

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

BIANCA VILELA PIRES

**Análise de parâmetros fisiológicos e perfil de expressão de genes associados
ao estresse térmico e eficiência alimentar em bovinos das raças Nelore e
Caracu**

Ribeirão Preto

2021

BIANCA VILELA PIRES

Análise de parâmetros fisiológicos e perfil de expressão de genes associados ao estresse térmico e eficiência alimentar em bovinos das raças Nelore e Caracu

“Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)”

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor(a) em Ciências.

Área de Concentração: Genética

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Cristina Paro de Paz

Coorientadora: Profa. Dra. Ester Silveira Ramos

Ribeirão Preto

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo de publicação preparada pela biblioteca do serviço de biblioteca de documentação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Pires, Bianca Vilela

Análise de parâmetros fisiológicos e perfil de expressão de genes associados ao estresse térmico e eficiência alimentar em bovinos das raças Nelore e Caracu. Ribeirão Preto, 2021.

128 f. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Genética.

Orientador: Cristina Paro de Paz, Claudia.

Coorientador: Silveira Ramos, Ester.

1.Estresse Térmico. 2.*Bos taurus indicus*. 3.*Bos taurus taurus*.
4.Eficiência Alimentar. 5.Análise de Agrupamento. 6.Meta-análise.



Universidade de São Paulo

ATA DE DEFESA

Aluno: 17135 - 10411967 - 1 / Página 1 de 1

Ata de defesa de Tese do(a) Senhor(a) Bianca Vilela Pires no Programa: Ciências Biológicas (Genética), do(a) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Aos 31 dias do mês de agosto de 2021, no(a) FMRP-USP realizou-se a Defesa da Tese do(a) Senhor(a) Bianca Vilela Pires, apresentada para a obtenção do título de Doutora intitulada:

"Análise de parâmetros fisiológicos e perfil de expressão de genes associados ao estresse térmico e eficiência alimentar em bovinos das raças Nelore e Caracu"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra ao candidato para exposição e a seguir aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

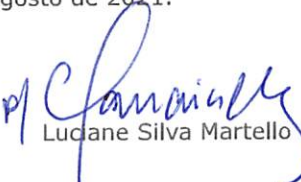
Nome dos Participantes da Banca	Função	Sigla da CPG	Resultado
Claudia Cristina Paro de Paz	Presidente	SAABSP(FMRP)	Não Votante
Nilce Maria Martinez Rossi	Titular	FMRP - USP	<u>APROVADA</u>
Luciane Silva Martello	Titular	FZEA - USP	<u>APROVADA</u>
Fernando Sebastião Baldi Rey	Titular	UNESP(FZEA)	<u>APROVADA</u>

Resultado Final: APROVADA

Parecer da Comissão Julgadora *

Eu, Ísis Sawasaki Silveira Leme _____, lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as). Ribeirão Preto, aos 31 dias do mês de agosto de 2021.

p/ 
Nilce Maria Martinez Rossi

p/ 
Luciane Silva Martello

p/ 
Fernando Sebastião Baldi Rey


Claudia Cristina Paro de Paz
Presidente da Comissão Julgadora

* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

A defesa foi homologada pela Comissão de Pós-Graduação em _____ e, portanto, o(a) aluno(a) _____ jus ao título de Doutora em Ciências obtido no Programa Ciências Biológicas (Genética) - Área de concentração: Genética.

Presidente da Comissão de Pós-Graduação

*Dedico a minha família e em
especial a memória de minha amada
avó Olympia Juvêncina Vilela.*

AGRADECIMENTOS

À Deus e a Nossa Senhora Aparecida, a qual sou devota.

A minha família por me apoiarem até aqui, ao meus pais Vilda e Norivaldo por sempre incentivar meus estudos e darem força para continuar e acreditar que é possível.

Ao meu esposo Gabriel por todo amor, incentivo, respeito, compreensão e paciência.

Ao meu filhote de quatro patas por sempre alegrar meus dias ao chegar em casa.

À minha orientadora Dra. Claudia Cristina Paro de Paz por todos ensinamentos e orientação, meu muito obrigada por ter me ajudado a ser a profissional que hoje sou.

À minha coorientadora Dra. Ester Silveira Ramos.

À Universidade de São Paulo, por meio do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pela oportunidade de realizar o Doutorado.

Ao Centro de Pesquisa de Bovinos de Corte, Instituto de Zootecnia de Sertãozinho, colaboradores e pesquisadores pela disponibilidade dos animais e espaço durante a execução do projeto de campo e toda ajuda a mim ofertada.

À banca examinadora por aceitar julgar meu trabalho e contribuir para a melhoria do mesmo.

A Dra. Nedenia Bonvino Stafuzza por toda amizade e parceria, que foi de suma importância para meu crescimento pessoal e profissional.

À minha amiga e companheira de pós-graduação Aline Santos, faltam palavras para te agradecer.

A todos colegas que contribuíram para a execução do meu o doutorado.

Às agências de fomento, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (CNPq), pelo auxílio financeiro na realização do presente trabalho.

Obrigada a todos.

RESUMO

Pires, B. V. Análise de parâmetros fisiológicos e perfil de expressão de genes associados ao estresse térmico e eficiência alimentar em bovinos das raças Nelore e Caracu. 2021. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

O aumento da temperatura ambiental leva ao estresse térmico em animais, alterando características fisiológicas e genéticas do animal. Assim, os objetivos do presente estudo foram: (1) avaliar as condições fisiológicas e a expressão relativa dos genes *HSPD1* (heat shock protein family D (Hsp60) member 1), *HSPA1A* (heat shock protein family A (Hsp70) member 1A), *HSP90AA1* (heat shock protein 90 alpha family class A member 1) em animais Nelore (*Bos taurus indicus*) e Caracu (*Bos taurus taurus*) submetidos ao estresse térmico; (2) buscar diferenças no perfil de expressão dos genes *ATPIA1* (*ATPase Na⁺/K⁺ transporting subunit alpha 1*), *NR3C1* (*nuclear receptor subfamily 3 group C member 1*), *POMC* (*proopiomelanocortin*), *NPY* (*neuropeptide Y*) e *LEP* (*leptin*) considerando a eficiência alimentar e a exposição ao calor, (3) identificar animais que apresentem alta eficiência alimentar e termotolerância e (4) avaliar o impacto do estresse térmico sobre a temperatura interna utilizando a meta-análise. Foram avaliados 78 novilhos das raças Nelore e Caracu. O teste de eficiência alimentar foi realizado durante 60 dias utilizando cochos eletrônicos. Ao final do teste os animais foram sorteados aleatoriamente e submetidos ao ambiente de estresse térmico e termoneutro. As características fisiológicas avaliadas incluíram temperaturas retais (TR) e de superfície (TS), frequências cardíacas (FC) e respiratórias (FR), níveis de cortisol sérico e o índice de tolerância ao calor (ITC). Amostras de sangue foram colhidas para análise de cortisol e posterior análise de expressão gênica. A temperatura ambiental variou entre 28 a 39°C, enquanto a umidade relativa foi de 30 a 65% durante o estudo. As características fisiológicas TR, TS, FR, ITC e cortisol sérico foram superiores em animais da raça Caracu. A expressão gênica relativa dos genes *HSPD1* e *HSP90AA1* foi diferente entre as raças Nelore e Caracu. O gene *ATPIA1* apresentou menor nível de expressão nos animais em ambiente termoneutro em comparação ao ambiente de estresse térmico. A interação entre raça e consumo e ganho residual influenciou o nível de expressão dos genes *NPY* e *LEP*. A análise de agrupamento não hierárquica, dividiu a população em dois grupos. O grupo 1 foi formado por animais com menor tolerância ao calor e maior eficiência alimentar, enquanto o grupo 2 compreendeu animais com maior tolerância ao calor e menor eficiência alimentar. Conclui-se que a raça Caracu, é menos adaptada ao estresse térmico quando comparada a raça Nelore, diante dos parâmetros fisiológicos e o padrão de expressão dos genes avaliados. As condições climáticas associadas a eficiência alimentar podem influenciar os padrões de expressão dos genes *ATPIA1* e *NPY*. Existe variabilidade fenotípica dentro e entre as raças Caracu e Nelore para as características de eficiência alimentar e termotolerância. O estudo meta-analítico apresentou elevada heterogeneidade das temperaturas retal e vaginal entre os rebanhos avaliados e demonstrou eficácia no uso destas medidas para avaliar o estresse térmico em bovinos. Auxiliando, portanto, na busca de estratégias que minimizem o efeito do estresse térmico sobre a produção animal.

Palavras chave: adaptabilidade, *Bos taurus taurus*, *Bos taurus indicus*, consumo alimentar, termotolerância.

ABSTRACT

Pires, B. V. Analysis of physiological parameters and expression profile of gene associated with heat stress and feed efficiency in Nelore and Caracu cattle. 2021. Thesis (Doctoral) - Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo.

An increase in environmental temperature can lead to heat stress in animals, altering the physiological and genetic characteristics of the animal. Within this context, the objectives of the present study were: 1) to evaluate the physiological conditions and relative expression of the *HSPD1* (heat shock protein family D [Hsp60] member 1), *HSPA1A* (heat shock protein family A [Hsp70] member 1A), and *HSP90AA1* (heat shock protein 90 alpha family class A member 1) genes in Nelore (*Bos taurus indicus*) and Caracu (*Bos taurus taurus*) animals exposed to heat stress; 2) to identify differences in the expression profile of the *ATP1A1* (ATPase Na⁺/K⁺ transporting subunit alpha 1), *NR3C1* (nuclear receptor subfamily 3 group C member 1), *POMC* (proopiomelanocortin), *NPY* (neuropeptide Y) and *LEP* (leptin) genes according to feed efficiency and exposure to heat; 3) to identify animals that have high feed efficiency and are heat tolerant, and 4) to evaluate the impact of heat stress on internal body temperature using a meta-analysis. Seventy-eight Nelore and Caracu steers were evaluated. The feed efficiency test was carried out for 60 days using the automatic feeding systems. At the end of the test, the animals were randomly allocated to the heat stress and thermoneutral environment. The physiological traits of the animals included rectal temperature (RT), skin temperature (ST), heart rate (HR), respiratory frequency (RF), serum cortisol levels and heat tolerance index (HTI). Blood samples were collected for cortisol measurement and subsequent gene expression analysis. The environmental temperature ranged from 28 to 39°C and relative humidity from 30 to 65% during the study. The RT, ST, RF, HTI and serum cortisol were higher in Caracu animals. Relative expression of the *HSPD1* and *HSP90AA1* genes differed between Nelore and Caracu animals. The expression level of the *ATP1A1* gene was higher in animals of the thermoneutral environment compared to those of the heat stress environment. The interaction between breed and residual intake and gain influenced the expression level of the *NPY* and *LEP* genes. Non-hierarchical clustering divided the population into two groups. Group 1 was formed by animals with lower heat tolerance and higher feed efficiency, while group 2 comprised animals with greater heat tolerance and lower feed efficiency. In conclusion, the physiological parameters and expression pattern of genes evaluated showed that the Caracu breed is less adapted to heat stress than Nelore animals. Climate conditions associated with feed efficiency can impact on the expression patterns of the *ATP1A1* and *NPY* genes. Phenotypic variability exists within and between the Caracu and Nelore breeds when feed efficiency and heat tolerance traits are analyzed. The meta-analytical study showed high heterogeneity of rectal and vaginal temperatures among the herds evaluated and demonstrated effectiveness in their use to assess heat stress in cattle. Therefore, these traits assist in the investigation of strategies that minimize the effect of heat stress in livestock.

