uma forma não-ligada ao DNA através de ligações transientes com hsp70, possivelmente por influenciar ou estabilizar uma conformação específica dos HSFs sem atividade de ligação ao DNA. Durante o choque térmico, o aparecimento de proteínas agregadas ou mal configuradas cria um grande "pool" de novos substratos de proteína que competem com os HSFs pela

associação com as hsp70. Os HSFs são separados das hsps e então fosforilados pela proteína quinase C (PKC) ou outra serina/treonina quinase, formando uma estrutura homotrimérica. Assim, o choque térmico e outros estressores iniciam os eventos que removem a influência regulatória negativa sobre a atividade de ligação dos HSFs ao DNA. Os trímeros entram no núcleo, se ligam aos HSEs localizados na região promotora dos genes da hsp e se tornam posteriormente fosforilados pelas HSF quinases. A transcrição é então iniciada, seguida pela tradução. Dessa forma, a ativação dos HSFs para ligarem ao DNA induz a uma transcrição elevada, síntese e acúmulo de hsps, em particular hsp70, que então se associa com os HSFs. A interação dos HSFs com as hsp70, e outras hsps, interfere com a atividade dos HSFs. Esses eventos são importantes na regulação de sua atividade transcricional e/ou retorno a condição normal (SCHLESINGER, 1990; MORIMOTO, 1993; MORIMOTO *et al.*, 1994b; KIANG & TSOKOS, 1998).

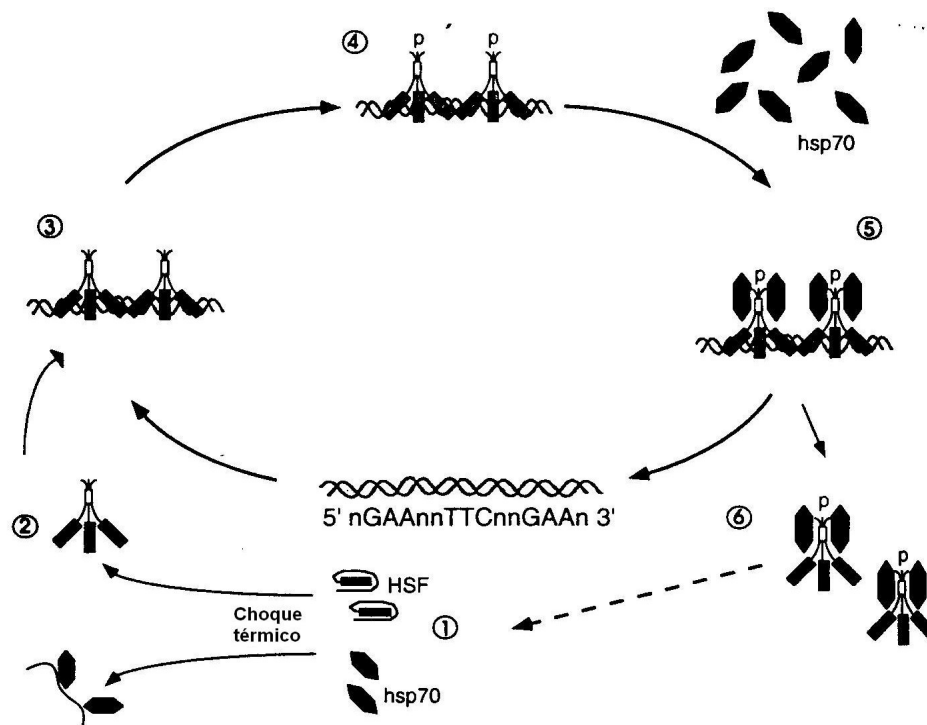


Figura 2 – Modelo de regulação do HSF. Em células não estressadas, os HSFs são mantidos na forma monomérica, não ligados ao DNA (1). Sob choque térmico, os HSFs formam trímeros (2), esses se ligam aos respectivos HSEs (3) e se tornam fosforilados (4). A ativação transcricional dos genes de choque térmico leva a um aumento nos níveis de hsp70 e a formação de um complexo HSF-hsp70 (5). Finalmente, os HSFs se dissociam do HSE e são eventualmente convertidos em monômeros não ligados ao DNA (6) (extraído de MORIMOTO, 1993).

e. hsp40

A família da hsp40 (DnaJ, em procariotos) consiste de mais de 100 membros, definidos pela presença de um domínio J altamente conservado de aproximadamente 78 aminoácidos. A estrutura típica de uma hsp40 inclui um domínio J em posição N-terminal, que está ligado por uma região rica em Gly-Phe (G/F) a um domínio de função desconhecida, seguido por um domínio de ligação de Zn^{2+} (“zinc finger”) no meio, e terminando com um domínio C-terminal (KELLEY, 1998; WITTUNG-STAFSHEDE *et al.*, 2003). Os membros das famílias da hsp70 e hsp40 interagem uns com os outros para desempenhar funções específicas na montagem, dobramento e redobramento de proteínas durante uma variedade de processos celulares, incluindo replicação de DNA, translocação de proteína e resposta ao estresse (FRYDMAN *et al.*, 1994; LU & CYR, 1998; FINK, 1999).

Pouco se sabe sobre as características estruturais das hsp40 que estão envolvidas em sua interação com as hsp70 e proteínas desconfiguradas; no entanto, tem-se conhecimento de que tanto a região N-terminal do domínio J quanto a região rica em G/F são necessárias para interação com as hsp70 e para estimular a atividade ATPásica da mesma. A região G/F também está envolvida na modulação da atividade de ligação ao substrato pela hsp70 (FINK, 1999).

A hsp40 isoladamente não possui capacidade de suprimir a agregação de proteínas desnaturadas e, muito embora também não possua atividade de “chaperone”, promove a renaturação de proteínas desnaturadas em cooperação com a hsp70. Ainda que muitos estudos ressaltem a relação entre o desenvolvimento da tolerância ao estresse exclusivamente com a hsp70, deve-se observar que a expressão da hsp70 associada a hsp40 oferece maior proteção, uma vez que a atividade de “chaperone” molecular da primeira é aumentada quando na presença da segunda (OHTSUKA & SUZUKI, 2000). Apesar de ainda não haver indicações de que o mesmo ocorra *in vivo*, evidências *in vitro* sugerem que cada hsp70 requer uma hsp40 em particular para um eficiente dobramento de proteínas (LU & CYR, 1998).

São propostos dois modos de interação entre hsp70 e hsp40 (Figura 3). O primeiro propõe que a hsp40 possa interagir com um complexo hsp70-substrato. Então,

mudanças conformacionais resultantes da ligação do substrato facilitariam a ligação à fenda no domínio ATPásico e a consequente hidrólise do ATP fortaleceria a ligação da hsp70 com esses substratos pré-ligados. O segundo modelo sugere que a hsp40 primeiro interaja com um polipeptídeo desconfigurado, conduzindo-o então a se ligar com a hsp70. Nesse modelo, o sítio de ligação de substrato da hsp70 estaria vazio, permitindo a interação inicial da hsp40 com o sítio de ligação de substrato da hsp70. Essa interação facilitaria a interação subsequente entre o tripeptídeo conservado (His-Pro-Asp) no domínio J e a fenda inferior do domínio ATPásico; uma mudança conformacional subsequente poderia promover a dissociação da hsp40 do domínio de ligação de substrato, permitindo ao substrato ligado à hsp40 ser transferido para a hsp70 (FINK, 1999; SUH *et al.*, 1999).

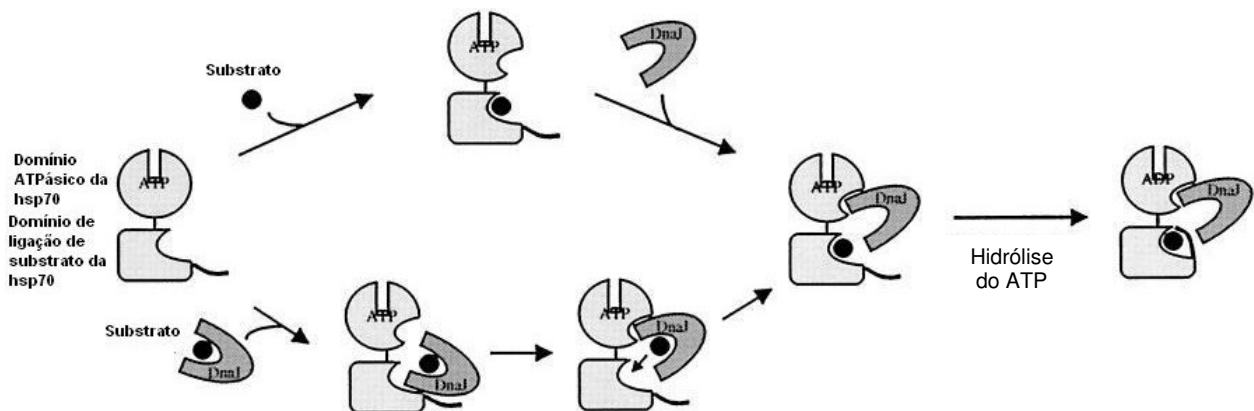


Figura 3 – Modelo proposto de dois modos de interação entre DnaJ (hsp40) e DnaK(hsp70) (Extraído de SUH *et al.*, 1999)

A natureza do nucleotídeo ligado a hsp70 afeta a conformação do “chaperone” e particularmente sua afinidade pela proteína-substrato. Assim, complexos com ATP possuem menor afinidade pelo substrato e aqueles com ADP ligados possuem afinidade maior. Embora o complexo com ATP se ligue a proteínas/peptídeos-substrato mais rapidamente que o complexo com ADP, o complexo ternário resultante, hsp70-ATP-substrato, também libera a proteína-substrato muito rapidamente, e dessa maneira, não se formam complexos produtivos. Por outro lado, o complexo hsp70-ADP, embora se ligando à proteína substrato a uma taxa mais lenta, forma um complexo ternário

relativamente estável. A formação de complexos de substratos quando hsp70-ATP e proteínas-substratos são combinadas surge da hidrólise do ATP que ocorre durante a reação. Dessa forma, a formação de complexos de vida longa entre proteínas desconfiguradas e hsp70 requer a presença de um complexo hsp70-ADP-substrato. Isto explica, ao menos em parte, a necessidade da hsp40, uma vez que essa estimula significativamente a taxa de hidrólise do ATP ligado à hsp70, levando assim à formação de hsp70-ADP (FINK, 1999; WITTUNG-STAFSHEDE *et al.*, 2003).

Funções das hsp70

A idéia de que, dentro das células, proteínas recém sintetizadas simplesmente não se dobras e se agregam em complexos oligoméricos, mas são antes assistidas por “chaperones” moleculares, já se tornou familiar. A característica básica dos “chaperones” moleculares é o fato de reconhecerem e se ligarem seletivamente a proteínas não-nativas para formar complexos estáveis. Na maioria dos casos, esses complexos são dissociados pela ligação e hidrólise do ATP. No contexto do dobramento de proteínas *in vivo*, os “chaperones” previnem a agregação irreversível de conformações não-nativas e mantêm as proteínas na via de dobramento produtiva. Além disso, mantêm as proteínas recém-sintetizadas em uma conformação desconfigurada favorável para a translocação através de membranas e ligação a proteínas não-nativas durante o estresse celular, entre outras funções (FINK, 1999). É provável que a maioria das proteínas celulares, se não todas, irão interagir com um “chaperone” em algum estágio de suas vidas. Inúmeras pesquisas indicam que a principal função das hsp70 seja a de “chaperone” molecular.

Os “chaperones” moleculares foram originalmente definidos como um grupo de proteínas que promovem o correto agrupamento de outras proteínas, mas não são componentes finais das estruturas funcionais. Outra definição é a de que são proteínas que ligam e estabilizam outra proteína em conformação instável e, por ligação e liberação controladas, facilitam seu correto destino *in vivo* (HENDRICK & HARTL, 1993; HARTL, 1996).

O dobramento de proteínas é o processo pelo qual a informação linear contida na seqüência de aminoácidos de um polipeptídeo dá origem à conformação tridimensional bem definida da proteína funcional. Proteínas configuradas e estáveis geralmente não são capazes de atravessar membranas de organelas subcelulares como mitocôndria e retículo endoplasmático. Proteínas precursoras destinadas para captação pós-transcricional nessas organelas devem ser antes estabilizadas por “chaperones” moleculares em um estado frouxamente configurado enquanto no citosol; de maneira similar, foi observada também a necessidade da hsp70 para a importação de proteínas para o núcleo (FRYDMAN & HARTL, 1994).

A termotolerância se desenvolve principalmente devido a expressão e acúmulo altamente regulados de várias hsps na célula, levando à ativação de mecanismos de reparo macromoleculares como uma estratégia de defesa contra desafios subseqüentes. Existem controvérsias quanto à afirmação de que os membros das famílias de proteínas de estresse são os principais responsáveis pelo fenômeno de desenvolvimento da termotolerância. A tolerância ao estresse não se deve isoladamente a maior expressão de hsps, e sugere-se que existam dois estados de termotolerância, o estado hsp-dependente e hsp-independente (VERBEKE *et al.*, 2001).

A hsp70 possui um papel na proteção de proteínas pré-existentes contra a desnaturação sob condições de estresse celular, tendo sua síntese aumentada nessas situações, enquanto que em células não estressadas as mesmas se apresentam em baixas concentrações. A capacidade de sobrevivência de diferentes indivíduos de uma mesma espécie quando expostos a temperaturas extremas por curtos períodos de tempo (termotolerância) varia grandemente, sendo tal habilidade dependente de fatores genéticos e ambientais. O fenômeno mais largamente estudado é a tolerância conseguida através de tratamentos por curtas exposições a temperaturas elevadas moderadas, tais tratamentos levam à síntese de um pequeno número de hsps (PARSELL & LINDQUIST, 1994). Uma grande variedade de mecanismos regulatórios, que atuam em nível transcricional e pós-transcricional, são empregados para assegurar que as hsps serão induzidas dentro de minutos, após a exposição a altas temperaturas, o que caracteriza a síntese de hsps como uma resposta emergencial.

O argumento mais convincente de que as hsp's têm função protetora é a forte correlação entre sua indução e o desenvolvimento da termotolerância. Um grupo de células ou organismo morre rapidamente quando a temperatura normal de crescimento é alterada para uma temperatura muito elevada. Por outro lado, um grupo semelhante que tenha recebido um pré-tratamento moderado de calor a fim de induzir as hsp's sobreviverá por mais tempo sob altas temperaturas. Além disso, o pré-tratamento induz a tolerância a outras formas de estresse e, da mesma maneira, outras formas de estresse induzem à tolerância ao calor (LINDQUIST & CRAIG, 1988). Aparentemente, as hsp's são induzidas por estresses moderados, os quais não são necessariamente letais, a fim de proteger o organismo contra estresses ainda mais severos.

A desnaturação das proteínas representa um sinal para a indução da resposta ao estresse. Por desnaturação das proteínas entende-se a alteração conformacional, que resulta na perda, reversível ou não, da capacidade de realizar uma determinada função biológica. Embora as proteínas da família hsp70 sejam sintetizadas de forma mais acentuada em condições de estresse, elas também participam de muitos aspectos do metabolismo em células não estressadas, incluindo o dobramento das proteínas recém-sintetizadas, o transporte de proteínas através das membranas mitocondriais e a interação com receptores de esteróides (GABRIEL, 2001). Em termos gerais, as hsp's funcionam prevenindo o acúmulo de proteínas danificadas pelo estresse por dois meios: algumas servem como “chaperones” moleculares, impedindo a agregação de proteínas desnaturadas e promovendo seu próprio redobramento, enquanto outras facilitam a degradação de proteínas anormais (PARSELL & LINDQUIST, 1994).

Embora a resposta aguda ao estresse possa ser importante para a sobrevivência dos tecidos afetados, a expressão de hsp70 e outras proteínas de choque térmico e “chaperones” moleculares pode apresentar efeitos negativos na biogênese de proteínas e, portanto, em uma variedade de atividades celulares. Como conseqüência, pode haver uma perda no potencial de crescimento da célula, bem como um atraso na habilidade da célula em responder ao estresse fisiológico. Uma vez que a capacidade da célula em sobreviver ao estresse é dependente da velocidade e duração da

resposta, qualquer alteração na habilidade em sentir ou responder ao estresse pode ter profundas conseqüências (MORIMOTO *et al.*, 1994a).

hsp70 e função imune

Do meio ao final da embriogênese, células tronco hematopoiéticas pluripotentes, as quais são precursoras de linfócitos e outras células do sistema imune, migram de ilhotas sangüíneas do saco da gema para o fígado, baço e bursa cloacal fetal. Durante a migração são expostas a fatores microambientais extrínsecos e locais, incluindo aqueles dos sistemas nervoso e endócrino, que as encaminham para as vias de desenvolvimento de granulócitos, eritrócitos, linfócitos e monócitos. Os pré-linfócitos se deslocam para o timo ou para a bursa cloacal, onde as células T e B sofrem modificações, seleção e maturação (MCEWEN *et al.*, 1997; GLICK, 2000). A função protetora do sistema imune se torna clara quando esse falha. Os estados de imunodeficiência herdada ou adquirida são caracterizados pelo aumento na susceptibilidade a infecções, incluindo a organismos normalmente considerados não-patogênicos.

O estudo inicial descritivo da bursa foi desenvolvido por Hieronymus Fabricius, de onde vem sua antiga denominação, bursa de Fabricius. A bursa é um órgão linfóide único às aves e se desenvolve como um apêndice dorsal da cloaca, surgindo dos 3 aos 5 dias de desenvolvimento embrionário (DE3 a DE5) como um broto rodeado por um componente mesenquimal de origem mesodérmica, o qual se desenvolve na medula do folículo da bursa. Em aves domésticas, a colonização da bursa por células tronco se inicia somente após a conclusão da primeira onda de crescimento do timo (DE6,5 a DE8) e dura vários dias, de DE8 a DE14; sua proliferação ocorre como um evento único de curta duração durante a vida embrionária. A ontogênese da linhagem de células B ocorre na bursa durante o desenvolvimento embrionário e na primeira semana após a eclosão (FREEMAN, 1971; SHARMA, 1991; DIETERLEN-LIÈVRE, 1994; GLICK, 2000). O crescimento da bursa pós-eclosão é caracterizado por um rápido crescimento de 3 a

4 semanas, um período de platô pelas próximas 5 a 6 semanas, e regressão antes da maturidade sexual (GLICK, 2000).

O conceito de células B e T surgiu somente após pesquisas básicas utilizando-se aves como modelo, revelando um papel imunológico para a bursa cloacal e para o timo. Os linfócitos B desse conceito foram assim denominados para identificar sua origem na bursa das aves e na medula óssea de mamíferos e os linfócitos T, identificados pela sua origem tímica (GLICK, 2000).

A resposta imune aos microrganismos é dividida em dois sistemas gerais: imunidade inata (natural) e imunidade adaptativa (específica ou adquirida). A imunidade inata compreende barreiras físicas, fatores solúveis e células fagocitárias, as quais podem ser consideradas como uma primeira linha de defesa contra microrganismos invasores. A imunidade inata é bastante similar entre indivíduos normais e não possui efeito de memória, sendo que a exposição ao mesmo patógeno gera a mesma resposta. Ela é direcionada contra estruturas moleculares de microrganismos, estruturas essas essenciais para a sobrevivência microbiana, presentes em muitos tipos de microrganismos e únicas a organismos patogênicos (MCEWEN *et al.*, 1997; DEVEREAUX, 2002). As principais células da imunidade inata são os macrófagos fagocitários e os neutrófilos. Embora os organismos patogênicos tenham desenvolvido mecanismos para escapar à resposta imune inata, esses são normalmente eliminados pela resposta imune adaptativa, a qual é capaz de montar uma resposta neutralizadora apropriada direcionada especificamente contra o organismo invasor. Embora a imunidade inata seja inflexível, ela proporciona uma primeira linha de defesa muito rápida, até que respostas imunes adaptativas mais poderosas e flexíveis se desenvolvam. Os sistemas imune inato e adaptativo não são independentes; a resposta imune inata provavelmente influencia o caráter da resposta adaptativa e os ramos efetores da resposta adaptativa utilizam-se de mecanismos efetores inatos, como os fagócitos (DEVEREAUX, 2002).

O sistema imune dos vertebrados é dividido em dois segmentos: a imunidade humoral e a imunidade celular. A imunidade humoral, caracterizada por anticorpos secretados pelos linfócitos B, está sob controle da bursa cloacal em aves (SHARMA,

1991). A descoberta da bursa cloacal e sua associação com a resposta humoral abriram caminhos para o entendimento da dualidade do sistema imune em componentes humorais e celulares.

A exposição das aves a antígenos resulta em estímulo das respostas imunes humoral e celular. Em uma resposta imune típica, as células apresentadoras de antígenos, como os macrófagos, processam o antígeno e apresentam-no processado às células imunes. A apresentação do antígeno inicia uma série complexa de eventos que culminam no desenvolvimento de uma resposta imune (SHARMA, 1991). A produção de anticorpos pelas células B previne a propagação de antígenos pela combinação e neutralização do patógeno, por permitir a tomada e digestão do patógeno pelas células fagocitárias e por facilitar a lise celular e morte (GLICK, 2000).

As respostas imunes podem ser divididas em três fases: indução ou reconhecimento, ativação ou expansão e efetora. Durante a fase de reconhecimento, os antígenos se ligam a receptores já presentes nos linfócitos. Na fase de ativação ou expansão, duas respostas são iniciadas: a proliferação celular, em que há a amplificação do sinal de reconhecimento do antígeno, aumentando o número de células capazes de interagir com o mesmo, e a diferenciação celular, na qual as células sofrem alterações em sua fisiologia e funções. Algumas células adquirem capacidade de destruir o antígeno com maior eficiência, enquanto outras se modificam em células de memória, que sobrevivem e geram uma resposta mais rápida quando há nova exposição ao mesmo antígeno. Finalmente, na fase efetora, as células que foram ativadas modificam sua atividade no sentido de eliminar o antígeno, contando com a ação de células não linfóides, responsáveis pela imunidade inata (MCEWEN *et al.*, 1997; MORGULIS, 2002).

