UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

HENRIQUE BARBOSA HOOPER

**Expressão gênica de proteínas de choque térmico como
marcador molecular de termotolerância em vacas Nelore**

Pirassununga

2015

HENRIQUE BARBOSA HOOPER

**Expressão gênica de proteínas de choque térmico como
marcador molecular de termotolerância em vacas Nelore**

Versão corrigida

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

Área de Concentração: Biociência Animal

Orientador: Prof. Dr. Evaldo Antonio
Lencioni Titto

Pirassununga

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

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

H786e Hooper, Henrique Barbosa
Expressão gênica de proteínas de choque térmico como
marcador molecular de termotolerância em vacas Nelore /
Henrique Barbosa Hooper. -- Pirassununga, 2015.
76 f.
Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.
Departamento de Ciências Básicas.
Área de Concentração: Biociência Animal.
Orientador: Prof. Dr. Evaldo Antonio Lencioni Titto.

1. *Bos taurus indicus* 2. Gerenciamento de calor
3. HSP 4. Leucócitos 5. Termólise. I. Título.

DEDICATÓRIA

À Deus, minha família e amigos pelo apoio, incentivo, companheirismo, amizade e instrução, o que tornou muito mais fácil minhas escolhas e decisões.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, força maior inexplicável, que me conduz ao melhor caminho e que me fortalece na concretização dos meus ideais.

Aos meus pais, Adolfo e Denise, meu irmão, Thiago, minha fortaleza, pelo apoio e incentivo incondicionais em mais essa etapa.

Aos meus avós, tios e primos pelo carinho de sempre, mesmo à distância.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Titto, pela oportunidade de continuar o aperfeiçoamento dentro da área da Bioclimatologia, além da amizade e confiança creditados ao meu trabalho.

Aos que plantaram a semente das proteínas de choque térmico em mim, o Prof. Dr. Alfredo Pereira e a Dra. Ana Geraldo (Qui), agradeço pela ideia central do trabalho, confiança em pouco tempo de convivência e auxílio além-mar.

À Prof.(a) Dra. Cristiane por deixar sua porta sempre aberta para auxiliar em alguma dúvida, dar sugestões e ensinar.

Ao Prof. Dr. Ed Hoffmann, pela assistência e cooperativismo.

Ao Prof. Dr. Mario Binelli, pelas instruções e por gentilmente conceder seu laboratório para realização das análises.

Ao Prof. Júlio Balieiro, pelo auxílio e sugestões quanto às análises estatísticas.

À Prof.(a) Dra. Luciane por me emprestar e me aconselhar na utilização da câmera termográfica.

Aos pós-graduandos do Laboratório de Biometeorologia e Etologia, Bettah, Raquel, Denis e Thuanny. Em particular, aos grandes parceiros, Fábio, Lina e Ana, que fizeram este trabalho muito mais leve, pelo comprometimento, competência e todas aventuras vividas. E também à nossa técnica, Dra. Thays, pela ajuda, organização e amizade.

À todos os “Labeanos” que auxiliaram na execução do Projeto.

À Prefeitura do Campus USP de Pirassununga, por disponibilizar os animais para a realização do projeto.

À todos os funcionários do Setor de Bovinos de Corte, Ismael, João Batista, Paulo César, Ricardo e o Valdir, peças chave no manejo com os animais, agradeço pela paciência, cooperativismo e disponibilidade.

À amiga Angela Gonella, por não medir esforços em me ajudar no longo processo das análises laboratoriais. Eu lhe agradeço por todo seu profissionalismo, ensinamentos, paciência e dedicação.

Aos amigos, Thiago (Arroz), Milton, Júlio, Agustin e Julianne pelo apoio nos manejos reprodutivos durante a estação de monta.

Aos colegas de pós-graduação da FZEA e da FMVZ pelos momentos no corredor do prédio e descontrações em nossas reuniões, festas e churrascos.

Aos meus amigos pelo apoio e carinho.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos por me acolher e dar suporte no ensino e pesquisa durante a Pós-graduação.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa durante todo o período de realização deste Mestrado.

“A alegria não chega apenas no encontro do achado, mas faz parte do processo da busca. E ensinar e aprender não pode dar-se fora da procura, fora da boniteza e da alegria.”

Paulo Freire

RESUMO

HOOPER, H. B. **Expressão gênica de proteínas de choque térmico como marcador molecular de termotolerância em vacas Nelore**. 2015. 76 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

Objetivou-se com este estudo compreender as dinâmicas das temperaturas corporais em fêmeas da raça Nelore, e relacionar os aspectos fisiológicos da termorregulação com as respostas celulares pela expressão de proteínas de choque térmico. O projeto foi desenvolvido no Laboratório de Biometeorologia e Etologia, da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, Pirassununga-SP. Foram utilizadas 20 vacas Nelore pluríparas, cíclicas, mantidas em sistema de pastejo. O período experimental precedeu a estação de monta de 2013 e terminou na inseminação artificial. Para classificar os animais quanto ao gerenciamento de calor foi monitorada a temperatura vaginal durante seis dias por meio de 16 data loggers (n=16). Com o intuito de melhor compreender o gerenciamento de calor, outras respostas fisiológicas, nomeadamente temperatura retal, caudal, ocular, frequência respiratória e taxa de sudação foram colhidas durante os quatro dias finais do monitoramento da temperatura vaginal. Para expressão gênica relativa colheram-se amostras de sangue (n=20). Foram realizados choques térmicos *in vitro* a 38°C, 40°C e 42°C por duas horas. Após tratamento térmico obteve-se o *pellet* de leucócitos para posterior extração do RNA pelo método TRIzol. Foram escolhidas 10 vacas com os melhores resultados de concentração de RNA, 5 pertencentes ao grupo de vacas eficientes quanto ao gerenciamento de calor, e 5 não eficientes (n=10). A RT-PCR foi realizada com o kit SuperScript III. A reação polimerase em cadeia em tempo real (qPCR) ocorreu no aparelho StepOnePlus® Applied Biosystem utilizando como marcador fluorescente o SYBR® Green para os genes alvo validados HSPA1A, HSPD1, HSP90AA1, HIF1A e endógenos ACTB, RPL15 e PPIA. Os dados foram analisados por ANOVA, regressão e correlação do SAS 9.2. As vacas foram classificadas em eficientes e não eficientes por meio de coeficientes angulares, advindos da regressão das temperaturas vaginais durante períodos de ganho e perda de calor. As vacas eficientes apresentaram menores temperaturas retais 37,65°C (P<0,01) e maior taxa

de sudação 528,73 g. m⁻². h⁻¹ (P<0,06). A nível celular, o aumento programado *in vitro* da temperatura não aumentou quantidade de transcritos, promovendo manutenção à 38°C e 40°C e declínio à 42°C. A ordem decrescente da abundância de transcritos foi HSPA1A, HSPD1 e HSP90AA1. Pode-se concluir que vacas Nelore com diferentes gerenciamentos de calor apresentam respostas termorregulatórias diferentes. A HSPA1A apresentou a maior abundância de transcritos sendo considerada como marcador molecular para termotolerância, por ser a mais sensível à temperatura e bem conservada. Não foi observado diferença nas expressões gênicas relativas das proteínas de choque térmico entre os animais classificados quanto ao gerenciamento de calor.

Palavras-chave: *Bos taurus indicus*; gerenciamento de calor, HSP; leucócitos; termólise.

ABSTRACT

HOOPER, H. B. **Gene expression of heat shock proteins as molecular marker of thermotolerance in Nellore cows.** 2015. 76 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

The aim of this study was to understand the dynamics of body temperatures in Nellore females, and relate the physiological aspects of thermoregulation with cellular responses by the expression of heat shock proteins. The project was developed in Biometeorology and Ethology Laboratory, Faculty of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Pirassununga-SP. Were used 20 Nellore pluriparous cows, cyclical, kept in grazing system. The experimental period preceded the 2013' breeding season and ended up in artificial insemination. To classify animals in relation to heat management the vaginal temperature was monitored for six days through 16 data loggers (n=16). In order to better understand the heat management, other physiological responses, including rectal, tail and eye temperatures, respiratory rate and sweating rate were taken during the final four days of vaginal temperature monitoring. For gene expression was harvested blood samples (n=20). *In vitro* heat shocks were performed at 38°C, 40°C and 42°C during two hours. After the heat treatment was obtained the leukocyte pellet for later RNA extraction by TRIzol method. Ten cows were chosen with the best RNA concentration results, five belonging to the group of cows efficient on heat management and five inefficient (n = 10). RT-PCR was performed with SuperScript III kit. The real-time polymerase chain reaction (qPCR) occurred in StepOnePlus® Applied Biosystems instrument using the SYBR® Green as fluorescent marker to the target validated genes HSPA1A, HSPD1, HSP90AA1, HIF1A and the endogenous ACTB, RPL15 and PPIA. Data were analyzed using ANOVA, regression and correlation SAS 9.2. The cows were classified as efficient and inefficient through angular coefficients, derived from regression of vaginal temperatures for the gain and heat loss periods. Efficient cows had lower rectal temperature 37.65°C (P<0.01), higher sweating rate 528.73 g. m⁻². h⁻¹ (P<0.06). At cellular level, the increase of *in vitro* programmed temperature has not increased the transcripts amount, promoting the maintenance at 38°C and 40°C and decline at 42°C. The decreasing order of transcripts amount was HSPA1A,

HSPD1 and HSP90AA1. It can be concluded that Nellore cows with different heat managements has different thermoregulatory responses. The HSPA1A showed the highest transcripts abundance being considered as a molecular marker for thermotolerance, for being more sensitive to temperature and better conserved. There was no difference in gene expression for heat shock proteins between animals classified by heat management.

Keywords: *Bos taurus indicus*; heat management; HSP; leukocytes; thermolysis.

SUMÁRIO

1	Introdução	12
1.1	Objetivo Geral	14
1.2	Objetivos Específicos	14
2	Revisão bibliográfica	15
2.1	Panorama Clima X Produção Animal	15
2.2	Zebuínos: adaptação fisiológica e celular	16
2.3	Estresse térmico: relação animal x ambiente	17
2.4	Adaptação: aclimatação e termotolerância	19
2.5	Proteínas de choque térmico (HSPs)	21
3	Material e Métodos	26
3.1	Local e laboratórios	26
3.2	Permissão ética	26
3.3	Variáveis meteorológicas	27
3.4	Animais	28
3.5	Fases experimentais	29
3.5.1	Mensuração contínua da temperatura vaginal	29
3.5.2	Mensurações pontuais de dados fisiológicos	31
3.5.3	Colheitas para expressão gênica	33
3.6	Processamento das amostras	34
3.6.1	Choque térmico <i>in vitro</i>	34
3.6.2	Separação dos leucócitos e hemólise	34
3.6.3	Extração do RNA	36
3.6.4	Síntese e determinação da quantidade de cDNA	37
3.7	Análises de expressão gênica	38
3.7.1	Delineamento de <i>primer</i>	38
3.7.2	Reação Polimerase em Cadeia em Tempo Real (qPCR):	42
3.7.3	Validação	42
3.7.4	Comparação	43

3.7.5	Sequenciamento de Produtos de PCR	44
4	Análise dos dados	45
5	Resultados e discussão	46
5.1	Aspectos fisiológicos da termorregulação das vacas Nelore	46
5.1.1	Classificação dos animais quanto ao gerenciamento de calor	46
5.1.2	Variáveis fisiológicas complementares	54
5.2	Aspectos celulares da termotolerância.....	60
6	Conclusões	66
	Referências	67

1 Introdução

A população mundial está em crescente ascensão e por consequência será necessário intensificar a produção de alimentos aliado à soluções que visem um menor impacto ambiental. Neste contexto, encontra-se o melhor gerenciamento dos recursos hídricos, das terras e da emissão de poluentes na atmosfera. Caso contrário, a escassez de recursos, juntamente com as alterações climáticas, impactará negativamente nas produções agrícolas e pecuárias, originando uma menor produção de alimentos e um aumento do número de pessoas em risco de fome.

A produção animal deverá se adequar buscando o equilíbrio nos âmbitos produtivos, ambientais e genéticos, não esquecendo o fator adaptabilidade. Assim sendo, será de grande importância entender as dinâmicas entre animal-ambiente, e quais as características mais relevantes para superar situações adversas.

Tensão é um estado de desequilíbrio orgânico, ocasionado por um agente estressor e diversos mecanismos compensatórios são recrutados para conter este desequilíbrio e retornar à normalidade (DOBSON; SMITH, 2000). Um desses mecanismos de adaptação celular é a produção e acumulação de proteínas de choque térmico. Tais proteínas, ou chaperonas moleculares, auxiliam nas atividades celulares em situações normais, sendo constitutivas, ou em situações adversas sua produção é aumentada, sendo induzidas (DEB et al., 2013). Essas funções incluem a reestruturação de proteínas desestruturadas, transporte de proteínas, dissolução de agregados, participação em vias de sinalização hormonal, entre outros.

Em bovinos que se desenvolveram em climas quentes há evidências da aquisição de genes para proteção contra o efeito deletério causado por temperaturas elevadas (HANSEN, 2004). O mesmo autor afirma que essa resistência genética é observada de forma diferente tanto em *Bos taurus indicus* quanto para *Bos taurus taurus*.

Tendo isso em vista, há a necessidade conhecer as dinâmicas de gerenciamento de calor, bem como quais as respostas celulares frente ao estresse térmico, e quais as características de adaptabilidade seriam relevantes visando o melhoramento genético. O entendimento da expressão gênica de proteínas de

choque térmico nas diferentes espécies e suas origens possibilitará a identificação de um marcador de termotolerância e assim, melhorar a reprodução e a produção em condição de estresse térmico.

Espera-se que os animais que gerenciam mais eficientemente a temperatura corporal apresentem uma maior capacidade termolítica (por meio da sudção e polipnéia térmica). Ao nível celular, a expectativa é que exista uma relação entre o aumento programado da temperatura em condições *in vitro* e a resposta celular pela produção de HSP, bem como a relação entre os grupos de diferentes gerenciamentos de calor. Com base nas respostas fisiológicas e celulares, será possível constatar qual o perfil de resposta termorregulatória e de termotolerância das fêmeas Nelore.