Keywords: adaptability, *Bos taurus taurus*, *Bos taurus indicus*, feed intake, thermotolerance.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Estresse Térmico	15
2.2 Raça Nelore	16
2.3 Raça Caracu.....	17
2.4 Eficiência Alimentar	18
2.5 Estresse Térmico e <i>Heat shock proteins</i>	19
2.6 Expressão de genes associados ao estresse térmico e eficiência alimentar.....	21
REFERÊNCIAS.....	24

CAPÍTULO 2. CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DE ANIMAIS DAS RAÇAS NELORE E CARACU SUBMETIDOS AO ESTRESSE TÉRMICO

RESUMO.....	31
1. INTRODUÇÃO.....	32
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
2.1 Local, Animais e Delineamento experimental	33
2.2 Avaliação de estresse térmico ambiental	33
2.3 Parâmetros Fisiológicos	34
2.4 Níveis de cortisol sérico	35
2.5 Análises Estatísticas	35
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4. CONCLUSÃO.....	46
REFERÊNCIAS.....	48

CAPÍTULO 3. DIFFERENTIAL EXPRESSION OF HEAT SHOCK PROTEIN GENES ASSOCIATED WITH HEAT STRESS IN NELORE AND CARACU BEEF CATTLE

ABSTRACT.....	54
1. INTRODUCTION.....	54
2. MATERIAL AND METHODS.....	55
2.1 Animals and treatments.....	55
2.2 Sample collections.....	55
2.3 RNA extraction.....	56
2.4 Real-time qPCR.....	56
2.5 Statistical analysis.....	56
3. RESULTS.....	56
4. DISCUSSION.....	58

5. CONCLUSION.....	60
6. REFERENCES.....	60
CAPÍTULO 4. EXPRESSION OF CANDIDATE GENES FOR RESIDUAL FEED INTAKE IN TROPICALLY ADAPTED <i>BOS TAURUS</i> AND <i>BOS INDICUS</i> BULLS UNDER THERMONEUTRAL AND HEAT STRESS ENVIRONMENTAL CONDITIONS	
ABSTRACT.....	63
1. INTRODUCTION.....	63
2. MATERIAL AND METHODS.....	64
2.1. Animals.....	64
2.2. Feed intake and performance traits.....	64
2.3. Environmental conditions.....	64
2.4. RNA extraction.....	65
2.5. Real-time quantitative PCR.....	65
2.6. Statistical analysis.....	65
3. RESULTS.....	65
3.1. Environmental conditions.....	65
3.2. Feed intake and performance traits.....	66
3.3. Gene expression.....	66
4. DISCUSSION.....	67
5. CONCLUSION.....	69
6. REFERENCES.....	69
SUPPLEMENTARY DATA.....	72
CAPÍTULO 5. CLUSTER ANALYSIS OF HEAT TOLERANCE AND FEED EFFICIENCY IN CARACU AND NELORE BEEF CATTLE	
ABSTRACT.....	75
1. INTRODUCTION.....	76
2. MATERIAL AND METHODS.....	77
2.1 Data	77
2.2 Cluster Analysis	80
3. RESULTS.....	81
4. DISCUSSION.....	82
5. CONCLUSION.....	84

6. REFERENCES.....	85
CAPÍTULO 6. TEMPERATURA INTERNA COMO PARÂMETRO INDICADOR DE ESTRESSE TÉRMICO EM BOVINOS TAURINOS E ZEBUÍNOS: UM ESTUDO DE META-ANÁLISE	
RESUMO.....	98
1. INTRODUÇÃO.....	100
2. MATERIAL E MÉTODOS	102
3. RESULTADOS	106
4. DISCUSSÃO	109
5. CONCLUSÃO.....	112
REFERENCIAS	114
MATERIAL SUPLEMENTAR.....	128
CONSIDERAÇÕES FINAIS	130

CAPÍTULO 1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

O estresse térmico tem causado alertas na produção animal nos últimos anos e, com o aquecimento global se intensificando, estudos em relação à termotolerância e a eficiência na produção animal têm sido cada vez mais relevantes. As alterações comportamentais e genéticas decorrentes da exposição do animal a altas temperaturas afetam os índices produtivos, prejudicando o sistema de produção agropecuário (BROWN-BRANDL, 2018).

O aquecimento global provoca prejuízos nos sistemas extensivos de produção animal, uma vez que a queda do índice pluviométrico, a elevação da temperatura e da radiação solar estão diretamente relacionados com a prática produtiva (NARDONE et al., 2010). A expressão gênica diferencial em bovinos criados em regiões com temperaturas mais elevadas tem provocado diferenças na resistência genética em *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus*, demonstrando que a adaptabilidade às condições ambientais é específica para cada subespécie animal (HANSEN, 2004). A variabilidade existente entre indivíduos de uma mesma população em relação ao estresse térmico é ampla, representando um desafio para o uso da seleção genética, verificando a necessidade de se identificar não apenas raças mais resistentes ao estresse térmico, mas também animais resistentes dentro de uma raça (GAUGHAN et al., 2010; MISZTAL, 2017).

Como qualquer animal de sangue quente, os mamíferos também devem manter sua temperatura corporal entre 35 e 39°C (PROSSER; HEATH, 1991), sendo que estas temperaturas são mantidas acima das temperaturas ambientais através da geração de calor metabólico. A manutenção da temperatura corporal nesta faixa estreita de variação, com limite de 38,5°C, é uma condição essencial para que as principais funções fisiológicas e todas as reações metabólicas sejam realizadas (TAKAHASHI, 2012). O aumento da temperatura corporal desempenha papel predominante, uma vez que variações de temperatura podem ser responsáveis por até 87% das alterações no consumo de alimentos (AHMED; EL AMIN, 1997). Visto que o consumo de matéria seca diminui e o de água aumenta quando a temperatura do ambiente se eleva (DAS et al., 2016; CANTALAPIEDRA-HIJAR et al., 2018).

Os mecanismos de adaptabilidade são diferentes entre as raças bovinas, sendo algumas mais tolerantes que outras, conforme suas peculiaridades. A raça Nelore (*Bos taurus indicus*), de origem indiana, demonstra tolerância ao calor por possuir pelos curtos, grossos e sedosos

que refletem os raios de sol. Sua resistência ao calor se deve também ao fato de apresentar maior superfície corporal irradiada que leva ao aumento da capacidade de dissipação de calor (GEBREMEDHIN et al., 1997), apresentam glândulas sudoríparas de maior diâmetro e volume em relação aos animais taurinos (RIBEIRO et al., 2010). Os animais da raça Caracu, (*Bos taurus taurus*) de origem europeia é considerada adaptada ao clima tropical, apresentam pelagem curta, que varia entre tons amarelos e alaranjados (McMANUS et al., 2010). As qualidades adaptativas e produtivas da raça Caracu foram revalorizadas na década de 70 e a raça foi difundida por várias regiões do Brasil.

As raças zebuínas (*Bos taurus indicus*), devido ao longo tempo de adaptação ao clima tropical, de maneira geral são mais eficientes em regular a temperatura corporal em resposta ao estresse térmico em comparação às raças europeias (*Bos taurus taurus*) (BEATTY et al., 2006). Como consequência do estresse térmico, os efeitos prejudiciais sobre o consumo de ração, produção de leite, taxa de crescimento e reprodução são menores nos animais zebuínos do que em taurinos (GAUGHAN et al., 1999; HANSEN, 2004). O estresse térmico afeta diretamente o consumo alimentar, tornando importante o estudo da expressão de genes associados a estas características em rebanhos de produção animal.

Diante disso, o presente trabalho teve por objetivo avaliar os genes *HSPD1* (heat shock protein family D (hsp60) member 1), *HSPA1A* (heat shock protein family A (hsp70) member 1A), *HSP90AA1* (heat shock protein 90 alpha family class A member 1), *NR3C1* (nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (glucocorticoid receptor), *POMC* (proopiomelanocortin), *ATP1A1* (sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1), *LEP* (leptin) e *NPY* (neuropeptide Y) quanto ao padrão de expressão durante a exposição ao estresse térmico e durante a ausência de estresse térmico em animais das raças Nelore e Caracu. Além de caracterizar os animais das raças Nelore e Caracu de acordo com os parâmetros fisiológicos indicadores de estresse térmico e comparar os diferentes níveis de expressão dos genes citados de acordo com a eficiência alimentar dos animais.

Ponderando-se a importância da adaptabilidade dos bovinos de corte às mudanças climáticas, as hipóteses do presente estudo foram:

- A exposição dos animais ao sol em ambas as raças promove alterações nos parâmetros fisiológicos, sendo mais intensas em animais da raça Caracu.
- Animais Nelore em situações de estresse térmico tendem a apresentar um aumento dos níveis de cortisol sérico em menor intensidade que animais Caracu.

- A raça Caracu, por se tratar de uma raça de origem europeia, tende a apresentar menor adaptabilidade ao estresse térmico, podendo ter a expressão de seus genes alterada conforme o aumento da temperatura, em relação aos animais da raça Nelore.
- O estresse térmico provoca a redução no consumo alimentar e está associado a adaptabilidade animal em ambas as raças Nelore e Caracu.
- Animais de ambas as raças com baixa tolerância ao estresse térmico apresentam baixa eficiência alimentar.

Tendo em vista a importância de estudos que busquem soluções e minimizem o efeito ambiental na produção de bovinos de corte, o presente estudo foi organizado em seis capítulos que primeiramente contemplam as considerações gerais e a revisão bibliográfica pertinente sobre o tema, no segundo é abordado a caracterização fenotípica dos animais Nelore e Caracu. O terceiro capítulo compreende a expressão gênica das *HSPs* em relação ao ambiente ao qual o animal está submetido. Em quarto, é apresentado a diferença no padrão de expressão de genes associados a eficiência alimentar em animais Nelore e Caracu submetidos a diferentes condições temperaturas no verão. O capítulo cinco compreende uma análise multivariada da relação existente entre termotolerância e eficiência alimentar entre as raças estudadas. E por fim, o sexto capítulo apresenta uma meta-análise sobre o uso da temperatura retal como indicador de estresse térmico em bovinos taurinos e zebuínos oriundos de estudos publicados nos últimos 20 anos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Estresse Térmico

O bem-estar é dependente de diversos fatores aos quais o animal está submetido, entre os quais destacam-se as necessidades, liberdades, adaptação, controle, capacidade de previsão, sofrimento, dor, ansiedade, medo, tédio, estresse e saúde do animal (GRANDIN, 2016). O bem-estar animal está ligado ao conforto, uma vez que animais homeotérmicos apresentam uma faixa de temperatura ambiental na qual se encontram em conforto térmico denominada zona de termoneutralidade, a qual varia em função da espécie, raça, nível de produção, estágio fisiológico e dieta (HANSEN, 2004).

Na zona de termoneutralidade, o sistema termorregulador não é acionado para capturar ou dissipar calor, o que faz com que o gasto de energia para manutenção seja mínimo, o que resulta em máxima eficiência produtiva (BACCARI JÚNIOR, 1998). A temperatura, umidade relativa do ar, radiação ultravioleta e vento são fatores que ao se encontrarem fora dos padrões aceitáveis para o organismo, fazem com que seu estado fisiológico se transforme e necessite da utilização de mecanismos termoregulatórios para restabelecer seu estado fisiológico adequado (FONSECA et al., 2015). Os animais passam por estresse térmico quando a temperatura do corpo é maior que a faixa ótima especificada para a atividade normal, porque a carga total de calor é maior que a capacidade de dissipação de calor (BERNABUCCI et al., 2010). Marai e Haebe (2010) definiram o estresse térmico como o estado no qual os mecanismos fisiológicos do animal são ativados para manter o equilíbrio térmico corporal quando expostos à elevadas temperaturas.

O aumento da temperatura retal em animais é um indicativo de estresse térmico, apontando a ação dos mecanismos naturais para dissipar o calor adicional e manter o status térmico em mamíferos (EL-TARABANY et al., 2017). A taxa de respiração é um mecanismo fisiológico utilizado pelos animais expostos ao estresse térmico, em que o animal dissipa o calor corporal através de mecanismos de resfriamento evaporativo respiratório (RENAUDEAU et al., 2012). Conseqüentemente a essas alterações nos mecanismos respiratórios, a frequência cardíaca também é modificada (WERNER et al., 2008; GODYŃ et al., 2019). Em ambientes com alta temperatura, os animais sofrem vasodilatação periférica que resulta na queda da pressão que, por sua vez, é compensada pelo aumento dos batimentos cardíacos (DETWEILER, 2017; GODYŃ; et al., 2019). O estresse térmico associado às mudanças climáticas afeta negativamente a produção bovina, reduzindo o consumo de ração e, conseqüentemente,

diminuindo o peso corporal, o ganho médio diário e afetando a condição corporal do animal (ANGEL et al., 2018; HABEEB et al., 2018).

A frequência cardíaca normal para bovinos varia entre 48 a 80 batimentos por minutos, sendo elevada em condições adversas (DETWEILER, 2017). A alteração da frequência cardíaca é decorrente da alteração de outros mecanismos, que constituem um sistema interligado, em que o aumento da temperatura retal, leva ao aumento da temperatura superficial alterando a frequência respiratória e posteriormente a frequência cardíaca (WERNER et al, 2008; KLEIN, 2014; GODYŃ et al, 2019). A exposição ao estresse térmico altera o metabolismo animal, afetando a produtividade do rebanho.