A síntese de hsps é aumentada para proteger células procarióticas e eucarióticas contra várias injúrias durante períodos de estresse causados por infecção, inflamação ou eventos similares. Em várias infecções e doenças auto-imunes, a hsp age como importante antígeno das respostas imunes humoral e celular. Embora as hsps exerçam importante papel em várias infecções e doenças auto-imunes, existem evidências conflitantes relativas ao envolvimento direto da hsp na proteção ou auto-agressão. Até o

momento, a iniciação da imunidade protetora contra agentes infecciosos ou desordens auto-imunes somente por hsps parece improvável. Particularmente, parece mais plausível que elas se tornem importantes antígenos durante a infecção ou inflamação e dessa forma influenciem e mantenham as respostas de defesa e auto-imune (ZÜGEL & KAUFMANN, 1999). Assim, as hsps agem como “chaperones”, não só durante a biogênese de outras proteínas como também durante a resposta imune a outros antígenos.

As hsps servem como “chaperones” celulares que participam da síntese protéica e transporte através de vários compartimentos celulares. Devido ao fato dessas proteínas terem localizações celulares únicas, a função de “chaperones” das proteínas de estresse freqüentemente envolve transferência de peptídeos entre proteínas de estresse. O papel central de tais proteínas na transferência de peptídeos através da célula pode ser responsável pela sua importância na modulação do sistema imune. Pesquisas indicam que essas proteínas de estresse têm a habilidade de modular a resposta imune celular (MOSELEY, 2000).

O sistema imune aviário opera sob os mesmos princípios gerais que o dos mamíferos. O estímulo antigênico inicia uma resposta imune que envolve cooperação celular entre os macrófagos, linfócitos B e T. Os macrófagos processam o antígeno e o apresentam aos linfócitos. Os linfócitos B, principais células que medeiam a imunidade humoral, transformam-se em plasmócitos e produzem anticorpos. Os linfócitos T, mais importantes para a imunidade celular, se diferenciam funcionalmente em diversas subpopulações. As linfocinas, produtos secretados pelas células ativadas por antígenos, medeiam as funções dessas células (SHARMA, 1991). A resposta imune em aves é altamente regulada, sendo que qualquer alteração da regulação resulta, freqüentemente, em imunodepressão.

Tanto células hospedeiras quanto microbianas se confrontam com alterações dramáticas nas suas condições de vida durante a infecção. Com essas condições alteradas, a indução da síntese de hsps é vital para a sobrevivência do patógeno. Subseqüentemente, níveis aumentados de hsps do patógeno nas células hospedeiras levam à rápida degradação da proteína pelo mecanismo de defesa do hospedeiro.

Produtos derivados do patógeno podem ser então eficientemente apresentados pelas células do hospedeiro e promover o reconhecimento das células infectadas pelo sistema imune. Embora o papel exato das hsp's na imunidade à infecção microbiana não esteja completamente compreendido, elas aparentemente servem como importantes antígenos na defesa contra agentes infecciosos. De fato, a resposta imune contra hsp's tem sido observada em doenças causadas por bactérias, protozoários, fungos e nematóides (ZÜGEL & KAUFMANN, 1999). Evidentemente, devido à sua alta conservação entre vários patógenos microbianos, as hsp's são os principais antígenos. As hsp's induzem respostas imunes humoral e celular muito fortes em numerosas infecções. Diferentes hsp's cognatas têm um alto grau de homologia na seqüência entre bactérias patogênicas e não patogênicas.

Pelo menos dois fatores contribuem para o fato de que as hsp's representam os principais antígenos num largo espectro de infecções: primeiro, essas proteínas são abundantes no patógeno, especialmente sob condições de estresse; segundo, uma memória imunológica para os determinantes de reação cruzada de hsp's conservadas é gerada durante a vida, baseada na reestimulação freqüente por contatos subseqüentes com micróbios de diferentes graus de virulência. Sob essas condições, a infecção de um indivíduo por um patógeno virulento permitiria que o sistema imune já preparado reagisse rapidamente antes da resposta imune para desenvolver mais anticorpos patógeno-específicos. Uma resposta imune para domínios conservados de hsp compartilhadas por diferentes micróbios pode, além disso, prevenir a colonização do hospedeiro por patógenos microbianos. A preparação do sistema imune contra hsp microbiana é um fenômeno comum que ocorre em estágios iniciais da vida (ZÜGEL & KAUFMANN, 1999).

A resposta imune é altamente regulada. Há um equilíbrio crítico entre os sinais que iniciam a resposta imune, a mantêm em nível ótimo e, finalmente, a terminam quando já foi apresentada. A quebra do controle regulatório freqüentemente resulta em imunodepressão. A imunodepressão é de importância econômica significativa na produção comercial avícola, pois vários agentes infecciosos são altamente imunodepressores (SHARMA, 1991). As aves expostas a esses agentes se

desenvolvem pouco e sucumbem a infecções oportunistas, resultando em perda econômica significativa. Os mecanismos envolvidos na imunodepressão do sistema imune aviário não são bem compreendidos e parecem ser complexos.

Os organismos têm desenvolvido muitas estratégias para se defender contra ambientes e condições estressantes. O sistema imune é o resultado da resposta desenvolvida pelo hospedeiro ao estresse do desafio do patógeno. A forma exata da resposta do sistema imune ao estresse, no entanto, não foi ainda definida, em parte devido às complexidades da imunidade do hospedeiro e dos sistemas de resposta ao estresse. Embora aumentos agudos nos níveis de glicocorticóides sejam considerados uma característica clássica da resposta ao estresse, é freqüentemente difícil de estabelecer uma relação entre a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenais (HPA) induzida pelo estresse e alterações na função imune (BLECHA, 2000).

Em aves, a modulação induzida pelo estresse no sistema imune tem importância tanto econômica quanto científica (DOHMS & METZ, 1991). A liberação de corticosterona pode ocasionar involução do tecido linfóide (timo, bursa cloacal e baço) e supressão da imunidade humoral e celular. O estresse crônico pode levar a altos níveis séricos de corticosteróides que, em altas doses, podem resultar em atrofia do timo e da bursa por apoptose (morte programada das células linfóides). No entanto, as conseqüências da ação do estresse sobre a imunidade são complexas, podendo implicar tanto em imunossupressão quanto em imunoestimulação. Tais variações podem ser devidas, em parte, a diferenças na intensidade e/ou duração do estímulo estressor e a variações genéticas de linhagens e indivíduos. (MORGULIS, 2002). Em baixas doses, os corticosteróides são imunomoduladores e podem regular o desenvolvimento da resposta imune celular e humoral (MCEWEN *et al.*, 1997).

Estresse embrionário e resposta endócrina

O objetivo principal do sistema imune de proteger contra a invasão e destruição de tecidos por patógenos é conduzido dentro de um organismo cujos mecanismos de manutenção da vida são governados pelo sistema neuroendócrino e pelo sistema

nervoso autonômico. Esses sistemas trabalham juntos para modular a ativação imune, bem como proporcionar equilíbrio para conter as propriedades potencialmente destrutivas dessa ativação (MCEWEN *et al.*, 1997). O “timing” dos eventos durante o desenvolvimento fetal e neonatal é crítico para a integridade e função normal de todos os animais. O estresse retira o animal do seu estado de homeostase, perturbando muito os sistemas endócrino e neuronais (LAY, 2000).

O eixo hipotálamo-pituitária-adrenais (HPA) consiste de três componentes: o hipotálamo, particularmente o núcleo paraventricular, a pituitária anterior e o córtex adrenal. Dentro desses três tecidos estão células especializadas que sintetizam e secretam três hormônios que agem como sinais primários do eixo HPA: hormônio de liberação de corticotropina (CRH), hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) e hormônios glicocorticóides (corticosterona em aves). O CRH é produzido no hipotálamo e é um estímulo obrigatório e primário para a produção e secreção de ACTH; esse, por sua vez, é produzido por um grupo de células da pituitária anterior, os corticotrofos, e é o estímulo primário para a síntese e secreção de glicocorticóides pelas células do córtex adrenal. Os glicocorticóides são o produto final da ativação do eixo HPA e são os hormônios efetores primários desse circuito neurohormonal. Receptores de glicocorticóides são encontrados tanto no núcleo paraventricular quanto na pituitária anterior e possuem efeito de “feedback” negativo sobre a síntese e secreção de CRH e ACTH em nível de hipotálamo e pituitária. Dessa forma, o eixo HPA é um circuito de alça fechada (MCEWEN *et al.*, 1997; CARSIA & HARVEY, 2000).

Procedimentos comuns como manejo, transporte e alterações nas instalações podem ativar o eixo HPA como indicativo de uma reação ao estresse. Durante o desenvolvimento fetal o controle endócrino entre o sistema nervoso central e periférico é afetado pela liberação pulsátil de hormônios hipotalâmicos, que agem sobre a pituitária, promovendo um efeito hormonal periférico associado que retroalimenta o hipotálamo para criar um “set point” no desenvolvimento dos órgãos. Se um feto em desenvolvimento for exposto a hormônios de estresse, então o eixo HPA pode ser permanentemente alterado por tal mecanismo (LAY, 2000). Assim, a exposição dos

hormônios de estresse durante o desenvolvimento neonatal pode também alterar de modo permanente a fisiologia dos animais.

A ontogenia do sistema endócrino ocorre durante o desenvolvimento pré e pós-eclosão nas aves domésticas; esse é completamente desenvolvido durante o período de desenvolvimento embrionário nas aves domésticas, envolvendo processos de criação e diferenciação de células endócrinas e aquisição gradual de interações entre os tecidos do sistema em questão. As células hipotalâmicas secretoras de CRH surgem no núcleo paraventricular do embrião durante a segunda metade do período de incubação, por volta do DE14, enquanto que os corticotrofos compreendem em torno de um quarto das células hipofisárias ao DE10. Aumento notável no número dessas células ocorre no DE14, e a síntese de ACTH começa dias antes dos primeiros neurônios secretoras de CRH serem detectados. A conexão vascular entre hipotálamo e pituitária anterior já se encontra presente ao DE6 e o plexo vascular hipotálamo-pituitária se completa ao DE12 (JENKINS & PORTER, 2004).

A partir de DE4 as adrenais do embrião, formadas pela disseminação do mesotélio celômico, já estão completas. A partir do DE9 essas glândulas crescem mais rapidamente do que o restante do organismo e a secreção de glicocorticóides se inicia simultaneamente e permanece a níveis baixos durante os 3 dias seguintes; dessa forma, os primeiros 12 dias de embriogênese representam o período de desenvolvimento autônomo das adrenais (Figura 4) (AVRUTINA *et al.*, 1985). Evidências sugerem que a pituitária começa a influenciar a atividade das adrenais entre DE13 e DE15, e que a secreção de glicocorticóides seja independente de ACTH até DE14 (AVRUTINA *et al.*, 1985; JENKINS & PORTER, 2004).

A partir do DE13 ocorrem alterações consideráveis no desenvolvimento das funções adrenais. A taxa de secreção de glicocorticóides é aumentada, provavelmente como um reflexo devido ao aumento no número de células, e as adrenais começam a responder a estímulos externos (AVRUTINA *et al.*, 1985). Tal resposta é ainda imatura, mesmo quando comparada com a de pintainhos recém-eclodidos.

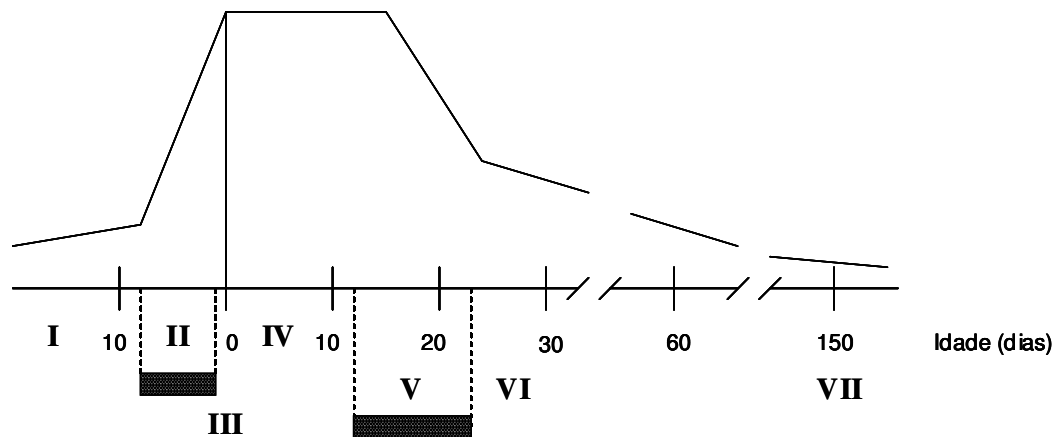



Figura 4 - Esquema de desenvolvimento da função das adrenais em poedeiras. I. período de desenvolvimento autônomo das adrenais; II. integração do eixo HPA; III. período de transição; IV. atividade máxima das adrenais; V. declínio rápido da atividade das adrenais; VI. declínio gradual da atividade; VII. maturidade das adrenais.  Períodos críticos. Extraído de AVRUTINA *et al.*, 1985.

Os hormônios secretados pelo sistema neuroendócrino hipotálamo-pituitária possuem um efeito amplo e de longa duração no organismo. Virtualmente todas as funções biológicas que são afetadas pelo estresse, incluindo imunocompetência, reprodução, metabolismo e comportamento, são reguladas por esses hormônios hipofisários. Sabe-se que a secreção destes hormônios hipofisários é alterada direta ou indiretamente durante o estresse. Aumentos na circulação de glicocorticóides adrenais (cortisol e corticosterona) têm sido bastante relacionados com diferentes tipos de estresse (MOBERG, 2000).

A elevação crônica de glicocorticóides resulta em catabolismo protéico, hiperglicemia, imunossupressão, susceptibilidade à infecção e depressão. Considerando as potentes ações deletérias da elevação dos glicocorticóides, uma função importante desses esteróides é reduzir a resposta do eixo HPA ao estresse, através de “feedback” negativo. A regulação da resposta ao estresse na glândula adrenal não é menos complexa que a regulação em nível de hipotálamo ou pituitária (MATTERI *et al.*, 2000).

Ao se considerar os efeitos dos hormônios glicocorticóides sobre o sistema imune, é importante ressaltar que os níveis desses hormônios variam consideravelmente durante o dia e há dois modos de secreção dos mesmos. Um modo

é fásico, como na resposta ao estresse, enquanto o segundo modo é cíclico, como no ritmo circadiano; ambos os modos operam mais ou menos independentemente, de forma que o “timing” do ritmo circadiano não é afetado pela resposta ao estresse, exceto quando sob condições extremas (MCEWEN *et al.*, 1997).

Muitas pesquisas em estresse durante o desenvolvimento indicam que animais expostos a agentes estressores durante o período embrionário ou ao nascer têm a habilidade aumentada em resistir ao estresse quando maduros (ARJONA *et al.*, 1990; IQBAL *et al.*, 1990; LAY, 2000; MORAES *et al.*, 2003). No entanto, se a exposição dos animais durante o desenvolvimento pode aumentar sua habilidade em resistir a situações estressantes, a manipulação desse fenômeno de modo controlado permitirá aos produtores criar sistemas de manejo específicos e assim, adequando-se a resposta ao estresse do animal ao seu ambiente, o bem estar pode ser aumentado, bem como a produtividade.

O 13^o dia foi escolhido porque tem-se conhecimento de que a maturação do eixo HPA no embrião de frangos ocorre próximo a esse dia. O aumento esperado na expressão de hsp70 durante o estresse embrionário poderia levar ao estabelecimento de uma espécie de memória imunológica, uma vez que infecções também são condições estressantes, e dessa forma, induziriam a uma nova síntese de tais proteínas de maneira mais rápida, gerando uma resposta imune mais eficiente. A hipótese abordada neste trabalho é que a manipulação da temperatura de incubação, no terço final da incubação interfere na resposta imune das aves pós-eclosão.

CAPÍTULO 2 - EXPRESSÃO DE hsp70 NA BURSA CLOACAL E CONCENTRAÇÃO DE CORTICOSTERONA EM PLASMA DE EMBRIÕES SUBMETIDOS A TRATAMENTO TÉRMICO INTERMITENTE MODERADO E RESPOSTA IMUNE PÓS-ECLOSÃO EM FRANGOS DE CORTE

RESUMO - O objetivo desse trabalho foi avaliar a expressão de hsp70 na bursa cloacal e a concentração de corticosterona (CS) no plasma de embriões de frangos de corte submetidos a tratamento térmico moderado por frio ou calor e a resposta imune das aves após a eclosão. Foram aplicados 3 tratamentos: controle (Co - incubação a 37,5°C, continuamente), calor e frio (Fr - 36,1°C) (Ca - 38,4°C) intermitente e moderado, durante 4 horas por dia, do 13º ao 19º dia de incubação (DE). Foram colhidas amostras de bursas e sangue de embriões de cada tratamento. Após a eclosão as aves foram criadas em termoneutralidade e foram colhidas amostras de sangue para avaliação da resposta imune contra o vírus da Doença de Newcastle. Os dados foram analisados em delineamento inteiramente casualizado, arranjos em esquema fatorial 3 x 7 (temperatura x dia de incubação). Não se verificou interação entre tratamentos e dia de incubação ($P=0,2037$). Observaram-se diferenças entre tratamentos ($P=0,0281$) para níveis de hsp70, sendo que o tratamento Fr apresentou menor concentração dessa proteína; e entre idades ($P=0,0001$), com maior expressão de hsp70 entre os dias DE17 e DE18. Não houve interação entre tratamentos e dia de incubação para níveis de CS ($P=0,8576$). As aves submetidas ao tratamento Ca apresentaram maiores concentrações plasmáticas de CS ($P=0,072$), quando comparadas àquelas do tratamento Fr. Foram observadas diferenças nos níveis de CS para idade ($P<0,0001$), ocorrendo aumento linear na concentração hormonal. Os tratamentos térmicos na incubação não influenciaram a função imune nas aves pós-eclosão ($P=0,2365$), mas essa reduziu com o avanço da idade e foi restaurada aos 21 dias de criação ($P<0,0001$). Assim, o tratamento por frio levou a menor expressão de hsp70, no entanto, o tratamento térmico embrionário aplicado no presente estudo não foi suficiente para afetar a resposta imune das aves.

Palavras-Chave: bursa cloacal, corticosterona, embriões de frangos de corte, estresse térmico moderado, proteína de choque térmico de 70 kD, resposta imune

Introdução

Todos os seres vivos respondem ao calor ou a outras situações estressantes pela indução da síntese de um grupo de proteínas denominadas proteínas de choque térmico (hsps). Essa resposta é um dos mecanismos adaptativos mais altamente conservados de que se tem conhecimento, e ocorre em todos os organismos. A indução da hsp é uma resposta emergencial, rápida e intensa (CRAIG, 1985; LINDQUIST & CRAIG, 1988; PARSELL & LINDQUIST, 1994; KIANG & TSOKOS, 1998) e essencial para a proteção celular contra danos causados por temperaturas excessivamente altas, para o reparo e/ou remoção de estruturas danificadas pelo estresse térmico e para a manutenção das estruturas celulares durante o estresse. Essas características parecem permitir que os organismos recuperem rapidamente suas funções normais após o estresse a que foram expostos (NAGAO *et al.*, 1990; MORIMOTO *et al.*, 1994).

Durante o desenvolvimento embrionário, o organismo é sensível a grandes variações de temperatura, podendo ocasionar a morte do embrião. No entanto, tratamentos moderados por calor aumentam a resistência não somente a altas temperaturas, mas também a uma grande variedade de estressores, tais como, anóxia, drogas, etanol, entre outros (PARSELL & LINDQUIST, 1994). O desenvolvimento da termotolerância está fortemente relacionado com o acúmulo de hsps nas células; os organismos se tornam mais termotolerantes no momento em que as hsps se tornam passíveis de indução (LINDQUIST & CRAIG, 1988; WANG & EDENS, 1994; FROSSARD, 1999). Esse fenômeno de tolerância é extremamente importante, resultando não somente em tolerância térmica, como também em resistência do organismo como um todo.

As hsps possuem propriedades únicas em gerar respostas imunes específicas contra agentes infecciosos. As hsps parecem estar associadas a peptídeos antigênicos,

e tal associação está relacionada com um possível papel na apresentação e processamento de antígenos, melhorando a resposta imune de maneira geral (POLLA *et al.*, 1998; ANDERSON & SRIVASTAVA, 2000; WALLIN *et al.*, 2002).

As hsp70 encontram-se amplamente distribuídas em diferentes tecidos em frangos de corte (WANG & EDENS, 1994; YAHAV *et al.*, 1997; GIVISIEZ *et al.*, 1999), mamíferos (FLANAGAN *et al.*, 1995; FROSSARD, 1999; LUFT & DIX, 1999), peixes e anfíbios (HEIKKILA *et al.*, 1986), mas somente nos últimos anos é que a expressão dessa proteína tem sido avaliada em embriões de frangos (GIVISIEZ *et al.*, 2001; GABRIEL *et al.*, 2002; LEANDRO *et al.*, 2004).

O estresse induz a uma resposta endócrina complexa envolvendo a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenais (HPA), elevando os níveis de corticosterona. A exposição de embriões de aves a baixas temperaturas entre o 13^o e 19^o dia de incubação resulta em alterações na secreção de corticóides em idade adulta, sugerindo que esse estágio de desenvolvimento represente um período crítico para manipulação a fim de se avaliar possíveis conseqüências do estresse embrionário durante a maturidade da ave (AVRUTINA *et al.*, 1985; MORAES *et al.*, 2003; MORAES *et al.*, 2004). Da mesma forma, agentes estressores podem alterar a função imune por diferentes mecanismos, como alterações na função endócrina. O impacto do estresse sobre o desenvolvimento de uma resposta imune depende da natureza, intensidade e duração do mesmo, podendo levar à modulação da resposta imune tanto pelo aumento ou supressão da mesma (DOHMS & METZ, 1991; EL-LETHEY *et al.*, 2003).