1.1 Objetivo Geral

O presente estudo visa compreender as dinâmicas das temperaturas corporais em fêmeas da raça Nelore, e assim relacionar os aspectos fisiológicos da termorregulação com as respostas celulares relativas às HSPs após choque térmico *in vitro*.

1.2 Objetivos Específicos

- Relacionar as dinâmicas das temperaturas corporais com as respostas termolíticas (taxa de sudção e polipnéia térmica);
- Identificar as respostas celulares pela expressão gênica relativa de HSPs nos leucócitos de bovinos perante o aumento programado da temperatura *in vitro*;
- Comparar os níveis de expressão gênica das proteínas de choque térmico entre grupos com diferentes gerenciamentos de calor.

2 Revisão bibliográfica

2.1 Panorama Clima X Produção Animal

Nas últimas décadas, a humanidade presenciou mudanças climáticas e ambientais, sendo muito delas influenciadas pela ação antropogênica, incluindo a redução de geleiras, aumento da temperatura global, ondas de calor, secas ou precipitações inconstantes (IPCC, 2014). O futuro ainda é incerto, entretanto sabe-se que as mudanças climáticas são uma ameaça ao desenvolvimento e por isso acende o interesse nas oportunidades de mitigação e adaptação.

Segundo Nardone et al. (2010), é esperado um aumento significativo da produção animal, levando-se em consideração o consumo de alimentos. Dessa maneira, o século XXI será um período em que a humanidade deverá estabelecer prioridades a respeito do consumo de água e alimentos devido às mudanças climáticas globais que impactarão a agricultura regional ou global (NARDONE et al., 2010).

As mudanças climáticas poderão impactar a produção agrícola e pastoril, com redução da disponibilidade de água bem como na severidade e distribuição de doenças humanas, animais e vegetais (THORNTON et al., 2009). Para os bovinos, as ondas de calor têm causado efeitos desastrosos em várias partes do mundo, como por exemplo a morte de 3.750 cabeças no oeste de Iowa (BROWN-BRANDL et al., 2005). Para atenuar os desafios ambientais, os sistemas de produção animal deverão se munir de opções gerenciais para reduzir o risco de consequências adversas (NIENABER; HAHN, 2007).

Considerando o aquecimento global, os sistemas de produção extensivos sofrerão efeitos diretos como a baixa incidência de chuvas, elevação da temperatura e radiação solar, que afetarão as pastagens e lavouras (NARDONE et al., 2010). Estes sistemas predominam nos países em desenvolvimento, prevendo-se uma redução de 20 a 25% da produção animal devido ao aquecimento global (SEGUIN, 2008).

Nestes países, os sistemas produtivos deverão se adequar não só para maior oferta de alimento como também às mudanças climáticas e disponibilidade de recursos (THORNTON et al., 2009). Segundo os mesmos autores, devido à complexidade do setor agropecuário, será necessário um conjunto de inovações tecnológicas, políticas e institucionais, além de melhorias ligadas à nutrição, genética e reprodução, adequadas a cada sistema.

Comumente, os produtores detêm o conhecimento para enfrentar desafios para o benefício dos seus animais do ponto de vista da aceitabilidade gerencial, viabilidade tecnológica e retorno econômico (NIENABER; HAHN, 2007). Entretanto, desafios térmicos sucessivos e intensos demandam estudo aprofundado para evitar consequências desastrosas. De acordo com o Thornton et al. (2009), o conhecimento a respeito do assunto ainda é limitado o que aumenta a importância do tema para avaliar como os sistemas produtivos deverão se comportar no futuro.

Neste contexto, a Biometeorologia desempenhará papel relevante na gestão ambiental da pecuária, por relacionar as respostas biológicas dos animais e produção agropecuária (NIENABER; HAHN, 2007).

2.2 Zebuínos: adaptação fisiológica e celular

Os bovinos são subdivididos nas classes taurino, zebuino e sanga, e desde sua domesticação há mais de 10.000 anos, eles desempenham papel fundamental para o crescimento e economia das civilizações (GARRICK; RUVINSKY, 1999).

De acordo com Chan, Nagaraj e Reverter (2010), os taurinos descenderam de ancestrais da Europa e Sudoeste da Ásia, apresentando orelhas curtas e ausência de corcova, os zebuínos descenderam de ancestrais do Sul asiático, apresentando orelhas grandes e corcova e a origem dos sanga é incerta, mas acredita-se que seria no oeste e sul africano. Segundo os mesmos autores, com as práticas de acasalamento eles foram divididos em: taurinos que habitavam o clima temperado, e possuíam pelame espesso, maior sensibilidade ao calor e depositavam mais gordura; os tropicais habitavam regiões de clima quente, sendo resistentes a

parasitas, tolerantes a escassez de alimentos e a clima inconstante destacando-se no grupo dos tropicais, a raça Nelore.

Em seu longo processo adaptativo em climas tropicais, os *Bos taurus indicus* foram capazes de regular mais eficientemente sua temperatura retal em resposta ao estresse térmico que os *Bos taurus taurus* (DEB et al., 2013). Nota-se assim que, os *Bos taurus indicus* detêm habilidade termorregulatória superior à dos *Bos taurus taurus* pela baixa produção de calor metabólico e elevada capacidade de fluxo de calor para o ambiente, ou ambos (HANSEN, 2004). Conforme o mesmo autor, a baixa taxa de crescimento e produção de leite é devido à baixa taxa de metabólica em várias raças zebuínas. Já a elevada capacidade de fluxo de calor está relacionada com a alta densidade de anastomoses artériovenosas na pele (HALES et al., 1978) pelagem espessa e densa (FINCH; BENNETT; HOLMES, 1984), pelagem lisa e brilhante que reduz as trocas de calor por radiação (HUTCHINSON; BROWN, 1969) e alta densidade de glândulas sudoríparas (NAY; HAYMAN, 1956).

Ao nível celular, há evidências que os bovinos que evoluíram em clima quentes adquiriram genes que os protegem dos efeitos adversos ocasionados por elevadas temperaturas como foi observado nos *Bos taurus indicus*, Senepol e Romosinuano (HANSEN, 2004). De acordo com o mesmo autor, ainda pouco se conhece a respeito dos genes responsáveis pela resistência ao calor em zebuínos, como também a compreensão da base fisiológica para a termotolerância.

2.3 Estresse térmico: relação animal x ambiente

O bem-estar de um indivíduo é o estado no que diz respeito às suas tentativas de lidar com o ambiente, podendo ser alcançado com pouco esforço sendo considerado satisfatório, ou pobre se o indivíduo falhar, gastando muito tempo e energia (BROOM, 1986). Para Sánchez-Rodríguez (2007), o bem-estar é o estado de harmonia física e fisiológica entre o organismo e o seu entorno, caracterizado pela ausência de privação, estimulação adversa, ou outras condições impostas que afetam a saúde e a produtividade do organismo.

O estresse é genericamente o conjunto de alterações comportamentais e fisiológicas, desencadeadas por agentes estressores seja do ambiente físico (calor, frio, espaço, fome, sede) social ou práticas de manejo (GRANDIN, 2000). Segundo Dobson e Smith (2000), o estresse acarreta falhas na expressão do potencial genético pela incapacidade do animal se ajustar ao ambiente.

Os animais mantidos em estresse térmico por calor quando variáveis ambientais, tais como temperatura ambiente, umidade, radiação solar e movimento do ar combinados superam o limite crítico superior da zona de termoneutralidade, resultando em uma carga de calor total (interna e ambiente) superior a capacidade de dissipação (BERNABUCCI et al., 2010).

Segundo Geraldo (2013), há a necessidade de conhecer as variadas respostas dos animais perante situações de estresse. Seja pelo entendimento das respostas fisiológicas relacionadas com a termorregulação (como a frequência respiratória, temperatura retal, taxa de sudação), das respostas comportamentais e, mais recentemente dos mecanismos celulares e características genéticas, entre as quais a expressão das proteínas de choque térmico.

De acordo com Puschmann e Jessen (1978), fisiologicamente a temperatura é controlada pelo hipotálamo, o centro termorregulador do cérebro via sistema nervoso central e periférico.

Ao nível hormonal, o hipotálamo além de ser um termostato regulador desempenha o controle de praticamente todo sistema endócrino pelo eixo hipotálamo-hipofisário (DE RENSIS; SCARAMUZZI, 2003). Sob estresse térmico, ocorre uma diminuição da atividade do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide, com a redução dos hormônios tireoidianos, triiodotironina (T3) e tiroxina (T4) (WHITE, 2009).

Em relação ao comportamento, de acordo com Titto et al. (2011) a capacidade de tolerância ao calor é um fator que modifica o comportamento de pastejo (tempo em estação, ruminação, frequência de pastejo) no gado de corte quando mantido em áreas onde existe disponibilidade de sombra.

Ao estimar se as condições ambientais estão ou não confortáveis alguns índices biometeorológicos foram desenvolvidos, envolvendo a combinação de

temperatura do ar e umidade relativa, ou também a radiação solar e movimento do ar (BERNABUCCI et al., 2010). A avaliação de parâmetros fisiológicos também auxilia no entendimento das respostas biológicas em situações de estresse térmico, na qual os parâmetros mais utilizados são a temperatura retal e frequência respiratória (BROWN-BRANDL et al., 2003). Conhecer esses índices e as respostas biológicas a eles associadas, nos permite avaliar as condições climáticas de criação e como os animais reagem a elas, e assim providenciar alternativas que priorizem o bem-estar dos animais.

2.4 Adaptação: aclimação e termotolerância

Os animais respondem ao estresse de acordo com o tipo de desafio térmico: em eventos agudos ocorrem respostas adaptativas de curto prazo quanto ao comportamento, respostas fisiológicas e funções imunológicas; já nos eventos a longo prazo ocorrem respostas orientadas para o desempenho, sobrevivência, crescimento e reprodução (Figura 1)(NIENABER; HAHN, 2007).

A adaptabilidade ou capacidade de adaptação é a habilidade do animal se ajustar a um conjunto de condições ambientais, até mesmo a extremos climáticos (MCMANUS et al., 2009). De acordo com Moseley (1997), a adaptação ao calor é dividida em termotolerância e aclimação. A termotolerância é a adaptação celular causada por uma exposição ao calor única, severa mas não letal, que permite ao organismo sobreviver à um estresse por calor subsequente e letal, pela síntese/acumulação celular de proteínas de choque térmico. No entanto, a aclimação é a habilidade do organismo em realizar trabalhos em estresse de calor por aprimorar a dissipação do calor devido à elevação moderada e repetida da temperatura.

A aclimação ao calor não só proporciona uma maior transferência de calor para a pele ou capacidade de dissipação de calor, mas também permite que o organismo tolere uma temperatura mais elevada (MOSELEY, 1997).

Figura 1. Esquema de resposta dos animais domésticos com mudanças no ambiente térmico.

Fonte: adaptado de Nienaber; Hahn (2007).

De acordo com Bernabucci et al. (2010), a adaptação é o conjunto de alterações que reduz a tensão produzida por componentes estressantes do ambiente podendo ser de origem genotípica ou fenotípica; a aclimação diz respeito a mudanças fisiológicas e comportamentais que ocorrem durante a vida de um organismo em resposta a mudanças climáticas naturais, que reduzem a tensão ou aumentam a resistência a esta.

Para Horowitz (2002), a aclimação ao calor inicia-se logo após a exposição a este, sendo um evento transitório, inicialmente com aumento da excitabilidade autonômica e ativação de mecanismos moleculares de proteção, a longo prazo ocorre a reprogramação gênica e respostas celulares. Segundo o mesmo autor, a resposta do choque térmico é diferente da aclimação por ser um processo rápido e

associado com a síntese de proteínas de choque térmico de vários pesos moleculares. Com a intenção de proteger as células do estímulo nocivo e acelerar a reparação após injúria térmica curta e subletal.

2.5 Proteínas de choque térmico (HSPs)

Constantemente as células estão expostas à estressores diversos e estes desafios promovem a ativação de mecanismos anti-estresse. Estes mecanismos envolvem uma variedade de moléculas, incluindo as moléculas chaperonas também conhecidas como proteínas de choque térmico (HSPs) (MACARIO; MACARIO, 2007).

Em 1962, o pesquisador Ritossa, descobriu após exposição das glândulas salivares de *Drosophila melanogaster* à 37°C por 30 minutos e à 25°C, a ocorrência de uma alteração cromossômica. Este foi o primeiro registro da descoberta de um gene que codifica as proteínas de choque térmico. Desde então, várias pesquisas procuram entender o papel das HSPs em situações de estresse.

As HSPs são chaperonas moleculares, proteínas envolvidas na manutenção das funções celulares, produzidas pela codificação de genes de choque térmico que são encontrados na maioria dos organismos desde bactérias, plantas e mamíferos, classificadas quanto ao seu peso molecular em kDa, sendo as principais famílias a 110, 100, 90, 70, 60, 40 kDa e as pequenas HSPs (inferiores a 30 kDa), e cofactores menores (SØRENSEN; KRISTENSEN; LOESCHCKE, 2003). De acordo com Kregel (2002), as HSPs estão presentes no citosol, na mitocôndria, no retículo endoplasmático e no núcleo, variando sua localização em razão da sua função. Nos mamíferos as mais estudadas são a de peso molecular 60, 70, 90 e 110 kDa, sendo expressas em condições de normotermia e condições estressantes podendo ser por hipertermia, depleção energética, hipóxia, acidose, isquemia, espécies reativas de oxigênio ou de nitrogênio e infecções (KREGEL, 2002). As HSP70 e HSP90 são observadas em todos os organismos e a HSP110 principalmente nas células de mamíferos (KIANG; TSOKOS, 1998).

As células, quando sujeitas ao choque térmico, reduzem a transcrição gênica, tradução e processamento do RNA, alteram a atividade de proteínas expressas, e por um pequeno período aumentam a expressão de HSPs (BERNABUCCI et al., 2010). Segundo Macario; Macario (2007), as chaperonas moleculares são proteínas que ajudam outras proteínas no dobramento, redobramento no caso de perderem a sua conformação nativa, e transporte para os seus destinos dentro das células (incluindo a translocação através das membranas das organelas). Também participam na dissolução de agregados proteicos conduzindo-os para degradação por máquinas proteolíticas (Figura 2).

Figura 2. Desenho da função celular das proteínas de choque térmico.

Fonte: adaptado de Sørensen; Kristensen; Loeschcke (2003).