2.2 Raça Nelore

A raça Nelore (*Bos taurus indicus*) originária do sul do continente asiático (Ongole), foi introduzida no Brasil pelos colonizadores durante a década de 1860. Atualmente a maior parte do rebanho brasileira é composto por animais Nelore, estes animais são caracterizados pela sua rusticidade, habilidade materna, conformação de carcaça, adaptabilidade ao clima tropical, além de apresentar boas características reprodutivas e alta eficiência alimentar (OLIVEIRA et al., 2002). Os animais Nelore apresentam porte médio a grande, coloração da pelagem variando de branca a cinza, pele preta, rica em melanina, olhos são elípticos, pretos e vivos, orelhas curtas e o cupim é destaque sobre a cernelha, principalmente nos machos (FIGURA 1). As fêmeas destacam-se pela facilidade de parto, habilidade materna e proteção das crias (GROSSI et al., 2016; ABCZ, 2020).

Figura 1. Animais da raça Nelore no Centro de Pesquisa de Bovinos de Corte, Instituto de Zootecnia.



Fonte: Arquivo Pessoal (2018).

Em 1976 foi iniciado o projeto de melhoramento na raça Nelore no Centro de Pesquisa de Bovinos de Corte, Instituto de Zootecnia – Sertãozinho, rebanho foi dividido sub-rebanhos, chamados Tradicional (NeT), Seleção (NeS) e Controle (NeC). Os rebanhos NeS e NeC constituem o programa de melhoramento, que utiliza como critério o ganho de peso diário e o peso pós-desmame padronizado à idade de 378 dias (P378). A mudança genética no peso pós-desmame é avaliada com base no rebanho NeC, que foi selecionado para seleção nula diferencial, enquanto o rebanho NeS foi selecionado para maiores diferenciais de seleção para peso padronizado aos 378 dias de idade (IZ, 2020). Atualmente o plantel da raça Nelore é constituído por 1077 animais (IZ, 2020).

2.3 Raça Caracu

A raça Caracu (*Bos taurus taurus*) se originou a partir de raças portuguesas, sendo hoje considerada uma raça taurina adaptada. Caracterizada pela docilidade, habilidade materna, baixa exigência nutricional, sendo utilizada para produção de carne e de leite (McMANUS et al., 2010, SPRITZE et al., 2003). Os animais apresentam pelagem que varia de amarelo claro a vermelho escuro, apresentando cabeça grande e larga com chifres bem desenvolvidos, tamanho mediano e a altura na cernelha abaixo de 1,50 metros (ABCCARACU, 2020).

Figura 2. Animais da raça Caracu no Centro de Pesquisa de Bovinos de Corte, Instituto de Zootecnia.



Fonte: Arquivo Pessoal (2018).

Durante o século XIX a raça Caracu se destacou na pecuária brasileira, porém na década de 60 a raça apresentou um grande declínio, restando poucos rebanhos, no ano de 1969 chegou a cogitar o fim da raça Caracu (McMANUS et al., 2010). Em meados de 1977 a partir do desenvolvimento de um programa de melhoramento genético iniciado pelo Centro de Pesquisa

de Bovinos de Corte, Instituto de Zootecnia – Sertãozinho, animais de 32 plantéis pertencentes a 28 criadores foram identificados e reunidos para a formação e conservação da genética da raça Caracu (TROVO; DUARTE, 1981). Atualmente o plantel da raça Caracu no Centro de Pesquisa, abrange 318 animais, sendo selecionados a partir do peso pós-desmame visando o aumento da taxa de crescimento (IZ, 2020).

2.4 Eficiência Alimentar

A eficiência alimentar é um fator imprescindível para a rentabilidade da atividade pecuária. Animais mais eficientes utilizam melhor os nutrientes oferecidos e apresentam maior conversão destes nutrientes em ganho de peso diário, além de apresentarem redução na eliminação de componentes impactantes no meio ambiente como carbono, metano e fezes em relação à animais menos eficientes para a produção de mesma quantidade de carne (BASARAB et al., 2003; NKRUMAH et al., 2006).

O consumo alimentar residual (CAR) é uma das metodologias mais utilizadas para mensurar a eficiência em rebanhos bovinos atualmente. O CAR foi desenvolvido em 1963 e começou a ser utilizado somente na década de 90 para identificar e selecionar animais mais eficientes (KOCH et al., 1963). O consumo alimentar estimado é obtido por meio de equação de regressão múltipla do consumo observado sobre o peso vivo médio metabólico e o ganho de peso, em que o CAR é considerado como resíduo da equação.

O consumo e ganho residual (CGR) apresenta uma nova maneira de avaliar a eficiência de bovinos de corte (BERRY; CROWLEY, 2012). O CGR é expresso como a soma do CAR com o ganho de peso residual (GPR), sendo o CAR multiplicado por menos um e ambos ajustados para variância igual a um (BERRY; CROWLEY, 2012; CROWLEY et al., 2010). Através do CGR é possível identificar animais com menor consumo e maior ganho de peso.

O CAR apresenta herdabilidade moderada (0,30 e 0,35), se destacando por reduzir os impactos econômicos e ambientais, como o consumo de ração e emissão de metano (MORAES et al., 2019; SANTANA et al., 2019). Porém o CAR tem sido associado negativamente com as características de carcaça, em que animais com baixa eficiência (CAR positivo) apresentam maior ingestão de energia e maior deposição de gordura de cobertura na carcaça (CANTALAPIEDRA-HIJAR et al., 2018; KENNY et al., 2018). Já o CGR está se destacando na seleção de animais eficientes. Na raça Nelore correlações fenotípicas altas entre CGR e parâmetros biométricos foram observadas, indicando sua utilização na seleção de animais com baixo consumo de ração e alto desempenho produtivo (FIGUEIREDO et al., 2019).

A eficiência alimentar em bovinos de corte é uma característica complexa e multifatorial, com alta variabilidade decorrente da interação de diversos processos biológicos. Podendo ser influenciada pela condição fisiológica do animal, manejo e fatores ambientais (ALEENA et al., 2016; KENNY et al., 2018), sendo o aumento da temperatura ambiental um desses fatores (SUMMER et al., 2019; WINDERS et al., 2020).

A exposição a elevadas temperaturas estimula os receptores térmicos periféricos, os quais transmitem impulsos nervosos ao centro de controle da fome e sede no hipotálamo, levando a diminuição no consumo alimentar afim de minimizar o gasto energético (HABEEB et al., 2018). Em novilhas Brangus, foi observada a elevação da frequência cardíaca em animais de baixa eficiência em relação aos de alta eficiência alimentar (PADDOCK, 2010). Richardson e Herd (2004) demonstraram durante um teste de eficiência alimentar (120 dias) que o estresse, o *turnover* proteico e o metabolismo tecidual explicam 37% da variação no CAR em animais das raças Angus, Shorton e Hereford. Na raça Limousine o aumento da temperatura ambiental reduziu o consumo alimentar em 11% (PEREIRA et al., 2008).

A eficiência alimentar é afetada por todo metabolismo animal e, por isso, correlações com metabólitos e expressão de determinados genes têm sido alvo de pesquisas na busca por melhor compreensão sobre os mecanismos que afetam a eficiência alimentar.

2.5 Estresse Térmico e *Heat shock proteins*

Além dos processos catabólicos e anabólicos associados ao estresse térmico, as características genéticas do animal é um importante fator para a termotolerância em bovinos. Estudos evidenciam a maior susceptibilidade de raças leiteiras taurinas quando expostas a ambientes com altas temperaturas (~40°C) em relação a temperaturas menores (~28°C) (WEST, 2003; LI et al., 2011; TAKAHASHI, 2012). Raças bovinas taurinas oriundas de climas quentes como *Senepol* e raças zebuínas adquiriram ao longo de sua evolução e adaptação diferentes alelos que as tornaram termotolerantes (HANSEN, 2004).

A adaptação celular de um animal a elevadas temperaturas é alcançada pela síntese de proteínas envolvidas em mecanismos anti-estresse durante a condição de estresse térmico, como as proteínas de choque térmico (*HSPs – Heat Shock Proteins*). A busca do entendimento da ação do estresse térmico frente ao metabolismo animal, envolve também outros genes associados a termorregulação, consumo alimentar, metabolismo de lipídeos e carboidratos, além das vias de sinalização hormonal, que são alteradas com a elevação da temperatura (KELLY et al., 2011; MEHLA et al., 2014; JUNG et al., 2017).

O estresse térmico agudo induz a expressão de genes envolvidos em processos metabólicos e relacionados ao sistema imune (PAGLIARONE; SFORCIN, 2009). Genes responsáveis pela produção das “chaperonas” (proteínas que auxiliam o dobramento/desdobramento e montagem/desmontagem de células sob condições fisiológicas de estresse), apresentam expressão aumentada em bovinos em situação de estresse térmico comparados aos bovinos não estressados (MEHLA et al., 2014).

Diversos mecanismos celulares são ativados para combater as condições de estresse térmico. A resposta ao choque térmico (HSR - *Heat Shock Response*) é o processo que se caracteriza por aumento muito rápido da expressão dos genes da família das *HSPs*, em resposta ao calor ou outros desafios metabólicos (WELCH, 1992; MEYER; SILVA, 1999).

As *HSPs* são agrupadas em seis famílias proteicas de acordo com suas sequências de aminoácidos e com seus pesos moleculares (em kD): pequenas hsp (hsp30, hsp20 e hsp10), hsp40, hsp60, hsp70, hsp90 e hsp100. A proteína hsp60, codificada pelo gene *HSPD1*, se destaca por desempenhar papel na indução de resposta inflamatória ou processos imunorreguladores (CHEN et al., 1999; KILMARTIN; REEN, 2004). Além de atuar no sistema imune, a proteína hsp60 pode ser utilizada como biomarcador, sinalizando às células do sistema imune o estado das células do organismo, indicando perturbações na homeostase devido a estresse físico ou molecular (QUINTANA; COHEN, 2008).

Dentre os genes da família de proteínas de choque térmico, o gene *HSPA1A*, codificante da proteína hsp70, é o primeiro a ser induzido em resposta a diversos fatores estressantes (MUKHOPADHYAY et al., 2003). Porém, o aumento da síntese de hsp70 não ocorre somente em função da elevação da temperatura, mas também em função da proliferação celular (FEDER et al., 1992), presença de tumores (JÄÄTTELÄ, 1995), resistência à apoptose (WYATT et al., 1996), tolerância à endotoxinas (CHI; MESTRIL, 2017) e à radiação ultravioleta (SIMON et al., 1995), além de processos patológicos como infecções virais, bacterianas e parasitárias, bem como doenças autoimunes (CASTRO et al., 2013). A proteína hsp70 interage diretamente com elementos da via de apoptose, inibindo a cascata de eventos que culminam com a morte celular (MOSSER et al., 1997).

A proteína hsp90 é uma das mais abundantes em células de eucariotos, o que representa 1 a 2% das proteínas celulares na ausência de estresse (CRAVEN et al., 1996). Há duas principais isoformas de hsp90 no citoplasma celular, a hsp90 α que é codificada pelo gene *HSP90AA1* e é induzível e a hsp90 β que é codificada pelo gene *HSP90AB1* e apresenta expressão constitutiva (CHEN et al., 2006). O papel da proteína hsp90 tem sido extensivamente

estudado em vários processos celulares incluindo a transdução de sinal, dobramento e degradação de proteínas, sobrevivência celular e evolução morfológica (CSERMELY et al., 1998). A expressão induzida de hsp90 pode desempenhar importante papel na resistência ao estresse térmico em bovinos, como descrito por Deb et al., (2014), que compararam o padrão da expressão da hsp90 em vacas das raças Sahiwal (*Bos indicus*) e Frieswal (*Bos indicus x Bos taurus*) e observaram que a expressão de RNA mensageiro da hsp90 foi significativamente superior na raça Sahiwal, tanto *in vitro* como *in vivo*, sugerindo maior viabilidade celular em condições de estresse térmico para os animais zebuínos em relação aos animais cruzados (*Bos indicus x Bos taurus*).