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito do estresse térmico intermitente durante o último terço da incubação sobre a expressão da hsp70 na bursa cloacal e sobre as concentrações plasmáticas de corticosterona de embriões de frangos de corte, bem como sobre a resposta imune das aves após a eclosão.

Material e Métodos

1. Manejo e tratamentos durante a incubação

Foram utilizados ovos férteis, provenientes de matrizes Cobb-500[®] com 39 semanas, em incubadoras artificiais (IP600, incubadoras Premium Ecológica Ltda, Belo Horizonte, MG, Brasil) a 37,5°C, 60% de umidade relativa e viragem a cada hora. Do primeiro ao 12º dia de incubação, todos os ovos foram submetidos continuamente à temperatura normal de incubação (37,5°C). No oitavo dia de incubação (DE8), procedeu-se à ovoscopia e os embriões mortos e ovos claros foram descartados. Foram incubados quatrocentos e cinquenta ovos com peso similar e divididos em três tratamentos: controle (Co; temperatura de incubação de 37,5°C), estresse por calor intermitente e moderado (Ca, 38,4°C/4 h/dia) e estresse por frio intermitente e moderado (Fr, 36,1°C/4 h/dia). O estresse térmico intermitente foi realizado a partir do 13º até o 19º dia de incubação (DE13 a DE19) e os ovos foram submetidos a temperaturas mais altas ou mais baixas durante 4 horas por dia. Os ovos do tratamento controle não sofreram nenhum tipo de estresse. Todos os ovos dos tratamentos Ca e Fr foram submetidos a estresse intermitente durante o período experimental. O tratamento por calor ou frio consistia na transferência dos ovos dos grupos Ca e Fr para duas outras incubadoras, ajustadas para 38,4°C e 36,1°C, respectivamente. Após 4 horas, os ovos Ca e Fr não utilizados para amostragem retornaram à incubadora mantida a 37,5°C até o dia seguinte, quando seriam novamente expostos ao frio ou calor. Dessa forma, o tratamento por calor se iniciou no DE13, repetindo-se no DE14, DE15, DE16, DE17, DE18 e DE19, sendo que o último grupo de ovos recebeu o tratamento durante todos os dias do período experimental, sofrendo um estresse acumulado de 28 horas de exposição ao calor ou frio. No DE19, os ovos remanescentes retornaram à incubadora controle para finalização do processo de incubação e obtenção de pintainhos para criação e avaliação da resposta imune.

2. Colheita de amostras

2.a. Plasma:

Foram colhidas amostras de sangue de 12 embriões por tratamento, por punção cardíaca, com seringas heparinizadas. O plasma foi obtido por centrifugação a 3500 g por 30 minutos e congelado a -20°C.

2.b. Bursa cloacal:

Imediatamente após o estresse, 12 ovos de cada tratamento foram abertos e os embriões foram mortos por decapitação. Foram colhidas bursas desses embriões, as quais foram agrupadas em “pool” (3 embriões/“pool”), totalizando 4 repetições por tratamento por dia de amostragem. Todas as amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -70°C até o processamento das mesmas.

3. Determinação de proteína total

As amostras de bursa foram homogeneizadas utilizando tampão de lise (20 mM Tris-HCl; pH 7,5; 0,9% NaCl; 2 mM β -mercaptoetanol), na proporção de 5 mL de tampão por grama de tecido, durante 30 s em homogeneizador Potter-Elvehjem (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, EUA), a 17000 g, seguido por intervalos de descanso em gelo por outros 30 s. Os tecidos lisados foram centrifugados a 4700 g por 30 minutos a 4°C, os sobrenadantes transferidos para microtubos e congelados a -20°C. A determinação de proteína total foi feita sempre em triplicatas e a concentração da proteína foi estimada a partir da regressão linear dos valores da curva-padrão feita para cada dosagem, utilizando-se albumina sérica bovina 99%, fração V (Sigma, Saint Louis, MO, EUA). Utilizou-se o kit Bio-Rad Protein Determination Assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), baseado no método descrito por BRADFORD (1976), de acordo com as instruções do fabricante.

4. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE)

A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida de eletroforese a 9% contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE, LAEMMLI, 1970), utilizando-se o

aparato Mini-Protean II (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) e voltagem constante (100 V). Quantidades conhecidas (30 µg) de proteína total e um padrão de referência com quantidades conhecidas de proteína foram aplicadas a todos os géis (GIVISIEZ *et al.*, 1999). Tal padrão de referência foi feito a partir de um “pool” de amostras de bursas dos embriões colhidos no 13^o dia, sendo uma amostra de cada tratamento. A amostra foi preparada utilizando-se uma alíquota de 30 µL para a eletroforese; a essa adicionou-se 30 µL de tampão de amostra duas vezes concentrado (125 mM Tris-HCl pH 6,8; 20% glicerol, 4% SDS; 0,002% azul de bromofenol) e 4 µL de β-mercaptoetanol. Antes de serem aplicadas no gel, as amostras de eletroforese mantidas a – 20^o C foram fervidas por 2 min, e imediatamente imersas em gelo.

5. Análise por “Western blotting”

Após a separação em gel de poliacrilamida-SDS, as proteínas foram eletroforeticamente transferidas para membranas de difluoreto de polivinilideno (PVDF). A transferência foi feita por 45 minutos a 4^o C e voltagem constante (90V), usando uma célula Mini Trans-Blot (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). As membranas foram coradas com Ponceau S a 0,05% em ácido acético a 1% durante um minuto para avaliar a transferência. Após várias lavagens com água deionizada, os sítios de interação não-específica foram bloqueados usando 10 mL de tampão salina fosfato (PBS) gelado, contendo 5% de leite em pó desnatado e Tween 20 (0,02%), por uma hora a temperatura ambiente, com agitação constante (aproximadamente 100 rpm). As membranas foram incubadas por uma hora a temperatura ambiente com anticorpo monoclonal anti-hsp70 (H-5157, Sigma, Saint Louis, MO) em 10 mL de PBS gelado, contendo Tween 20 (0,02%) (PBS-T) e 5% de leite em pó desnatado, na diluição de 1:1000. Foram realizadas quatro lavagens de cinco minutos cada com 10 mL de PBS-T e uma lavagem de 10 minutos com 10 mL de PBS, sob agitação constante. As membranas foram incubadas com um anticorpo secundário anti-camundongo conjugado a fosfatase alcalina (A-3562, Sigma, Saint Louis, MO), em 10 mL de PBS contendo 5% de leite em pó desnatado, na diluição de 1:5000, por uma hora, a temperatura ambiente e agitação constante. Após nova seqüência de lavagens,

conforme descrito anteriormente, a reação de cor foi desenvolvida adicionando-se 33 μ L de cloreto de nitro-azul de tetrazólio (NBT; 50 mg/mL em dimetilformamida) e 66 μ L 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato p-toluideno (BCIP; 50 mg/mL em dimetilformamida 70%) em 10 mL de tampão de fosfatase alcalina (Tris HCl, pH 9,5, 1M; NaCl 2M; MgCl₂ 1M). A reação foi interrompida pela adição de uma solução de ácido tricloroacético a 3%. Após lavagem com água deionizada, as membranas foram secas e mantidas ao abrigo da luz. O sinal de cor das bandas correspondentes à hsp70 foi analisado por densitometria a 525 nm (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan), usando o modo de reflectância e leitura em zig-zague. A hsp70 foi quantificada de acordo com GIVISIEZ *et al.* (1999). Resumidamente, retas-padrão de hsp70 foram construídas utilizando-se hsp70 purificada (H-9776, Sigma, Saint Louis, MO, EUA) e a técnica de “Western blotting” foi realizada como descrito acima. A relação entre as amostras e o padrão de referência em cada membrana foi usada para determinar a quantidade de hsp70 no sobrenadante. Os resultados foram expressos como ng de hsp70/ μ g de proteína total.

6. Radioimunoensaio

Os níveis plasmáticos de corticosterona foram determinados através da técnica de radioimunoensaio, utilizando-se kit comercial (ImmuChem™ Double Antibody Corticosterone RIA, MP Biomedicals), conforme recomendações do fabricante.

7. Manejo das aves

Após a eclosão, foram criados 30 pintainhos provenientes de cada tratamento por um período de três semanas, os quais foram alojados em três boxes de uma câmara climatizada. Todas as aves foram mantidas em boxes com cama de maravalha e receberam água e ração *ad libitum*. Foi fornecida dieta farelada à base de milho e farelo de soja. Os níveis calculados de proteína bruta e energia metabolizável das rações inicial e de crescimento foram, respectivamente, 21,50% e 3200 kcal de EM/kg de ração. As aves foram mantidas em ambiente com temperatura termoneutra (35°C, 32°C e 28°C durante a primeira, segunda e terceira semanas, respectivamente). No 7^o

dia de idade, todas as aves foram vacinadas contra a Doença de Newcastle (New Vac-LS, La Sota Tipo B1, Fort Dodge).

8. Colheita de amostras durante a criação

Foram colhidas amostras de 1 mL de sangue por punção da veia jugular aos 3, 7, 15 e 21 dias de idade, de seis aves por tratamento, tomadas aleatoriamente. O sangue colhido foi mantido em estufa a 37°C por uma hora, posteriormente centrifugado a 3500 g por 30 minutos e o soro obtido foi transferido para microtubos, devidamente identificados, e congelados a -20°C até o momento das análises.

9. Sorologia

A presença de anticorpos anti-Newcastle nas amostras de soro foi avaliada por ensaio imunoenzimático (ELISA) contra antígenos do vírus da Doença de Newcastle, utilizando-se o kit comercial (FlockCheck, IDEXX Laboratories, Westbrooke, EUA)¹. Foram utilizados os soros proveninetes da colheita de sangue realizada aos 3, 7, 15 e 21 dias de idade. Os resultados foram expressos como relação S/P, obtida através da equação:

$$S / P = \frac{\text{médiaA} - \text{médiaCN}}{\text{médiaCP} - \text{médiaCN}}$$

Em que: média A = média da amostra;
 média CN = média do controle negativo;
 média CP = média do controle positivo.

10. Análise estatística

Os dados referentes aos níveis de hsp70, corticosterona plasmática e relação S/P foram analisados em um delineamento completamente casualizado, arranjos em um esquema fatorial 3 x 7 (três temperaturas de incubação x sete dias de incubação).

Foi realizada uma análise de variância usando-se o procedimento “General Linear Models” do Programa SAS[®] (LITTELL et al., 2002) e em caso de diferença significativa as médias de tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey (5%). O efeito de dias de incubação e idade pós eclosão foram estudados por meio de regressões polinomiais.

Resultados e discussão

A Figura 1 mostra uma membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF) escolhida ao acaso e que é representativa das demais utilizadas para a quantificação da hsp70 na bursa cloacal de embriões expostos ao estresse pelo frio e pelo calor, aos 14 dias de incubação (DE14).

Não foi verificada interação significativa entre idade do embrião e tratamentos por estresse térmico moderado para os níveis de hsp70 ($P=0,2037$). O tratamento por frio moderado induziu a menor expressão de hsp70 ($P=0,0281$) (Figura 2) em comparação com o tratamento controle, enquanto que a exposição ao calor provoca expressão de hsp70 similar aos demais tratamentos.

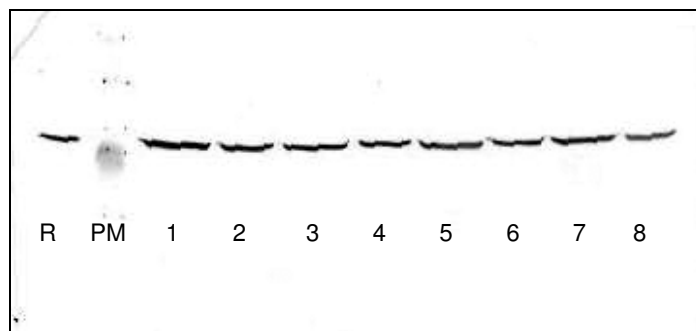


Figura 1 - Membrana de “Western blotting” com bandas de hsp70 em bursa de embriões expostos ao tratamento por frio ou calor aos 14 dias de incubação. R, amostra de referência; PM, marcador de peso molecular; amostras 1, 5 e 7, tratamento controle; amostras 2 e 6, tratamento por frio; amostras 3, 4 e 8, tratamento por calor.

¹ IDEXX Laboratories, Inc. One IDEXX Drive, Westbrook, Maine 04092, USA.

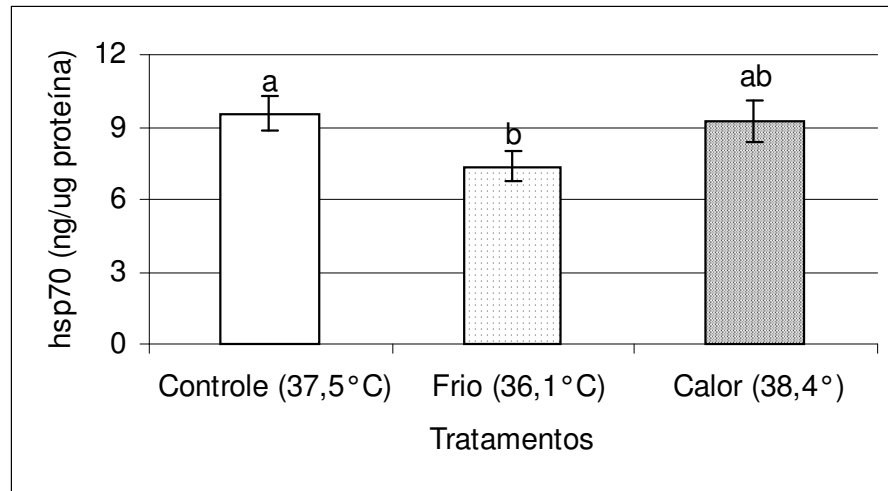


Figura 2 – Médias \pm erro-padrão dos níveis de hsp70 em bursa de embriões de frangos de corte submetidos a tratamento térmico embrionário moderado, aplicado dos 13 aos 19 dias de incubação ($P=0,0281$).

Embora ainda não tenha sido estudada a expressão quantitativa de hsp70 em bursa cloacal, KAWAZOE *et al.* (1999) demonstraram que esse órgão expressa a referida proteína tanto de maneira constitutiva quanto induzida por elevação da temperatura durante DE12. O estresse por frio ou calor por 4 a 6 h nos dias DE13, DE16 e DE19, levou a menor expressão de hsp70 nos pulmões nos dias DE13 e DE19 e no coração no dia DE13, enquanto que o estresse por calor induziu a maior expressão dessa proteína no coração nos dias DE13 e DE 19 e nos pulmões no dia DE19 (LEANDRO *et al.*, 2004). Independentemente do tipo de estresse aplicado, concentrações até aproximadamente 5 vezes mais elevadas de hsp70 foram obtidas no cérebro dos embriões quando comparadas aos demais tecidos, a saber: coração, fígado, músculo peitoral e pulmões. GIVISIEZ *et al.* (2001), estudando os efeitos do estresse embrionário crônico por frio ou calor, obtiveram resultados semelhantes para expressão de hsp70 no cérebro de embriões aos DE19 e DE20.

Segundo FLANAGAN *et al.* (1995) a expressão de hsp70 é tecido-dependente e obedece a uma hierarquia, privilegiando órgãos considerados vitais em detrimento aos demais tecidos. Dessa forma, a baixa responsividade da bursa cloacal aos tratamentos térmicos quando comparados ao controle pode ser devido à sua posição hierárquica em relação aos demais tecidos embrionários. Outra hipótese seria a de que esse órgão

seja mais resistente ao estresse no período em que foi aplicado, uma vez que seu período crítico de crescimento e proliferação celular ocorre do DE8 ao DE14 (DIETERLEN-LIÈVRE, 1994).

Observou-se efeito significativo para dia de incubação ($P < 0,0001$), com o aumento da expressão de hsp70 entre o início e o fim do período de tratamento térmico (Figura 3). A análise de regressão polinomial para se avaliar o efeito de dia de incubação foi significativa e é possível inferir que a expressão de hsp70 aumentou com o avanço da idade ($Y_{\text{hsp70}} = -0,2794 (\text{dia de incubação})^2 + 9,6421 (\text{dia de incubação}) - 72,698$; $R^2 = 0,99$), sendo que os maiores níveis dessa proteína foram obtidos no DE17, seguido por uma queda na expressão da mesma nos dias subsequentes. Esse padrão de expressão difere do observado por LEANDRO *et al.* (2004), que descreveram maiores níveis de hsp70 em estágios mais precoces do desenvolvimento embrionário. No entanto, o aumento crescente verificado no presente estudo se deve, muito provavelmente, ao próprio desenvolvimento embrionário, uma vez que esse padrão se assemelha bastante ao obtido para a secreção de corticosterona (Figura 5) nos mesmos animais durante o período avaliado.

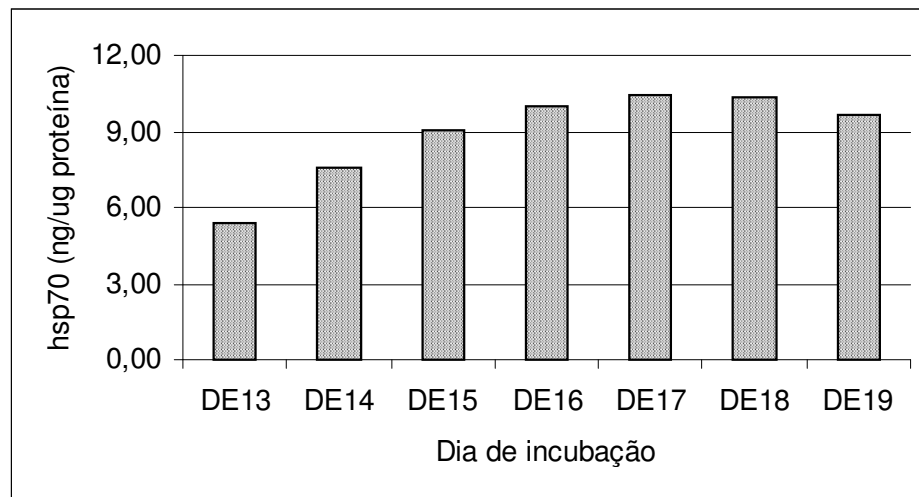


Figura 3 – Médias ajustadas da expressão de hsp70 em bursa de embriões de frangos de corte submetidos a tratamento térmico moderado, para efeito de dia de incubação ($P < 0,0001$).

Não se observou interação significativa entre DE e tratamentos para a concentração de corticosterona ($P=0,8576$). O tratamento por frio induziu a menor concentração plasmática de corticosterona ($P=0,0072$) em relação aos embriões expostos ao calor, enquanto o tratamento por calor e o controle não diferiram entre si (Figura 4). Houve efeito significativo para idade ($P<0,0001$), tendo-se verificado aumento linear nos níveis de corticosterona com o decorrer dos dias de incubação (Figura 5), sendo que ao 19º dia tais níveis foram superiores em relação aos obtidos para os demais dias de incubação. Foram calculadas regressões polinomiais para avaliar o efeito de idade sobre os níveis hormonais, e a equação obtida foi a seguinte: $Y_{cort} = -5,2549 (\text{dia de incubação})^2 + 201,08 (\text{dia de incubação}) - 1707,1$; $R^2 = 0,99$.

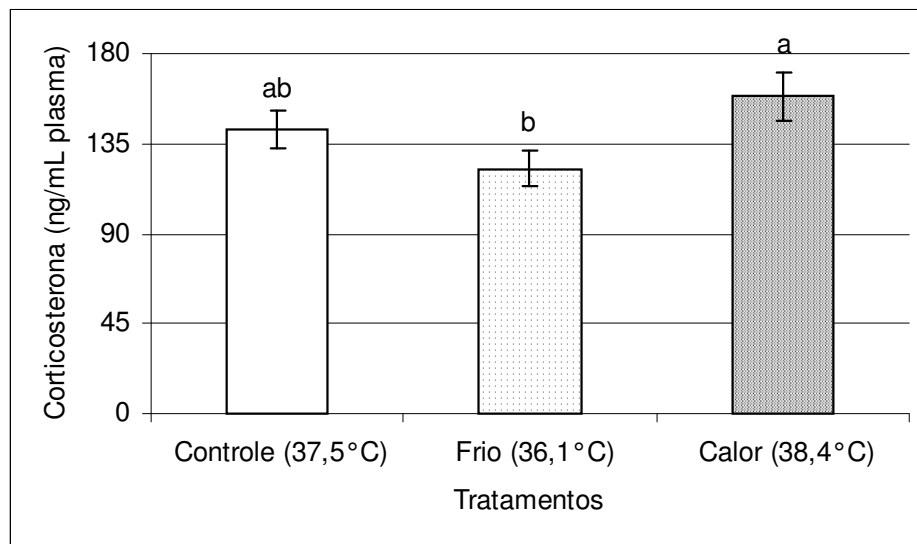


Figura 4 – Médias \pm erro-padrão dos níveis de corticosterona no plasma de embriões de frangos de corte submetidos a tratamento térmico embrionário moderado aplicado dos 13 aos 19 dias de incubação ($P=0,0072$).

O aumento na concentração de corticosterona observado no tratamento por calor em relação aos demais tratamentos pode ser devido a adaptações epigenéticas engendradas em resposta ao estresse e as alterações verificadas nos níveis hormonais do presente estudo coincidem com o período crítico de desenvolvimento do eixo HPA (DE13 a DE19) (AVRUTINA *et al.*, 1985). MORAES *et al.* (2004) submeteram embriões de DE13 a DE17 a 39°C e obtiveram níveis crescentes de corticosterona no plasma

nesse período, para os animais tratados por calor ou não. No entanto, a magnitude do aumento relatado foi semelhante para ambos os tratamentos, exceto no DE14, quando a alteração da temperatura levou a uma elevação dos níveis hormonais.