Estas funções são importantes em condições celulares normais, no entanto, sob condições de estresse a sua produção é acentuada, uma minoria é induzida na privação de glicose ou por proteínas reguladoras de glicose (BERNABUCCI et al., 2010; SØRENSEN; KRISTENSEN; LOESCHCKE, 2003). Em 1997, Moseley afirmou que a função de manutenção de proteínas estruturais em situações de estresse é

importante para estabilizar o citoesqueleto, exercendo um papel importante na integridade de todo organismo por manter assim as barreiras endoteliais e epiteliais.

A expressão gênica varia de acordo com a ativação de fatores transcrpcionais de choque térmico (HSF1), aumento da expressão de proteínas de choque térmico e redução da expressão e síntese de outras proteínas, aumento da oxidação de glicose e aminoácidos e redução do metabolismo de ácidos graxos e ativação do sistema imune pela secreção extracelular da HSP (COLLIER et al., 2008). Caso o estresse persista, essa expressão gênica é alterada levando à mudanças fisiológicas, estado referido como aclimatação controlado pelo sistema endócrino (COLLIER et al., 2008).

De acordo com Kiang e Tsokos (1998), a regulação das HSPs ocorre com a participação de fatores transcrpcionais de choque térmico (HSFs) e elementos de choque térmico (HSEs), em condições normais, sem estresse, as HSPs ficam ligadas ao HSFs no citosol, mas em situações de estresse ou isquemia, as HSPs se separam dos HSFs, que são posteriormente fosforilados pela proteína quinase C (PKC) ou por outra proteína serina-treonina quinase, formando uma estrutura homotrimérica. Os trímeros entram no núcleo, se ligam aos HSEs (localizados na região promotora) que são fosforilados pelas HSFs quinases. Assim, inicia-se a transcrição e em seguida a tradução. As novas HSPs se ligam aos HSFs prevenindo outra síntese, e ficam disponíveis para atuarem em uma nova situação (Figura 3).

Em muitos organismos a HSP70 é considerada a maior família de proteínas podendo ser exclusivamente induzida, constitutiva e induzida ou unicamente constitutiva (SØRENSEN; KRISTENSEN; LOESCHCKE, 2003), compondo este grupo as de peso molecular 72, 73, 75 e 78 kDa, sendo a HSP72 altamente induzida e sua síntese é aumentada em resposta à vários estressores (KREGEL, 2002). As HSP70 e HSP60 realizam o movimento de proteínas celulares através da membrana mitocondrial, a HSP70 transporta a proteína para a membrana mitocondrial externa, participa do desdobramento proteico e inserção na membrana (MOSELEY, 1997). A HSP60 participa no redobramento da proteína dentro da mitocôndria (DESHAIES et al., 1988), também sendo pró e anti-apoptótica (KREGEL, 2002). A HSP90 tem sido associada a várias proteínas citosólicas e nucleares envolvidas na sinalização

celular como uma chaperona para receptores de hormônios esteroides (BOHEN; YAMAMOTO, 1994).

Figura 3. Resumo da sinalização para síntese de novas proteínas de choque térmico quando em estresse.

Fonte: adaptado de Kregel (2002).

De acordo com Guerriero Jr. e Raynes (1990), os linfócitos de vacas da raça Brahman, de ovelhas, cavalos e galinhas após choque térmico *in vitro*, sintetizaram proteínas de choque térmico, em especial o aumento das proteínas HSP70 e HSP90. No estudo conduzido por Kamwanja et al. (1994) com o objetivo de testar a viabilidade celular e concentração de HSP70 em linfócitos das raças Angus, Senepol e Brahman, perceberam que em cultura a 45°C por 3 horas a viabilidade celular reduzia mais na raça Angus que nas raças Brahman ou Senepol.

Geraldo (2013) num estudo realizado *in vitro*, submeteu linfócitos de vacas Holstein a diferentes tratamentos de choque térmico, tendo verificado uma maior expressão de mRNA-HSPA1A e mRNA-HSP90AA1 em situação de estresse por frio (10 °C) e estresse por calor (40 e 42 °C).

Bañuelos-Valenzuela e Sánchez-Rodríguez (2005), constataram que a quantidade de HSP70 após o aumento programado da temperatura a 38, 40, 42 e 44°C por 3 horas, foi maior em ordem decrescente para as raças Holandesa-Australiano, Criolo, Pardo Suiço, Holandesa e Limousin, respectivamente. Dessa forma, em linfócitos, a quantidade expressa de HSP70 está relacionada com a quantidade recebida de estresse de calor e varia sua expressão de acordo com a raça.

No estudo de Mishra et al. (2011) com bezerros de búfalo da raça Murrah, evidenciou-se que há o aumento da síntese de HSP70 em linfócitos quando submetidos a estresse térmico *in vitro* (cultura celular a 37 e 42°C) como também *in vivo* (quente-seco e quente-úmido). Estes autores observaram que o aumento quantitativo dos níveis de HSP70 em linfócitos foi maior no experimento *in vivo* que no *in vitro*, devido a outras fontes estressoras no tratamento *in vivo*. Geraldo et al. (2013) em estudo da expressão gênica de HSPA1A e HSP90AA1 de linfócitos de vacas não identificaram diferenças entre os tratamentos térmicos *in vivo* e *in vitro*, porém encontraram diferenças entre as expressões gênicas dentro de cada tratamento.

Kumar et al. (2015), sugeriram que os genes envolvidos na síntese das proteínas de choque térmico podem ser utilizados como biomarcadores no estudo do estresse em bovinos e búfalos e sua expressão depende da raça e da espécie. Além disso, evidenciaram variações na expressão gênica em relação à tolerância ao calor e adaptação em diferentes condições climáticas.

3 Material e Métodos

3.1 Local e laboratórios

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biometeorologia e Etologia, da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, Pirassununga-SP, situado à 21°80'00" de latitude sul e 47°25'42" de longitude oeste, à uma altitude de 634m. Segundo a classificação de Köppen-Geiger, a região apresenta clima do tipo Cwa (subtropical úmido), com temperatura média anual de $22,7 \pm 4,9^{\circ}\text{C}$ a $25,2 \pm 4,7^{\circ}\text{C}$ e pluviosidade média anual próxima a 1363 mm. O período experimental ocorreu até a inseminação artificial da estação de monta de 2013, entre outubro e novembro de 2013.

A colheita de dados foi realizada no centro de manejo do Setor de Bovinocultura de Corte da Prefeitura do Campus Administrativo de Pirassununga (PUSP-P), composto por uma área coberta por telhas de barro, piso de cimento, pé direito de 3m e ventilação natural, contendo currais, seringa, brete de contenção, balança e embarcador, e por uma área descoberta contendo outros currais com piso de terra. Em ambas as áreas existiam cochos de água à disposição dos animais.

As análises moleculares foram realizadas no laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular da FMVZ-USP, e apoio dos laboratórios de Morfofisiologia Molecular do Desenvolvimento, Fisiologia Animal e Biometeorologia e Etologia, da FZEA- USP.

3.2 Permissão ética

Este projeto está adequado à legislação vigente, lei Federal 11794, de 08 de outubro de 2008 e à lei Estadual 11977, de 25 de agosto de 2008, e foi aprovado pelo Comitê de Ética CEUA/FZEA-USP sob nº. 13.1.2186.74.2, em 14 de outubro de 2013.

3.3 Variáveis meteorológicas

As variáveis climáticas foram registradas no local das colheitas por meio de dois *data loggers* (Onset HOBO® temp/RH/2 ext channels), que registravam a temperatura do ar, a umidade relativa e a temperatura do globo negro a cada 15 minutos, dentro e fora do galpão. Esses dispositivos permaneceram no local até o final das colheitas.

Dados complementares foram obtidos pela estação meteorológica eletrônica do Laboratório de Construções e Ambiência, da FZEA/USP, localizada a 2.331m do setor de bovinocultura de corte, a cada 10 minutos. Foi determinado para a estação Primavera (22 de setembro de 2013 a 20 de dezembro de 2013) os dados médios de temperatura do ar, umidade relativa, radiação solar, pluviosidade e velocidade do ar (Tabela 1).

Tabela 1. Dados climáticos médios registrados durante a Primavera pela estação meteorológica eletrônica.

	Primavera
Tar ¹ média	22,77
Tar ¹ variação	9,9 - 35,7
UR ² variação	29 - 93
Rsolar ³ máx	1536
Rsolar ³ média	227,45
Pluviosidade ⁴	451,2
Vento ⁵	1,3

¹ Temperatura do ar (°C); ² Umidade relativa (%); ³ Radiação solar (média durante horas de luz (W/m²)); ⁴ Pluviosidade acumulada (mm); ⁵ Velocidade do vento (m/s)

3.4 Animais

Os animais foram escolhidos aleatoriamente de um rebanho de 258 fêmeas bovinas comerciais da raça Nelore (*Bos taurus indicus*), compondo um delineamento inteiramente casualizado (Figura 4).

Figura 4. Vacas que participaram do experimento no pasto e no curral de manejo.

Fonte: Própria autoria

Foram utilizadas 20 vacas pluríparas (do rebanho da Prefeitura do Campus Administrativo de Pirassununga - PUSP-P), com 30 a 90 dias pós-parto, cíclicas, com escore corporal entre 3 e 4 (0: magra, 5: obesa), sem afecções reprodutivas detectáveis por exame ginecológico ou outras afecções clínicas aparentes. Os animais foram mantidos em sistema de pastejo, com acesso à suplementação

mineral e água *ad libitum*, além de sombras naturais. Convencionou-se 20 fêmeas por se tratar de um número satisfatório e que atende as exigências para realização das análises fisiológicas e principalmente de expressão gênica relativa. Cada animal foi considerado como uma unidade experimental.

3.5 Fases experimentais

O período experimental precedeu a estação de monta e terminou na inseminação artificial da estação de monta de 2013, em virtude da possibilidade de agrupar os animais escolhidos em um único lote antes do início da estação de monta. Os eventos seguiram a seguinte sequência: mensuração contínua da temperatura vaginal (n=16) período em que foi registrada a temperatura vaginal por meio de dispositivo intravaginal (25/10/2013 a 01/11/2013). De forma complementar, nos últimos quatro dias de mensuração da temperatura vaginal foram realizadas mensurações pontuais de dados fisiológicos (n=20) (29/10/2013 a 01/11/2013). Após a remoção do dispositivo intravaginal, as vacas permaneceram em descanso para regeneração de trato vaginal (01/11/2013 a 05/11/2013). Quando foram iniciadas as colheitas de sangue no momento da sincronização (05/11/2013) e da inseminação (14/11/2013) (n=20), para as análises de expressão gênica relativa. No processamento de amostras todos animais passaram pela extração de RNA, porém dentre as vacas classificadas quanto a temperatura vaginal, somente 10 vacas com os melhores resultados de concentração do RNA prosseguiram para expressão gênica (n=10).

3.5.1 Mensuração contínua da temperatura vaginal

A mensuração contínua da temperatura vaginal foi realizada por meio da inserção intravaginal de *data loggers* modelo HOB0 Water Temperature Pro v2 (11,5cm de comprimento, 3,0cm de largura e 43g de peso), com registros a cada 15 minutos. Das 20 vacas, 17 receberam o *data logger* adaptado (PEREIRA, GERALDO e MATORANA FILHO, personal communication, 2013) com parte do implante intravaginal em branco (livre de progesterona) (Figura 5A) e revestido com

preservativos para reduzir as lesões à mucosa vaginal e proteger os dispositivos (Figura 5B). Após anestesia epidural baixa com 5mL de lidocaína, os dispositivos foram implantados com auxílio de um aplicador (Figura 5C) e fixados por sutura vulvar do tipo Horizontal em “U”, de Wolff (Figura 5D). Os dispositivos permaneceram na cavidade vaginal durante oito dias. Os dados do primeiro e último dia não foram considerados por não completarem colheitas de um dia completo, pois foi quando os dispositivos foram inseridos e removidos. Somente os dados de um dispositivo foram perdidos (n=16).

Figura 5. A - Data logger adaptado; B – Data logger revestido; C – Aplicador intravaginal; D – Fixação vulvar.

Fonte: Própria autoria

Os dados provenientes da mensuração contínua da temperatura vaginal foram utilizados para classificar os animais quanto ao gerenciamento de calor, em eficientes (E) e não eficientes (NE). Para tal, foi adotada a seguinte metodologia: dos seis dias de registro completo da temperatura vaginal foram escolhidos dois com condições climáticas semelhantes e estressantes, tanto para temperatura do ar, do

globo negro e umidade relativa; nestes dias escolhidos, delimitou-se a temperatura vaginal para dois períodos distintos, o primeiro para ganho de calor, das 12h00min às 19h00min, e o segundo para perda de calor, das 19h00min às 7h00min do dia seguinte. Por regressão foram calculadas duas equações de modo a representar o ganho de calor e a perda de calor. Para cada animal determinou-se o coeficiente angular de ganho (β positivo - declive ascendente) e o coeficiente angular de perda (β negativo - declive descendente). Discriminou-se os animais analisando os coeficientes de perda e ganho.

Como primeiro critério para separar os animais foi utilizado o declive descendente, referente à perda de calor, sendo os eficientes aqueles com maiores β (acima da média do grupo), ou seja, aqueles que dissipavam calor rapidamente, já os não eficientes os animais abaixo da média do grupo. Como segundo critério, foi utilizado o declive ascendente, referente ao ganho de calor, sendo os eficientes aqueles com menores declives ascendentes e os não eficientes com maiores, ou seja, que ganhavam calor rapidamente.

3.5.2 Mensurações pontuais de dados fisiológicos

Com a finalidade de complementar as informações provenientes da mensuração contínua, também foram mensuradas outras variáveis fisiológicas ($n=20$). Essas mensurações ocorreram nos últimos quatro dias antes da remoção dos *data loggers*, pela manhã (início às 7 horas) e pela tarde (início às 15 horas).

O registro dos dados decorreu após a chegada dos animais no curral de manejo, enquanto contidos no brete para a mensuração dos parâmetros fisiológicos. Durante a espera, os animais ficavam em ambiente coletivo, sombreado e com água à vontade.