2.6 Expressão de genes associados ao estresse térmico e eficiência alimentar

Os animais submetidos a situações de estresse manifestam a indução da secreção do hormônio liberador de corticotropina (CRH) pelo hipotálamo e do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela hipófise anterior. O ACTH estimula a adrenal, que sintetiza e libera adrenalina, noradrenalina e cortisol. O estresse ativa o eixo hipotálamo-pituitário-adrenal e aumenta os níveis plasmáticos do cortisol (KANEKO, 1997; DOBSON; SMITH, 2000), considerado o hormônio indicador de estresse.

O receptor glicocorticoide, codificado pelo gene *NR3C1* (nuclear receptor subfamily 3 group C member 1), está associado em sua forma inativa a um complexo multi-proteico de chaperonas moleculares, incluindo diversas *HSPs*. Durante a resposta a agentes estressores, o receptor glicocorticoide inibe a produção de cortisol (KLOET et al., 2009). O gene *NR3C1* está localizado no cromossomo 7 (54.344.785-54.491.863 bp) de bovinos, onde apresenta relação direta com os níveis de cortisol no metabolismo animal (MURÁNI et al., 2010). Estudos em suínos (POLETTTO et al., 2006) e em ovinos (SLOBODA et al., 2008) identificaram diferenças nos níveis de expressão do gene *NR3C1* quando os animais estão em situação de estresse. É importante salientar que o cortisol, também denominado de hormônio do estresse, tem sua ação mediadas por dois receptores corticosteróides intracelulares: o receptor mineralocorticóide (MR) e o receptor glicocorticóide (GR/NR3C1). Silva et al. (2013) observaram que a expressão de *NR3C1* está associada às concentrações de cortisol em bovinos da raça Nelore.

O gene *POMC* (proopiomelanocortin), localizado no cromossomo bovino 11 (74.117.368-74.124.990 bp), atua no comportamento ingestivo e homeostase energética (ZHANG et al., 2009). Estudos dos níveis de expressão do gene *POMC* em relação ao

crescimento e desenvolvimento animal demonstraram que a sua expressão é 42% menor em animais com baixo CAR, criados em ambientes com temperaturas elevadas (ZHANG et al., 2008; PERKINS et al., 2014). Com base nestes trabalhos, foi observado que o estresse térmico leva a menor expressão do gene anorexígeno *POMC* em animais mais eficientes, sugerindo que estes animais tiveram maior impulso para comer. Deobald e Buchanan (2011) identificaram SNPs no gene *POMC* que estão associados com qualidade de carcaça, área de olho de lombo, deposição de gordura e taxa de marmoreio em bovinos de corte mestiços. Em camundongos, foi observado um papel essencial do gene *POMC* para a função adrenal e peso corporal, além de estar relacionado com obesidade (CLARK, 2016).

O gene *ATPIA1* (ATPase Na⁺/K⁺ transporting subunit alpha 1) está localizado no cromossomo bovino 3, sua função está relacionada ao controle do gradiente eletroquímico de Na⁺ e K⁺ na membrana plasmática (DAS et al., 2015). Em animais das raças Tharparkar (raça indígena) e Vrindavani (mestiço) Kashyap et al. (2015) observaram que durante o verão a expressão do gene *ATPIA1* aumentou consideravelmente, estando positivamente correlacionada com a temperatura retal. O gene *ATPIA1* é considerado um potencial marcador de tolerância térmica para a seleção em bovinos (ANGEL et al., 2018; SEJIAN et al., 2018) auxiliando a combater os efeitos do estresse térmico. Polimorfismos deste gene foram identificados em animais da raça Deoni (BARANI et al., 2017); Jersey (DAS et al., 2015); Holandês (LIU et al., 2010), estes estudos demonstraram que o gene *ATPIA1* sofre alterações em sua expressão em resposta ao estresse térmico, além de apresentar alta variabilidade genética. Diante dos estudos já realizados, acredita-se em uma relação entre o estresse térmico, a concentração de sódio e potássio e o estresse oxidativo em mamíferos (BERNABUCCI et al., 2002; YANG, 2007; NARDONE et al., 2010; WANG et al., 2011 e DEB et al., 2015).

A leptina apresenta um importante papel na homeostase energética, no metabolismo endócrino e na imunidade dos animais (VICKERS; SLOBODA, 2012). O gene *LEP* está localizado no cromossomo bovino 4, a leptina é reguladora do metabolismo energético e influencia o comportamento ingestivo e reprodutivo em bovinos (Perkins et al., 2014). Alterações no sistema endócrino e consequentemente o aumento da secreção de leptina ocorre em animais submetidos ao estresse térmico (BERNABUCCI et al., 2002). O aumento da temperatura ambiental está associado a elevação dos níveis de leptina no metabolismo, Morera et al., (2012) observou em seus experimentos com ratos em estresse térmico, uma queda na glicemia, um aumento dos níveis de glicose e maior secreção de insulina e leptina. Correlações positivas entre a eficiência alimentar e a expressão da leptina foram observadas em bovinos de

corte cruzados no Canadá (NKRUMAH et al., 2004), em novilhas oriundas de cruzamento entre Limousin × holandês (KELLY et al., 2009) e na raça Angus (TRUJILLO et al., 2013). O aumento da secreção da leptina inibe a alimentação, fornecendo sensação de saciedade, através da inibição do neurotransmissor NPY e estimulação dos neurotransmissores POMC (VICKERS; SLOBODA, 2012; OH et al., 2016).

O neuropeptídeo Y, codificado pelo gene *NPY*, é um neurotransmissor chave do sistema nervoso central que desempenha um papel vital na homeostase da energia alimentar em mamíferos. O gene *NPY* (neuropeptide Y) está localizado em bovinos no cromossomo 4 (71.616.855-71.623.983 bp), cuja a expressão atua na regulação da ingestão de alimento (SHERMAN et al., 2008). O *NPY* influencia várias vias biológicas que regulam o apetite, o comportamento alimentar e a homeostase da energia em humanos e animais (TATEMOTO et al., 1982; WHITE, 1993; WYNNE et al., 2005; ARORA, 2006). Em um estudo sobre os efeitos do consumo energético elevado na composição da carcaça e na expressão do gene *NPY* em novilhas *Bos taurus indicus*, Diniz-Magalhães et al. (2017) concluíram que a aceleração da puberdade com alta ingestão energética está relacionada com maior taxa de gordura corporal e menor expressão do gene *NPY*. O *NPY* também está ligado ao aumento dos níveis plasmáticos de insulina e de corticosteróides, o qual pode atuar como mediador em algumas ações da leptina no hipotálamo (HOSSNER, 1998). Perkins et al. (2014) identificaram maior expressão de *NPY* em animais com baixo CAR, ou seja, animais mais eficientes tendem a apresentar expressão elevada de *NPY* em relação a animais menos eficientes.

As condições climáticas tendem a afetar a criação de bovinos de corte em países como o Brasil, onde a maior produtividade é garantida a partir de sistemas extensivos de produção (INÁCIO et al., 2018). A raça Nelore detém 80 % do rebanho destinado a produção de carne (ABCZ, 2020) enquanto que o rebanho Caracu tem em média 125 mil animais registrados pela Associação Brasileira de Criadores de Caracu (ABCCARACU, 2020). O estudo de genes que afetam a produção de carne em animais zebuínos e taurinos em decorrência das mudanças no meio ambiente demonstram a importância da busca por novas estratégias e soluções para o sistema pecuário, minimizando os efeitos prejudiciais do estresse térmico sobre os animais.

REFERÊNCIAS

- ABCZ, 2020. **Associação Brasileira dos criadores de Zebu**. Disponível em: <<http://www.abcz.org.br/Home/Conteudo/22889-Estatisticas>> <<http://www.abcz.org.br/Home/Conteudo/23985-Racas-Zebuinas>>
- ABCCARACU, 2020. **Associação Brasileira de Criadores de Caracu**. Disponível em: <<https://www.abccaracu.com.br/>>.
- AHMED, M. M. M.; EL AMIN, A. I. Effect of hot dry summer tropical climate on forage intake and milk yield in Holstein-Friesian and indigenous zebu cows in Sudan. **Journal of Arid Environments**, v. 35, n. 4, p. 737-746, 1997.
- ALEENA, J. et al. Significance of metabolic response in livestock for adapting to heat stress challenges. **Asian Journal of Animal Sciences**, v. 10, n. 4-5, p. 224-234, 2016.
- ANGEL, S. P. et al. Climate Change and Cattle Production: Impact and Adaptation. **Journal of Veterinary Medicine and Research**, v. 5, n. 4, p. 1134, 2018.
- ARORA, S.; ANUBHUTI. Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity - A review. **Neuropeptides**, v. 40, n. 6, p. 375-401, 2006.
- BACCARI JÚNIOR, F. Adaptação de sistemas de manejo na produção de leite em clima quente. In: Simpósio Brasileiro de Ambiência na Produção de Leite, Piracicaba, 1998. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 24-67.
- BARANI, A. et al. Genetic characterization and identification of single nucleotide polymorphisms of *ATPIA1* gene in Indian humped cattle. **Indian Journal of Animal Research**, v. 51, n. 1, p. 58-63, 2017.
- BASARAB, J. A. et al. Residual feed intake and body composition in young growing cattle. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 83, n. 2, p. 189-204, 2003.
- BEATTY, D. T. et al. Physiological responses of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle to prolonged, continuous heat and humidity. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. 4, p. 972-985, 2006.
- BERNABUCCI, U. et al. Metabolic and hormonal acclimation to heat stress in domesticated ruminants. **Animal**, v. 4, n. 7, p. 1167-1183, 2010.
- BERNABUCCI, U. et al. Markers of Oxidative Status in Plasma and Erythrocytes of Transition Dairy Cows During Hot Season. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n.9, p. 2173-2179, 2002.
- BERRY, D. P.; CROWLEY, J. J. Residual intake and body weight gain: A new measure of efficiency in growing cattle. **Journal of Animal Science**, v. 90, n. 1, p. 109-115, 2012.
- BROWN-BRANDL, T. M. Understanding heat stress in beef cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 47, p. 1-9, 2018.
- CANTALAPIEDRA-HIJAR, G. et al. Review: Biological determinants of between-animal variation in feed efficiency of growing beef cattle. **Animal**, v. 12, n. 2, p. 321-335, 2018.
- CASTRO, Simone Vieira et al. Proteínas de choque térmico hsp70: estrutura e atuação em resposta ao estresse celular. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 7, n. 4, p. 261-271, 2013.
- CHEN, B.; ZHING, D.; MONTEIRO, A. Comparative genomics and evolution of the HSP90

- family of genes across all kingdoms of organisms. **BMC Genomics**, v.7, p.156-175, 2006.
- CHEN, W. et al. Human 60-kDa heat-shock protein: a danger signal to the innate immune system. **The Journal of Immunology**, v. 162, n. 6, p. 3212-3219, 1999.
- CHI, S. H.; MESTRIL, R. Stable expression of a human *HSP70* gene in a rat myogenic cell line confers protection against endotoxin. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 270, n. 4, p. 1017-1021, 2017.
- CLARK, A. J. L. 60 YEARS OF POMC: The proopiomelanocortin gene: discovery, deletion and disease. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 56, n. 4, p. 27-37, 2016.
- CRAVEN, R. A. et al. A novel hsp70 of the yeast ER lumen is required for the efficient translocation of a number of protein precursors. **The EMBO Journal**, v. 15, n. 11, p. 2640-2650, 1996.
- CROWLEY, J. J. et al. Phenotypic and genetic parameters for different measures of feed efficiency in different breeds of Irish performance-tested beef bulls. **Journal of Animal Science**, v. 88, n. 3, p. 885-894, 2010.
- CSERMELY, P. et al. The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 79, n. 2, p. 129-68, 1998.
- Das R. et al. Impact of heat stress on health and performance of dairy animals: A review. **Veterinary World**, v. 9, n. 3, p. 260-268, 2016.
- 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. 435-440, 2014.
- DEOBALD, H. M.; BUCHANAN, F. C. Characterization of two Pro-opiomelanocortin gene variants and their effects on carcass traits in beef cattle. **BMC Genetics**, v. 12, n. 1, p. 2, 2011.
- DETWEILER, D. K. Regulação cardíaca. In: DUKES, H. H. (Ed.). **Fisiologia dos animais domésticos**. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. p. 942.
- DINIZ-MAGALHÃES, J. et al. Effect of high energy intake on carcass composition and hypothalamic gene expression in *Bos indicus* heifers. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 46, n. 8, p. 664-669, 2017.
- DOBSON, H.; SMITH, R. What is stress, and how does it affect reproduction? **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 743-752, 2000.
- EL-TARABANY, M. S.; EL-TARABANY, A. A.; ATTA, M. A. Physiological and lactation responses of Egyptian dairy Baladi goats to natural thermal stress under subtropical environmental conditions. **International Journal of Biometeorology**, v. 61, n. 1, p. 61-68, 2017.
- FEDER, J. H. et al. The consequences of expressing hsp70 in *Drosophila* cells at normal temperatures. **Genes & Development**, v. 6, n. 8, p. 1402-1413, 1992.
- FIGUEIREDO, D. M. et al. The phenotypic relationship between residual intake and gain and other feed efficiency traits in Nellore cattle. **Tropical Animal Health and Production**, v. 51, n. 2, p. 449-456, 19 fev. 2019.
- FONSECA, W. J. L. et al. Comportamento ingestivo e respostas termorregulatórias de equinos

em atividades de pastejo. **Journal of Animal Behaviour and Biometeorology**, v. 3, n. 1, p. 28-34, 2015.