Tem sido proposto que diversos mecanismos imunológicos são regulados por incrementos na taxa de secreção de corticosteróides, resultando em imunossupressão em aves adultas (DOHMS & METZ, 1991; MASHALY *et al.*, 1992; MC EWEN *et al.*, 1997). Segundo DECUYPERE *et al.* (1988), o tratamento por calor do DE11 ao DE20 levou a uma posterior redução nos níveis de corticosterona em frangos de corte quando submetidos a estresse térmico agudo aos 40 dias de idade. Utilizando temperaturas elevadas e reduzidas em estágios iniciais ou finais do período embrionário, YAHAV *et al.* (2004) observaram maior resistência ao desafio térmico e reduções nos níveis de corticosterona em pintainhos de 3 dias de idade, previamente tratados por calor entre DE16 e DE18. No entanto, a literatura é bastante escassa no que diz respeito ao efeito do estresse embrionário sobre a resposta imune nas aves adultas. Se os níveis plasmáticos de glicocorticóides são reduzidos após tratamento térmico durante a incubação, e altos níveis desses induzem a supressão na resposta imune das aves, então é possível que tal redução provoque relativa melhora nos parâmetros imunológicos em aves previamente tratadas pelo frio ou calor.

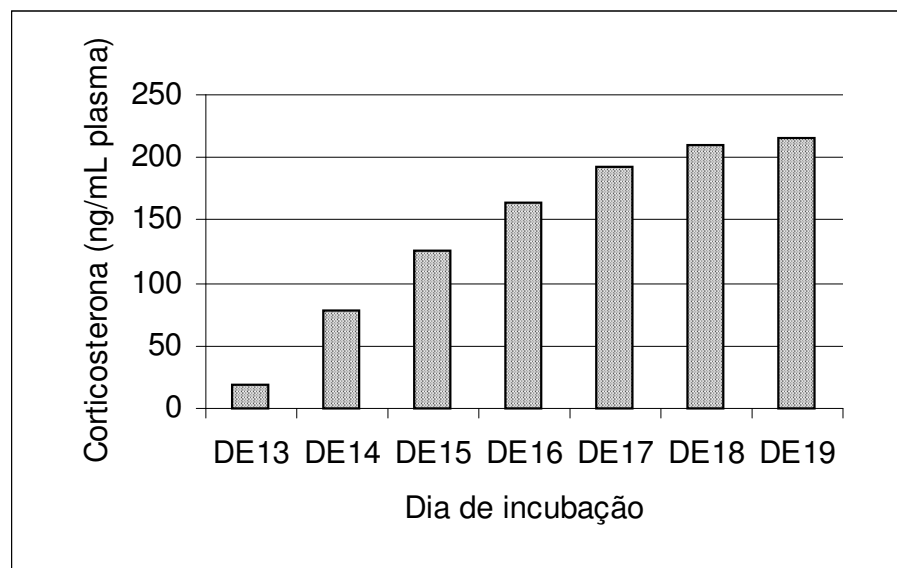


Figura 5 – Médias ajustadas dos níveis de corticosterona no plasma de embriões de frangos de corte submetidos a tratamento térmico moderado, para efeito de dia de incubação ($P < 0,0001$).

MASHALY *et al.* (2004) utilizando estresse cíclico e por calor em poedeiras verificaram uma significativa redução na resposta imune humoral no grupo estressado por calor e atribuem tal fato a uma série de eventos, que se inicia com o aumento na produção de citocinas inflamatórias, estas estimulam a secreção do hormônio de liberação de corticotropina (CRH), que por sua vez estimula a síntese de corticosterona, culminando em depressão na produção de anticorpos.

Imediatamente após a eclosão e aos 7 dias de idade, no momento da vacinação, os pintainhos de todos os tratamentos foram pesados. Não foram observadas diferenças para o peso dos pintainhos no momento da eclosão ($P=0,6437$), nem tampouco com uma semana de vida ($P=0,1878$). Dessa forma, o estresse aplicado não influenciou o desenvolvimento e ganho de peso das aves na primeira semana, independentemente do tratamento. Esses resultados estão de acordo com LAY & WILSON (2002), YALÇIN & SIEGEL (2003) e YAHAV *et al.* (2004) que não observaram alterações no peso corporal dos pintainhos submetidos a estresse por calor e/ou frio durante a incubação.

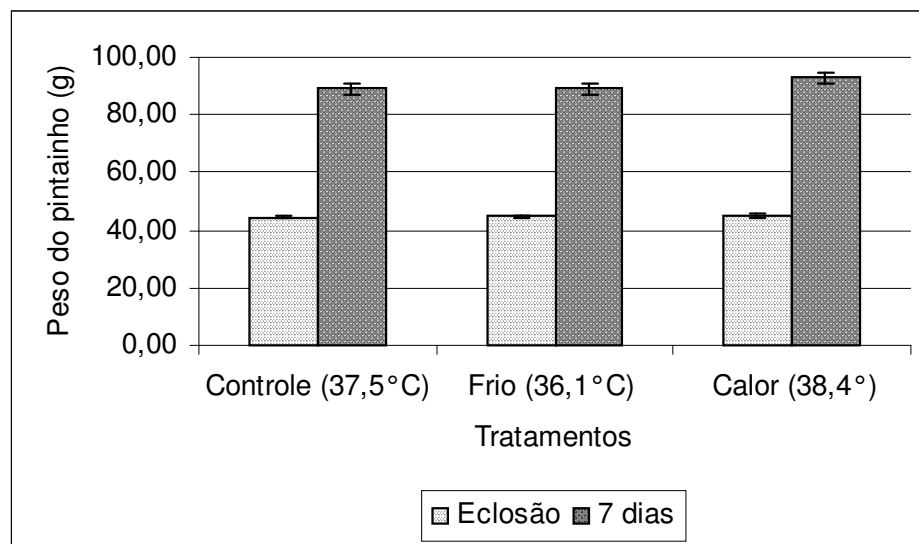


Figura 6 – Peso à eclosão de pintainhos submetidos a tratamento térmico moderado aplicado dos 13 aos 19 dias de incubação ($P=0,6437$) e aos 7 dias de idade ($P=0,1878$).

Não houve interação significativa entre tratamentos e DE para a relação S/P ($P=0,2086$). Não foram observados efeitos de tratamento ($P=0,2365$) sobre a relação

S/P, no entanto, as aves pertencentes aos grupos tratados por frio ou calor durante o período embrionário apresentaram pequena melhora em relação às aves do grupo controle (Figura 7). Verificaram-se diferenças entre as idades ($P < 0,0001$), tendo havido um decréscimo gradual dos 3 aos 15 dias, seguido por uma recuperação abrupta aos 21 dias (Figura 8), comportamentos descritos por: $Y_{S/P} = 0,0123 (\text{idade})^2 - 0,3526 (\text{idade}) + 2,8573$; $R^2 = 0,9229$.

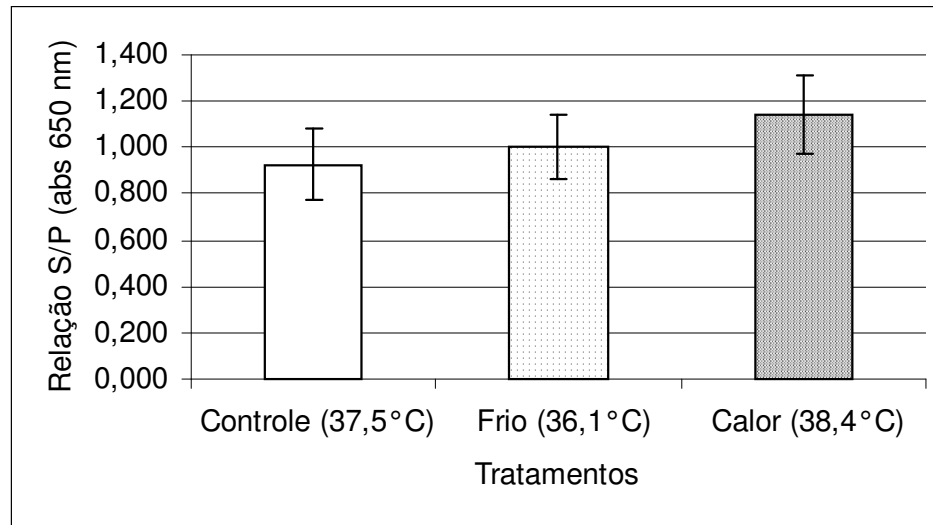


Figura 7 – Médias \pm erro-padrão da relação S/P (absorbância a 650 nm) no soro das aves submetidas a tratamento térmico embrionário moderado do 13º ao 19º dia de incubação, criadas em termoneutralidade e vacinadas aos 7 dias contra o vírus da Doença de Newcastle, para efeito de tratamento ($P=0,2365$).

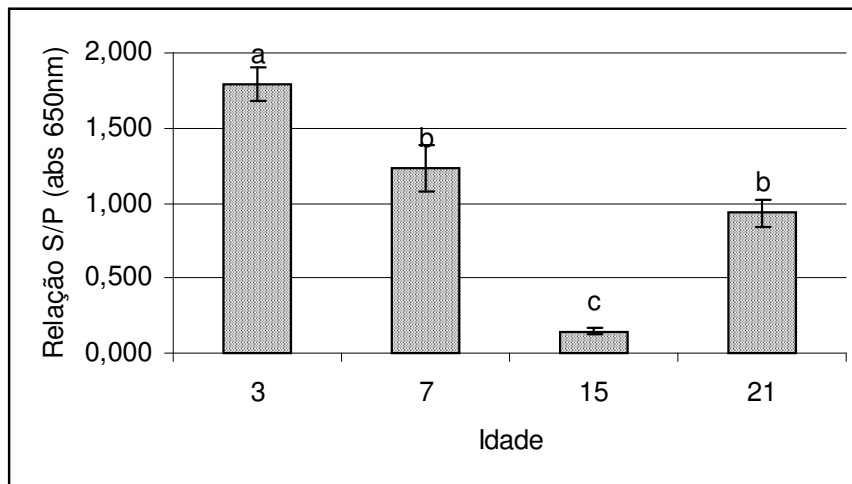


Figura 8 – Médias \pm erro-padrão da relação S/P (absorbância a 650 nm) no soro das aves submetidas a tratamento térmico embrionário moderado do 13º ao 19º dia de incubação, criadas em termoneutralidade e vacinadas aos 7 dias contra o vírus da Doença de Newcastle, para efeito de idade ($P < 0,0001$).

O estresse por frio de curta duração em diferentes linhagens de poedeiras com 5 semanas de idade induziu a um aumento da atividade fagocítica e da imunidade humoral inata, sem alterações, no entanto, na imunidade humoral adaptativa (HANGALAPURA *et al.*, 2003). Em um estudo posterior, a exposição mais prolongada das aves à baixa temperatura, todavia, não afetou a resposta imune das aves (HANGALAPURA *et al.*, 2004b).

Os resultados da relação S/P para efeito de idade indicam uma redução na imunidade inata com o aumento da idade até os 15 dias, sendo que aos 21 dias observa-se uma recuperação da imunidade, muito provavelmente devido à vacinação realizada ao sétimo dia. A redução observada entre os dias 7 e 15 possivelmente se deve pela competição dos anticorpos maternos pelo vírus vacinal e iniciação da resposta imune adaptativa.

Parece razoável admitir que as condições utilizadas no presente trabalho não tenham sido suficientemente estressantes, a ponto de incitar uma resposta imunológica evidente nas aves após a eclosão. No entanto, pode-se notar que os níveis de anticorpos aos 21 retornaram a valores mais elevados de relação S/P. Dessa forma, as condições de estresse na incubação parecem não ter efeitos deletérios sobre a resposta imune das aves. Restaria ainda avaliar se essa resposta se mantém por períodos mais prolongados, e também, sob condições de desafio pelo agente. Caso o estresse embrionário não prejudique a capacidade do animal em responder eficientemente à infecção, o método pode ser avaliado mais amplamente, em condições comerciais.

Assim sendo, o estresse intermitente moderado por frio levou a menor expressão de hsp70 em relação ao tratamento controle, enquanto que o estresse por frio ou calor não foram suficientes para alterar a secreção de corticosterona nos embriões ou a resposta imune nas aves após a eclosão.

CAPÍTULO 3 – EXPRESSÃO DE hsp70 NA BURSA CLOACAL E CONCENTRAÇÃO DE CORTICOSTERONA EM PLASMA DE EMBRIÕES SUBMETIDOS A ESTRESSE TÉRMICO AGUDO E RESPOSTA IMUNE PÓS-ECLOSÃO EM FRANGOS DE CORTE

RESUMO - O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão de hsp70 na bursa cloacal de embriões de frangos de corte submetidos a estresse térmico agudo por frio ou por calor, bem como a concentração plasmática de corticosterona (CS) e a resposta imune das aves às 3 semanas de idade. Foram aplicados três tratamentos: controle (Co - incubação a 37,5°C, continuamente), estresse agudo por calor (Ca – 40,0°C) e por frio (Fr – 35,5°C), durante 4 horas em cada dia, do 13º ao 19º dia de incubação (DE13 a DE19). Os ovos que foram estressados em um determinado dia não foram novamente manipulados, dessa forma, avaliou-se somente o efeito das 4 horas de estresse. Foram colhidas amostras de bursas e de sangue de embriões provenientes de cada tratamento, imediatamente após o estresse. Após a eclosão as aves foram criadas em termoneutralidade e foram colhidas amostras de sangue para avaliação da resposta imune contra o vírus da Doença de Newcastle. Houve interação entre tratamentos e dia de incubação ($P < 0,0001$) para os níveis de hsp70 na bursa. Dentro de tratamentos, os níveis de hsp70 foram superiores para os embriões estressados por frio nos DE13, DE15, DE16 e DE17 ($P < 0,05$). Também para os níveis de CS no plasma houve interação entre tratamentos e dia de incubação ($P = 0,0391$), sendo que no DE17 ($P = 0,0236$) o tratamento Fr apresentou menores concentrações desse hormônio. A função imune nas aves foi positivamente afetada pelo estresse embrionário ($P = 0,0034$), decaindo com o avanço da idade e recuperada aos 21 dias, após a vacinação. Assim, o estresse embrionário foi eficaz em aumentar a síntese de hsp70 na bursa cloacal dos embriões e em provocar melhora sobre a resposta imune humoral inata das aves.

Palavras-Chave: bursa cloacal, corticosterona, embriões de frangos de corte, estresse térmico agudo, plasma, proteína de choque térmico de 70 kD

Introdução

As proteínas de choque térmico (hsp) representam elementos importantes no que diz respeito à sobrevivência a estímulos estressores, independente de sua natureza. Suas principais funções de proteção celular, auxílio no dobramento de proteínas recém-sintetizadas e remoção de estruturas danificadas pelo estresse tornaram-se, nos últimos anos, um conceito clássico, bem definido e amplamente estudado (CRAIG, 1985; LINDQUIST, 1986; MORIMOTO *et al.*, 1994a; PARSELL & LINDQUIST, 1994; KIANG & TSOKOS, 1998). O estímulo por temperaturas extremas se apresenta como o mais relevante para a avicultura e, portanto, tem sido utilizado como modelo para o estudo da expressão de tais proteínas e sua possível correlação com o desenvolvimento da termotolerância (WANG & EDENS, 1994; YAHAV *et al.*, 1997a; YAHAV *et al.*, 1997b; WANG & EDENS, 1998; GIVISIEZ *et al.*, 1999; DIONELLO *et al.*, 2001; GABRIEL *et al.*, 2002; GIVISIEZ *et al.*, 2003; LEANDRO *et al.*, 2004).

A termotolerância é definida como a capacidade das células, após sua exposição a estresses moderados e subsequente recuperação, de sobreviver a um estresse que, sem esse pré-tratamento, seria letal. Esse fenômeno se desenvolve devido a diferentes mecanismos celulares e moleculares, dentre eles a expressão e acúmulo de hsp na célula, levando à ativação de mecanismos reparadores, como um meio de estabelecer uma espécie de memória celular (PARSELL & LINDQUIST, 1994; VERBEKE *et al.*, 2001). O principal achado determinando que as hsp estivessem diretamente relacionadas com o desenvolvimento da termotolerância partiu de RIABOWOL *et al.* (1988), quando esses observaram que fibroblastos injetados com anticorpos anti-hsp70 não resistiram à exposição a temperaturas elevadas.

Devido ao fato do estresse retirar o animal da homeostase, o sistema neuroendócrino é alterado, resultando em aumento na secreção de glicocorticóides. Assim sendo, a exposição ao estresse durante a vida fetal ou neonatal pode ter efeitos significativos na fisiologia do animal. O sistema endócrino responde de alguma maneira a estressores específicos, uma vez que a sinalização hormonal exerce papel vital na manutenção da homeostase (MATTERI *et al.*, 2000). O efeito geral na resposta

adaptativa do animal ao estresse é a integração de respostas hormonais múltiplas, e frequentemente interativas, que afetam diretamente a saúde e desempenho das aves.

O papel do córtex adrenal em resposta ao estresse embrionário tem sido observado em muitas espécies, incluindo frangos de corte. A exposição a temperaturas reduzidas do 13° ao 19° dia de incubação levou ao aumento na taxa de secreção de glicocorticóides e, após tal tratamento, as adrenais se tornaram mais responsivas a estímulos estressantes (AVRUTINA *et al.*, 1985). A concentração de corticosterona também aumentou em embriões com 14 dias de incubação submetidos a estresse por calor do 13° até o 17° dia de incubação (MORAES *et al.*, 2004), sugerindo que alterações no ambiente durante o desenvolvimento embrionário podem levar a adaptações fisiológicas que culminariam no desenvolvimento de melhores respostas termorregulatórias na ave em idade adulta. A partir do 13º dia de incubação, todos os sistemas estão formados, e iniciam-se os processos de crescimento e maturação dos mesmos (HAMBURGER & HAMILTON, 1951), sendo que esse estágio se apresenta como um período crucial para manipulação e avaliação das alterações fisiológicas decorrentes (AVRUTINA *et al.*, 1985; MORAES *et al.*, 2003; MORAES *et al.*, 2004).

YAHAV *et al.* (2004) avaliaram o efeito de estresse por calor e por frio durante o período embrionário e verificaram que a imposição de temperaturas mais elevadas (39,5 e 41,0°C) entre o DE16 e DE18 resultou em aumento na termotolerância e redução dos níveis de corticosterona quando os pintainhos foram expostos a estresse por calor aos 3 dias de idade.

Em uma situação de estresse, as hsp's atuam sobre o sistema imune de forma a estimular a produção de citocinas pelos macrófagos (MOSELEY, 2000) as quais aumentam a secreção de hormônio de liberação de corticotropina (CRH), esse, por sua vez, eleva a taxa de secreção de corticosterona. Como consequência, ocorre uma depressão na produção de anticorpos, resultando em imunossupressão (MASHALY *et al.*, 1998). Assim sendo, o papel das hsp's sobre a função imune ainda é bastante controverso, uma vez que em um primeiro momento parecem estimular a resistência, e em outro, parecem ser imunossupressoras.

O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do estresse térmico agudo por frio ou por calor sobre os níveis de hsp70 na bursa cloacal e os níveis de corticosterona no plasma de embriões de frangos de corte, e posteriormente a resposta imune das aves após a eclosão.

Material e Métodos

1. Manejo e tratamentos durante a incubação

Foram utilizados ovos férteis, provenientes de matrizes “Cobb” com 37 semanas de idade. Os ovos foram incubados a 37,5° C e 60% de umidade relativa em incubadora artificial com a temperatura controlada automaticamente (Incubadora IP600, Premium Ecológica LTDA) e submetidos à viragem a cada 1 hora. No sétimo dia de incubação foi realizada ovoscopia, a fim de eliminar embriões mortos, selecionando-se 1200 ovos com peso similar e divididos em três tratamentos: controle (Co; temperatura de incubação de 37,5° C), estresse agudo por calor (Ca, 40,0° C/4 h) e estresse agudo por frio (Fr, 35,5° C/4 h). Do primeiro ao 12º dia de incubação, os ovos dos 3 tratamentos foram continuamente submetidos à temperatura normal de incubação (37,5 °C). O estresse térmico agudo foi realizado a partir do 13º até o 19º dia de incubação (DE13 a DE19). A cada dia, grupos diferentes de 55 ovos dos tratamentos Ca e Fr foram submetidos a temperaturas mais altas ou mais baixas durante 4 horas, enquanto os ovos do tratamento controle não sofreram nenhum tipo de estresse. O tratamento térmico consistia na transferência dos ovos dos grupos Ca e Fr para incubadoras ajustadas para 40,0° C e 35,5° C por 4 horas. Ao final do estresse agudo, 30 ovos por tratamentos eram usados para colheita tecidual e 25 ovos retornavam à incubadora controle para eclosão e avaliação da resposta imune durante a criação dos pintainhos.

2. Colheita de amostras

2.a. Plasma:

Foram colhidas amostras de sangue de 12 embriões por tratamento, por punção cardíaca, com seringas heparinizadas. O plasma foi obtido por centrifugação a 3500 g por 30 minutos e congelado a -20°C.

2.b. Bursa cloacal:

Imediatamente após o estresse, 30 ovos de cada tratamento foram abertos e os embriões foram mortos por decapitação. Foram colhidas bursas desses embriões, as quais foram agrupadas em “pool” (5 embriões/“pool”), totalizando 6 repetições por tratamento por dia de amostragem. Todas as amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -70°C até o processamento das mesmas.