Foram registradas a temperatura caudal e retal por termômetro de contato e clínico (Figura 6A e 6B), a taxa de sudação pela técnica de Schleger & Turner (1965), utilizando a fórmula $S \text{ (g. m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}) = (22 \times 3.600) / (2,06 \times \text{tempo em segundos})$

(Figura 6C), em uma região tricotomizada centro-lateral esquerda do tronco à altura das costelas, e a imagem termográfica da região da cabeça com foco região ocular (Figura 6D) utilizando a câmera termográfica Testo® 875-2i (coeficiente de emissividade 0,98).

Figura 6. Mensuração da temperatura caudal (A), retal (B), da taxa de sudação pela técnica de Schlegel & Turner (C) e registro da imagem termográfica no brete (D) nas vacas Nelore.

Fonte: Própria autoria

Somente a frequência respiratória foi determinada por contagem de movimentos torácicos, enquanto permaneciam na seringa, de modo a evitar alterações promovidas pelo estresse do manejo de contenção (Figura 6F). As imagens termográficas foram analisadas utilizando o *software* próprio do equipamento isolando a área ocular.

Uma semana após a colocação dos *data loggers* procedeu-se a remoção dos mesmos. Antes da estação de monta, os animais permaneceram uma semana em

descanso de pré-sincronização, para adequada recuperação do tecido vaginal antes da inserção do implante intravaginal de progesterona.

3.5.3 Colheitas para expressão gênica

Após o descanso de pré-sincronização, teve início a estação de monta, seguindo o seguinte protocolo:

- Dia 0: aplicação de benzoato de estradiol (2mg) com aplicação do implante intravaginal de progesterona.
- Dia 8: remoção do implante de progesterona e aplicação de prostaglandina (256mg/mL) e 300UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG), via intramuscular.
- Dia 9: aplicação de benzoato de estradiol (1mg), via intramuscular.
- Dia 10: inseminação com sêmen convencional de quatro touros Nelore escolhidos conforme critérios de cruzamento.
- Dia 20: Repasse com o touro.
- Dias 40, 70, 100: diagnósticos de gestação aos 30, 60, 90 dias por meio de ultrassonografia com avaliação da presença ou não do concepto.

Os animais que participaram no estudo foram protocolados e inseminados pelo médico veterinário Dr. Milton Maturana Filho, com exceção de uma fêmea que não foi inseminada por ser muito reativa.

Foi colhido sangue por punção da veia jugular das 20 vacas no momento da sincronização e da inseminação artificial, de modo a assegurar a disponibilidade de amostra caso ocorresse algum imprevisto. Para expressão gênica, utilizaram-se seis tubos de sangue com heparina (~8mL de cada) da BD Vacutainer® por animal (duplicata por tratamento térmico). No final das colheitas, o sangue seguiu para processamento.

3.6 Processamento das amostras

3.6.1 Choque térmico *in vitro*

Após a colheita, para maior preservação do meio celular as amostras de sangue para expressão gênica foram imediatamente transportadas para o Laboratório de Biometeorologia e Etologia onde se iniciaram os tratamentos térmicos, conforme sugerido por Agnew e Colditz (2008), que constataram diferenças na expressão gênica de HSPs de amostras frescas e refrigeradas. Com três aparelhos distintos de banho-maria calibrados para as temperaturas 38°C, 40°C e 42°C (Figura 7), iniciou-se o choque térmico *in vitro* por duas horas consecutivas, (WANG, DILLER E AGGARWAL, 2003; GERALDO, 2013).

Figura 7. Banho-maria utilizado para choque térmico *in vitro*.

Fonte: Própria autoria

3.6.2 Separação dos leucócitos e hemólise

Ao término do tratamento térmico, procedeu-se a centrifugação a 2.500 r.p.m. (960 x g), durante 20 minutos a uma temperatura de 20°C. A camada leucocitária (*buffy coat*) foi transferida para um *ependorf* de 1,5mL e o volume do microtubo foi completado com a solução de hemólise, contendo: 3,7 g ácido etilenodiamino tetra-

acético (EDTA); 80,2 g cloreto de amônia (NH_4Cl); 8,4 g bicarbonato de sódio (NaHCO_3); 1 L de água destilada.

Em seguida, o material foi novamente centrifugado a 10.000 r.p.m. ($15.420 \times g$) a 20°C , por 5 minutos, e no final foi descartado o sobrenadante por inversão do microtubo. As lavagens foram repetidas até que o *pellet* de leucócitos estivesse bem claro (sem hemácias). Para que as amostras fossem então armazenadas a uma temperatura de -80°C , foi realizado uma última lavagem com uma solução tampão fosfato-salino - PBS (10.000 r.p.m., 20°C , por 5 minutos), com posterior descarte do sobrenadante (Figura 8).

Figura 8. A - Camada leucocitária após centrifugação; B - Preparo solução de hemólise; C - Lavagem com solução de lise; D - Pellet de leucócitos

Fonte: Própria autoria

3.6.3 Extração do RNA

O RNA total foi isolado pelo método de TRIzol® Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA), reagente que causa ruptura celular, porém mantém a integridade do RNA. Foi adicionado a cada amostra contendo o pellet 0,75mL de TRIzol® Reagent (Figura 9A), homogeneizando até a completa dissolução do *pellet* (Figura 9B) e incubando por 5 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida adicionou-se 200 µL de clorofórmio, misturou-se com vórtex por 15 segundos e incubou-se por 5 minutos à temperatura ambiente. Logo após, iniciou-se a centrifugação a 12.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Durante este tempo, foram preparados novos tubos de 1,5mL para receber o RNA. Aproximadamente 600 µl da fase aquosa foi transferida para os novos microtubos de RNA (Figura 9C), onde se adicionou 500 µL de álcool isopropílico por amostra. Após mistura os microtubos foram incubados a -80°C, *overnight*. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 8 minutos a 4°C, observou-se o *pellet* de RNA precipitado no fundo do *ependorf*. O sobrenadante foi removido e adicionado 1mL de etanol 75 %, procedendo uma nova centrifugação a 12000 x g durante 5 minutos a 4°C. O etanol sobrenadante foi cuidadosamente removido e deixou-se os microtubos secarem por 5 min a temperatura ambiente. Ao final, ressuspendeu-se o RNA com 20 µL de água tratada com dietil pirocarboneto (DEPC).

Figura 9. A – *Pellet* com TRIzol® Reagent; B – *Pellet* homogeneizado; C – Fase aquosa; D – Aparelho NanoVue Plus

Fonte: Própria autoria

Logo após a ressuspensão realizou-se a etapa de digestão com DNase I (Deoxyribonuclease I Amplification Grade - Invitrogen - Cat. N. 18068-015). Etapa importante para que não haja contaminação do RNA total extraído com o DNA genômico, o que poderia interferir nas análises de expressão gênica. No microtubo de RNA (20 µL) foi adicionado 2 µL de 10X DNase I Reaction Buffer, 1,0 µL de DNase I Amplification Grade (1U/µL). Incubou-se por 15 minutos a 37°C. Foi adicionado 1 µL de EDTA (solução 25mM), homogeneizou-se e incubou-se por 10 minutos a 65°C, de modo a inativar a DNase I.

A concentração e pureza do RNA foram estimadas por leitura em espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Life Sciences; Figura 9D) pela absorbância 260nm e pelas razões 260/280 e 260/230 respectivamente (sendo que a razão deve estar entre 1,6 e 1,8). As amostras foram armazenadas a -80°C até a síntese de cDNA.

A extração foi realizada em todas as amostras da sincronização e da inseminação, porém para as próximas etapas somente foram utilizadas as amostras provenientes da inseminação.

3.6.4 Síntese e determinação da quantidade de cDNA

Das amostras provenientes da inseminação foram escolhidas 10 vacas, cinco eficientes e cinco não eficientes (como descrito no item 3.5.1), com os melhores resultados da concentração do RNA, determinada na etapa anterior.

Previamente à síntese de cDNA, o RNA foi diluído em água DEPC até alcançar a concentração de 1 micrograma em 10 microlitros de água. Para a síntese de cDNA foi utilizado o kit de transcrição reversa Superscript III (Invitrogen).

A reação de transcrição reversa foi a responsável pela transcrição do RNA em cDNA. Em microtubos de 0,2 mL livre de DNase e RNase foram adicionados 10,0 µL de amostra RNA (1 µg) e 1,00 µL de pd(T) 12-18 (0,5 µg.µL⁻¹). Em seguida os tubos foram incubados a 65°C durante 5 minutos e depois resfriados a 4°C. Foi preparada uma solução *mix* contendo: 4,0 µL de tampão 5X, 2,0 µL de DTT, 1,0 µL de dNTP (10mM de cada), 1,0 µL de RNase Out, e 1,0 µL de Superscript III. Acrescentou-se

9,4 μ L da solução *mix* a cada tubo e incubou-se por 1 hora a uma temperatura de 50°C, seguido de 15 minutos a 70°C. Posteriormente os tubos foram resfriados e armazenados a -20°C.

3.7 Análises de expressão gênica

Para melhor confiabilidade dos resultados de expressão gênica, seguiu-se uma sistemática de análises (Figura 10).

Figura 10. Fluxograma da quantificação de transcritos por qPCR.

Fonte: Própria autoria

3.7.1 Delineamento de *primer*

Para amplificação de um produto único em uma reação de polimerase em cadeia (PCR), é necessário que os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) senso e anti-senso sejam específicos para o gene a ser detectado. Para isso, as sequências de mRNA dos genes de interesse foram localizados na base de dados da NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>). Antes de fazer as análises, as sequências foram mascaradas empregando o RepeatMasker (SMIT, HUBLEY, GREEN, 1996-2010), para evitar que o desenho de *primers* fosse realizado sobre regiões de alta complexidade e repetitividade das sequências. A ferramenta PrimerQuestQM foi utilizada para desenhar os *primers*. Cada par de primer foi avaliado quanto à

probabilidade de formação de hairpins, homodímeros e heterodímeros de *primers* utilizando o programa Oligo Analyser 3.1. Tais sequências foram testadas quanto a sua especificidade usando o software BLAST1. Os pares de *primers* escolhidos foram sintetizados por laboratório terceirizado. Os detalhes dos *primers* estão nas tabelas 2 e 3.

Os *primers* chegaram ao laboratório liofilizados. Uma primeira ressuspensão foi feita com água tratada com DEPC livre de nucleases, gerando uma solução de estoque com concentração de 100 mM, armazenada a -20°C. Uma alíquota dessa solução foi diluída em água para fazer a solução de trabalho, com concentração de 20 mM. Esta solução também foi armazenada a -20°C.

Tabela 2. Característica dos *primers* alvo delineados para as quantificações dos transcritos.

Genes alvo	Símbolo do Gene	Número no GeneBank	Sequência primer senso (5' - 3')	Sequência primer anti-senso (5' - 3')	Amplicon	Referência
Heat shock transcription factor 1	<i>HSF1</i>	NM_001076809.1	GATTCGCCAGGACA GTGTTA	CCTCGTTCTCGTG CTTCAT	107	PrimerQuest
Bos taurus heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin) (HSPD1), transcript variant 3	<i>HSPD1</i>	NM_001166610.1	CTCATCTCACTCGG GCTTATG	GGCTACAGCATCG GCTAAA	98	PrimerQuest
Bos taurus heat shock 70kDa protein 1A	<i>HSPA1A</i>	NM_203322.2	ACCCGCAGAACAC GGTGTT	AGGCTTGTCTCCG TCGTTGA	118	PrimerQuest
Bos taurus heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1	<i>HSP90A A1</i>	NM_001012670.2	GTCCATACATCGGG CTTGTT	TACCTTTCCAGCG GCTTTAC	96	PrimerQuest
Bos taurus hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)	<i>HIF1A</i>	NM_174339.3	GAGGCTCACCATCA GCTATTT	GCAATTCATCTGT GCCTTCATT	91	PrimerQuest

Tabela 3. Característica dos *primers* endógenos delineados para as quantificações dos transcritos.

Genes endógenos	Símbolo do Gene	Número de acesso no GeneBank	Sequência primer senso (5' - 3')	Sequência primer anti-senso (5' - 3')	Tamanho do Amplicon	Referência
Bos taurus glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>GAPDH</i>	NM_001034034.2	GTCGGAGTGAAC GGATTTG	GATGGCCTTTCCATT GATGA	206	PrimerQuest
Bos taurus actin, beta	<i>ACTB</i>	NM_173979.3	GGATGAGGCTCA GAGCAAGAGA	TCGTCCCAGTTGGT GACGAT	77	BETTEGOWDA, 2006
Ribosomal protein L15	<i>RPL-15</i>	AY786141.1	TGGAGAGTATTGC GCCTTCTC	CACAAGTTCCACCAC ACTATTGG	64	BETTEGOWDA, 2006
Bos taurus histone H2A	<i>HISTONA 2</i>	AY835842.1	GAGGAGCTGAAC AAGCTGTTG	TTGTGGTGGCTCTCA GTCTTC	103	BETTEGOWDA, 2006
Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	<i>PPIA</i>	NM_178320.2	GCCATGGAGCGC TTTGG	CCACAGTCAGCAAT GGTGATCT	64	BETTEGOWDA, 2006

3.7.2 Reação Polimerase em Cadeia em Tempo Real (qPCR):

Foram executadas análises por qPCR para obtenção dos dados de expressão gênica, utilizando-se o equipamento StepOnePlus® Applied Biosystem (Life Technologies, Carlsbad, CA) utilizando como marcador fluorescente o SYBR® Green (Power SYBR® Green PCR Master Mix, número de catálogo: 4367659). Cada reação teve o volume total de 20µL (Tabela 4). Foi utilizado placas de 96 poços (MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate, número de catálogo: 4346907) e fitas adesivas transparentes para selá-las (MicroAmp® Optical Adhesive Film, número de catálogo: 4360954).

A condição de corrida do qPCR é caracterizada por: estágio de espera: 95°C por 10 minutos; 40 Ciclos: desnaturação, aumento de temperatura e separação da fita dupla (95°C por 15 segundos), anelamento, *primers* se ligam a sua região homóloga no cDNA (60°C por 1 minuto); curva de dissociação.

Tabela 4. Característica dos *primers* alvo delineados para as quantificações dos transcritos.