GAUGHAN, J. B. et al. Assessing the heat tolerance of 17 beef cattle genotypes. **International Journal of Biometeorology**, v. 54, n. 6, p. 617-627, 2010.

GAUGHAN, J. B. et al. Heat tolerance of Boran and Tuli crossbred steers. **Journal of Animal Science**, v. 77, n. 9, p. 2398, 1999.

GEBREMEDHIN, K. G.; NI, H.; HILLMAN, P. E. Modeling temperature profile and heat flux through irradiated fur layer. **Transactions of the ASAE**, v. 40, n. 5, p. 1441-1447, 1997.

GODYŃ, D.; HERBUT, P.; ANGREGKA, S. Measurements of peripheral and deep body temperature in cattle - A review. **Journal of Thermal Biology**, v. 79, p. 42-49, 2019.

GRANDIN, T. Evaluation of the welfare of cattle housed in outdoor feedlot pens. **Veterinary and Animal Science**, v. 1-2, p. 23-28, 2016.

GROSSI, D. do A. et al. Effect of IGF1, GH, and PIT1 markers on the genetic parameters of growth and reproduction traits in Canchim cattle. **Molecular Biology Reports**, v. 42, n. 1, p. 245-251, 2015.

HABEEB, A. et al. Negative Effects of Heat Stress on Growth and Milk Production of Farm Animals. **Journal of Animal Husbandry and Dairy Science**, v. 2, n. 1, p. 1-12, 2018.

HANSEN, P. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 349-360, 2004.

HOSSNER, K. L. Cellular, molecular and physiological aspects of leptin: Potential application in animal production. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 78, n. 4, p. 463-472, 1998.

INÁCIO, M. C. P. et al. Intensive system x extensive in the cattle breeding. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 16, n. 1, p. 1-9, 2018.

IZ, 2020. **Instituto de Zootecnia - Centro Avançado de Pesquisa de Bovinos de Corte**. Secr. Agric. e Abast. São Paulo. Disponível em: <<http://www.iz.sp.gov.br/pagina.php?id=33>>.

JÄÄTTELÄ, M. Over-expression of hsp70 confers tumorigenicity to mouse fibrosarcoma cells. **International Journal of Cancer**, v. 60, n. 5, p. 689-693, 1995.

JUNG, U. S. et al. Upregulated heat shock protein beta-1 associated with caloric restriction and high feed efficiency in longissimus dorsi muscle of steer. **Livestock Science**, v. 202, p. 109-114, 2017.

KANEKO, J. J. Serum proteins and the disproteinemias. In: **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. HARVE, J.W. (Ed.) San Diego: Academic Press, 1997. p. 117-138.

KASHYAP, N. et al. Association of *ATPIA1* gene polymorphism with thermotolerance in Tharparkar and Vrindavani cattle. **Veterinary World**, v. 8, n. 7, p. 892-897, 2015.

KELLY, A. K. et al. mRNA expression of genes regulating oxidative phosphorylation in the muscle of beef cattle divergently ranked on residual feed intake. **Physiological Genomics**, v. 43, n. 1, p. 12-23, 2011.

KENNY, D. A. et al. Invited review: Improving feed efficiency of beef cattle - The current state of the art and future challenges. **Animal**, v. 12, n. 9, p. 1815-1826, 2018.

KILMARTIN, B.; REEN, D. J. *HSP60* induces self-tolerance to repeated *HSP60* stimulation and cross-tolerance to other pro-inflammatory stimuli. **European Journal of Immunology**, v. 34, n. 7, p. 2041-2051, 2004.

KLEIN, B. G. **Cunningham Tratado De Fisiologia Veterinária**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

KLOET, E. R. de et al. Glucocorticoid signaling and stress-related limbic susceptibility pathway: About receptors, transcription machinery and microRNA. **Brain Research**, v. 1293, p. 129-141, 2009.

KOCH, R. M. et al. Efficiency of feed use in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 22, n. 2, p. 486-494, 1963.

LI, Q.L. et al. Two Novel SNPs in *HSF1* Gene are associated with thermal tolerance traits in Chinese Holstein cattle. **DNA and Cell Biology**, v. 30, n. 4, p. 247-254, 2011.

LIU, Yanxin et al. A novel SNP of the *ATPIA1* gene is associated with heat tolerance traits in dairy cows. **Molecular biology reports**, v. 38, n. 1, p. 83-88, 2011.

MARAI, I. F. M.; HAEEB, A. A. M. Buffalo's biological functions as affected by heat stress - A review. **Livestock Science**, v. 127, n. 2-3, p. 89-109, 2010.

McMANUS, C. M. et al. A raça Caracu. **INCT: Informação Genético-Sanitária da Pecuária Brasileira**, 2010.

MEHLA, K. et al. Genome-wide analysis of the heat stress response in Zebu (Sahiwal) cattle. **Gene**, v. 533, n. 2, p. 500-507, 2014.

MEYER, T. N.; SILVA, A. L. D. Resposta celular ao estresse. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 45, n. 2, p. 181-188, 1999.

MISZTAL, I. Breeding and genetics symposium: Resilience and lessons from studies in genetics of heat stress. **Journal of Animal Science**, v. 95, p. 1780-1787, 2017.

MORAES, G. F. et al. Selection for feed efficiency does not change the selection for growth and carcass traits in Nellore cattle. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 136, n. 6, p. 464-473, 2019.

MORERA, Patrizia et al. Chronic heat stress up-regulates leptin and adiponectin secretion and expression and improves leptin, adiponectin and insulin sensitivity in mice. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 48, n. 2, p. 129, 2012.

MOSSER, D. et al. Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. **Molecular and Cellular Biology**, v. 17, n. 9, p. 5317-5327, 1997.

MUKHOPADHYAY, I.; SAXENA, D. K.; CHOWDHURI, D. K. Hazardous effects of effluent from the chrome plating industry: 70 kDa heat shock protein expression as a marker of cellular damage in transgenic *Drosophila melanogaster* (hsp70-lacZ). **Environmental Health Perspectives**, v. 111, n. 16, p. 1926-1932, 2003.

MURÁNI, E. et al. Association of HPA axis-related genetic variation with stress reactivity and aggressive behaviour in pigs. **BMC Genetics**, v. 11, n. 1, p. 74, 2010.

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.

- NKRUMAH, J. D. et al. Relationships of feedlot feed efficiency, performance, and feeding behavior with metabolic rate, methane production, and energy partitioning in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. 1, p. 145-153, 2006.
- OH, T. S. et al. Hypothalamic AMPK-induced autophagy increases food intake by regulating *NPY* and *POMC* expression. **Autophagy**, v. 12, n. 11, p. 2009-2025, 2016.
- OLIVEIRA, J. H. F.; MAGNABOSCO, C. U.; BORGES, A. M. S. M. Nelore : Base Genética e Evolução Seletiva no Brasil. **Embrapa Cerrados**, p. 50, 2002.
- PADDOCK, Z. D. **Energy expenditure in growing heifers with divergent residual feed intake phenotypes. Effects and interactions of metaphylactic treatment and temperament on receiving steers**. 2010. 51 f. Ph. D. Thesis (Nutrition and Food Science) - Texas A&M University, 2010.
- PAGLIARONE, A. C.; SFORCIN, J. M. Estresse: revisão sobre seus efeitos no sistema imunológico Stress: review about the effects on the immune system. **Biosaúde**, v. 11, n. 1, p. 57-90, 2009.
- PEREIRA, A. M. F. et al. Effect of thermal stress on physiological parameters, feed intake and plasma thyroid hormones concentration in Alentejana, Mertolenga, Frisian and Limousine cattle breeds. **International Journal of Biometeorology**, v. 52, n. 3, p. 199-208, 2008.
- PERKINS, S. D. et al. Effect of residual feed intake on hypothalamic gene expression and meat quality in Angus-sired cattle grown during the hot season. **Journal of Animal Science**, v. 92, n. 4, p. 1451-1461, 2014.
- POLETTI, R. et al. Effects of early weaning and social isolation on the expression of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 and 2 mRNAs in the frontal cortex and hippocampus of piglets. **Brain Research**, v. 1067, n. 1, p. 36-42, 2006.
- PROSSER, C. L.; HEATH, J. E. Temperature. In: PROSSER, C. L. (Ed) **Comparative Animal Physiology, Environmental and Metabolic Animal Physiology**. 4th ed. New York: Wiley; 1991. p. 109-166.
- QUINTANA, F. J.; COHEN, I. R. Regulatory T cells and immune computation. **European Journal of Immunology**, v. 38, n. 4, p. 903-907, 2008.
- RENAUDEAU, D. et al. Adaptation to hot climate and strategies to alleviate heat stress in livestock production. **Animal**, v. 6, n. 5, p. 707-728, 2012.
- RIBEIRO, A. R. B. et al. Características das glândulas sudoríparas de bovinos Nelore, Senepol x Nelore e Angus x Nelore. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 47, 2010, Salvador. **Anais...** Salvador: SBZ, 2010.
- RICHARDSON, E. C.; HERD, R. M. Biological basis for variation in residual feed intake in beef cattle. 2. Synthesis of results following divergent selection. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 44, n. 5, p. 431, 2004.
- SANTANA, M. H. de A. et al. The genetic and genomic effects of Nellore lineages on feed efficiency, intake and performance. **Livestock Science**, v. 228, p. 104-108, 2019.
- SEJIAN, V. et al. Review: Adaptation of animals to heat stress. **Animal**, v. 12, n. 2, p. 431-444, 2018.

SHERMAN, E. L. et al. Polymorphisms and haplotypes in the bovine Neuropeptide Y, Growth Hormone Receptor, Ghrelin, Insulin-like Growth Factor 2, and Uncoupling Pproteins 2 and 3 genes and their associations with measures of growth, performance, feed efficiency, and carcass merit in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 1, p. 1-16, 2008.

SILVA, B. et al. Avaliação da expressão gênica dos receptores mineralocorticoide e glicocorticoide em relação a características endócrinas associadas ao estresse em bovinos Nelore. In: Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal, 10, 2013, Uberaba. **Anais...** Uberaba: SBMA, 2013.

SIMON, M. et al. Heat shock protein 70 overexpression affects the response to ultraviolet light in murine fibroblasts. Evidence for increased cell viability and suppression of cytokine release. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 95, n. 3, p. 926-933, 1995.

SLOBODA, D. M. et al. Expression of glucocorticoid receptor, mineralocorticoid receptor and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 and 2 in the fetal and postnatal ovine hippocampus: ontogeny and effects of prenatal glucocorticoid exposure. **Journal of Endocrinology**, v. 197, n. 2, p. 213-220, 2008.

SPRITZE, Á. et al. Caracterização genética da raça bovina Crioulo Lageano por marcadores moleculares RAPD. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 38, n. 10, p. 1157-1164, 2003.

SUMMER, A. et al. Impact of heat stress on milk and meat production. **Animal Frontiers**, v. 9, n. 1, p. 39-46, 2019.

TAKAHASHI, M. Heat stress on reproductive function and fertility in mammals. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 11, n. 1, p. 37-47, 2012.

TATEMOTO, K. et al. Neuropeptide Y - a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. **Nature**, v. 296, n. 15, p. 659-660, 1982.