3. Determinação de proteína total

As amostras de bursa foram homogeneizadas utilizando tampão de lise (20 mM Tris-HCl; pH 7,5; 0,9% NaCl; 2 mM β -mercaptoetanol), na proporção de 5 ml de tampão por grama de tecido, durante 30 s em homogeneizador Potter-Elvehjem (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, EUA), a 17000 g, seguido por intervalos de descanso em gelo por outros 30 s. Os tecidos lisados foram centrifugados a 4700 g por 30 minutos a 4°C, os sobrenadantes transferidos para microtubos e congelados a -20°C. A determinação de proteína total foi feita sempre em triplicatas e a concentração da proteína foi estimada a partir da regressão linear dos valores da curva-padrão feita para cada dosagem, utilizando-se albumina sérica bovina 99%, fração V (Sigma, Saint Louis, MO, EUA). Utilizou-se o kit Bio-Rad Protein Determination Assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), baseado no método descrito por BRADFORD (1976), de acordo com as instruções do fabricante.

4. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE)

A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida de eletroforese a 9% contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE, LAEMMLI, 1970), utilizando-se o

aparato Mini-Protean II (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) e voltagem constante (100 V). Quantidades conhecidas (30 µg) de proteína total e um padrão de referência com quantidades conhecidas de proteína foram aplicadas a todos os géis (GIVISIEZ *et al.*, 1999). Tal padrão de referência foi feito a partir de um “pool” de amostras dos embriões colhidos no 13º dia, sendo uma amostra de cada tratamento. A amostra foi preparada utilizando-se uma alíquota de 30 µL para a eletroforese; a essa adicionou-se 30 µL de tampão de amostra duas vezes concentrado (125 mM Tris-HCl pH 6,8; 20% glicerol, 4% SDS; 0,002% azul de bromofenol) e 4 µL de β-mercaptoetanol. Antes de serem aplicadas no gel, as amostras mantidas a –20º C foram fervidas por 2 min, e imediatamente imersas em gelo.

5. Análise por “Western blotting”

Após a separação em gel de poliacrilamida-SDS, as proteínas foram eletroforeticamente transferidas para membranas de difluoreto de polivinilideno (PVDF). A transferência foi feita por 45 minutos a 4º C e voltagem constante (90 V), usando uma célula Mini Trans-Blot (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). As membranas foram coradas com Ponceau S a 0,05% em ácido acético a 1% durante um minuto para avaliar a transferência. Após várias lavagens com água deionizada, os sítios de interação não-específica foram bloqueados usando 10 mL de tampão salina fosfato (PBS) gelado, contendo 5% de leite em pó desnatado e Tween 20 (0,02%), por uma hora à temperatura ambiente, com agitação constante (aproximadamente 100 rpm). As membranas foram incubadas por uma hora a temperatura ambiente com anticorpo monoclonal anti-hsp70 (H-5157, Sigma, Saint Louis, MO) em 10 mL de PBS gelado, contendo 5% de leite em pó desnatado e Tween 20 (0,02%) (PBS-T), na diluição 1:1000. Foram realizadas quatro lavagens de cinco minutos cada com 10 mL de PBS-T e uma lavagem de 10 minutos com 10 mL de PBS, sob agitação constante. As membranas foram incubadas com anticorpo secundário anti-camundongo conjugado a fosfatase alcalina (A-3562, Sigma, Saint Louis, MO), em 10 mL de PBS contendo 5% de leite em pó desnatado, na diluição de 1:5000, por uma hora, a temperatura ambiente e agitação constante. Após nova seqüência de lavagens, conforme descrito

anteriormente, a reação de cor foi desenvolvida adicionando-se 33 μ L de cloreto de nitro-azul de tetrazólio (NBT; 50 mg/mL em dimetilformamida) e 66 μ L 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato p-toluideno (BCIP; 50 mg/mL em dimetilformamida 70%), em 10 mL de tampão de fosfatase alcalina (Tris HCl, pH 9,5, 1 M; NaCl 2 M; MgCl₂ 1 M). A reação foi interrompida pela adição de uma solução de ácido tricloroacético a 3%. Após lavagem com água deionizada, as membranas foram secas e mantidas ao abrigo da luz. O sinal de cor das bandas correspondentes à hsp70 foi analisado por densitometria a 525 nm (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan), usando o modo de reflectância e leitura em ziguezague. A hsp70 foi quantificada de acordo com GIVISIEZ *et al.* (1999). Resumidamente, curvas padrão de hsp70 foram construídas utilizando-se hsp70 purificada (H-9776, Sigma, Saint Louis, MO, EUA) e a técnica de “Western blotting” foi realizada como descrito acima. A relação entre as amostras e o padrão de referência em cada membrana foi usada para determinar a quantidade de Hsp70 no sobrenadante. Os resultados foram expressos como ng de hsp70/ μ g de proteína total.

6. Radioimunoensaio

Os níveis plasmáticos de corticosterona foram determinados através da técnica de radioimunoensaio, utilizando-se kit comercial ImmuChem™ Double Antibody Corticosterone RIA (MP Biomedicals), conforme recomendações do fabricante.

7. Manejo das aves

Após a eclosão, foram criados 20 pintainhos provenientes de cada tratamento por um período de três semanas, em câmara climatizada. Todas as aves receberam água e ração *ad libitum*. Todas as aves foram criadas em boxes com cama de maravalha e receberam água e ração *ad libitum*. Foi fornecida dieta farelada à base de milho e farelo de soja. Os níveis calculados de proteína bruta e energia metabolizável das rações inicial e de crescimento foram, respectivamente, 21,50% e 3200 kcal de EM/kg de ração. As aves foram mantidas em ambiente com temperatura termoneutra (35°C, 32°C e 28°C durante a primeira, segunda e terceira semana, respectivamente).

No 7º dia de idade, todas as aves foram vacinadas contra a Doença de Newcastle (New Vac-LS, La Sota Tipo B1, Fort Dodge).

8. Colheita de amostras durante a criação

Foram colhidas amostras de 1 mL de sangue por punção da veia jugular aos 3, 7, 15 e 21 dias de idade, de seis aves por tratamento, tomadas aleatoriamente. O sangue colhido foi mantido em estufa a 37°C por uma hora, centrifugado a 3500g por 30 minutos e o soro obtido transferido para microtubos, devidamente identificados, e congelados a -20°C até o momento das análises.

9. Sorologia

A presença de anticorpos anti-Newcastle nas amostras de soro foi avaliada por ensaio imunoenzimático (ELISA) contra antígenos do vírus da Doença de Newcastle, utilizando-se o kit comercial (FlockCheck, IDEXX Laboratories, Westbrooke, EUA)². Foram utilizados os soros proveninetes da colheita de sangue realizada aos 3, 7, 15 e 21 dias de idade. Os resultados foram expressos como relação S/P, obtida através da equação:

$$S / P = \frac{\text{médiaA} - \text{médiaCN}}{\text{médiaCP} - \text{médiaCN}}$$

Em que: média A = média da amostra;
 média CN = média do controle negativo;
 média CP = média do controle positivo.

10. Análise estatística

Os dados referentes aos níveis de hsp70 e peso de bursa foram analisados em um delineamento completamente casualizado, arranjos em um esquema fatorial 3 x 7 (três temperaturas de incubação x sete idades). Os níveis plasmáticos de corticosterona

foram arranjados em um esquema fatorial 3 x 5 (três temperaturas de incubação x cinco idades). Os dados de resposta imune foram arranjados em um esquema fatorial 3 x 7 x 4 (três temperaturas x sete dias de incubação x quatro idades pós-eclosão). Foi realizada uma análise de variância usando-se o procedimento “General Linear Models” do Programa SAS[®] (LITTELL *et al.*, 2002) e em caso de diferença significativa as médias de tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey (5%). O efeito de dias de incubação e idade pós eclosão foram estudados por meio de regressões polinomiais.

Resultados e discussão

A Figura 1 mostra uma membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF) escolhida ao acaso e que é representativa das demais utilizadas para a quantificação da hsp70 na bursa cloacal de embriões expostos ao estresse pelo frio e pelo calor, aos 17 e 18 dias de incubação (DE17 e DE18).

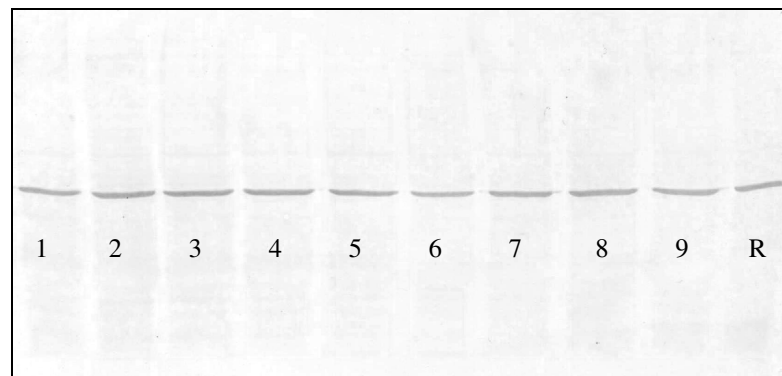


Figura 1 - Membrana de “Western blotting” com bandas de hsp70 em bursa de embriões expostos ao tratamento por frio ou calor. Amostra 1, tratamento por frio aos 17 dias; amostras 2 a 7, tratamento controle aos 18 dias; amostra 9, tratamento por calor aos 18 dias; R, amostra de referência.

Houve interação significativa entre tratamentos e dia de incubação ($P < 0,0001$) para os níveis de hsp70 na bursa cloacal dos embriões submetidos a estresse térmico agudo (Figura 2). Foram observados maiores níveis de hsp70 para o tratamento por frio em relação ao controle. Menores concentrações da proteína foram encontradas para o

² IDEXX Laboratories, Inc. One IDEXX Drive, Westbrook, Maine 04092, USA.

tratamento controle no 13^o dia de incubação (DE13) ($P=0,0469$), DE15 ($P=0,0013$), DE16 ($P=0,0452$) e DE17 ($P=0,0003$), somente no DE19 a expressão de hsp70 pelos embriões pertencentes ao tratamento controle superou os níveis verificados para os demais tratamentos ($P=0,0044$). A expressão de hsp70 foi semelhante entre tratamentos no DE14 ($P=0,2589$) e DE18 ($P=0,8417$).

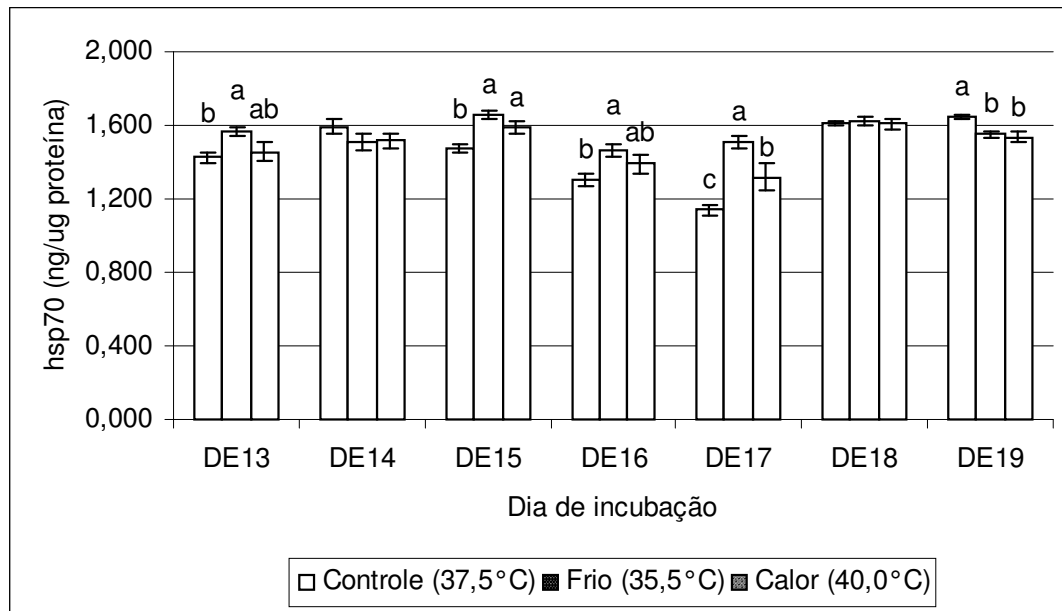


Figura 2 – Desdobramento da interação entre dia de incubação e tratamentos para a concentração de hsp70 na bursa cloacal de embriões de frangos de corte que sofreram estresse térmico embrionário agudo dos 13 aos 19 dias de incubação. Médias \pm erros padrão para tratamentos seguidas de letras iguais, dentro de cada idade, são iguais entre si ($P>0,05$).

A maior expressão de hsp70 pelos embriões tratados por frio ou calor em relação aos do tratamento controle foi uma resposta fisiológica no sentido de manter a integridade da bursa cloacal e dos produtos por ela secretados, mais provavelmente devido à severidade do estresse aplicado do que à duração do mesmo, uma vez que os resultados aqui apresentados se referem somente a uma única exposição de 4 horas em cada dia avaliado. GABRIEL *et al.* (2002) utilizaram temperaturas de 41°C e 44°C por uma hora e verificaram que os embriões submetidos ao estresse moderado não apresentaram alterações na expressão de mRNA de hsp70, no entanto, o estresse de apenas uma hora pela temperatura mais elevada induziu a um incremento de 15 vezes

na expressão dessa proteína. GIVISIEZ *et al.* (2001) avaliando os efeitos do estresse crônico por frio ou calor no último terço da incubação encontraram que o estresse por frio induziu a uma maior expressão de hsp70 no cérebro, pulmões e fígado, em relação ao estresse por calor. Assim sendo, temperaturas danosas induzem a expressão de hsp70 como forma de proteger o tecido contra agressões que comprometam seu ótimo funcionamento.

Os embriões pertencentes ao tratamento controle apresentaram maiores níveis de hsp70 entre DE13 e DE15, tendo havido uma redução nos DE16 e DE17, seguida de uma recuperação nos DE18 e DE19: $Y_{Co} = 0,0275 (\text{dia de incubação})^2 - 0,2073 (\text{dia de incubação}) + 1,7358$; $R^2=0,3336$ ($P<0,003$). Esta variação na expressão de hsp70 dependente da idade não foi observada para os tratamentos por frio ($P=0,7679$) ou por calor ($P=0,4179$). Possivelmente, esse padrão de expressão da hsp70 ocorreu devido ao “timing” do desenvolvimento da bursa cloacal, uma vez que sua colonização compreende o período entre DE8 e DE14 (DIETERLEN-LIÈVRE, 1994), espera-se que os níveis dessa proteína estejam ligeiramente aumentados devido aos eventos de proliferação celular que estejam ocorrendo. Com o fim da onda de crescimento da bursa, os níveis de hsp70 são então reduzidos, para novamente sofrerem um incremento quando próximos à eclosão, período naturalmente estressante para o embrião, devido a todas as alterações fisiológicas às quais está submetido nessa ocasião.

A concentração de corticosterona no plasma mostrou interação significativa entre tratamentos e dia de incubação ($P=0,0391$). Apenas no DE17 verificou-se diferença entre tratamentos (Figura 3) ($P=0,0236$), sendo que o tratamento por frio apresentou menores concentrações desse hormônio. Para avaliar o efeito de dia de incubação dentro de tratamentos sobre a concentração de corticosterona, foi calculada uma regressão polinomial: $Y_{Co} = -15,713 (\text{dia de incubação})^2 + 521,61(\text{dia de incubação}) - 4065,4$; $R^2 = 0,7578$ ($P=0,0436$). Os dias de incubação não influenciaram os níveis de corticosterona quando o embrião foi exposto ao frio ($P=0,2899$) ou ao calor ($P=0,8551$).

O aumento na secreção de corticosterona é um dos maiores indicativos de estresse em aves (SIEGEL, 1995). Por outro lado, PUVADOLPIROD & THAXTON

(2000) admitem que o estresse em aves não apresenta um grupo de respostas adaptativas uniformes, sendo que em trabalhos anteriores não se observou a ocorrência de todas as respostas simultaneamente, ou mesmo em um padrão previsível. Encontrou-se, por exemplo, níveis aumentados ou reduzidos de corticosterona no plasma ou da razão heterófilos/linfócitos (H/L).

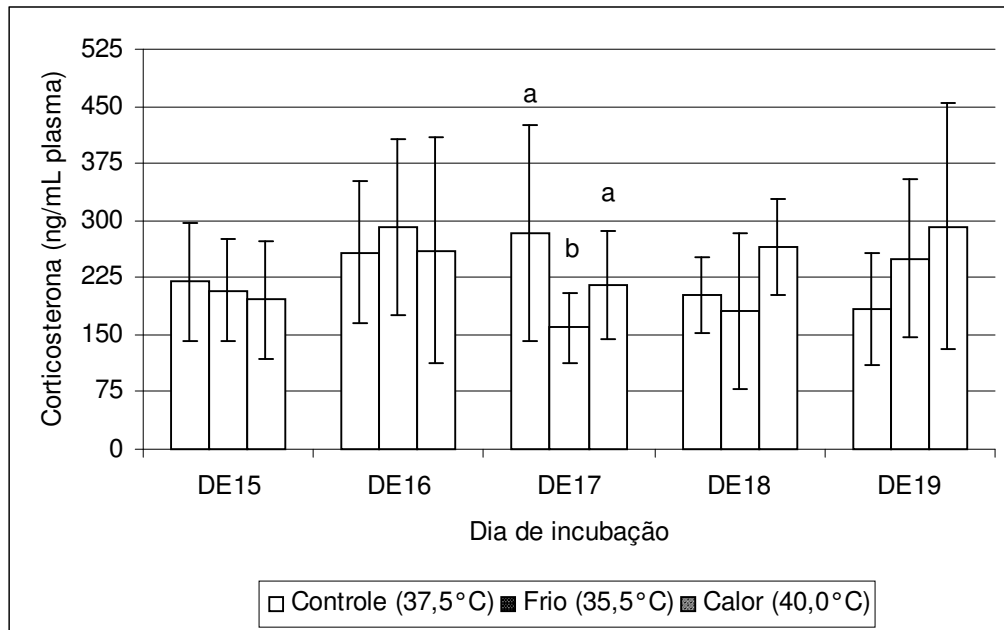


Figura 3 – Desdobramento da interação entre dia de incubação e tratamentos para a concentração de corticosterona no plasma de embriões de frangos de corte que sofreram estresse térmico embrionário agudo dos 13 aos 19 dias de incubação. Médias \pm erros padrão para tratamentos seguidas de letras iguais, dentro de cada idade, são iguais entre si ($P > 0,05$).

Avaliando-se o peso da bursa cloacal em relação ao peso do embrião, foi observada interação significativa entre tratamentos e dia de incubação ($P=0,0350$). Apenas dentro de DE19 foi verificada diferença significativa entre tratamentos ($P=0,0011$), sendo que o tratamento controle apresentou peso superior aos demais tratamentos (Figura 4). Foram calculadas regressões polinomiais para avaliar o efeito de idade dentro de cada tratamento sobre o peso relativo da bursa, e as equações obtidas foram as seguintes: $Y_{Co} = 2,8303 (\text{dia de incubação})^2 - 95,367 (\text{dia de incubação}) + 894,52$; $R^2=0,438$ ($P=0,0112$); $Y_{Fr} = -8,4224 (\text{dia de incubação}) + 240,8$;

$R^2=0,5974$ ($P<0,0001$); e $Y_{Ca} = 2,57$ (dia de incubação)² - 92,409 (dia de incubação) + 916,46, $R^2=0,7666$ ($P=0,0069$).

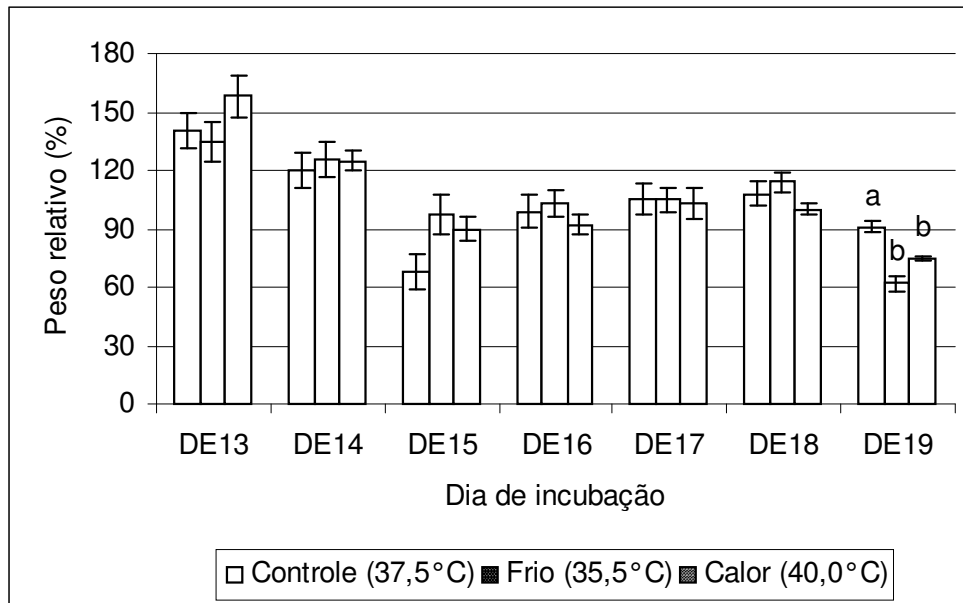


Figura 4 – Desdobramento da interação entre tratamentos e dia de incubação para peso da bursa cloacal (mg) relativo ao peso de embriões de frangos de corte submetidos a estresse agudo embrionário dos 13 aos 19 dias de incubação. Médias \pm erros padrão para tratamentos seguidas de letras iguais, dentro de cada idade, são iguais entre si ($P>0,05$).

Os maiores valores de peso relativo da bursa observados nos DE13 e DE14 podem ser atribuídas ao fato de esse ser o período final da onda de crescimento desse órgão (DIETERLEN-LIÈVRE, 1994) e intensa proliferação celular. Apesar de os dias 13 e 14 serem críticos para o crescimento da bursa, o estresse de 4 horas não foi suficiente para provocar alterações significativas ($P>0,05$). Nos dias que se seguiram, os valores foram diminuindo em relação àqueles iniciais, pois, nessa fase está sendo finalizada a colonização da bursa e a partir de então se dá o maior crescimento do corpo do embrião, valores mais baixos eram esperados. No entanto, no DE19 houve uma redução no peso da bursa para os tratamentos por frio e por calor ($P=0,0011$) em relação ao controle.