Concentração de Primer	Reagente					
	Power SyBr Green	Primer Senso	Primer Anti-Senso	Água	cDNA	Total
150nM	10	0,3	0,3	5,4	4,0	20
300nM	10	0,6	0,6	4,8	4,0	20
600nM	10	1,2	1,2	2,6	4,0	20

3.7.3 Validação

Para validação dos *primers* escolhidos, reações de qPCR com concentrações finais de cada reação de *primers* senso:anti-senso de 150:150nM, 300:300nM e 600:600nM de *primers* foram testadas em duplicata com um *pool* de cDNA contendo todas amostras. Para escolher a concentração dos *primers* a ser usada, os dados fornecidos pelo *software* do aparelho StepOnePlus foram analisados pelo *software* LinRegPCR (<http://www.genequantification.de/download.html#linregpcr>). A escolha

foi feita considerando a concentração de *primers* que gerou: (1) eficiência da reação mais próxima a 100%, dentro de um intervalo de 90 a 110%, (2) curva de dissociação com pico único de amplificação para reações com cDNA e sem picos para reações de controle negativo, sem cDNA e (3) a menor concentração limiar (Ct).

Após a escolha da concentração de *primers* para cada transcrito analisado, elaborou-se uma curva padrão. Foram feitas diluições seriadas do *pool* de cDNA, conforme a tabela 5, em duplicata, e a concentração de *primers* usada foi a escolhida de acordo com o resultado do teste de concentração.

Tabela 5. Volumes e descrição para preparação da curva padrão de cDNA de leucócitos de vacas Nelore (volumes em μ l).

Diluição	Solução de Origem	Volume da solução de origem	Volume de H ₂ O	Volume Final
1:20	1	1	19	20
1:40	1:20	10	10	20
1:80	1:40	10	10	20
1:160	1:80	10	10	20
1:320	1:160	10	10	20

Para aceitação da curva, valores de inclinação da curva padrão (*slope*), coeficiente de determinação (r^2) e eficiência, fornecidos pelo *software* do aparelho StepOnePlus foram analisados. Foram aceitas curvas com eficiência entre 90 e 110% e r^2 próximo de 1. Os *primers* validados foram: HSF1, HSPD1, HSPA1A, HIF1A, GAPDH, ACTB, RPL15, HISTONA 2 e PPIA.

3.7.4 Comparação

Após a validação dos *primers*, iniciaram-se as comparações quanto à abundância de cada transcrito para os 10 animais com os seus respectivos tratamentos térmicos (38°C, 40°C, 42°C), utilizando cDNA na diluição de 1:40 de cada animal em triplicata. Nesta etapa, os genes alvo que se obteve comparação

foram: HSPD1, HSPA1A, HSP90AA1 e HIF1A, e dos endógenos foram: ACTB, RPL-15, HISTONA H2 e PPIA (Tabela 6).

A fim de selecionar genes endógenos de referência, foi utilizado o aplicativo GeNorm Microsoft Excel. Este fornece a medida da estabilidade de expressão do gene (M) (VANDESOMPELE et al., 2002). Os genes *Beta Actin* (ACTB), *Ribosomal protein L 15* (RPL-15), *Histone 2*, *Cyclophilin A* (PPIA) foram convertidos para escala de expressão quantitativa utilizando o método delta-Ct e foram processados no geNorm. Estes genes foram classificados com base em valores de M, em que os genes com a expressão mais estável tinham os menores valores de M. Inicialmente os dados foram analisados no GeNorm utilizando todos os quatro genes e, posteriormente selecionou-se os três genes mais estáveis (ACTB, RPL15 e PPIA). A eficiência do qPCR e os valores de Cq (ciclo quantificação) foram determinados por amostra utilizando o Software LinRegPCR (V2014.2; <http://linregpcr.nl/>). A quantificação foi obtida depois da normalização dos valores de expressão de genes alvo (valores Cq) pela média geométrica dos valores de expressão dos endógenos ACTB, RPL15 e PPIA.

Tabela 6. Eficiência dos *primers* dos genes utilizados na comparação.

Gene	Eficiência do Primer (%)
HSPD1	1,996
HSPA1A	1,994
HSP90AA1	1,995
HIF1A	1,97
ACTB	2,006
RPL-15	1,944
HISTONA 2	1,928
PPIA	1,997

3.7.5 Sequenciamento de Produtos de PCR

Para sequenciamento da porção amplificada na reação, os produtos de PCR foram purificados utilizando QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen Laboratories). Os produtos de PCR foram quantificados por NanoVue (GE Life Sciences). As amostras foram diluídas e acrescidas das soluções dos respectivos *primers* e

encaminhadas para o Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo. As sequências dos resultados foram acessadas pelo *software* Chomas e testadas quanto a sua especificidade usando o *software* BLAST1. Confirmando definitivamente a identidade do produto de PCR.

4 Análise dos dados

Com o intuito de classificar os animais quanto ao gerenciamento de calor, foi feito uma regressão logística utilizando a temperatura vaginal como variável dependente e hora do dia como variável independente, com uma estrutura de medida repetida no tempo, fixando horários, para obtenção do coeficiente angular (β) de ganho de calor e perda de calor.

As variáveis meteorológicas foram analisadas pelo teste F e teste t de Student. A temperatura do ar, temperatura do globo negro e umidade relativa foram utilizadas como variáveis dependentes e o dia e o período como independentes, com o intuito de entender variações entre dias e períodos, bem como a interação dias e períodos. Para isso utilizou-se o procedimento GLM do *software* SAS 9.2, (SAS Inst., Inc., Cary, NC).

Foram estimados coeficientes de correlação simples (Pearson) entre as variáveis fisiológicas e meteorológicas, considerando correlação forte para valores maiores que 0,7, moderada entre 0,3 e 0,7 e fraca menores que 0,3.

As variáveis fisiológicas foram analisadas como medidas repetidas no tempo utilizando o animal como efeito aleatório e a data como bloco. As médias foram comparadas pelo teste F e teste t de Student. E o procedimento para comparações múltiplas o PDIFF pelo procedimento MIXED do *software* SAS 9.2 (SAS Inst., Inc., Cary, NC). Não se obteve efeito da interação período e gerenciamento de calor.

Para as análises de expressão gênica relativa foram realizadas análises de variância pelo procedimento MIXED do *software* SAS. Para os choques térmicos *in vitro* foram incluídos somente os efeitos fixos de tratamento (38°C, 40°C e 42°C), sem a interação tratamento e gerenciamento de calor. Para as análises de

expressão gênica em relação ao gerenciamento de calor foram incluídos efeitos fixos de tratamento (38°C e 40°C), considerou-se que para bovinos o tratamento térmico à 42°C não seria válido biologicamente para as comparações entre gerenciamentos, e a interação tratamento e gerenciamento. As médias foram comparadas pelo teste F e t de Student (PDIFF). Para essas análises também foi utilizado o teste F e teste t de Student.

Todos os testes foram realizados a 5% de probabilidade e os valores apresentados pelas médias e erro padrão da média. A estrutura utilizada na análise de medidas repetidas foi escolhida como base no menor valor do Critério de Informação de Akaike (AIC).

5 Resultados e discussão

5.1 Aspectos fisiológicos da termorregulação das vacas Nelore

5.1.1 Classificação dos animais quanto ao gerenciamento de calor

O ambiente térmico em termos de temperatura do ar (Tar), umidade relativa (UR) e temperatura do globo negro (TGN), durante os seis dias completos de mensuração contínua a cada 15 minutos, estão descritos na tabela 7 e figura 11. As maiores médias de temperatura do ar foram encontradas nos dias 1, 2 e 6, respectivamente. Já para temperatura do globo negro foram respectivamente nos dias 1, 6 e 5. Para umidade relativa as maiores médias encontradas foram respectivamente nos dias 2, 5 e 6. Titto et al. (1999) consideraram para as raças Marchigiana, Nelore e Simental condição de conforto as temperaturas do ar entre 22°C e 25°C e estresse de 28 a 35°C. Baeta & Souza (1997), consideram que a temperatura do ar de 10°C até 27°C e umidade relativa entre 60 e 70% são condições climáticas não estressantes para bovinos.

Tabela 7. Valores médios, máximos e mínimos das variáveis meteorológicas de seis dias de mensuração contínua da temperatura do ar, do globo negro e umidade relativa.

Dia	Temperatura do ar (°C)			Temperatura do globo negro (°C)			Umidade relativa (%)		
	Média	Máx.	Mín.	Média	Máx.	Mín.	Média	Máx.	Mín.
1	27,52	41,61	19,31	30,10	49,24	18,65	58,02	86,34	21,51
2	25,60	36,47	18,53	26,71	45,49	17,91	65,95	92,75	34,06
3	22,25	34,20	15,7	24,67	42,50	15,24	61,87	86,73	29,38
4	22,77	35,93	13,28	25,52	50,92	12,89	61,61	87,12	29,32
5	24,18	39,8	15,50	26,85	51,88	15,10	63,51	86,95	30,55
6	25,04	39,17	17,46	27,39	52,13	17,15	61,93	79,86	32,41

Segundo Kelly e Bond (1971), a utilização da temperatura do globo negro é um bom indicativo dos efeitos combinados de temperatura do ar, temperatura radiante e velocidade do vento, como também fornece uma medida indireta do calor radiante em graus Celsius (BACCARI JUNIOR, 1998). Como os animais ficavam a pasto sob a influência da radiação solar direta, um dos critérios utilizados para selecionar os dias mais estressantes foi a temperatura do globo negro. Outro critério, foi que os dias fossem semelhantes quanto aos valores de temperatura do ar e umidade relativa. Portanto, para análise das temperaturas vaginais escolheu-se os dias 5 e 6, como sendo os que representassem condições mais estressantes e similares.

Figura 11. Gráfico da representação das variáveis meteorológicas durante os seis dias de mensuração contínua.

¹Tar- temperatura do ar, ²TGN- temperatura do globo negro, ³UR- umidade relativa.

*Início do dia 5. **Início do dia 6.

Observou-se as maiores médias de temperatura do ar e globo negro para o período de ganho de calor e os menores valores para o período de perda de calor, como esperado devido às alterações provocadas pelo efeito diurno (Tabela 8).

Tabela 8. Média, máximo e mínimo dos dados meteorológicas para os dias e períodos escolhidos.

Dia 5		Tar ¹ (°C)	UR ² (%)	TGN ³ (°C)
12h00min 19h00min	Média	33,67	41,55	41,82
	Máximo	39,8	54,44	51,93
	Mínimo	28,05	30,55	27,93
Dia 5/6				
19h00min 07h00min	Média	20,48	70,8	20,09
	Máximo	28,6	79,86	27,92
	Mínimo	17,46	49,98	17,15

¹ Temperatura do ar, ² Umidade Relativa, ³ Temperatura de Globo Negro.

A análise da temperatura corporal pode ser realizada de diferentes maneiras, uma prática que vem ganhando relevância é o monitoramento contínuo por dispositivos. A vantagem deste sistema é a observação da dinâmica das respostas termorregulatórias quanto às mudanças da carga térmica imposta. Os métodos mais comuns utilizados são a mensuração da temperatura timpânica (HAHN et al., 1990), retal (REUTER et al., 2010), vaginal (BURDICK et al., 2012), subdérmico (HAHN et al., 1990) e intrarruminal (ALZAHAL et al., 2011). Para Hillman et al. (2009), a medida da temperatura vaginal se assemelha a retal com variação de $0.06 \pm 0.015^{\circ}\text{C}$. Burdick et al., (2012) relatam que a temperatura vaginal apresenta alta correlação ($r=0,92$) com temperatura retal.

Hahn (1999), descreve que o ritmo diurno da temperatura corporal é monofásico com máximo ao final da tarde e mínimo pela manhã como observado nas figuras 12 e 13, sendo constante e cíclico. O mesmo autor destaca que as variações da temperatura corporal dependem do animal e são ditadas pelas condições ambientais podendo alterar o ritmo, aumentar as médias e a amplitude. Preferiu-se, portanto, escolher não só o dia mais estressante mais que os dias fossem semelhantes quanto ao ambiente térmico. Notou-se também que dentro dos períodos selecionados houve uma variação dependente do grupo em que o animal estava.

A mensuração contínua da temperatura vaginal nos dias escolhidos evidenciou um incremento calórico no período escolhido de 12h00min às 19h00min e redução gradativa das 19h00min às 7h00min do dia seguinte. Para melhor compreender a dinâmica de temperatura corporal designou-se por regressão um coeficiente angular para ganho e perda de calor. Os valores máximos, mínimos e os coeficientes angulares para o ganho de calor (β_1) e para perda de calor (β_2) da temperatura vaginal no período selecionado estão representados na tabela 9. Nesta tabela, os animais estão em ordem decrescente de β_2 , sendo os oito primeiros classificados como eficientes (E) e ou demais não eficientes (NE). Segundo Bligh (1998), em ambientes quentes uma das características essenciais para os animais manterem a homeotermia é a eficiência em perder calor. Dessa forma, escolheu-se como principal critério para classificar os animais a dissipação do calor. A variação da temperatura vaginal nos períodos escolhidos está representada nas figuras 12, para as vacas E, e na figura 13 para as NE, nas mesmas condições ambientais.

Pode-se observar que a temperatura vaginal atingiu seu pico nos dois grupos por volta das 16 horas. O que está de acordo com o encontrado por Brown-Brandl et al. (2003). Nota-se também que o perfil de variação para ganho de calor entre os dois grupos é semelhante, diferindo nos perfis de variação para perda de calor, com maior amplitude de variação para as vacas NE e menor inclinação das retas sugerindo menor velocidade de perda de calor. Dessa forma, a metodologia utilizada conseguiu distinguir as vacas quanto ao perfil de variação da temperatura vaginal e assim classificá-las quanto ao gerenciamento de calor.

Finch (1985), destaca que o ciclo diário da temperatura retal altera conforme o metabolismo energético e de água e está relacionado com a capacidade adaptativa. O mesmo autor afirma que bovinos que controlam sua temperatura dentro de uma faixa estreita dentro do ciclo diário são mais produtivos que aqueles que têm uma ampla variação no ciclo diário. Mesmo as pequenas mudanças na temperatura corporal causam efeitos nas funções neuroendócrinas e teciduais podendo reduzir a fertilidade, crescimento e lactação (FINCH, 1985).

Tabela 9. Valores máximos, mínimos e os coeficientes angulares para o ganho de calor (β_1) e perda de calor (β_2) para temperatura vaginal de fêmeas Nelore nos dias 5 e manhã do dia 6.