TROVO, J. B. F.; DUARTE, F. A. M. Levantamento de núcleos de criação de bovinos da raça Caracu no Brasil. **Zootecnia**, v.19, p.245-263, 1981.

TRUJILLO, A. I. et al. Association of SNP of neuropeptide Y, leptin, and *IGF-1* genes with residual feed intake in confinement and under grazing condition in Angus cattle. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 9, p. 4235-4244, 2013.

VICKERS, M. H.; SLOBODA, D. M. Leptin as mediator of the effects of developmental programming. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 26, n. 5, p. 677-687, 2012.

WANG, Zeying et al. Novel SNPs in the *ATP1B2* gene and their associations with milk yield, milk composition and heat-resistance traits in Chinese Holstein cows. **Molecular biology reports**, v. 38, n. 3, p. 1749-1755, 2011.

WELCH, W. J. Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. **Physiological Reviews**, v. 72, n. 4, p. 1063-1081, 1992.

WERNER, J. et al. Concepts in physiological regulation: a thermoregulatory perspective. In: TAYLOR, N. A. S.; GROELLER, H. **Physiological bases of human performance during work and exercise**. 1. ed. Edinburgh: Elsevier, 2008, p. 325-340.

WEST, J. W. Effects of heat-stress on production in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 6, p. 2131-2144, 2003.

- WHITE, J. D. Neuropeptide Y: a central regulator of energy homeostasis. **Regulatory Peptides**, v. 49, n. 2, p. 93-107, 1993.
- WINDERS, T. M. et al. Impact of Shade in Beef Feedyards on Performance, Body Temperature, and Heat Stress Measures. **Nebraska Beef Cattle Reports**, p. 65-70, 2020.
- WYATT, S. et al. Trigeminal ganglion neurons are protected by the heat shock proteins hsp70 and hsp90 from thermal stress but not from programmed cell death following nerve growth factor withdrawal. **Molecular Brain Research**, v. 39, n. 1-2, p. 52-56, 1996.
- WYNNE, K. et al. Appetite control. **Journal of Endocrinology**, v. 184, n. 2, p. 291-318, 2005.
- YANG, S. Study on seasonal variation on some biochemical indices of blood and correlation between them and heat tolerance in Holstein cows. **Xinjiang Agric Univ**, p. 2835, 2007.
- ZHANG, C. L. et al. The polymorphism of bovine POMC gene and its association with the growth traits of Nanyang cattle. **Hereditas**, v. 31, n. 12, p. 1221-1225, 2009.
- ZHANG, X. et al. FK506 - Binding Protein 51 Regulates Nuclear Transport of the Glucocorticoid Receptor β and Glucocorticoid Responsiveness. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 49, n. 3, p. 1037-1047, 2008.

CAPÍTULO 2. CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DE ANIMAIS DAS RAÇAS NELORE E CARACU SUBMETIDOS AO ESTRESSE TÉRMICO

RESUMO

O aumento da temperatura ambiental provoca distúrbios na termorregulação animal, o que desencadeia uma série de modificações metabólicas e fisiológicas que afetam a eficiência da produção animal. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar as diferenças de parâmetros fisiológicos entre animais das raças Nelore e Caracu submetidos ao estresse térmico. Foram avaliados 78 novilhos de 12-15 meses de idade das raças Nelore e Caracu pertencentes ao rebanho do Instituto de Zootecnia de Sertãozinho-SP, onde foram realizadas as mensurações das temperaturas retal (TR) e superficial (TS), além das frequências cardíaca (FC) e respiratória (FR) dos animais, bem como a coleta de amostras de sangue para análise de cortisol. Também foram mensuradas temperatura ambiente (TA), umidade relativa (UR), temperatura do globo negro (T_GN) e cálculo do índice de tolerância ao calor (ITC). No período da manhã os animais permaneceram em seu ambiente natural e no período da tarde foram divididos em dois grupos: sol e sombra. Para a análise de variância dos dados foi utilizado o procedimento Mixed do SAS, em que o modelo incluiu os efeitos fixos de tratamento, raça e mês de coleta, além das interações entre os efeitos ($P < 0,05$). Os valores de ITC permaneceram próximos a 10 para animais de ambas as raças, o que demonstra a adaptabilidade ao ambiente tropical. A TR média para animais Caracu ($38,99 \pm 0,02^{\circ}\text{C}$) foi superior à obtida para Nelore ($38,87 \pm 0,02^{\circ}\text{C}$), bem como a TS que apresentou $37,08 \pm 0,11^{\circ}\text{C}$ para animais Caracu e $35,92 \pm 0,12^{\circ}\text{C}$ para Nelore. A FC não diferiu de maneira significativa ($P < 0,05$) entre as raças Nelore e Caracu. Animais da raça Caracu obtiveram FR elevada durante o estudo, o que está relacionado ao fato dos animais Caracu apresentarem TR e TS superiores aos animais Nelore. O nível de cortisol sérico também foi superior em animais da raça Caracu ($24,16 \pm 0,93 \text{ ng/mL}$) em relação aos animais da raça Nelore ($19,10 \pm 0,99 \text{ ng/mL}$). A raça Caracu, de origem taurina, demonstrou tolerância as condições ambientais da região tropical quando observados os parâmetros fisiológicos, porém apresentou menor índice de adaptabilidade ao serem comparados com a raça Nelore, os quais são de origem zebuína e, portanto, mais adaptados ao calor.

Palavras chave: bovinos de corte, cortisol, fisiologia, termorregulação.

1. INTRODUÇÃO

A produção animal tem sido influenciada por diversos fatores ao longo dos anos, o que impulsiona a investigação de pesquisas que minimiza os prejuízos e maximiza a eficiência produtiva. Em rebanhos de bovino de corte, um dos fatores preocupantes durante a última década é o aumento da temperatura ambiental. As características climáticas de uma região envolvem ação conjunta de agentes climáticos, como radiação solar, vento, temperatura, umidade, pluviosidade e pressão atmosférica que atuam diretamente e indiretamente na produção animal (GAUGHAN et al., 2008).

O aumento da temperatura ambiental acarreta distúrbios na termorregulação animal, interferindo nos mecanismos de troca de calor, gastos de energia e comportamento, os quais desencadeiam modificações metabólicas, fisiológicas e genéticas no metabolismo animal (ARCHANA et al., 2017; FARMER; FARRELL, 2018).

As raças destinadas à produção de carne apresentam características fisiológicas e morfológicas diferentes em decorrência da região em que habitam, sendo que muitos estudos buscam identificar raças mais adaptadas a determinado ambiente comparando animais zebuínos com taurinos (SCHARF et al., 2010; RENAUDEAU et al., 2012; KUMAR et al., 2018; VEISSIER et al., 2018). Animais das raças adaptadas como Senepol e Romosinuano apresentaram maior tolerância ao calor em comparação com animais da raça Brahman, Angus e Hereford em estudos realizados por Hammond et al. (1996). Ao longo do período evolutivo, a separação entre *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus* mostrou a aquisição de alelos que conferem maior termotolerância aos animais zebuínos (HANSEN, 2004).

A raça Nelore (*Bos taurus indicus*), de origem indiana, é considerada uma raça que apresenta tolerância ao calor devido a suas características corporais, uma vez que apresentam maior superfície corporal, maior número de glândulas sudoríparas, além do que apresentam uma taxa metabólica mais baixa (trato digestivo menor) em relação a animais taurinos, o que representa menor geração de calor (NAVARINI et al., 2009). A raça Caracu (*Bos taurus taurus*), embora de origem europeia, é considerada adaptada ao clima tropical. O fato de estar exposta a seleção natural por muitas gerações fez com que a raça Caracu se adaptasse às condições locais e desenvolvesse características que permitiu aos animais sobreviverem com uma dieta geralmente pobre em nutrientes, expostos a alta infestação por ectoparasitas e elevada temperatura ambiental (SPRITZE et al., 2003).

Diante da diversidade dos rebanhos de bovinos de corte no território brasileiro, o presente estudo objetivou avaliar as diferenças em parâmetros fisiológicos (temperaturas retal

e superficial, frequências cardíaca e respiratória) e nos níveis de cortisol sérico entre animais das raças Nelore e Caracu submetidos ao estresse térmico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local, Animais e Delineamento Experimental

O projeto foi realizado no Centro de Pesquisa de Bovinos de Corte, Instituto de Zootecnia em Sertãozinho (SP), onde foram realizadas as mensurações das temperaturas retais e superficiais, frequências cardíacas e respiratórias, além da coleta de amostras de sangue para dosagem de cortisol. As análises laboratoriais de mensuração de cortisol foram realizadas no Laboratório de Fisiologia Animal do Departamento de Ciências Básicas da FZEA/USP, Pirassununga-SP. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA n°237-16) do Instituto de Zootecnia.

A temperatura média anual em Sertãozinho é 24,7°C e a pluviosidade média anual é 1.446 mm (INMET, 2019). As avaliações ambientais consistiram na mensuração da temperatura do ambiente (TA), umidade relativa (UR) e temperatura do globo negro (T_GN), obtidas automaticamente a partir de duas bases de medidas meteorológicas de modelo HOBO U12-013 (Onset Computer Corporation, MA, EUA), em que uma base foi alocada à sombra e a outra base ao sol posicionadas a 1,5 metros de altura da superfície.

Foram avaliados 37 animais Nelore e 40 Caracu, todos machos com idade entre 12-15 meses de idade, pertencentes ao mesmo grupo de contemporâneos, recriados em pasto e suplementados em cocho. Os 77 animais foram mantidos em pastagens próximas ao curral de manejo durante todo período experimental, com espaço coberto (sombreamento) para todos os animais e com suplementação no cocho de acordo com as práticas de gestão realizadas no Centro de Pesquisa de Bovinos de Corte, Instituto de Zootecnia.

2.2 Avaliação de estresse térmico ambiental

Durante os meses de verão, quando as temperaturas atingem o pico (outubro a março), foram realizadas mensurações das temperaturas retal e superficial, bem como frequências cardíacas e respiratórias dos animais. Cada animal foi submetido ao estresse por calor (desafio) causado pela exposição ao sol por 2 horas em dias típicos de verão com T_GN acima de 45°C. Cada coleta foi realizada durante dois dias ensolarados consecutivos, totalizando quatro coletas

por animal, estas realizadas nos meses de outubro e dezembro de 2017 e fevereiro e março de 2018.

Os animais foram submetidos a três tratamentos: manhã (0) compreendeu manter todos os 77 animais em piquete com sombra e sol no período da manhã (8:00 às 10:00) afim de simular o ambiente real no qual os animais são mantidos durante sua vida produtiva; tarde sombra (1) os animais foram mantidos à sombra em curral coberto (piso em concreto, telhas de barro e pé direito de 3,5 m) com disponibilidade água e alimento no período das 11:00 às 13:00; e tarde sol (2) em que os animais foram mantidos ao sol em piquete anexo no período das 11:00 às 13:00.

Todas as colheitas fenotípicas experimentais foram realizadas em curral com tronco coberto imediatamente após cada tratamento, em que foram mensuradas a temperatura retal, temperatura da superfície corporal, frequências cardíaca e respiratória.

2.3 Parâmetros Fisiológicos

Para obtenção da temperatura retal (TR, °C) foi utilizado um termômetro clínico veterinário com escala até 44°C, introduzido no reto do animal (3,5 cm de profundidade) por um período de dois minutos. A coleta da temperatura da superfície foi realizada por meio de Termômetro Infravermelho ITTI 380 (Instrutemp, Br). Foram adotadas as medidas de três pontos de coleta de temperatura: face (perto dos olhos), dorsal e região caudal (perto da mucosa do ânus), as quais foram utilizadas para gerar a média de temperatura superficial (TS, °C) de cada animal.

Os animais foram conduzidos ao tronco de contenção e a frequência respiratória (FR, mov/min) obtida pela auscultação indireta das bulhas, com auxílio de estetoscópio flexível e cronômetro, por meio da contagem do número de movimentos durante 15 segundos, seguida de multiplicação do valor obtido por quatro para obtenção da FR em um minuto. A frequência cardíaca (FC, bat/min) foi obtida com auxílio de estetoscópio flexível e cronômetro por meio da contagem do número de batimentos cardíacos durante 15 segundos, a qual foi multiplicada por quatro para a obtenção da FC durante um minuto.