Ao se avaliar a relação S/P, verificou-se que houve efeito significativo para dia de incubação ($P=0,0006$) (Figura 5). Não ocorreu, no entanto, interação entre dia de incubação ($P=0,2241$) e tratamento ou entre dia de incubação e idade ($P=0,8814$).

Houve decréscimo linear na resposta imune das aves com o avanço dos dias de incubação: $Y_{S/P DE} = -0,0297$ (dia de incubação) + 0,9097 ($R^2 = 0,7118$). Esses resultados podem significar que quanto mais precocemente os embriões forem manipulados, mais eficazes serão os efeitos do estresse sobre a resposta imune.

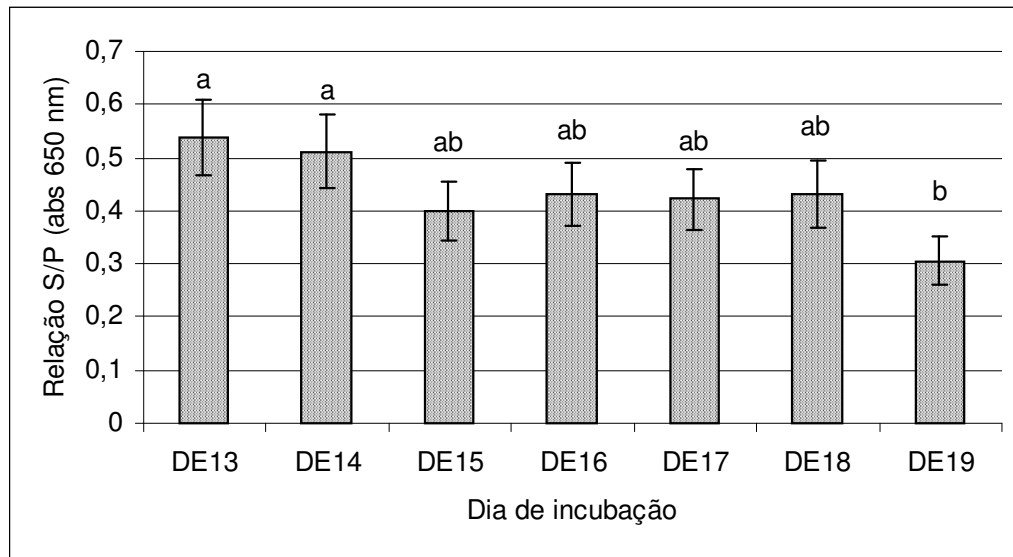


Figura 5 - Médias \pm erro-padrão da relação S/P (absorbância a 650 nm) em soro de frangos de corte submetidos a estresse térmico embrionário agudo de acordo com o dia de incubação ($P < 0,0006$).

Foi observada interação significativa entre tratamentos e idade da ave ($P = 0,0034$) (Figura 6), sendo que os tratamentos em que se utilizaram o estresse por frio ou calor induziram melhor resposta imune quando comparados ao tratamento controle no terceiro ($P = 0,0248$), sétimo ($P < 0,0001$) e 15º dia pós-eclosão ($P < 0,0001$). Por outro lado, não foram observadas diferenças entre os tratamentos ($P = 0,2947$) no 21º dia de criação. Ao longo do período avaliado observou-se, para todos os tratamentos, uma redução na relação S/P do terceiro ao 15º dia com uma recuperação no 21º dia. Este efeito foi avaliado através das seguintes equações: $Y_{Co} = 0,0066$ (idade)² - 0,1877 (idade) + 1,2762; $R^2 = 0,9324$ ($P < 0,0001$); $Y_{Fr} = 0,0069$ (idade)² - 0,2089 (idade) + 1,6725; $R^2 = 0,9997$ ($P < 0,0001$) e $Y_{Ca} = 0,0064$ (idade)² - 0,2025 (idade) + 1,6794; $R^2 = 0,9882$ ($P < 0,0001$). A interação

tripla (tratamentos, dia de incubação e idade pós-eclosão) não foi significativa ($P=0,1154$).

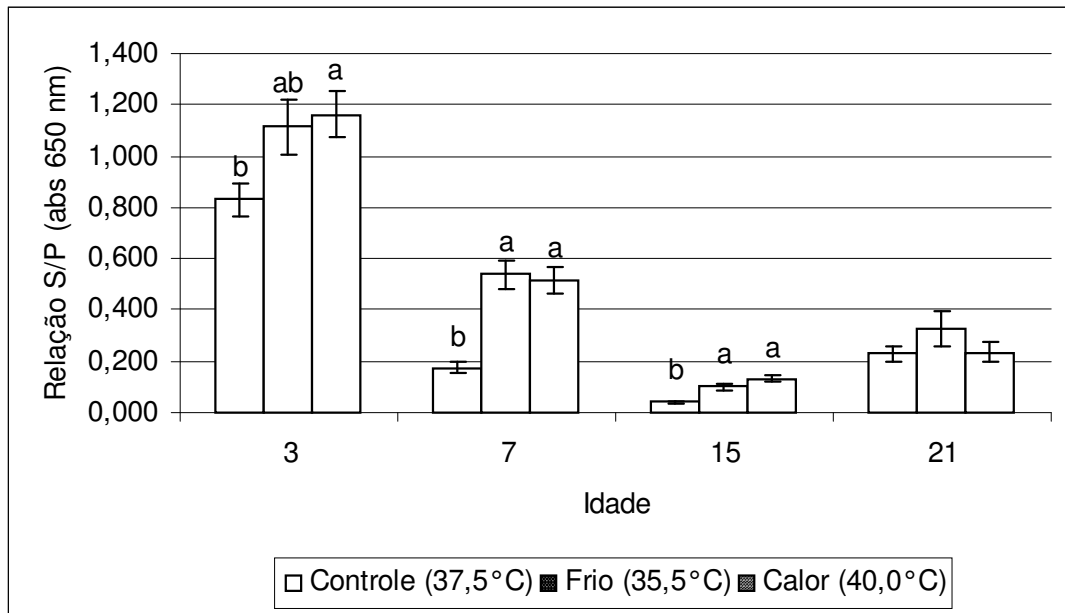


Figura 6 – Desdobramento da interação entre tratamentos e idade para relação S/P (absorbância a 650 nm) em soros de frangos de corte submetidos a episódios de estresse agudo embrionário entre o 13º e 19º dia de incubação. Médias \pm erros padrão para tratamentos seguidas de letras iguais, dentro de cada idade, são iguais entre si ($P>0,05$).

Os efeitos do estresse térmico em aves adultas são bastante contraditórios. HANGALAPURA *et al.* (2003, 2004a) utilizaram estresse por frio (10°C) em poedeiras antes da imunização verificaram que esse tratamento induziu a uma melhoria na imunidade humoral inata, mas pouca influência teve sobre a imunidade humoral adquirida. Ao avaliar o efeito de temperaturas cíclicas e do estresse por calor em poedeiras, MASHALY *et al.* (2004) observaram uma redução na síntese de anticorpos nas aves submetidas ao estresse térmico.

Ao avaliar o efeito da incubação a 38,8°C ou 36,8°C a partir do DE13 sobre a resposta imune humoral de frangos de corte aos 14, 35 e 42 dias de idade, SANTIN *et al.* (2003) não verificaram alterações significativas no título de anticorpos. No entanto, os períodos avaliados por esses autores compreendem a fase de soroneutralização (15 dias) e do platô referente à resposta imune humoral adquirida.

A redução na resposta imune dos 3 aos 15 dias se deve ao decréscimo quantidade de anticorpos maternos e ao fenômeno de soroneutralização após a vacinação aos 7 dias. No 21^o dia, ocorre uma recuperação dos níveis de anticorpos, pois são sintetizados em reposta à vacinação. No entanto, não são observadas diferenças entre os tratamentos nessa idade, sugerindo que o estresse embrionário tem maior influência sobre a resposta imune humoral inata.

Com base nos resultados encontrados, pode-se concluir que o estresse embrionário por frio ou calor foi eficaz em aumentar a síntese de hsp70 na bursa cloacal, bem como resultou em melhor resposta imune humoral inata das aves; no entanto, não alterou os níveis de corticosterona nos embriões. Parece razoável admitir que o estresse por frio seja mais eficaz que o estresse por calor, podendo-se afirmar ainda que o estresse fosse mais efetivo se aplicado nos DE13 e DE14.

CAPÍTULO 4 – EFEITOS DA INJEÇÃO DE DEXAMETASONA E DA HIPÓXIA DURANTE A INCUBAÇÃO SOBRE A EXPRESSÃO DE hsp70 PRÉ E PÓS-ECLOSÃO EM TECIDOS DE FRANGOS DE CORTE

RESUMO – Este estudo teve como objetivo comparar a expressão de hsp70 em fígado e músculo peitoral de embriões/pintainhos de frangos de corte submetidos à ausência de ventilação (hipóxia), associada à injeção de dexametasona (DEX) no 16º ou 18º dia de incubação com condições normais de incubação. Foram incubados 1200 ovos inicialmente divididos em dois grupos submetidos ou não à hipóxia até o 10º dia. A partir do 11º dia de incubação, ambos os grupos foram mantidos sob condições normais de incubação e no 16º ou 18º dia 150 ovos foram injetados na câmara de ar com 0,1 mL de solução de dexametasona a 500 µg/mL. Nos estágios de “internal pipping” (IP), eclosão e aos 7 dias de idade foram colhidas amostras de fígado e músculo peitoral de 5 animais de casa tratamento para avaliação da expressão de proteína de choque térmico de 70 kD (hsp70). Utilizou-se a técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (“real-time” PCR) e os dados foram analisados pelo método comparativo do ciclo limiar (“cycle threshold”, C_t). Durante o IP e eclosão, o tratamento não-ventilado e injetado aos 18 dias apresentou as maiores expressões de hsp70 no fígado, com 67,2 e 1,3 vezes a expressão do controle ventilado, sendo que este efeito se inverte aos 7 dias. Já no músculo peitoral, observou-se maior expressão para o grupo ventilado e injetado aos 18 dias tanto no IP (2,2), quanto na eclosão (1,2). Aos 7 dias, a maior expressão foi apresentada pelo controle do grupo não ventilado (1,4). Os resultados sugerem que o fígado seja mais sensível aos efeitos da hipóxia quando comparado ao músculo peitoral, bem como à injeção de DEX, principalmente durante o período de IP.

Palavras-chave: ciclo limiar (C_t), dexametasona, embriões de frangos de corte, hipóxia, proteínas de choque térmico de 70 kD, “real-time” PCR

Introdução

Durante o processo de incubação artificial na avicultura industrial, as condições ótimas de temperatura, umidade e oxigenação para o desenvolvimento do embrião são mantidas de forma controlada (MURAROLI & MENDES, 2003). Os embriões utilizam O₂ para seu metabolismo, liberando CO₂, o que os torna dependentes da qualidade do ar em seu ambiente. Alterações nos níveis de CO₂ durante o período embrionário podem levar a mudanças no tempo total que o embrião leva para atingir seu completo desenvolvimento, sendo que níveis reduzidos de CO₂ aceleram o desenvolvimento embrionário, podendo levar a uma eclosão precoce em relação aos embriões incubados sob níveis normais de CO₂ (TAZAWA & WHITTOW, 2000; DECUYPERE *et al.*, 2003; HASSANZADEH *et al.* 2004).

A hipóxia pode induzir a alterações na taxa de desenvolvimento pela alteração e liberação na atividade de controladores neuro-hormonais endógenos, gerando indivíduos com pulmões mais desenvolvidos e que eclodem mais precocemente. O surfactante pulmonar, uma mistura complexa de lipídeos e proteínas, é de suma importância para o pintainho no momento em que este inala o ar pela primeira vez, pois age reduzindo a tensão de superfície das moléculas de água nos pulmões, reduzindo conseqüentemente o trabalho (esforço) de respiração. A maturação do sistema surfactante é indicada pelo aumento nos corpos lamelares, os quais são excitados para o líquido que recobre os pulmões e onde os lipídeos se acumulam para formar o filme surfactante na interface água-ar. Os primeiros corpos lamelares surgem no 16^º dia de incubação e se diferenciam rapidamente e sofrem hiperplasia, atingindo seu número máximo no 18^º dia de incubação (BLACKER *et al.*, 2004).

Os glicocorticóides exercem importante papel no desenvolvimento do surfactante aviário e estudos revelam que a dexametasona (DEX) aplicada *in vitro* aumenta a síntese de fosfolipídeos em células embrionárias tipo II em aves e sua administração *in ovo* pode acelerar o desenvolvimento pulmonar (BLACKER *et al.*, 2004). A DEX é uma droga sintética que mimetiza a ação da corticosterona. Este último é encontrado no plasma em concentrações aumentadas quando o animal está submetido a uma

situação estressante. Da mesma forma, a injeção do mesmo ou de substância similar, gera respostas semelhantes às encontradas durante o estresse. A injeção de DEX tem sido utilizada como modelo para o estudo do estresse tanto em poedeiras (JOSEPH & RAMACHANDRAN, 1992) quanto em perus (HUFF *et al.*, 1998; 1999; 2001a; b).

Uma vez que os picos de concentração plasmática de glicocorticóides ocorrem ao final do desenvolvimento embrionário em aves, é provável que estes fatores interajam entre si e induzam à síntese de proteínas de choque térmico (hsp). As hsp são assim denominadas por terem sido primeiramente observadas quando células foram submetidas a estresse por calor (Ritossa, 1962, citado por TISSIÈRES *et al.*, 1974). No entanto, sua expressão não está restrita somente em resposta a esse tipo de alteração ambiental, pois também pode ser induzida pela exposição do organismo a diferentes estressores, como etanol, anóxia, infecções e drogas (LINDQUIST & CRAIG, 1988; MORIMOTO *et al.*, 1994). Dessa forma, a ausência de ventilação, ou hipóxia, durante o período inicial de incubação representa, por si só, um estímulo estressante, podendo levar à expressão aumentada de hsp70, na tentativa de proteger o embrião em formação contra danos que comprometam seu perfeito desenvolvimento.

O objetivo deste estudo foi comparar a expressão de hsp70 em fígado e músculo peitoral de embriões e pintainhos de frangos de corte submetidos à hipóxia causada por ausência de ventilação até o décimo dia de incubação, associada à injeção de dexametasona no 16^o e 18^o dias.

Material e métodos

1. Incubação e tratamentos

Foram incubados 1200 ovos provenientes de matrizes da linhagem Cobb, sendo que metade foi incubada sob condições normais (37,8°C, 65% UR, ventilação constante), enquanto que a segunda metade foi privada de ventilação (hipóxia) até o décimo dia de incubação. A partir do 11^o dia de incubação, ambos os grupos foram incubados sob condições normais.

Aos 16 ou 18 dias de incubação, injetou-se dexametasona (DEX) solúvel em água (500 µg/mL) na câmara de ar de 150 ovos pertencentes aos grupos ventilado e não-ventilado, totalizando 6 tratamentos: controle ventilado (Co/Ve), injetado com DEX aos 16 dias e ventilado (D16/Ve), injetado com DEX aos 18 dias e ventilado (D18/Ve), controle não-ventilado (Co/Nv), injetado com DEX aos 16 dias e não-ventilado (D16/Nv) e injetado com DEX aos 18 dias e não-ventilado (D18/Nv). Uma única dose de 0,5 µg de DEX em 0,1 mL de solução salina foi injetada na câmara de ar, e o orifício foi fechado com Micropore[®] (J&J). No 18^º dia de incubação, procedeu-se a ovoscopia, e os ovos com evidência de embriões vivos foram transferidos para as bandejas de eclosão.

2. Criação

Após a eclosão, as aves foram alojadas em câmara climatizada e criadas em temperatura termoneutra (35°C) por uma semana. Os pintainhos receberam água e ração *ad libitum*.

3. Colheita de amostras

Foram colhidas amostras de fígado (lobo esquerdo) e músculo peitoral (esquerdo) de cinco embriões/pintainhos nos estágios de “internal pipping” (IP), eclosão e aos sete dias pós-eclosão, as quais foram devidamente identificadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. As amostras foram mantidas a -80°C até o momento do processamento.

4. Extração de RNA tecidual

O RNA foi extraído utilizando-se TRIZOL[®] Reagent (Invitrogen, Merelbeke, Bélgica) de acordo com recomendações do fabricante. Em resumo, 100 mg de tecido (fígado e músculo peitoral) foram descongeladas e imediatamente homogeneizadas com ultra-turrax (Yanken & Kunkel) em 1 mL de solução de TRIZOL por 15 s em gelo,. O homogenado foi transferido para tubos de 2 mL e incubado à temperatura ambiente por 5 min. Adicionou-se 200 µL de clorofórmio por 1 mL de TRIZOL utilizado. Os tubos foram agitados vigorosamente por 15 s e incubados a temperatura ambiente por 3 min.

A fase aquosa foi separada por centrifugação (12000 *g*, 15 min, 4° C) e transferida para um tubo limpo. Adicionou-se álcool isopropílico gelado (1/2 do volume de TRIZOL), para precipitação do RNA total por 10 min à temperatura ambiente. Após centrifugação a 12.000 *g* por 10 min (4° C), o isopropanol foi retirado e o precipitado lavado com 1 mL de etanol 70% gelado. O etanol foi desprezado após centrifugação a 7.500 *g* por 5 min (4° C). Após secagem do precipitado, o RNA foi ressuspenso em 50 µL de água ultra pura tratada com dietilpircarbonato (DEPC) (Fluka Chemie AG, Alemanha) e estocado a -80°C.

5. Transcrição reversa – Reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)

A técnica para a síntese da primeira fita de cDNA foi realizada em duas etapas. Na primeira etapa, adicionou-se ao tubo de reação 2 µg de RNA total (1 µg/µL), 1 µM de “Random primer” (Promega, EUA), 0,5 µM de cada nucleotídeo (Promega) e água ultra pura tratada com DEPC (0,01% v/v) para o volume de 16 µL. A mistura foi desnaturada por 3 min a 80° C. Para a segunda etapa, adicionou-se a cada tubo de reação 2 µL de tampão 5x fornecido com a enzima (Promega), 5 U de transcriptase reversa (AMV enzyme[®], Promega) e 1 µL de inibidor de RNase (RNAsin, Promega), totalizando-se 20 µL. O tubo foi colocado em termociclador (MJ-PTC-200, Biozym) a 42° C por 45 min e depois submetido a um passo final de extensão a 95° C por 5 min. As amostras foram imediatamente colocadas em gelo. Alíquotas da primeira fita de cDNA (2 µL) foram utilizadas nas reações de real time-PCR e o restante foi estocado a -80° C.

6. Real-time PCR

A reação de real-time PCR foi desenvolvida em termociclador ABI Prism[®] 7700 (Applied Biosystems, Foster City, USA) utilizando-se o kit LightCycler[®] DNA MASTER SYBR Green I (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan). A solução para a reação consistia em 2 µL de cDNA previamente preparado, 2 µL do “master mix” (contendo nucleotídeos, SYBR Green e Taq DNA polimerase), 1 µL de cloreto de magnésio (MgCl₂), 11 µL de água ultra pura para 20 µL e 2 µL de cada um dos iniciadores

(Invitrogen) sense e anti-sense (Tabela 1), para cada gene utilizado. A reação foi iniciada com desnaturação inicial a 95°C por 2 min, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 min, anelamento a 60°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min e 30 s. A reação foi terminada a 72°C por 10 min e extinguida a 4°C.

O produto utilizado neste estudo, LightCycler® DNA MASTER SYBR Green I, é um corante com propriedade de emitir fluorescência (530 nm) quando ligado a DNA de fita dupla, permitindo a detecção do DNA, independentemente da seqüência. Quando em solução, o corante apresenta pouca ou nenhuma fluorescência; assim sendo, o aumento na fluorescência é diretamente proporcional a quantidade de DNA fita dupla gerado durante a reação (LEKANNE DEPREZ *et al.*, 2002; Roche Diagnostics GmbH, 2005).

No início da amplificação, a reação contém apenas DNA desnaturado, iniciadores e o corante, e o mínimo de fluorescência que venha a ser emitida nessa etapa será subtraído posteriormente pelo programa. Após o anelamento dos iniciadores, poucas moléculas do corante se ligam ao DNA, resultando em pequeno aumento na emissão de fluorescência. Durante a fase de extensão mais moléculas de corante se ligam ao DNA recém-sintetizado e observa-se um aumento na fluorescência através da curva de amplificação. Quando da desnaturação do DNA no ciclo seguinte as moléculas do corante se desligam do DNA e ocorre uma redução do sinal, voltando a ser emitida novamente ao final de cada etapa de extensão. Dessa forma, é possível monitorar o aumento na amplificação do DNA a cada ciclo (Roche Diagnostics GmbH, 2005).

A expressão do gene 18S é avaliada para ser utilizada no método de semi-quantificação do gene hsp70, conforme descrito abaixo. Genes que apresentam pouca variação nos níveis de expressão podem ser utilizados para esse fim e são denominados "housekeeping genes". Além do 18S, pode-se citar ainda a β -actina e GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase).

Tabela 1 – Pares de iniciadores para hsp70 e 18S.