Animal	Tvag ¹ Mín	Tvag ¹ Máx	β_1	Tvag ¹ Máx	Tvag ¹ Mín	β_2	Classificação
A	38,34	39,2	0,06	38,78	37,7	0,08	E
B	38,25	39,4	0,09	38,84	37,92	0,07	E
C	38,09	39,6	0,09	38,7	37,56	0,06	E
D	38,31	39,2	0,06	38,78	37,84	0,06	E
E	38,12	39,06	0,11	38,78	37,98	0,05	E
F	38,06	39,03	0,10	38,67	37,78	0,04	E
G	38,2	39,37	0,10	38,81	38,12	0,04	E
H	38,34	38,98	0,08	38,95	38,36	0,04	E
I	37,95	39,32	0,07	38,64	37,97	0,03	NE
J	38,03	38,92	0,10	38,78	38,23	0,03	NE
K	38,45	39,26	0,06	38,76	38,14	0,03	NE
L	38,42	38,89	0,04	38,81	38,28	0,03	NE
M	38,17	39,12	0,08	38,76	38,14	0,03	NE
N	38,2	39,38	0,13	39,72	38,14	0,02	NE
O	38,23	39,49	0,08	38,64	38,03	0,02	NE
P	38,31	39,23	0,07	39,12	38,14	0,01	NE

¹Temperatura vaginal mínima, ²Temperatura vaginal Máxima, ³Coeficiente angular de ganho de calor, ⁴Coeficiente angular de perda de calor

E – vacas eficientes, NE – vacas não eficientes.

Figura 12. Gráfico da temperatura vaginal durante o ganho e perda de calor das vacas Nelore eficientes (E).

¹ Temperatura do ar, ² Temperatura do globo negro

Figura 13. Gráfico da temperatura vaginal durante o ganho e perda de calor das vacas Nelore não eficientes (NE).

¹ Temperatura do ar, ² Temperatura do globo negro

5.1.2 Variáveis fisiológicas complementares

Observou-se que os dias 2 e 3 não apresentaram diferenças entre médias para temperatura do ar e umidade relativa (Tabela10). Quando se analisa temperatura do globo negro, notou-se diferença significativa entre todos os dias ($P<0,05$), sendo maior para os dias 3 e 4, correspondente aos dias escolhidos.

Tabela 10. Médias seguidas de erro padrão médio das variáveis meteorológicas para os quatro dias de colheitas.

Variável	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	EPM
Temperatura do ar (°C)	25,14 ^c	26,26 ^b	26,53 ^b	28,62 ^a	0,27
Temperatura do globo negro (°C)	24,54 ^d	25,47 ^c	26,09 ^b	26,78 ^a	0,2
Umidade relativa (%)	57,02 ^a	58,43 ^a	58,85 ^a	54,03 ^b	0,8

Letras minúsculas iguais na linha para cada variável não diferem entre si pelo teste t ($P>0,05$).

A temperatura do ar, do globo negro e umidade relativa foram menores pela manhã em relação à tarde ($P<0,01$) (Tabela11). A influência exercida pelo ambiente térmico nas respostas fisiológicas deve ser avaliada considerando as mudanças referentes ao aquecimento do período diurno, e resfriamento promovido pelo período noturno como constatado por West, Mullinix e Bernard (2003). Tendo isso em vista, o período da manhã apresentaria uma condição mais amena em que os animais provavelmente perderiam calor para o meio, e o inverso aconteceria no período da tarde em que as condições ambientais favoreceriam o ganho de calor.

Tabela 11. Médias seguidas de erro padrão médio das variáveis meteorológicas para os períodos da manhã e da tarde.

Variável	Manhã	Tarde	<i>P-valor</i>	EPM
Temperatura do ar (°C)	22,38	30,9	$P<0,01$	0,19
Temperatura do globo negro (°C)	19,6	31,85	$P<0,01$	0,57
Umidade relativa (%)	66,73	47,43	$P<0,01$	0,14

Ao analisar a interação dia e período, notou-se que não houve diferença significativa para temperatura do ar nas manhãs dos dias 1 e 2 e nas tardes dos dias 2 e 3 ($P>0,05$) (Tabela 12). Nos demais dias e períodos encontrou-se diferença significativa entre as médias ($P<0,01$). Para temperatura do globo negro não houve diferença nas médias das manhãs dos dias 1 e 2 e das tardes nos dias 2 e 4, e 3 e 4 ($P>0,05$). Assim sendo, pode-se evidenciar similaridade entre as temperaturas dos globos nos dias escolhidos para classificar os animais. Já para umidade relativa não houve diferença entre as médias das manhãs nos dias 1 e 4, e as tardes nos dias 1 e 3, e 2 e 4 ($P>0,05$). A descrição das variáveis meteorológicas nos permite entender possíveis alterações nas variáveis fisiológicas devido à mudanças dentro dos dias e entre os dias, conforme Brown-Brandl et al. (2003).

Tabela 12. Médias seguidas de erro padrão médio das variáveis meteorológicas para a interação dia e período.

	Dia 1		Dia 2		Dia 3		Dia 4		
Variável	Manhã	Tarde	Manhã	Tarde	Manhã	Tarde	Manhã	Tarde	EPM
Tar (°C)¹	20,79 ^f	29,49 ^c	20,44 ^f	32,09 ^a	21,97 ^e	31,08 ^{ab}	26,33 ^d	30,91 ^b	0,38
TGN (°C)²	18,24 ^f	30,84 ^c	18,22 ^f	32,73 ^a	20,38 ^e	31,82 ^b	21,55 ^d	32,01 ^{ab}	1,13
UR (%)³	64,56 ^c	49,48 ^d	72,02 ^a	44,84 ^e	67,9 ^b	48,8 ^d	62,46 ^c	45,6 ^e	0,29

Letras minúsculas iguais na linha para cada variável não diferem entre si pelo teste t ($P>0,05$). ¹ Tar - temperatura do ar, ² TGN - temperatura do globo negro, ³ UR - umidade relativa.

A média de temperatura retal encontrou-se valor dentro da normalidade fisiológica como proposto por Kolb (1987), 38,5 a 39,3°C (Tabela 13). A temperatura vaginal apresentou média um pouco acima do observado para temperatura retal, mas como medida da temperatura profunda também se encontrou dentro da normalidade fisiológica proposta por Kolb (1987). Podendo ser uma medida mais fidedigna em relação a temperatura retal pois o dispositivo de medida está localizado mais internamente.

Tabela 13. Médias, máximos e mínimos das variáveis fisiológicas de vacas Nelore para os dias de colheitas pontuais dos dados fisiológicos.

Variável	Média	Mínimo	Máximo
Temperatura retal (°C)	38,31	36,05	39,89
Temperatura vaginal (°C)	38,7	37	39,6
Temperatura caudal (°C)	33	24,5	39,4
Temperatura ocular(°C)	33,46	28,4	36,4
Frequência respiratória (m.r.m.)	34,32	20	60
Schleger e Turner (g. m⁻². h⁻¹)	462,65	136,82	1088

As médias temperaturas superficiais, caudal e ocular, estavam 5,31°C e 4,85°C menores que a temperatura profunda. Esta diferença é explicada por Silva (2000) que relatou diferenças na temperatura de diferentes tecidos devido à sua atividade metabólica, não sendo homogênea em todo o corpo. Outra explicação é que quanto mais externa é a região em relação ao corpo do animal maior a influência do ambiente térmico.

A média de frequência respiratória mostrou-se dentro da normalidade que é de 24 - 50 movimentos respiratórios por minuto como proposto por Swenson e Reece (1996). Mcmanus et al. (2014) encontraram médias de 22,55 à sombra e 23,91 para animais Zebu ao sol.

O valor médio de taxa de sudação pelo método de Schleger & Turner foi de 462,65 g.m⁻².h⁻¹ bem superior ao encontrado por Barbosa et al. (2014) para Nelore branco e Nelore vermelho, 259,8 e 228,7 g.m⁻².h⁻¹. Em pesquisa realizada por McManus et al. (2009), a taxa de sudação variou de 224,61 g.m⁻².h⁻¹ para Nelore e 258,61 g.m⁻².h⁻¹ para Nelore mocho. Schleger e Turner (1965) encontrou taxa de sudação para novilhos Hereford x Shorthorn de 488 g.m⁻².h⁻¹ e Brahman x Shorthorn de 500 g.m⁻².h⁻¹ no verão australiano, valores altos e ótimos para regiões tropicais. O mesmo foi observado para raça Braford no Mato Grosso do Sul em estudo de Bertipaglia et al. (2008) que obteve média de 493,59 g.m⁻².h⁻¹. Silva (2000) afirma que a taxa de sudação aumenta com o aumento de temperatura e que os zebuínos são muito eficientes utilizando a sudação. Cheung e Mclellan (1998) afirmam que características comuns para a aclimação ao calor são a elevação da capacidade de perder calor por mecanismos evaporativos e a redução da temperatura corporal.

Tabela 14. Coeficientes de correlação de Pearson entre variáveis fisiológicas e meteorológicas.

	TR	Tvag	Tcau	Tocu	FR	S&T	Tar	Tgn	UR
TR ¹	-	0,63	0,63	0,56	0,35	0,22	0,71	0,70	-0,64
Tvag ²	0,63	-	0,45	0,50	0,29	0,38	0,62	0,59	-0,55
Tcau ³	0,63	0,45	-	0,56	0,38	0,24	0,77	0,81	-0,78
Tocu ⁴	0,56	0,50	0,56	-	0,45	0,26	0,87	0,81	-0,81
FR ⁵	0,35	0,29	0,38	0,32	-	0,27	0,46	0,49	-0,41
S&T ⁶	0,22	0,38	0,24	0,20	0,27	-	0,32	0,38	-0,32
Tar ⁷	0,71	0,62	0,77	0,64	0,46	0,32	-	0,95	-0,95
Tgn ⁸	0,70	0,59	0,81	0,66	0,49	0,38	0,95	-	-0,93
UR ⁹	-0,64	-0,55	-0,78	-0,61	-0,41	-0,32	-0,95	-0,93	-

*não significativo ($P > 0,05$)

¹Temperatura retal (°C), ²Temperatura vaginal (°C), ³Temperatura caudal (°C), ⁴Temperatura ocular (°C), ⁵Frequência respiratória (m.r.m.), ⁶Schleger & Turner (g. m⁻². h⁻¹), ⁷Temperatura do ar (°C), ⁸Temperatura do globo negro (°C), ⁹Umidade relativa (%).

A temperatura retal mostrou correlação moderada e positiva ($P < 0,0001$) com temperatura vaginal e temperatura caudal ($r = 0,63$), temperatura ocular ($r = 0,56$) e frequência respiratória ($r = 0,35$) (Tabela 14). Fraca e positiva ($P < 0,0049$) com Schleger & Turner ($r = 0,22$). Com as variáveis meteorológicas, alta e positiva ($P < 0,0001$) com temperatura do ar ($r = 0,71$) e temperatura do globo negro ($r = 0,7$), e moderada e negativa ($P < 0,0001$) para umidade relativa ($r = -0,64$).

Observou-se correlações moderadas entre temperatura retal e vaginal, caudal e ocular indicando que o aumento de temperatura retal esteve moderadamente associado com o aumento da temperatura em outros pontos anatômicos.

Todas as temperaturas corporais estudadas foram positivamente associadas à frequência respiratória, indicando que o aumento da temperatura corporal está associada à polipnéia térmica pela necessidade de perder calor mais eficientemente por vias evaporativas.

As correlações entre temperatura vaginal e caudal, vaginal e ocular, caudal e ocular foram próximas entre si, o que indica que como o aumento da temperatura em diferentes partes anatômicas levaria o aumento em outras partes em diferentes

magnitudes. Tais diferenças se devem a relação do corpo com o ambiente e a taxa metabólica dos diferentes tecidos (SILVA, 2000).

A temperatura do ar apresentou correlações fortes ou moderadas positivas ($P < 0,0001$) para todas as variáveis fisiológicas. Destaca-se a correlação forte da temperatura do ar e temperatura ocular ($r = 0,87$), indicando que com a elevação da temperatura do ar rapidamente levaria o incremento da temperatura ocular. Segundo Church, Cook e Schaefer (2009) quando o animal está sob estresse ocorreria a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal com posterior aumento de catecolaminas e dos níveis de cortisol bem como alterações no fluxo sanguíneo, o que promoveria mudanças na produção de calor, o que pode ser avaliado pela termografia ocular.

A temperatura do globo negro também apresentou correlações fortes ou moderadas positivas ($P < 0,0001$) para todas as variáveis fisiológicas. Já a umidade relativa apresentou correlações fortes ou moderadas negativas ($P < 0,0001$) para todas as variáveis fisiológicas.

A temperatura retal, vaginal, caudal, ocular, frequência respiratória e Schleger & Turner foram menores de manhã em relação à tarde (Tabela 15). Houve aumento do incremento calórico pelas características ambientais inerentes ao período.

Tabela 15. Médias seguidas de erro padrão médio das variáveis fisiológicas de vacas Nelore para período e tipo de gerenciamento, sem o efeito da interação.

Variável	Período			Gerenciamento			Interação	
	Manhã	Tarde	P-valor	Eficiente	Não eficiente	P-valor	EPM	P-valor
TR ¹	37,28	38,32	<0,0001	37,65	37,95	0,0013	0,12	0,1818*
Tvag ²	38,42	38,83	<0,0001	38,58	38,67	0,0827*	0,06	0,2086*
Tcau ³	29,53	34,59	<0,0001	31,78	32,35	0,1269*	0,46	0,7298*
Tocu ⁴	30,91	34,1	<0,0001	32,56	32,45	0,5030*	0,18	0,3391*
FR ⁵	29,51	37,57	<0,0001	33,76	33,32	0,7225*	1,05	0,8790*
ST ⁶	441,47	567,35	<0,0001	528,73	480,08	0,0554	30,53	0,3937*

¹Temperatura retal (°C), ²Temperatura vaginal (°C), ³Temperatura caudal (°C), ⁴Temperatura ocular (°C), ⁵Frequência respiratória (m.r.m.), ⁶Schleger & Turner (g. m⁻². h⁻¹). *não significativo ($P > 0,05$).