A determinação do estresse térmico foi realizada utilizando como referência o índice de tolerância ao calor: $ITC = 10 - (TR2 - TR1)$, determinado por Baccari Junior et al. (1986), em que TR2 corresponde a temperatura retal após a exposição ao sol (15:00 h.) e TR1 a temperatura retal antes da exposição (8:00 h.).

2.4 Níveis de cortisol sérico

As colheitas das amostras de sangue foram realizadas junto as demais coletas, a partir da veia caudal, em tubos a vácuo com heparina. As amostras de sangue dos animais foram colhidas antes (pela manhã - 7:30h) e após (à tarde - 15:00h) a realização do experimento, para dosagem do cortisol sérico. A quantificação da concentração de cortisol nas amostras de plasma colhidas antes e após a exposição do estresse pelo calor foram mensuradas com o kit imunoenzimático (Diagnostic Systems Laboratory Inc., USA), via método de ELISA.

2.5 Análises Estatísticas

Os dados foram avaliados utilizando o software SAS 9.2 (SAS Inst., Inc., Cary, NC, USA). O procedimento Univariate avaliou os dados quanto à normalidade e homocedasticidade, em que não foi rejeitada a hipótese nela (H_0), assumindo desta maneira a análise com base em métodos paramétricos. Para analisar o grau de associação entre os dados obtidos foi realizado o Teste de Correlação Linear de Pearson, com nível de significância de 5%.

Para avaliar as condições ambientais (TA, UR, T_GN) foi realizado a análise de variância por meio do procedimento GLM, considerando no modelo os efeitos fixos de tratamento e mês de coleta, considerando nível de significância de 5%,

$$Y_{ij} = \mu + T_i + M_j + \varepsilon_{ij}$$

em que:

Y_{ij} = valor da variável resposta no j -ésimo mês no i -ésimo tratamento;

μ - média geral;

T_i – efeito fixo do i -ésimo tratamento (i = manhã, tarde sombra, tarde sol);

M_j – efeito fixo do j -ésimo mês de coleta (j = outubro, dezembro, fevereiro e março);

ε_{ijklm} – erro aleatório associado do j -ésimo mês no i -ésimo tratamento.

As características TR, TS, FC, FR, ITC e cortisol sérico foram analisados utilizando o procedimento Mixed para medidas repetidas, sendo o ajuste do modelo verificado pelo critério de Akaike (AIC). O modelo incluiu os efeitos fixos de raça, tratamento e mês de coleta, além das interações entre os efeitos ($\alpha = 5\%$),

$$Y_{ijklm} = \mu + B_i + T_j + M_k + BT_{ij} + BM_{ik} + TM_{jk} + BTM_{ijkl} + \varepsilon_{ijklm}$$

em que:

Y_{ijklm} = observação do indivíduo m , do rebanho i , no tratamento j durante o mês k ;

μ - média geral;

B_i – efeito fixo da i -ésima raça ($i =$ Nelore, Caracu);

T_j – efeito fixo do j -ésimo tratamento ($j =$ manhã, tarde sombra, tarde sol);

M_k – efeito fixo do k -ésimo mês de coleta ($k =$ outubro, dezembro, fevereiro e março);

BT_{ij} – interação entre os efeitos da i -ésima raça e j -ésimo tratamento;

BM_{ik} – interação entre os efeitos da i -ésima raça e k -ésimo mês de coleta;

TM_{jk} – interação entre os efeitos do j -ésimo tratamento e k -ésimo mês de coleta;

BTM_{ijkl} – interação entre os efeitos da i -ésima raça, do j -ésimo tratamento e do k -ésimo mês de coleta;

ε_{ijklm} – erro aleatório associado a cada observação $ijklm$, suposto normalmente distribuído e independente com média zero e variância um.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As condições ambientais e sua variação ao longo do experimento são descritas na Tabela Suplementar A. O aumento da TA leva ao aumento da T_GN, promovendo desta maneira uma queda na UR (Tabela 1), o que interfere diretamente nas características fisiológicas dos animais. A alteração nas condições climáticas ambientais está associada a mudanças fisiológicas nos animais homeotérmicos (ALEENA et al., 2016; SEJIAN et al., 2018).

A TA obteve associação positiva mediana com a TR, TS. Já com a FC, FR e cortisol a associação da TA foi positiva, porém foi fraca (Tabela 1). A variação na TR (38°C a 39°C) está associada as alterações nas frequências cardíaca e respiratória e no cortisol sérico durante os tratamentos e meses estudados em ambas as raças (Tabela 1). Diante da exposição ao calor, o animal aumenta a taxa de respiração e a temperatura retal, evitando uma carga extra de calor no corpo e, conseqüentemente mantendo a homeotermia (ANGEL et al., 2018).

Tabela 1. Coeficientes de correlação linear de Pearson entre as variáveis.

	TA	UR	T_GN	TR	TS	FC	FR	CORT
TA	1,00	-0,88***	0,95***	0,43***	0,68***	0,13**	0,11**	0,15***
UR		1,00	-0,83***	-0,44***	-0,58***	-0,15**	-0,44***	-0,10**
T_GN			1,00	0,42***	0,67***	0,11**	0,04 ^{NS}	0,13**
TR				1,00	0,55***	0,24***	0,16***	0,11**
TS					1,00	0,11**	0,04 ^{NS}	0,06 ^{NS}
FC						1,00	0,22***	-0,05 ^{NS}
FR							1,00	-0,05 ^{NS}
CORT								1,00

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, NS $P > 0.05$.

Assim como no presente estudo, McManus et al. (2011) observaram que a TR apresentou correlação positiva com a temperatura ambiental (0,49) em raças bovinas criadas no Brasil. A temperatura retal está diretamente associada com os índices produtivos tanto em bovinos de leite (COLLIER et al., 2008) interferindo na produção de leite, como em bovinos de corte (BERNABUCCI et al., 2010) interferindo no ganho de peso (WEST, 2003; GRUBER et al., 2010).

A temperatura ambiental média observada durante o estudo foi de 32,1°C e se manteve próxima a 40°C no tratamento 2 (tarde sol) nos quatro meses de experimento. Os meses de dezembro e fevereiro não se diferiram significativamente ($P < 0,05$) em relação a TA. Observando a temperatura média em países tropicais durante o verão e os dados obtidos neste estudo, podemos inferir que os animais estão sob estresse térmico ao menos um período do dia, como pode ser notado ao analisar as temperaturas ambiental e de globo negro durante a exposição ao sol (39°C; 41°C) (Tabela 2). A zona de conforto térmico para bovinos em geral tem como limite inferior 13°C e um limite máximo de 30°C, com umidade relativa do ar entre 60 e 70% (AZEVEDO e ALVES, 2009; MAZZULLO et al., 2014; VAN IAER et al., 2015), sendo assim a TA neste estudo excedeu o limite máximo da zona de termoneutralidade dos bovinos.

Tabela 2. Médias estimadas, seguidas do erro padrão, para as variáveis temperatura ambiental (TA - °C), umidade relativa (UR - %) e temperatura do globo negro (T_GN - °C) de acordo com os efeitos fixos de tratamento (0: manhã, 1: tarde sombra e 2: tarde sol) e mês de coleta (outubro, dezembro, fevereiro e março).

	TA	UR	T_GN
Tratamentos			
0	28,01 ± 0,14 ^c	64,56 ± 0,37 ^a	28,79 ± 0,17 ^c
1	32,97 ± 0,19 ^b	46,91 ± 0,52 ^b	33,43 ± 0,24 ^b
2	39,75 ± 0,19 ^a	34,42 ± 0,52 ^c	41,59 ± 0,24 ^a
Mês			
Outubro	35,61 ± 0,21 ^a	33,11 ± 0,54 ^d	35,89 ± 0,26 ^a
Dezembro	32,62 ± 0,19 ^c	49,32 ± 0,53 ^c	35,05 ± 0,24 ^a
Fevereiro	32,12 ± 0,19 ^c	54,25 ± 0,51 ^b	32,02 ± 0,24 ^b
Março	33,96 ± 0,19 ^b	57,85 ± 0,52 ^a	35,47 ± 0,24 ^a

*Médias seguidas da mesma letra não se diferem entre si pelo Teste de Tukey 5%.

A UR apresentou ampla variação entre os meses de coleta e se manteve superior para o tratamento 0, seguido dos tratamentos 1 e 2. O tratamento 2 apresentou os menores índices de UR durante o estudo. A UR no mês de março foi superior aos demais meses (Tabela 2). Quando a temperatura do ambiente supera o valor máximo de conforto para o animal (~30°C em zebuínos), a umidade relativa do ar passa a ter papel fundamental nos mecanismos de dissipação de calor (PIRES; CAMPOS, 2008). A alta porcentagem de umidade relativa do ar dificulta a

liberação de calor por evaporação o que promove alterações nas respostas fisiológicas dos animais (SOUZA et al., 2007).

A T_{GN} atingiu o pico durante o mês de outubro sendo semelhante ao mês de dezembro e março, tendo uma queda no mês de fevereiro. Os tratamentos 0, 1 e 2 influenciaram a T_{GN}, sendo superior no tratamento 2 (Tabela 2). No presente estudo foi possível notar que ao longo dos meses a T_{GN} foi superior no período da tarde quando os animais estavam expostos ao sol, o que já era esperado, tendo em vista que foram selecionados dias quentes de verão onde as temperaturas tendem a se elevar no período da tarde.

A variação da T_{GN} ao longo do dia relatada por Ribeiro et al. (2008) em estudo com bovinos de corte (Nelore e cruzados Angus x Nelore e Senepol x Nelore) foi de 16°C a 39°C, menor que a observada no presente estudo. Em um estudo com rebanho de corte Angus x Charolês foi observada T_{GN} em torno de 27°C na sombra e 34°C ao sol durante o período da manhã, enquanto no período da tarde foram observadas as temperaturas de 35°C na sombra e 44°C ao sol (MARQUES et al., 2006) corroborando com os resultados aqui apresentados.

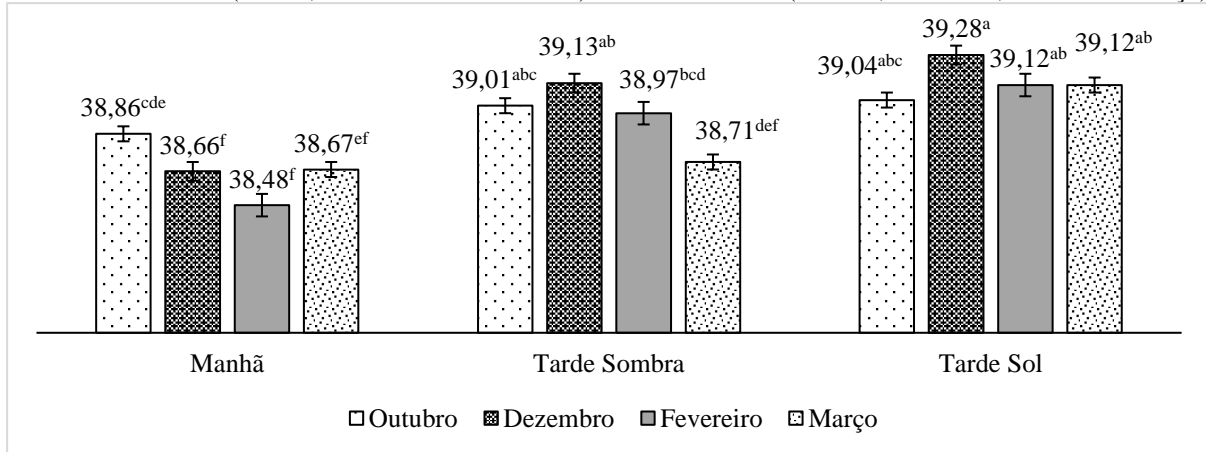
Animais da raça Caracu apresentaram TR ($38,99 \pm 0,02^\circ\text{C}$) superior ($P = 0,0001$) aos animais da raça Nelore ($38,85 \pm 0,03^\circ\text{C}$) (Figura 3). A TR é utilizada para avaliar a adaptabilidade dos animais em climas quentes, a qual é dependente das trocas de calor (FAÇANHA et al., 2013; BARBOSA et al., 2014), diante do fato de zebuínos apresentarem maior adaptabilidade ao calor em relação aos taurinos esta diferença na TR entre as raças estudadas era esperada. Sendo assim a raça Nelore se mostrou melhor adaptada ao ambiente tropical em comparação com a raça Caracu em relação aos índices de TR.