Gene	Iniciador	Seqüência do iniciador (5' – 3')	Posição	Tamanho esperado
hsp70(*)	Sense	AACCGCACCCACCCAGCTATG	218	359
	Anti-sense	CTGGGAGTCGTTGAAGTAAGCG	577	
18S	Sense	CTGCCCTATCAACTTTCG	273	515
	Anti-sense	ATTCCATTATTCCTAGCT	788	

(*)MAZZI et al, 2003

7. Eletroforese em gel de agarose

Separou-se 10 µL dos produtos de real-time PCR e procedeu-se a eletroforese em gel de agarose (Fluka Chemie AG) a 2% (g/mL) contendo 1% (g/mL) de brometo de etídeo (Fluka Chemie AG) a fim de se verificar a especificidade das bandas (Figuras 1 e 2). O peso molecular aproximado das bandas de DNA foi definido utilizando-se marcador de peso molecular de 100 pb (Eurogentec, Herstal, Bélgica). Em todos os géis, foi adicionado o controle negativo da reação, que incluía todos os reagentes e água DEPC em vez de produto de reação da reação de transcriptase. Após a eletroforese, o gel foi visualizado por iluminação ultra violeta e escaneado por densitômetro (ImageMaster VDS, Pharmacia Biotech, Suécia).



Figura 1 - Produto final da real-time PCR (35 ciclos) para hsp70 obtidos a partir de 2 µg de RNA total de músculo peitoral de embriões de frangos de corte (eclosão), analisados em gel de agarose (2%). 1 - Marcador molecular de 100 pb; 2 e 3 – Co/Nv; 4 e 5 – D16/Nv; 6 e 7 – D18/Nv; 8 e 9 – Co/Ve; 10 e 11 – D16/Ve, 12 e 13 – D18/Ve; 14 – água tratada com DEPC.



Figura 2 - Produto final da real-time PCR (35 ciclos) para 18S obtidos a partir de 2 µg de RNA total de músculo peitoral de embriões de frangos de corte (IP), analisados em gel de agarose (2%). 1 - Marcador molecular de 100 pb; 2 e 3 – Co/Nv; 4 e 5 – D16/Nv; 6 e 7 – D18/Nv; 8 e 9 – Co/Ve; 10 e 11 – D16/Ve, 12 e 13 – D18/Ve; 14 – água tratada com DEPC.

8. Método $2^{\bullet\bullet C_t}$ (método comparativo)

Os dados referentes à expressão da hsp70 foram calculados pelo método comparativo do “cycle threshold” (C_t) utilizando-se a equação $2^{\bullet\bullet C_t}$, derivada por LIVAK & SCHMITTGEN (2001). Essa equação calcula as mudanças na expressão de um gene (no caso, hsp70) como sendo a diferença relativa entre uma amostra experimental e outra calibradora, isto é, expressão entre hsp70 e 18S nas amostras, respectivamente. Esse método parte do princípio que as eficiências de amplificação dos dois pares de iniciadores sejam relativamente semelhantes e, dessa forma, dispensa a necessidade de se estabelecer uma curva padrão. A significância do método é estabelecida através do cálculo de intervalos de confiança a 95% de probabilidade.

As Tabelas 2 e 3 e os cálculos a seguir demonstram os passos do método comparativo utilizados para estabelecer a expressão do gene da hsp70 em relação ao gene 18S. Um tratamento é utilizado como controle e todos os demais são expressos em relação a este, em termos de porcentagem de expressão. No presente trabalho, utilizou-se como tratamento controle o tratamento que não foi submetido à hipóxia ou injeção com dexametasona (Co/Ve).

Os resultados apresentados estão expressos como valores em relação ao tratamento controle pertencente ao grupo ventilado (Co/Ve).

Tabela 2. Tabela para cálculo da expressão de hsp70 pelo método comparativo, utilizando-se o 18S como calibrador

	hsp70	18S	$\bullet C_t$	$\bullet\bullet C_t$	$2^{\bullet\bullet C_t}$
Trat 1	A ₁	B ₁	A ₁ -B ₁ = C ₁	C ₁ -C ₁ = 0	2 ⁰ = 1
Trat 2	A ₂	B ₂	A ₂ -B ₂ = C ₂	C ₂ -C ₁ = D	F = 2 ^{-D}
Trat 3	A ₃	B ₃	A ₃ -B ₃ = C ₃	C ₃ -C ₁ = E	G = 2 ^{-E}

Intervalo de confiança:

$$1 \pm s,$$

$$F \pm s,$$

$$G \pm s, \text{ em que } s = \text{desvio padrão}$$

O desvio-padrão foi determinado pela subtração do valor médio do Ct do 18S pelo valor médio do Ct da hsp70. O desvio-padrão da diferença foi calculado a partir dos desvios-padrão dos valores de 18S e hsp70 utilizando-se a seguinte equação:

$$s = \sqrt{(s_1^2 + s_2^2)}$$

Tabela 3 – Quantificação relativa usando o método do Ct comparativo para amostras de músculo no estágio de “internal pipping”.

Tratamento	hsp70 (C _t médio) ^a	18S (C _t médio) ^a	•C _t (hsp70-18S) ^b	••C _t (•C _r •C _{t,Co/Ve}) ^c	2 ^{-••C_t} ^d
Co/Ve*	20,60±0,6	13,31±0,3	7,29±0,5	0,00±0,5	1,00 (0,3-1,6)
D16/Ve	22,10±2,1	14,28±2,5	7,82±0,7	0,530,7±	0,69 (-2,5-3,9)
D18/Ve	20,64±0,4	14,49±1,3	6,15±1,2	-1,14±1,2	2,2 (0,7-3,6)
Co/Nv	20,71±0,5	13,13±0,4	7,59±0,3	0,30±0,3	0,8 (0,1-1,5)
D16/Nv	21,40±0,6	14,26±1,9	7,15±2,0	-0,14±2,0	1,1 (-0,8-3,1)
D18/Nv	23,03±3,4	13,04±0,4	9,99±3,2	2,70±3,2	0,2 (-3,2-3,5)

a. Dados referentes a média de 5 repetições por tratamento.

b. O valor de •C_t é determinado subtraindo-se a média do valor do •C_t do 18S da média do valor de •C_t da hsp70. O desvio-padrão da diferença é calculado a partir dos desvios-padrão dos valores de hsp70 e 18S.

c. O cálculo do ••C_t envolve a subtração do •C_t do tratamento de interesse pelo valor de •C_t do valor calibrador (Co/Ve*). Esta é a subtração de uma constante arbitrária, assim, o desvio-padrão do ••C_t é o mesmo do desvio padrão do valor de •C_t.

d. A variação dada pela hsp70 relativa ao Co/Ve é determinada pela expressão: 2^{-••C_t}, com ••C_t + s e ••C_t - s, em que s = desvio-padrão do valor de ••C_t.

Resultados e discussão

A ausência de ventilação aumentou expressão de hsp70 (Figura 3) para os tratamentos Co/Nv e D18/Nv no fígado, esse aumento foi da ordem de 17,7 e 67,2 vezes, respectivamente. Dentro do grupo de ovos incubados em condições normais, apenas ovos do D18/Ve apresentaram expressão 4,4 vezes superior ao Co/Ve. Por sua vez, na eclosão (Figura 4), apenas os embriões pertencentes a D18/Nv apresentaram expressão superior ao Co/Ve, enquanto os demais tratamentos foram inferiores. Dentro

do grupo que foi ventilado no início da incubação a expressão de hsp70 foi ainda menor, indicando que a ausência de ventilação atuou como um agente estressor, aumentando a expressão da hsp 70.

Aos 7 dias de idade observou-se uma resposta oposta, com o tratamento D18/Ve apresentando os maiores níveis relativos de hsp70 no fígado dentre todos os tratamentos (Figura 5), sendo 3,3 vezes superior ao Co/Ve. A expressão dessa proteína para o tratamento Co/Nv foi similar à observada para o controle geral, e os tratamentos por injeção no grupo não-ventilado apresentaram os menores níveis relativos de hsp70 para essa idade. Convém ressaltar que os animais pertencentes ao tratamento D16/Ve parecem ter sido os mais sensíveis à injeção por DEX, uma vez que não houve sobrevivência para amostragem aos 7 dias. Pode ter ocorrido algum problema técnico na injeção da dexametasona, o que parece pouco provável já que a mesma solução foi utilizada em todos os procedimentos de inoculação.

É possível ainda que os embriões não-ventilados tenham se desenvolvido mais rapidamente devido a hipóxia no período inicial de incubação. A hipóxia pode levar a hiperplasia vascular, o que resulta em melhora na capacidade de captação de nutrientes pelo embrião e aceleração do metabolismo, induzindo os embriões incubados sem ventilação a se desenvolverem mais rapidamente que os incubados sob condições normais. Dessa forma, as aves pertencentes ao grupo não-ventilado estariam em idade fisiológica mais avançada em relação às do grupo ventilado.

Os resultados sugerem que o fígado é mais sensível aos efeitos da injeção de DEX quando da ausência de ventilação durante o “internal pipping” e na eclosão. No entanto, este comportamento se inverte aos 7 dias, quando o único tratamento restante do grupo ventilado apresenta maiores níveis de hsp70.

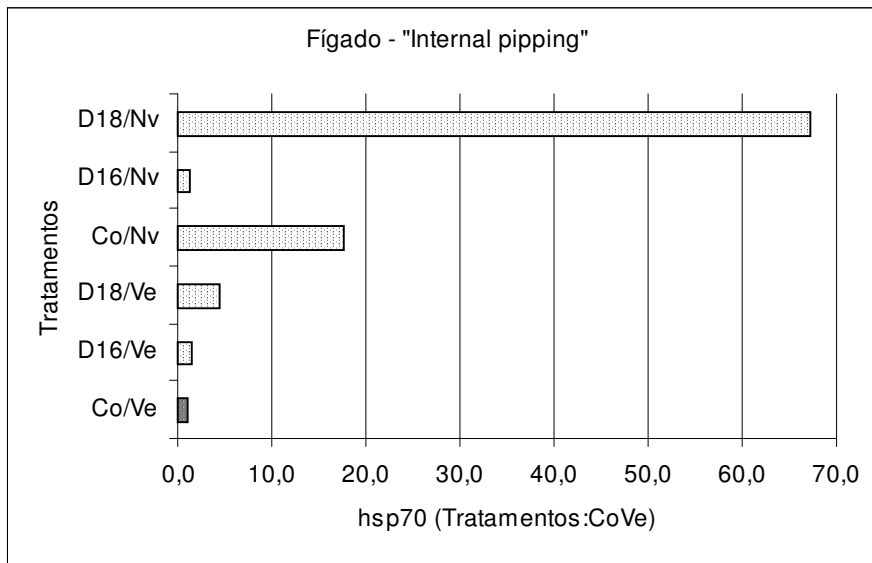


Figura 3 – Expressão da hsp70 em relação ao tratamento Co/Ve em fígado de embriões no estágio de “internal pipping”.

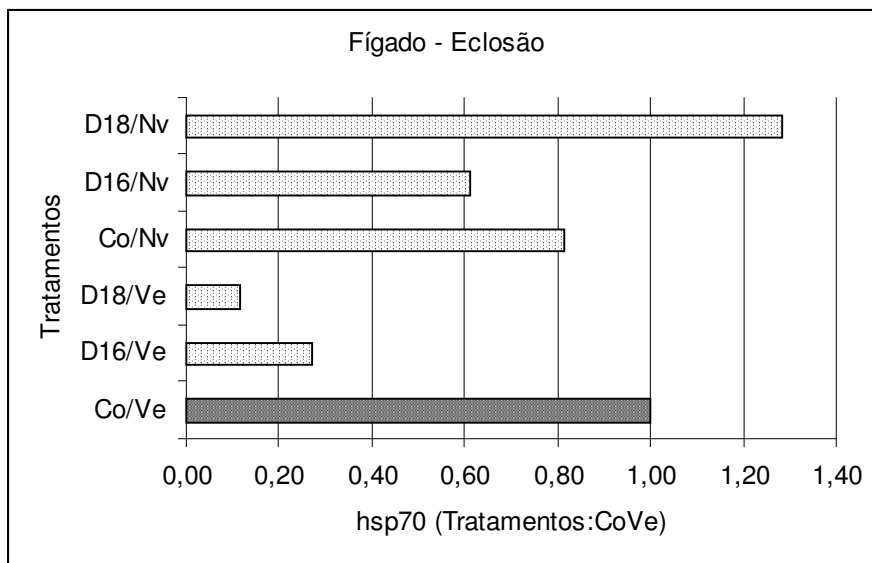


Figura 4 – Expressão da hsp70 em relação ao tratamento Co/Ve em fígado de embriões na ecloração.

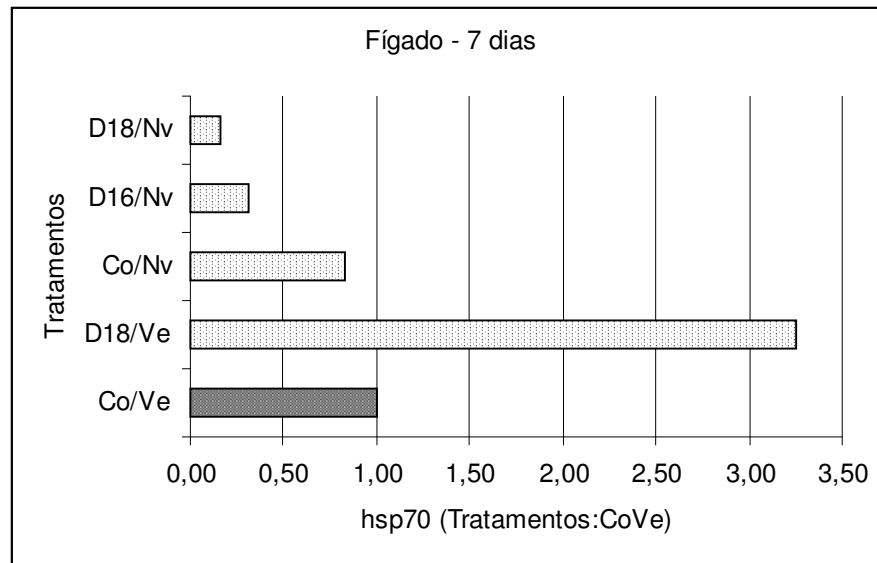


Figura 5 – Expressão da hsp70 em relação ao tratamento Co/Ve em fígado de pintainhos aos 7 dias de idade.

Para a expressão de hsp70 no músculo peitoral na fase de “internal pipping” (Figura 6) foram observados maiores níveis dessa proteína para o tratamento D18/Ve (2,2 vezes). Dentre os embriões do grupo não-ventilado o tratamento D18/Nv apresentou os menores níveis. Na eclosão (Figura 7), verificou-se um pequeno aumento nos níveis de hsp70 em relação ao Co/Ve para os tratamentos D18/Ve e Co/Nv. Pintainhos provenientes de ovos injetados aos 16 dias de incubação apresentaram menor expressão relativa de hsp70, independentemente da ventilação.

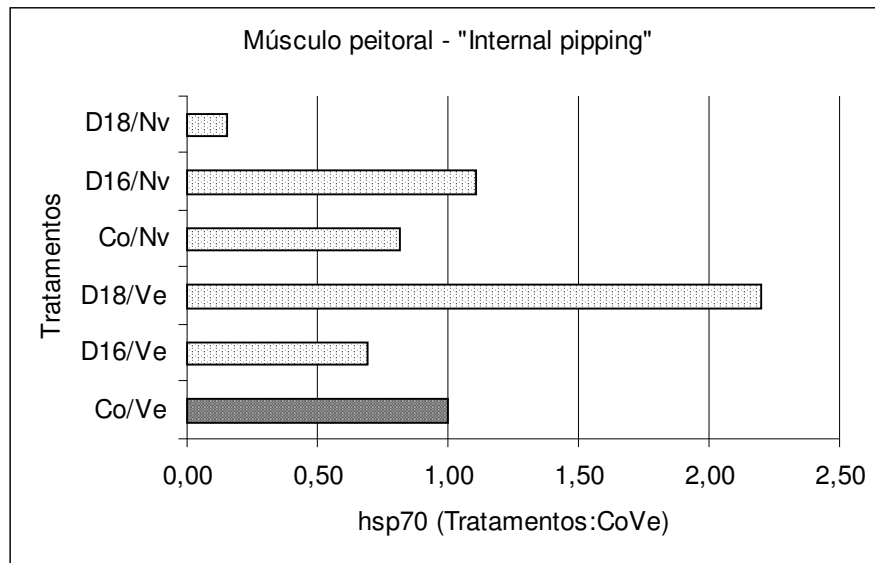


Figura 6 – Expressão da hsp70 em relação ao tratamento Co/Ve em músculo peitoral de embriões no estágio de “internal pipping”.

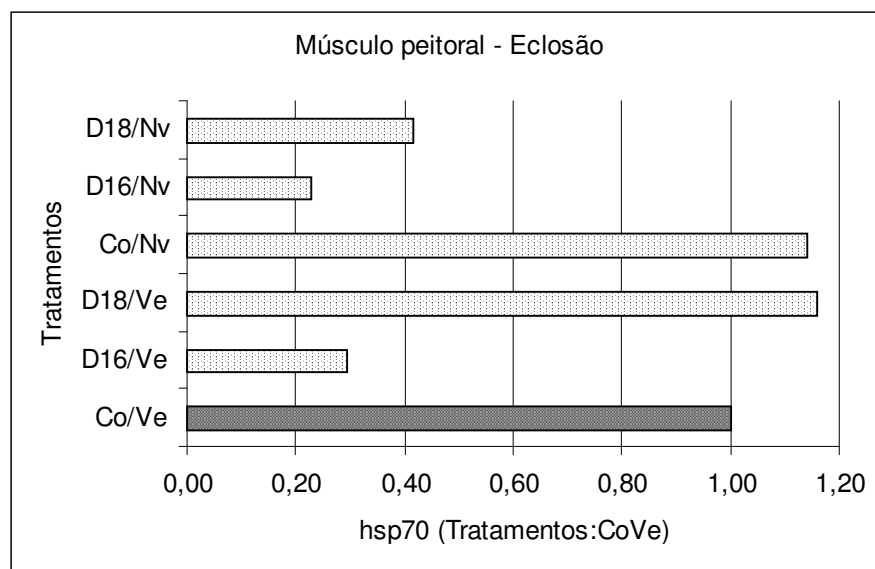


Figura 7 – Expressão da hsp70 em relação ao tratamento Co/Ve em músculo peitoral de embriões na eclosão.

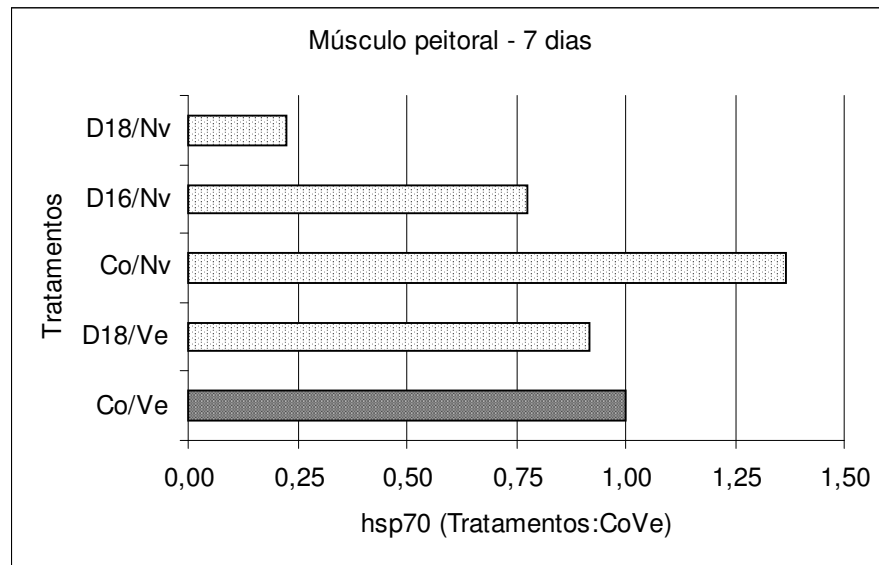


Figura 8 – Expressão da hsp70 em relação ao tratamento Co/Ve em músculo peitoral de pintainhos aos 7 dias.

A expressão relativa de hsp70 em músculo aos 7 dias de idade (Figura 8) foi superior ao controle geral apenas para o tratamento Co/Nv, sendo que o tratamento D18/Nv apresentou os menores níveis dessa proteína dentre todos os tratamentos.

BLACKER *et al.* (2004) incubaram ovos em condições normais de oxigenação (21% O₂, 0,03% CO₂) até o décimo dia e a partir de então aplicaram o tratamento por hipóxia (17% O₂, 0,03% CO₂) até o final do processo de incubação. Associada a hipóxia, injetou-se DEX 48 e 24 h antes do momento de coleta previsto (DE16, DE18 e DE20). Estes autores verificaram aumento nos níveis de corticosterona plasmática entre DE16 e DE20 para os animais controle e considerável incremento nesses níveis hormonais para os embriões tratados com DEX no DE16 sob normóxia. Além disso, os embriões submetidos a hipóxia associada a injeção de DEX no DE16 e DE20 apresentaram níveis ainda maiores de corticosterona em relação aos embriões controle.

HASSANZADEH *et al.* (2004) verificaram níveis elevados de corticosterona em embriões incubados em altitude elevada, quando comparados aos incubados em baixa altitude. Pode-se supor que se os níveis de corticosterona são indicativos de estresse e que estes estão correlacionados positivamente com níveis de hsp70, então a situação de hipóxia também induziria a maior síntese dessas proteínas.

Ao se comparar os tecidos avaliados neste estudo, observa-se que o fígado apresenta maior sensibilidade e responsividade aos tratamentos, principalmente a expressão observada no IP para os embriões injetados no DE18 e não-ventilados. Provavelmente esse efeito se deva à taxa de metabolização da DEX, uma vez que apesar de ainda serem superiores aos Co/Ve, os níveis de hsp70 para os pintainhos do D18/Nv se mostram elevados no momento da eclosão. Pode-se ainda afirmar que durante a fase de IP e eclosão, independentemente do tecido analisado, ocorre maior susceptibilidade a hipóxia e injeção de DEX, enquanto que aos 7 dias o que se observa é um comportamento inverso.