Quando analisado o gerenciamento de calor, houve diferença significativa entre as médias de temperatura retal ($P < 0,01$), e tendência para Schleger & Turner ($P < 0,06$). Observou-se numericamente que as vacas classificadas como eficientes detiveram menor temperatura retal, vaginal, caudal, e maior temperatura ocular, frequência respiratória e taxa de sudação. O contrário é observado nas vacas classificadas como não eficientes. Com exceção para temperatura ocular.

As características observadas nas vacas eficientes refletem maior capacidade de manutenção da temperatura corporal provavelmente pela elevada capacidade de perder calor pela sudação, quando comparadas às vacas não eficientes. Jessen (2001) afirma que tanto a sudação quanto o ofego são relevantes para a homeotermia, embora variável entre espécies. O mesmo foi constatado por Pereira et al. (2014) que verificaram diferenças entre raças de *Bos taurus taurus* em perder calor por evaporação. Em ambos os grupos deste estudo, a frequência respiratória estava dentro da normalidade proposta por Swenson e Reece (1996). Por outro lado, a taxa de sudação esteve acima dos valores encontrados por Schleger e Turner (1965) (Brahman $\times$ Shorthorn - $500 \text{ g.m}^{-2}\text{h}^{-1}$ no verão australiano). Assim, presume-se que a elevada habilidade em perder calor está dependente da habilidade em suar (Schmidt-Nielsen, 1995). A maior temperatura ocular nas vacas eficientes pode estar relacionada à atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal como sugerido por Church, Cook e Schaefer (2009), mas ainda é necessário maiores evidências para esta comprovação.

As vacas classificadas como não eficientes também utilizam os mecanismos evaporativos para perderem calor. Entretanto, supostamente elas recorrem aos mecanismos de perda de calor sensível por mais tempo, com o aumento da temperatura profunda e periférica, mobilizando com menor intensidade a sudação.

Finch (1985) ressalta que a temperatura corporal é uma característica hereditária e a seleção dentro de raças para características de termorregulação, tais como taxas de sudação eficientes e baixa resistência em perder calor, seria uma boa estratégia para o melhoramento em regiões tropicais.

5.2 Aspectos celulares da termotolerância

Observou-se que houve diferença significativa entre a abundância dos transcritos das proteínas de choque térmico entre os tratamentos 38°C e 40°C com 42°C (Tabela 16). Entretanto, não houve aumento da expressão gênica de HSPA1A e HSP90AA1 com o aumento programado da temperatura *in vitro*. Para a proteína de peso molecular 60kDa (HSPD1), observou-se numericamente ligeiro aumento a 40°C. Esperava-se que ao nível celular o estresse térmico aumentasse a desnaturação e desagregação proteica, comprometesse os componentes do citoesqueleto, a permeabilidade de membranas e a inibição da síntese proteica (SONNA et al., 2002) e por consequência houvesse a maior necessidade de síntese de proteínas de choque térmico para estabilizar tais desarranjos. Portanto, os dados não corroboram os de Mishra et al. (2011) que observaram aumento de HSP70 em linfócitos de búfalo com o estresse térmico. Também não corroboram os do trabalho de Agnew; Colditz (2008) com bovinos e ovinos, e os referidos por Kishore et al. (2013) em *Bos taurus indicus*, *Bos taurus taurus* e *Bubalus bubalis* e em diferentes raças como evidenciado por Bañuelos-Valenzuela e Sánchez-Rodríguez (2005).

Tabela 16. Médias seguidas de erro padrão médio da expressão gênica relativa em leucócitos de HSPA1A, HSPD1, HSP90AA1 E HIF1A para tratamentos.

Gene	Tratamento			P-valor	EPM
	38°C	40°C	42°C		
HSPA1A	1,30 ^a	1,28 ^a	0,84 ^b	<0,0001	0,02
HSPD1	1,19 ^a	1,20 ^a	0,93 ^b	<0,0001	0,02
HSP90AA1	1,02 ^a	0,98 ^a	0,78 ^b	<0,0001	0,0018
HIF1A	1,18 ^a	1,15 ^a	1,14 ^a	0,4603	0,02

Letras minúsculas iguais na linha para cada variável não diferem entre si pelo teste t (P>0,05).

Nas condições experimentais deste estudo, os resultados sugerem que o choque térmico não estimulou a maior expressão das proteínas de choque térmico, havendo parcial manutenção da abundância de transcritos entre os tratamentos 38°C e 40°C. Entretanto, nota-se substancial declínio na abundância de RNAm no choque térmico a 42°C. Neste estudo o fator tempo de exposição não foi levado em consideração, porém presume-se que o choque agudo a 42°C gerou uma

instabilidade proteica que inviabilizou a transcrição. Agnew e Colditz (2008) verificaram que há uma redução na expressão de HSP70 por interferência da intensidade da temperatura, já Kishore et al. (2013) verificaram redução da expressão pela interferência do tempo em tratamento térmico. Entretanto, a relação temperatura e tempo é contraditória, Lepock (2005) afirma que a resposta celular ao estresse está relacionada com a quantidade de proteínas desnaturadas e agregadas pelo efeito do estresse térmico e não em relação ao tempo em determinada temperatura.

O ranking de genes de maior abundância de transcritos para os de menor seguiu a seguinte ordem: HSPA1A> HSPD1> HSP90AA1 nos tratamentos à 38°C e 40°C, com valores de 1,30; 1,19; 1,02 e 1,28; 1,20; 0,98, respectivamente (Figura 14). À 42°C a sequência decrescente foi HSPD1> HSPA1A> HSP90AA1. A HSPA1A é conhecida por ser a chaperona altamente induzida com a função de estabilizar a conformação nativa de proteínas e manter a sobrevivência celular quando em estresse térmico. Baraja-Vásquez et al. (2005), testaram a importância da HSPD1 (HSP60) no transporte proteico bidirecional através da mitocôndria e citoplasma e que em estresse a função mitocondrial estaria mais ativa aumentando a expressão de HSP60, que foi observado no tratamento a 40°C. A HSP90AA1 geralmente funciona como co-chaperona da HSPAA1 em um complexo para reestruturar a conformação de proteínas. A baixa expressão gênica relativa observada para HSP90AA1 deve-se ao fato desta não estar especificamente envolvida no mecanismo de proteção celular ressaltando a expressão de HSPA1A (KIANG; TSOKOS, 1998). Geraldo (2013), supõe que a HSP90AA1 é uma proteína mais eficiente na identificação da existência ou não de estresses térmicos, porém não será tão discriminatória em relação a intensidade do estresse quanto à HSPA1A.

Para o gene HIF1A, observou-se que a abundância de transcritos com o aumento programado da temperatura *in vitro* foi de 1,18, 1,15 e 1,14, e para gerenciamentos 1,17 e 1,14, mas sem diferença significativa entre médias ($P>0,05$). O fator induzido por hipóxia 1α , é a subunidade sensível ao oxigênio sendo um regulador transcricional da homeostase do oxigênio. Katschinski et al. (2002), descreveram que a HSP90 pode se ligar ao HIF1A, entretanto pouco se conhece a respeito da ativação de proteínas de choque térmico quando em estresse na atividade de HIF1A. Eles reportam que a HSP90 tem papel estabilizador da função

de HIF1A em diferentes variações do ambiente celular, pressão parcial de oxigênio e temperatura. Esperava-se que com o aumento programado da temperatura *in vitro* elevaria o consumo de oxigênio e consequentemente aumentaria a abundância de transcritos de HIF1A, como foi constatado por Katschinski et al. (2002). Entretanto, neste estudo isto não foi constatado. Resultados semelhantes ao observados por Sakatani et al. (2013), que após tratamento térmico de embriões bovinos em estágio de mórula não encontraram efeito do choque térmico na expressão de HIF1A, somente a redução da expressão de HIF3A.

Figura 14. Gráfico da expressão gênica relativa dos genes alvos nos diferentes tratamentos térmicos. *Médias do gene não diferem entre tratamentos térmicos ($P>0,05$).

Ao analisar as médias de expressão gênica considerando a classificação das vacas quanto ao gerenciamento de calor foi considerado que biologicamente o tratamento térmico a 42 °C não poderia ser incluído nas comparações, pois esta condição não ocorreria ao nível celular *in vivo*. Numericamente, as vacas eficientes apresentaram maior expressão gênica relativa para as proteínas de choque térmico analisadas (Tabela 17). O ranking de genes de maior abundância de transcritos para os de menor seguiu a seguinte ordem: HSPA1A > HSPD1 > HSP90AA1 (Figura 15). Abundância de transcritos está relacionada a função dessas proteínas, como previamente descrito.

Tabela 17. Médias seguidas de erro padrão médio da expressão gênica relativa em leucócitos de HSPA1A, HSPD1, HSP90AA1 e HIF1A para gerenciamentos.

Gene	Gerenciamentos			Interação	
	Eficiente	Não Eficiente	<i>P</i> -valor	EPM	<i>P</i> -valor
HSPA1A	1,32	1,26	0,1635	0,02	0,7932
HSPD1	1,21	1,18	0,3260	0,02	0,1290
HSP90AA1	1,01	1,00	0,7515	0,018	0,6482
HIF1A	1,18	1,14	0,2294	0,02	0,1473

Ao interpretar estes resultados, acredita-se que a diferença de expressão gênica relativa entre gerenciamentos possivelmente é explicada pelas respostas termorregulatórias desses animais que influenciaram a resposta celular *in vitro*.

Figura 15. Gráfico da expressão gênica relativa dos genes alvos para diferentes gerenciamentos de calor.

Presume-se que as vacas eficientes consigam gerenciar o ganho e a perda de calor por mecanismos fisiológicos e comportamentais, e portanto, os efeitos deletérios do estresse de calor são menores ao nível celular não precisando recrutar mecanismos de proteção pela produção de proteínas de choque térmico. Dessa forma, as vacas eficientes possuem um *pool* reduzido de proteínas de choque

térmico. Entretanto, quando em tratamento térmico agudo e subletal *in vitro*, ocorria um *feed-back* positivo para síntese de proteínas por meio da dissociação do complexo *heat shock protein* - *heat shock factor* (HSP-HSF). Os HSFs em trímeros fosforilados prosseguem ao núcleo para que junto aos *heat shock elements* promovam a transcrição, elevando a quantidade de transcritos. Por isso, foi observada uma maior quantidade de transcritos nestes animais (Figura 16).

Figura 16. Esquema da dinâmica termorregulação e termotolerância. A vaca A, com maior habilidade em perder calor, acumularia um *pool* menor de proteínas de choque térmico (HSPs) e a nível celular não é tão influenciada pelos efeitos deletérios do estresse térmico, entretanto quando em choque térmico *in vitro* necessitaria elevar a abundância de transcritos para produzir mais HSPs. A vaca B, com menor habilidade em perder calor, acumularia um *pool* maior de HSPs para contornar os efeitos deletérios do estresse térmico. Por outro lado, *in vitro*, não precisaria elevar a abundância de transcritos.

Fonte: Própria autoria

Por outro lado, o gerenciamento da homeotermia nas vacas não eficientes não é suficiente somente com mecanismos fisiológicos e comportamentais, necessitando recrutar mecanismos citoprotetores. Dessa forma, estas vacas detêm um *pool* maior de proteínas de choque térmico, o que exerce um menor efeito de *feed-back* positivo na produção das proteínas de choque térmico quando as células são expostas ao choque térmico agudo e sub-letal, e por consequência estas apresentaram menor abundância de transcritos. Para conclusão dessas pressuposições, seria necessário aliar os dados da expressão gênica relativa com a quantificação proteica.

Para Moseley (1997), a aclimação não somente reduz a temperatura corporal por aumentar o fluxo de calor para a pele e a capacidade de dissipar calor, como também permite ao organismo tolerar elevadas temperaturas. Dessa forma, a aclimação ao calor permitiria ao animal produzir em condições estressantes por estar em equilíbrio térmico por mecanismos fisiológicos da termorregulação. De acordo com o mesmo autor, as HSPs estão relacionadas à adaptação do organismo ao calor além da termotolerância. Há inferências a respeito das diferenças interespecies nos padrões de acumulação de HSPs associadas com a habitação em climas quentes. É o que relata Ulmasov et al. (1992), que lagartos que vivem em diferentes regiões detêm diferentes quantidades de HSP70, sendo que quanto maior a temperatura do nicho ecológico maior a quantidade de HSP70 constitutiva, sem condição de estresse. Tal informação não pode ser extrapolada aos endotérmicos mas nos permite entender que o acúmulo de HSP está relacionado a uma característica de adaptação. O mesmo foi descrito em formigas (*Cataglyphis bombycina*) que habitam o deserto do Saara (GEHRING; WEHNER, 1995) e com humanos que moravam na Ásia e outros que moravam na Europa (LYASHKO et al., 1994). Assim sendo, Moseley (1997) afirma a importância das HSPs na termotolerância e os diferentes acúmulos de HSPs em animais adaptados à ambientes quentes sugerem um possível papel das HSPs na aclimação.

Neste experimento supõe-se que a cadeia de sinalização intracelular para síntese de proteínas de choque térmico (Figura 3) foi influenciada pela quantidade pré-existente de HSPs, estimulando ou não a “de novo” HSPs sínteses. O caminho para compreensão das respostas envolvendo termorregulação e termotolerância ainda é longo, e exige a necessidade de entender as vias de sinalização celular quanto à transcrição e tradução de proteínas de choque térmico, seja *in vitro* com maior controle da condição a ser testada ou *in vivo* diante do controle orgânico do animal, buscando assim compreender quais os mecanismos fisiológicos e celulares envolvidos no gerenciamento de calor e como essa dinâmica está relacionada com a produção animal.

6 Conclusões

Vacas Nelore com diferentes gerenciamentos de calor apresentam respostas termorregulatórias diferentes.

Para os leucócitos das vacas Nelore em uma situação *in vitro*, houve manutenção da abundância de transcritos das proteínas de choque térmico HSPA1A, HSPD1 e HSP90AA1 nos tratamentos térmicos 38°C e 40°C, e substancial declínio à 42°C. A abundância de transcritos após tratamento térmico para as proteínas de choque térmico foi decrescente, na ordem de HSPA1A, HSPD1 e HSP90AA1. Indicando a HSPA1A (HSP70) como marcador molecular para termotolerância, por ser a mais sensível à temperatura e mais bem conservada.

Ao nível celular não foi observado diferença nas expressões gênicas relativas das proteínas de choque térmico entre os animais classificados quanto ao gerenciamento de calor.

Referências

- AGNEW, L. L.; COLDITZ, I. G. Development of a method of measuring cellular stress in cattle and sheep. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 123, n. 3-4, p. 197–204, 2008.
- ALZAHAL, O. et al. The use of a radiotelemetric ruminal bolus to detect body temperature changes in lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 7, p. 3568–74, 2011.
- BACCARI JUNIOR, F. Adaptação de sistemas de manejo na produção de leite em climas quentes. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AMBIÊNCIA NA PRODUÇÃO DE LEITE, Piracicaba, 1998. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, p.24-67, 1998.
- BAÊTA, F.C.; SOUZA, C.F. **Ambiência em edificações rurais - conforto animal**. Viçosa: UFV, 1997, 246p.
- BAÑUELOS-VALENZUELA, R.; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, S. H. La proteína de estrés calórico Hsp70 funciona como un indicador de adaptación de los bovinos a las zonas áridas. **Revista Electrónica de Veterinaria REDVET**, v. 6, p. 1–18, 2005.
- BARAJA-VÁSQUEZ, G. E. et al. Las proteínas de estrés calórico Hsp60, 70 y 90 participan en la adaptación de los caprinos a las zonas áridas. **Revista Electrónica de Veterinaria REDVET**, v. 6, n. 3, 2005.
- BARBOSA, B. R. P. et al. Tolerância ao calor em bovinos das raças Nelore branco, Nelore vermelho e Pantaneira. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 15, n. 4, p. 854–865, 2014.
- BERNABUCCI, U. et al. Metabolic and hormonal acclimation to heat stress in domesticated ruminants. **Animal**, v. 4, p. 1167–1183, 2010.
- BERTIPAGLIA, E. C. A. et al. Desempenho reprodutivo, características do pelame e taxa de sudação em vacas da raça Braford. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 9, p. 1573–1583, 2008.
- BLAST1. Disponível em: <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em 20 de junho de 2015.

BLIGH, J. Mammalian homeothermy: an integrative thesis. **Journal of Thermal Biology**, v. 23, n. 3-4, p. 143–258, 1998.

BOHEN, S. P.; YAMAMOTO, K. R. Modulation of Steroid Receptor Signal Transduction by Heat Shock Proteins. In: **The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones**. v. 26, p. 313–334.

BROOM, D. M. Indicators of poor welfare. **The British Veterinary Journal**, v. 142, p. 524–526, 1986.

BROWN-BRANDL, T. et al. Thermoregulatory responses of feeder cattle **Journal of Thermal Biology**, v. 28, n. October 2002, p. 149–157, 2003.

BROWN-BRANDL, T. M. et al. Analyses of thermoregulatory responses of feeder cattle exposed to simulated heat waves. **International Journal of Biometeorology**, v. 49, n. 5, p. 285–296, 2005.

BURDICK, N. C. et al. Development of a self-contained, indwelling vaginal temperature probe for use in cattle research. **Journal of Thermal Biology**, v. 37, n. 4, p. 339–343, 2012.

CHAN, E. K. F.; NAGARAJ, S. H.; REVERTER, A. The evolution of tropical adaptation: comparing taurine and zebu cattle. **Animal Genetics**, v. 41, n. 5, p. 467–77, 2010.

CHEUNG, S. S.; MCLELLAN, T. M. Heat acclimation, aerobic fitness, and hydration effects on tolerance during uncompensable heat stress. **Journal of Applied Physiology**, v. 84, n. 5, p. 1731–1739, 1998.

CHOMAS. Disponível em: <<http://technelysium.com.au/>>. Acesso em 20 de junho de 2015.

CHURCH, J. S.; COOK, N. J.; SCHAEFER, A. L. Recent Applications of Infrared Thermography for Animal Welfare and Veterinary Research: Everything from Chicks to Elephants. **InfraMation. Anais...**2009.

COLLIER, R. J. et al. Invited review: genes involved in the bovine heat stress response. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 2, p. 445–54, 2008.

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

DEB, R. et al. Effect of heat stress on the expression profile of Hsp90 among Sahiwal (*Bos indicus*) and Frieswal (*Bos indicus* x *Bos taurus*) breed of cattle: a comparative study. **Gene**, v. 536, n. 2, p. 435–40, 2013.

DESHAIES, R. J. et al. A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. **Nature**, v. 332, n. 6167, p. 800–5, 1988.

DOBSON, H.; SMITH, R. F. What is stress, and how does it affect reproduction? *Animal Reproduction Science*, v. 60-61, p. 743–52, 2000.

FINCH, V. A. Body Temperature in Beef Cattle: Its Control and Relevance to Production in the Tropics. **Journal of Animal Science**, v. 62, n. 2, p. 531–542, 1985.

FINCH, V. A.; BENNETT, I. L.; HOLMES, C. R. Coat colour in cattle: effect on thermal balance, behaviour and growth, and relationship with coat type. **The Journal of Agricultural Science**, v. 102, n. 01, p. 141, 1984.

GARRICK, D. J.; RUVINSKY, A. **The Genetics of Cattle**, 2nd Edition. Wallingford, UK: CABI, 1999.

GEHRING, W. J.; WEHNER, R. Heat shock protein synthesis and thermotolerance in *Caenorhabditis*, an ant from the Sahara desert. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 7, p. 2994–2998, 1995.

GERALDO, A. C. A. P. de M. G. et al. 2013. In vivo and in vitro heat shock proteins gene expression in cattle. **Anais...ADSA-ASAS Joint Annual Meeting**, 2013, Indianápolis, Indiana, USA. Disponível em: <<http://dspace.uevora.pt/rdpc/handle/10174/9374>>. Acesso em: 2 jun. 2015.

GERALDO, A. C. A. P. de M. G. **Termotolerância em fêmeas bovinas : abordagens celular e fisiológica**. 2013. 93 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013. Disponível em: <www.teses.usp.br/teses/disponiveis/74/74131/tde.../DO5476737COR.pdf>. Acesso em: 02 de abril de 2015.

GRANDIN, T. Behavioural principles of handling cattle and other grazing animals under extensive condition. In: GRANDIN, T. **Livestock handling and transport**. 2.ed. Cabi Publishing: Wallingford, 2000. p.63-85.

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

HAHN, G. L. Dynamic responses of cattle to thermal heat loads. **Journal of Animal Science**, v. 77 Suppl 2, p. 10–20, 1999.

HAHN, G. L. et al. Measuring physiological responses of animals to environmental stressors using a microcomputer-based portable data logger. **Journal of Animal Science**, v. 68, n. 9, p. 2658–65, 1990.

HALES, J. R. et al. Thermal control of blood flow through capillaries and arteriovenous anastomoses in skin of sheep. **Pflügers Archiv : European Journal of Physiology**, v. 378, p. 55–63, 1978.

HANSEN, P. J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 349–60, 2004.

HILLMAN, P. E. et al. Continuous measurements of vaginal temperature of female cattle using a data logger encased in a plastic anchor. **Applied Engineering in Agriculture**, v. 25, n. 2, p. 291–296, 2009.

HOROWITZ, M. From molecular and cellular to integrative heat defense during exposure to chronic heat. **Comparative Biochemistry and Physiology A Molecular and Integrative Physiology**, v. 131, p. 475–483, 2002.

HUTCHINSON, J. C.; BROWN, G. D. Penetrance of cattle coats by radiation. **Journal of Applied Physiology**, v. 26, n. 4, p. 454–464, 1969.

IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change), 2014. Climate Change 2014: Synthesis Report: Headline statements from the Summary for Policymakers. Disponível em: <http://www.ipcc.ch/report/ar5/syr/docs/ar5_syr_headlines_en.pdf>. Acesso em 11 de março de 2015.

JESSEN, C. **Temperature Regulation in Human and Others Mammals**, 1st. ed. Springer, Berlin, 2001.

KAMWANJA, L. A et al. Responses of bovine lymphocytes to heat shock as modified by breed and antioxidant status. **Journal of Animal Science**, v. 72, n. 2, p. 438–44, 1994.

KATSCHINSKI, D. M. et al. Heat induction of the unphosphorylated form of hypoxia-inducible factor-1 α is dependent on heat shock protein-90 activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 11, p. 9262–9267, 2002.

KELLY, C. F., AND T. E. BOND. Bioclimatic factors and their measurement: A guide to environmental research on animals. **National Academy of Sciences**, Washington, DC. 1971.

KIANG, J. G.; TSOKOS, G. C. Heat Shock Protein 70 kDa: Molecular Biology , Biochemistry , and Physiology. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 80, n. 2, p. 183–201, 1998.

KISHORE, A. et al. Peripheral blood mononuclear cells: a potential cellular system to understand differential heat shock response across native cattle (*Bos indicus*), exotic cattle (*Bos taurus*), and riverine buffaloes (*Bubalus bubalis*) of India. **Cell Stress & Chaperones**, v. 19, n. 5, p. 613–621, 2013.

KOLB, E. **Fisiologia veterinaria**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1987.

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

KUMAR, A. et al. Expression profiling of major heat shock protein genes during different seasons in cattle (*Bos indicus*) and buffalo (*Bubalus bubalis*) under tropical climatic condition. **Journal of Thermal Biology**, v. 51, p. 55–64, 2015.

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

LYASHKO, V. N. et al. Comparison of the heat shock response in ethnically and ecologically different human populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 26, p. 12.492–12.495, 1994.

MACARIO, A. J. L.; MACARIO, E. C. de. Molecular chaperones: Multiple functions, pathologies, and potencial applications. **Frontiers in Bioscience**, v. 12, p. 2588–2600, 2007.

MCMANUS, C. et al. Heat tolerance in naturalized Brazilian cattle breeds. **Livestock Science**, v. 120, n. 3, p. 256–264, 2009.

MCMANUS, C. M. et al. Factors affecting heat tolerance in crossbred cattle in central Brazil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 15, n. 2, p. 152–158, 2014.

MISHRA, A et al. Influence of induced heat stress on HSP70 in buffalo lymphocytes. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 95, n. 4, p. 540–4, 2011.

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

NARDONE, A. et al. Effects of climate changes on animal production and sustainability of livestock systems. **Livestock Science**, v. 130, n. 1-3, p. 57–69, 2010.

NAY, T.; HAYMAN, R. Sweat glands in Zebu (*Bos indicus* L.) and European (*B. taurus* L.) cattle. I. Size of individual glands, the denseness of their population, and their depth below the skin surface. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 7, n. 5, p. 482, 1956.

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

OLIGO ANALYSER 3.1 software. Disponível em:
<<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>>. Acesso em 20 de junho de 2015.

PEREIRA, A. M. F. et al. Evaporative heat loss in *Bos taurus*: do different cattle breeds cope with heat stress in the same way? **Journal of Thermal Biology**, v. 45, p. 87–95, 2014.

PRIMERQUESTQM. Disponível em:
<<http://www.idtdna.com/primerquest/Home/Index>>. Acesso em 20 de junho de 2015.

PUSCHMANN, S.; JESSEN, C. Anterior and posterior hypothalamus: Effects of independent temperature displacements on heat production in conscious goats. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, v. 373, n. 1, p. 59–68, 1978.

REUTER, R. R. et al. Technical note: Development of a self-contained, indwelling rectal temperature probe for cattle research. **Journal of Animal Science**, v. 88, n. 10, p. 3291–5, 2010.

RITOSSA, F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. **Experientia**, v. 18, n. 1957, p. 571–573, 1962.

SAKATANI, M. et al. Changes in the transcriptome of morula-stage bovine embryos caused by heat shock: relationship to developmental acquisition of thermotolerance. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, v. 11, n. 1, p. 3, 2013.

SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, S. H. Respuesta hormonal de los organismos superiores ante el estrés calórico - Hormonal response to the higher organism after the caloric stress. **Revista Electrónica de Veterinaria REDVET**, v. 8, p. 1–8, 2007.

SCHLEGER, A.; TURNER, H. Sweating rates of cattle in the field and their reaction to diurnal and seasonal changes. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 16, n. 1, p. 92, 1965.

SCHMIDT-NIELSEN, K., **Scalling - Why is Animal Size so Important?** 1st ed. Cambridge University Press, Melbourne, 1995.

SEGUIN, B., 2008. The consequences of global warming for agriculture and food production. In: Rowlinson, P., Steele, M., Nefzaoui, A. (Eds.), **Proceedings...** International Conference “Livestock and Global Climate Change”.

SILVA, R.G. **Introdução à bioclimatologia animal**. Nobel, São Paulo, 2000.

SONNA, L. A. et al. Invited review: Effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. **Journal of Applied Physiology**, v. 92, n. 4, p. 1725–42, 2002.

SØRENSEN, J. G.; KRISTENSEN, T. N.; LOESCHCKE, V. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. **Ecology Letters**, v. 6, n. 11, p. 1025–1037, 2003.

SWENSON, M. J.; REECE, W. O. Dukes **Fisiologia dos Animais Domésticos**. 11^a ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil, p. 856, 1996.

THORNTON, P. K. et al. The impacts of climate change on livestock systems in developing countries: A review of what we know and what we need to know. **Agricultural Systems**, v. 101, n. 3, p. 113–127, 2009.

TITTO, C. G. et al. Heat tolerance and the effects of shade on the behavior of Simmental bulls on pasture. **Animal Science Journal**, v. 82, n. 4, p. 591–600, 2011.

TITTO, E. A. L. et al. Estudo da tolerância ao calor em tourinhos das raças Marchigiana, Nelore e Simental. In: CONGRESSO DE ZOOTECNIA, 9, 1999, Porto-Portugal. **Anais...** Porto-Portugal: APEZ, 1999.

ULMASOV, K. A. et al. Heat shock proteins and thermoresistance in lizards. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 5, p. 1666–70, 1992.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v.3, n.7, RESEARCH0034 (2002).

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

WEST, J. W.; MULLINIX, B. G.; BERNARD, J. K. Effects of hot, humid weather on milk temperature, dry matter intake, and milk yield of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 1, p. 232–242, 2003.

WHITE, B.A. **Os sistemas endócrino e reprodutor**. In: KOEPPEN, B. M.; STANTON, B.A. 6 ed. Berne & Levy: Fisiologia. Rio de Janeiro: Elsevier, p.731-744, 2009.