CAPÍTULO 5 – IMPLICAÇÕES

Nos últimos anos a avicultura mundial tem se defrontado com situações desafiadoras, tanto do ponto de vista econômico quanto sanitário. Com o aparecimento de casos de “gripe aviária” na Ásia houve também uma crescente preocupação com o estabelecimento de barreiras sanitárias mais rígidas, fomentou-se e multiplicou o número de pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de vacinas mais eficazes e à melhoria dos parâmetros imunológicos.

A manipulação da temperatura durante a incubação é uma prática de manejo com potencialidades devido à rapidez e facilidade de aplicação. Adicionalmente, apresenta custo reduzido, principalmente por não requerer mão de obra extra, e amplo espectro de ação, uma vez que o volume de ovos incubados na indústria é bastante significativo. Os resultados obtidos mostram que a manipulação térmica durante o desenvolvimento embrionário das aves tem grande potencial para ser utilizado como uma ferramenta para melhorar a resposta imune das aves. No entanto, muitos questionamentos e hipóteses a serem confirmados surgiram, merecendo estudos adicionais.

Nossos resultados indicaram que a alteração aguda da temperatura tanto por frio quanto por calor induziu à melhor resposta imune humoral nos pintainhos até os 15 dias de idade. Convém avaliar se esta melhora se prolonga até o final do período de criação, após a primeira e segunda vacinações e, ainda, se o estresse aplicado pode influenciar no desempenho das aves. Utilizamos como parâmetro imunológico nesse estudo a resposta contra o vírus da Doença de Newcastle, por saber que este incita a resposta imune humoral eficientemente. No entanto, é interessante avaliar se essa resposta também é observada quando se utiliza outro agente e, ainda, se a resposta imune celular também é afetada e de que maneira.

Caso seja comprovado que o estresse térmico tem capacidade de estimular o sistema imune, seria interessante estabelecer o tipo de estresse mais adequado à indústria, bem como se possivelmente sua associação com outro estressor, por

exemplo, a hipóxia, poderia incrementar tal resposta. Será necessário ainda avaliar se a resposta imune das aves após desafio por infecção com determinado antígeno sofrerá alterações como resultado dos tratamentos pré-eclosão. Não se sabe, ainda, como a hipóxia ou a injeção de substância corticosteróide, como a dexametasona, poderia agir a longo prazo sobre a resposta imune e o desempenho das aves. Supõe-se que exposição dessas aves ao estresse térmico em idade adulta poderia induzir a alterações nos níveis de anticorpos e na velocidade da resposta frente a desafio por antígenos diversos. Nesse último caso, poderia se avaliar a expressão de hsp70, uma vez que os aumentos observados para os tratamentos térmicos durante a incubação podem estar relacionados com a melhora da resposta imune e quando de uma nova exposição a temperaturas alteradas, poderia incitar uma resposta mais rápida.

Foram observados maiores níveis de anticorpos para as aves que foram submetidas ao tratamento térmico aos DE13 e DE14, visto que esses são os dois últimos dias de crescimento da bursa, que acontece entre os dias DE8 e DE14; assim, é possível que se as manipulações forem feitas mais precocemente, no período que compreende a onda de crescimento da bursa, respostas mais consistentes sejam verificadas.

Referências

- ANDERSON KM, SRIVASTAVA PK. Heat, heat shock, heat shock proteins and death: a central link in innate and adaptive immune responses. **Immunology Letters**, v. 74, p. 35-39, 2000.
- ARJONA AA, DENBOW DM, WEAVER JR, WD. Effect of heat stress early in life on mortality of broilers exposed to high environmental temperatures just prior to marketing. **Poultry Science**, v. 67, p. 226-231, 1988.
- ARJONA AA, DENBOW DM, WEAVER JR, WD. Neonatally-induced thermotolerance: physiological responses. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 95A, n. 3, p. 393-399, 1990.
- AVRUTINA AJA, GALPERN IL, KISLJUK SM. Stimulations of adrenals during the critical periods of development and production in fowls. **World Poultry Science Journal**, v. 41, n. 2, p. 108-114, 1985.
- BLACKER HA, ORGEING S, DANIELS CB. Hypoxic control of the development of the surfactant system in the chicken: evidence for physiological heterokairy. **The American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 287, p. 403-410, 2004.
- BLECHA F. Immune system response to stress. In: MOBERG GP, MENCH JA. **The biology of animal stress**. Oxon: CAB International; 2000. p. 111-121.
- BRADFORD, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CARSIA RV, HARVEY S. Adrenals. In: WHITTOW GC. **Sturkie's Avian Physiology**. San Diego: Academic Press; 2000. p.489-537.
- CRAIG EA. The heat shock response. **Critical Reviews in Biochemistry**, v. 18, n. 3, p. 239-280, 1985.
- DEVEREAUX G. The immune system: an overview. In: CALDER PC, FIELD CJ, GILL HS. **Nutrition and immune function**. Oxon: CAB International, 2002. p. 1-20.
- DIETERLEN-LIÈVRE, F. Hemopoiesis during avian ontogeny. **Poultry Science Reviews**, v. 5, p. 273-305, 1994.

- DIONELLO NJL, FERRO JA, MACARI M, RUTZ F, FURLAN LR, FERRO MIT. Efeito do estresse térmico agudo sobre os níveis da proteína e RNA mensageiro da HSP70, em fígado e cérebro de pintos de corte de diferentes linhagens. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 5, p. 1506-1513, 2001.
- DOHMS JE, METZ A. Stress - mechanisms of immunosuppression. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 30, n. 1, p. 89-109, 1991.
- EL-LETHEY H, HUBER-EICHER B, JUNGI TW. Exploration of stress-induced immunosuppression in chickens reveals both stress-resistant and stress-susceptible antigen responses. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 95, p. 91-101, 2003.
- FEIGE U, MOLLENHAUER J. Heat shock proteins. **Experientia**, v. 48, n. 7, p. 621-622, 1992.
- FERNANDES M, O'BRIEN T, LIS JT. Structure and regulation of heat shock gene promoters. In: MORIMOTO RI, TISSIÈRES A, GEORGOPOULOS C. **The biology of heat shock proteins and molecular chaperones**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1994. p. 375-393.
- FINK, AL. Chaperone-mediated protein folding. **Physiological Reviews**, v. 79, n. 2, p. 425-449, 1999.
- FLANAGAN SW, RYAN AJ, GISOLFI CV, MOSELEY PL. Tissue-specific HSP70 response in animals undergoing heat stress. **American Journal of Physiology**, v. 268, p. R28-R32, 1995.
- FREEMAN BM. The endocrine status of the bursa of Fabricius and the thymus gland. In: BELL DJ, FREEMAN BM. **Physiology and biochemistry of the domestic fowl**. London: Academic Press; 1971. p. 575-587.
- FROSSARD JL. Heat shock protein 70 (HSP70) prolongs survival in rats exposed to hyperthermia. **European Journal of Clinical Investigations**, v. 29, p. 561-562, 1999.
- FRYDMAN J, HARTL FU. Molecular chaperone functions of hsp70 and hsp60 in protein folding. In: MORIMOTO RI, TISSIÈRES A, GEORGOPOULOS C. **The biology of heat shock proteins and molecular chaperones**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1994. p. 251-283.

FRYDMAN J, NIMMESGERN E, OHTSUKA K, HARTL FU. Folding of nascent polypeptide chains in a high molecular mass assembly with molecular chaperones. **Nature**, v. 370, p. 111-117, 1994.

GABRIEL JE. **Estudo da expressão temporal e espacial de genes associados a miogênese durante o desenvolvimento embrionário de aves**. 2001. 118 f. Tese (doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

GABRIEL JE, MOTA AF, BOLELI IC, MACARI M, COUTINHO LL. Effect of moderate and severe heat stress on avian embryonic hsp70 gene expression. **Growth, Development & Aging**, v. 66, p. 27-33, 2002.

GIVISIEZ PEN, FERRO JA, FERRO MIT, KRONKA SN, DECUYPERE E, MACARI M. Hepatic concentration of heat shock protein 70 kD (hsp70) in broilers subjected to different thermal treatments. **British Poultry Science**, v. 40, p. 292-296, 1999.

GIVISIEZ PEN, DA SILVA MM, MAZZI CM, FERRO MIT, FERRO JA, GONZALES E, MACARI M. Heat or cold chronic stress affects organ weights and Hsp70 levels in chicken embryos. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 81, p. 83-87, 2001.

GIVISIEZ PEN, FURLAN RL, MALHEIROS EB, MACARI M. Incubation and rearing temperature effects on Hsp70 levels and heat stress response in broilers. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 83, p. 213-220, 2003.

GLICK B. Immunophysiology. In: WHITTOW GC. **Sturkie's Avian Physiology**. San Diego: Academic Press; 2000. p. 657-670.

HAMBURGER V, HAMILTON HL. A series of normal stages in the development of the chicken embryo. **Journal of Morphology**, v. 88, p. 49-92, 1951.

HANGALAPURA BN, NIEUWLAND MGB, DE VRIES REILINGH G, HEETKAMP MJW, VAN DEN BRAND H, KEMP B, PARMENTIER HK. Effects of cold stress on immune responses and body weight of chicken lines divergently selected for antibody responses to sheep red blood cells. **Poultry Science**, v. 82, p. 1692-1700, 2003.

HANGALAPURA BN, NIEUWLAND MGB, DE VRIES REILINGH G, VAN DEN BRAND H, KEMP B, PARMENTIER HK. Durations of cold stress modulates overall immunity of

chicken lines divergently selected for antibody responses. **Poultry Science**, v. 83, p. 765-775, 2004a.

HANGALAPURA BN, NIEUWLAND MGB, BUYSE J, KEMP B, PARMENTIER HK. Effect of duration of cold stress on plasma adrenal and thyroid hormone levels and immune responses in chicken lines divergently selected for antibody responses. **Poultry Science**, v. 83, p. 1644-1649, 2004b.

HARTL, FU. Molecular chaperones in cellular protein folding. **Nature**; v. 381, p. 571-580, 1996.

HASSANZADEH M, BOZORGMEHRI FARD MH, BUYSE J, BRUGGEMAN V, DECUYPERE E. Effect of chronic hypoxia during embryonic development on physiological functioning and on hatching and post-hatching parameters related to ascites in broiler chickens. **Avian Pathology**, v. 33, n. 6, p. 558-564, 2004.

HEIKKILA JJ, BROWDER LW, GEDAMU L, NICKELLS RW, SCHULTZ GA. Heat-shock gene expression in animal embryonic systems. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, v. 28, p. 1093-1105, 1986.

HENDRICK JP, HARTL FU. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 62, p. 349-384, 1993.

HUFF GR, HUFF WE, BALOG JM, RATH NC. The effects of dexamethasone immunosuppression on turkey osteomyelitis complex in an experimental *Escherichia coli* respiratory infection. **Poultry Science**, v. 77, p. 654-661, 1998.

HUFF GR, HUFF WE, BALOG JM, RATH NC. Sex differences in the resistance of turkeys to *Escherichia coli* challenge after immunosuppression with dexamethasone. **Poultry Science**, v. 78, p. 38-44, 1999.

HUFF GR, HUFF WE, BALOG JM, RATH NC. Effect of early handling of turkey poults on later responses to a dexamethasone-*Escherichia coli* challenge. 1. Production values and physiological response. **Poultry Science**, v. 80, p. 1305-1313, 2001a.

HUFF GR, HUFF WE, BALOG JM, RATH NC. Effect of early handling of turkey poults on later responses to a dexamethasone-*Escherichia coli* challenge. 2. Resistance to air sacculitis and turkey osteomyelitis complex. **Poultry Science**, v. 80, p. 1314-1322, 2001b.

- IQBAL A, DECUYPERE E, ABD EL AZIM A, KÜNH ER. Pre- and post-hatch high temperature exposure affects the thyroid hormones and corticosterone response to acute heat stress in growing chicken (*Gallus domesticus*). **Journal of Thermal Biology**, v. 15, n. 2, p. 149-153, 1990.
- JENKINS SA, PORTER TE. Ontogeny of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis in the chicken embryo: a review. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 26, p. 267-275, 2004.
- JOSEPH J, RAMACHANDRAN AV. Alterations in carbohydrate metabolism by exogenous dexamethasone and corticosterona in post-hatched White Leghorn chicks. **British Poultry Science**, v. 33, p. 1085-1093, 1992.
- KAWAZOE Y, TANABE M, NAKAI A. Ubiquitous and cell-specific members of the avian small heat shock protein family. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 455, p. 271-275, 1999.
- KELLEY, WL. The J-domain family and the recruitment of chaperone power. **Trends in Biochemical Science**, v. 23, p. 222-227, 1998.
- KIANG JG, TSOKOS GC. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 80, n. 2, p. 183-201, 1998.
- LAEMMLI, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 226, p. 112-115, 1970.
- LAY DC, JR. Consequences of stress during development. In: MOBERG GP, MENCH JA. **The biology of animal stress**. Oxon: CAB International; 2000. p. 249-267.
- LAY DC, JR, WILSON ME Development of the chicken as a model for prenatal stress. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 1954-1961, 2002.
- LEANDRO NS, GONZALES E, FERRO JA, FERRO MI, GIVISIEZ PEN, MACARI M. Expression of heat shock protein in broiler embryo tissues after acute cold or heat stress. **Molecular reproduction and development**, v. 67, n. 2, p. 172-177, 2004.
- LINDQUIST S, CRAIG EA. The heat shock proteins. **Annual Reviews of Genetics**, v. 22, p. 631-377, 1988.
- LITTELL, R.C.; STROUP, W.W.; FREUND, R.J. **SAS For Linear Models**. SAS Institute, 2002. Fourth edition, SAS Institute Inc, Cary, NC. 466 p.

- LU Z, CYR DM. The conserved carboxyl terminus and zinc finger-like domain of the co-chaperone Ydj1 assist hsp70 in protein folding. **The Journal of Biological Chemistry**; v. 272, n. 10, p. 5970-5978, 1998.
- LUFT JC, DIX DJ. Hsp70 expression and function during embryogenesis. **Cell Stress & Chaperones**, v. 4, n. 3, p. 162-170, 1999.
- MASHALY MM, HENDRICKS III GL, KALAMA MA, GEHAD AE, ABBAS AO, PATTERSON PH. Effect of heat stress on production parameters and immune responses of commercial laying hens. **Poultry Science**, v. 83, p. 889-894, 2004.
- MASHALY MM, TROUT JM, HENDRICKS III GL, AL-DOKHI LM, GEHAD A. The role of neuroendocrine immune interactions in the initiation of humoral immunity in chickens. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 15, n. 5, p. 409-422, 1998.
- MATTERI RL, CARROLL JA, DYER CJ. Neuroendocrine responses to stress. In: MOBERG GP, MENCH JA. **The biology of animal stress**. Oxon: CAB International; 2000. p. 43-76.
- MAZZI CM, FERRO JA, FERRO MIT, SAVINO VJM, COELHO AAD, MACARI M. Polymorphism analysis of the hsp70 stress gene in broiler chickens (*Gallus gallus*) of different breeds. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, n. 3, p. 275-281, 2003.
- MCEWEN BS, BIRON CA, BRUSON KW, BULLACH K, CHAMBERS WH, DHABHAR FS, GOLDFARB RH, KITSON RP, MILLER AH, SPENCER RL, WEISS JM. The role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease: neural, endocrine and immune interactions. **Brain Research Reviews**, v. 23, p. 73-133, 1997.
- MOBERG GP. Biological response to stress: implications for animal welfare. In: MOBERG GP, MENCH JA. **The biology of animal stress**. Oxon: CAB International; 2000. p. 1-21.
- MORAES VMB, MALHEIROS RD, BRUGGEMAN V, COLLIN A, TONA K, VAN AS P, ONAGBESAN OM, BUYSE J, DECUYPERE E, MACARI M. Effect of thermal conditioning during embryonic development on aspects of physiological responses of broilers to heat stress. **Journal of Thermal Biology**, v. 28, p. 133-140, 2003.
- MORAES VMB, MALHEIROS RD, BRUGGEMAN V, COLLIN A, TONA K, VAN AS P, ONAGBESAN OM, BUYSE J, DECUYPERE E, MACARI M. The effect of timing of

thermal conditioning on embryo physiological parameters and its relationship to thermotolerance in adult broiler chickens. **Journal of Thermal Biology**, v. 29, p. 55-61, 2004.

MORIMOTO RI. Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. **Science**, v. 259, p. 1409-1410, 1993.

MORIMOTO RI, TISSIÈRES A, GEORGOPOULOS C. Progress and perspectives on the biology of heat shock proteins and molecular chaperones. In: MORIMOTO RI, TISSIÈRES A, GEORGOPOULOS C. **The biology of heat shock proteins and molecular chaperones**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1994a. p. 1-30.

MORIMOTO RI, JURIVICH DA, KROEGER PE, MATHUR SK, MURPHY SP, NAKAI A, SARGE K, ABRAVAYA K, SISTONEN LT. Regulation of heat shock gene transcription by a family of heat shock factors. In: MORIMOTO RI, TISSIÈRES A, GEORGOPOULOS C. **The biology of heat shock proteins and molecular chaperones**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1994b. p. 417-455.

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

MURAROLI A, MENDES AA. Manejo da incubação, transferência e nascimento do pinto. In: MACARI M, GONZÁLES E. Manejo da incubação, Jaboticabal: FACTA; 2003. p. 180-198.

NAGAO RT, KIMPEL JA, KEY JL. Molecular and cellular biology of the heat-shock response. **Advances in Genetics**, v. 28, p. 235-274, 1990.

NAKAI A, MORIMOTO RI. Characterization of a novel heat shock transcription factor, heat shock factor 3, suggests a new regulatory pathway. **Molecular and Cellular Biology**, v. 13, n. 4, p. 1983-1997, 1993.

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

OHTSUKA K, SUZUKI T. Roles of molecular chaperones in the nervous system. **Brain Research Bulletin** 2000; 53(2): 141-146.

- PARSELL DA, LINDQUIST S. Heat shock proteins and stress tolerance. In: MORIMOTO RI, TISSIÈRES A, GEORGOPOULOS C. **The biology of heat shock proteins and molecular chaperones**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1994. p. 457-494.
- POLLA BS, BACHELET M, DALL'AVA J, VIGNOLIA AM. Heat shock proteins in inflammation and asthma: Dr. Jekyll or Mr. Hyde? **Clinical and Experimental Allergy**, v. 28, p. 527-529, 1998.
- PUVADOLPIROD S, THAXTON JP. Model of physiological stress in chickens. 1. Response parameters. **Poultry Science**, v. 79, p. 363-369, 2000.
- ROCHE DIAGNOSTICS GMBH. LightCycler® DNA MASTER SYBR Green I. Version September, 2005.
- SANTIN E, MAIORKA A, POLVEIRO WJC, PAULILLO AC, LAURENTIZ AC, BORGES SA, FISCHER DA SILVA AV. Effect of environmental temperature on immune response of broilers. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 12, p. 247-250, 2003.
- SCHLESINGER, MJ. Heat shock proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 21, p. 12111-12114, 1990.
- SHARMA JM. Overview of the avian immune system. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 30, n. 1, p. 13-17, 1991.
- SIEGEL, HS. Stress, strains and resistance. **British Poultry Science**, v. 36, p. 3-22. 1995.
- SUH WC, LU CZ, GROSS CA. Structural features required for the interaction of the hsp70 molecular chaperone DnaK with its cochaperone DnaJ. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 43, p. 30534-30539, 1999.
- TAZAWA H, WHITTOW GC. Incubation physiology. In: WHITTOW GC. **Sturkie's avian physiology**. San Diego: Academic Press; 2000. p. 617-634.
- TISSIÈRES A, MITCHELL HK, TRACY UM. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. **Journal of Molecular Biology**, v. 84, p. 389-398, 1974.

- WALLIN RPA, LUNDQVIST A, MORÉ SH, VON BONIN A, KIESSLING R, LJUNGGREN H-G. Heat shock proteins as activators of the innate immune system. **Trends in Immunology**, v. 23, n. 3, p. 130-135, 2002.
- WANG S; EDENS FW. Hsp70 mRNA expression in heat-stressed chickens. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 107B, n. 1, p. 33-37, 1994.
- WANG S, EDENS FW. Heat conditioning induces heat shock proteins in broiler chickens and turkey poults. **Poultry Science**, v. 77, p. 1636-1645, 1998.
- WELCH, WJ. Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. **Physiological Reviews**, v. 72, n. 4, p. 1063-1081, 1992.
- WITTUNG-STAFSHEDE P, GUIDRY J, HORNE BE, LANDRY SJ. The J-domain of hsp40 couples ATP hydrolysis to substrate capture in hsp70. **Biochemistry**, v. 42, p. 4937-4944, 2003.
- VERBEKE P, FONAGER J, CLARK BFC, RATTAN SIS. Heat shock response and ageing: mechanisms and applications. **Cell Biology International**, v. 25, n. 9, p. 845-857, 2001.
- YAHAV S, SHAMAY A, HOREV G, BAR-ILAN D, GENINA O, FRIEDMAN-EINAT M. Effect of acquisition of improved thermotolerance on the induction of heat shock proteins in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 76, p. 1428-1434, 1997a.
- YAHAV S, SHAMAY A, HABERFELD A, HOREV G, HURWITZ S, FRIEDMAN-EINAT M. Induction of thermotolerance in chickens by temperature conditioning: heat shock expression. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 813, p. 628-636, 1997b.
- YAHAV S. Domestic fowl – Strategies to confront environmental conditions. **Avian and Poultry Reviews**, v. 11, n. 2, p. 81-95, 2000.
- YAHAV S, COLLIN A, SHINDER D, PICARD M. Thermal manipulations during chick embryogenesis: effects of timing and temperature. **Poultry Science**, v. 83, p. 1959-1963, 2004.
- ZÜGEL U, KAUFMANN SH. Immune response against heat shock proteins in infectious diseases. **Immunobiology**; v. 201, n. 1, p. 22-35, 1999.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)