A média de TR obtida para a raça Nelore neste estudo foi semelhante à descrita por Barbosa et al. (2014) equivalente a 39,5°C em Nelore branco e vermelho. Em estudo com animais das raças Sahiwal (*Bos indicus*) e Frieswal (*Bos indicus* x *Bos taurus*) não foi observada diferença significativa na TR diante da elevação da temperatura ambiental durante os meses de março a maio, típicos de verão na Índia (DEB et al., 2014).

A interação entre tratamento e mês afetou significativamente ($P < 0,05$) a TR dos animais, sendo o tratamento tarde sol nos meses de dezembro (TA: 36,4°C), fevereiro (TA:40,5°C) e março (TA:41,9°C) superior aos demais tratamentos e meses. Porém a TR obtida nos animais no tratamento tarde sombra em dezembro (TA: 31,6°C) não foi diferente da TR obtida no tratamento tarde sol nos meses de estudo. O mês de fevereiro apresentou a menor TR no tratamento manhã tendo apresentado TA igual a 25°C, enquanto o mês de dezembro apresentou a maior TR no tratamento tarde sol nos animais Nelore e Caracu ($38,48 \pm 0,08^\circ\text{C}$ e

39,28 ± 0,06°C; P < 0,05) sendo a TA neste tratamento em dezembro foi igual a 36,4°C. (Figura 3).

Figura 3. Temperatura retal (TR - °C) observada em animais das raças Nelore e Caracu de acordo com a interação entre os tratamentos (manhã, tarde sombra e tarde sol) e o mês de coleta (outubro, dezembro, fevereiro e março).



*Médias seguidas de letras diferentes, no mesmo tratamento, diferem entre si pelo teste de Tukey ($\alpha < 0,05$).

Fonte: Arquivo Pessoal (2018).

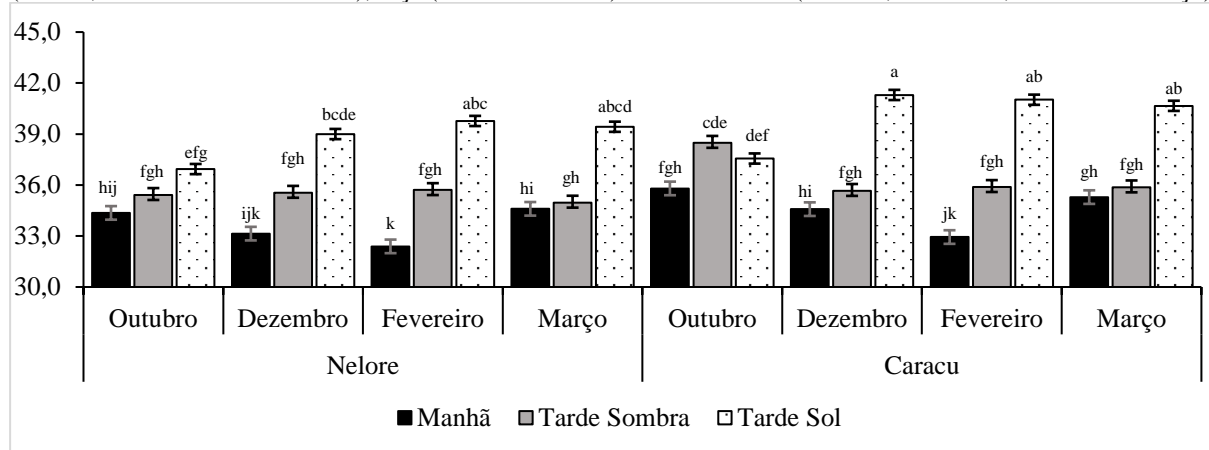
A TR dos animais no tratamento manhã foi estatisticamente superior em outubro em relação aos meses de dezembro e fevereiro, sendo que em outubro foi observada a maior TA (30,5°C). A TR obtida nos animais no tratamento tarde sombra em março foi menor ($P < 0,05$) que a TR obtida no mesmo tratamento, nos demais meses estudados. A menor TR relatada está associada a TA mínima de 29°C e máxima de 33°C, com umidade relativa média de 58%. A TR obtida nos animais no tratamento tarde sol não diferiu estatisticamente ao longo dos quatro meses estudados (Figura 3), sendo que o tratamento tarde sol apresentou as maiores TA, com médias entre 36°C a 42°C ao longo dos meses estudados.

A TS foi influenciada ($P = 0,0045$) pela interação tripla entre tratamento, raça e mês de coleta (Figura 4). As raças Nelore e Caracu apresentaram diferença na TS no mês de outubro no tratamento 1 e no mês de dezembro no tratamento 2 ($P < 0,0001$). Nos demais meses e tratamentos não foi observada diferença na TS entre as raças estudadas. A maior média de TS foi observada no tratamento 2 durante o mês de dezembro para a raça Caracu ($41,30 \pm 0,36^\circ\text{C}$), a qual se diferiu significativamente dos tratamentos 0 e 1 nos demais meses e tratamentos (Figura 4).

As diferenças observadas na TS durante os meses estudados provêm da variação na umidade relativa e temperatura ambiental. Considerando que a dissipação de calor ocorre através da pele do animal, a evaporação se torna responsável pelo controle homeostático na

dificuldade da troca de calor para o ambiente (KLEIN, 2014). Sendo assim a TS é influenciada pelos fatores climáticos (COLLIER et al., 2008; GAUGHAN et al., 2010).

Figura 4. Médias estimadas da temperatura superficial (TS - °C) de acordo com a interação tripla entre tratamento (manhã, tarde sombra e tarde sol), raça (Caracu e Nelore) e mês de coleta (outubro, dezembro, fevereiro e março).



*Médias seguidas de letras diferentes, no mesmo tratamento, diferem entre si pelo teste de Tukey ($\alpha < 0,05$).

Fonte: Arquivo Pessoal (2018).

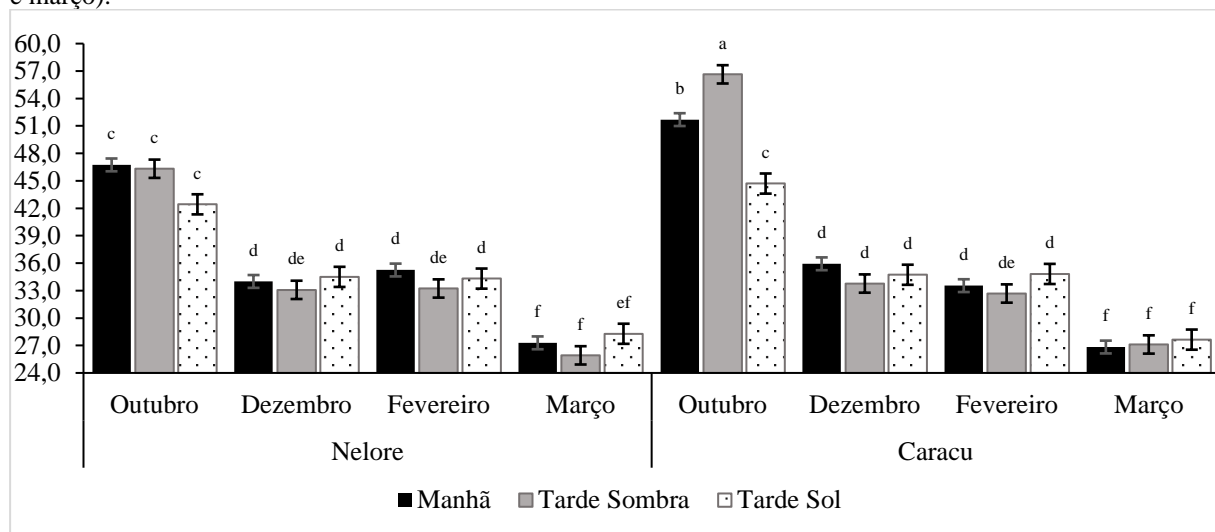
A menor TS ocorreu na raça Nelore no tratamento 0 no mês de fevereiro ($32,39 \pm 0,35^{\circ}\text{C}$), sendo diferente da média obtida nos meses de outubro ($P < 0,0001$) e março ($P = 0,0008$) na mesma raça e tratamento. A menor TS em Nelore não é diferente significativamente da menor média de TS observada na raça Caracu no mês de fevereiro ($32,94 \pm 0,35^{\circ}\text{C}$), também no tratamento 0 (Figura 4). Atentando para os resultados obtidos pode ser inferido que a exposição ao sol afetou a temperatura de superfície tanto em animais Nelore como em Caracu, demonstrando a importância de estratégias que amenizem o efeito da temperatura ambiental sobre a criação de bovinos de corte.

A elevação na TS durante a exposição ao sol no período da tarde em relação aos demais tratamentos, corrobora com o coeficiente de correlação entre TS e TA, que foi positivo e alto (0,68) (Tabela 1). O aumento da TS durante o período de exposição ao sol também foi verificado por Souza et al. (2007) e Barbosa et al. (2014), sendo que em situações de estresse térmico o fluxo sanguíneo é aumentado do núcleo central para a superfície do animal, o que acarreta o aumento da temperatura superficial (CARVALHO et al., 1995).

A TS também é influenciada pela coloração, comprimento e densidade do pelo que afetam a adaptação dos animais em regiões tropicais, sendo que pelos curtos, pele fina e menos quantidade de folículos pilosos por unidade de área estão diretamente ligados à maior adaptabilidade às condições quentes (SEJIAN et al., 2018), cujas diferenças são notadas entre animais da raça Nelore e Caracu. Estas diferenças interferem na resposta do animal frente a exposição ao sol, porém não foram avaliadas neste estudo.

A FR mínima nos animais estudados foi de 25,9 e a máxima de 56,6 movimentos/minuto. As medidas normais de FR em bovinos adultos variam de 10 a 30 respirações por minuto, mas podem apresentar variações entre 12 e 36 respirações/minuto (GAUGHAN et al., 1999; BACCARI JÚNIOR, 2001). A temperatura externa ao se elevar diante da intensificação da temperatura ambiental, diminui a perda de calor por radiação e aumenta a perda através da respiração animal, o que incide sobre a frequência respiratória (McMANUS et al., 2009; COSTA et al., 2015).

Figura 5. Médias estimadas de frequência respiratória (FR- mov/min) de acordo com a interação tripla entre tratamento (manhã, tarde sombra e tarde sol), raça (Caracu e Nelore) e mês de coleta (outubro, dezembro, fevereiro e março).



*Médias seguidas de letras diferentes, no mesmo mês, diferem entre si pelo teste de Tukey ($\alpha < 0,05$).

Fonte: Arquivo Pessoal (2018).

Animais da raça Nelore obtiveram FR semelhante nos meses de outubro e março, não tendo sido observado diferença significativa entre os tratamentos 0, 1 e 2. Diante destes resultados é possível inferir que o estresse térmico não foi suficiente para provocar alterações na frequência respiratória nos animais da raça Nelore nestes meses. Animais da raça Caracu apresentaram FR superior no mês de outubro para o tratamento 1, sendo estatisticamente diferente dos tratamentos 0 e 2. A temperatura ambiental no tratamento 1 no mês de outubro foi de 35,8°C e a umidade relativa igual a 31%. Nos demais meses estudados não foi observada diferença significativa para a FR entre os tratamentos 0, 1 e 2 na raça Caracu (Figura 5).

A FR observada nos tratamentos 0, 1 e 2 nos meses de dezembro, fevereiro e março não foi diferente ($P > 0,05$) entre animais Nelore e Caracu. Utilizando a FR como critério, pode-se considerar que a raça Caracu e Nelore são raças com tolerância ao ambiente tropical, possivelmente apresentando limites superiores de TR, TS e FR em comparação a outras raças. Animais da raça Caracu obtiveram frequência respiratória mais elevada durante o estudo, o que

está relacionado ao fato dos animais Caracu apresentarem também a TR e TS superiores em relação aos animais Nelore (Figura 5), além do fato de ser uma raça taurina, que apesar de adaptada ainda apresenta diferenças no perfil de termotolerância em relação aos animais zebuínos (BROWN-BRANDL, 2018). Estudos realizados por Ribeiro et al. (2008) obtiveram resultados semelhantes ao do presente estudo, em que animais *Bos taurus* apresentaram média de FR superior a animais *Bos indicus* (41,52 mov/min e 35,19 mov/min respectivamente).

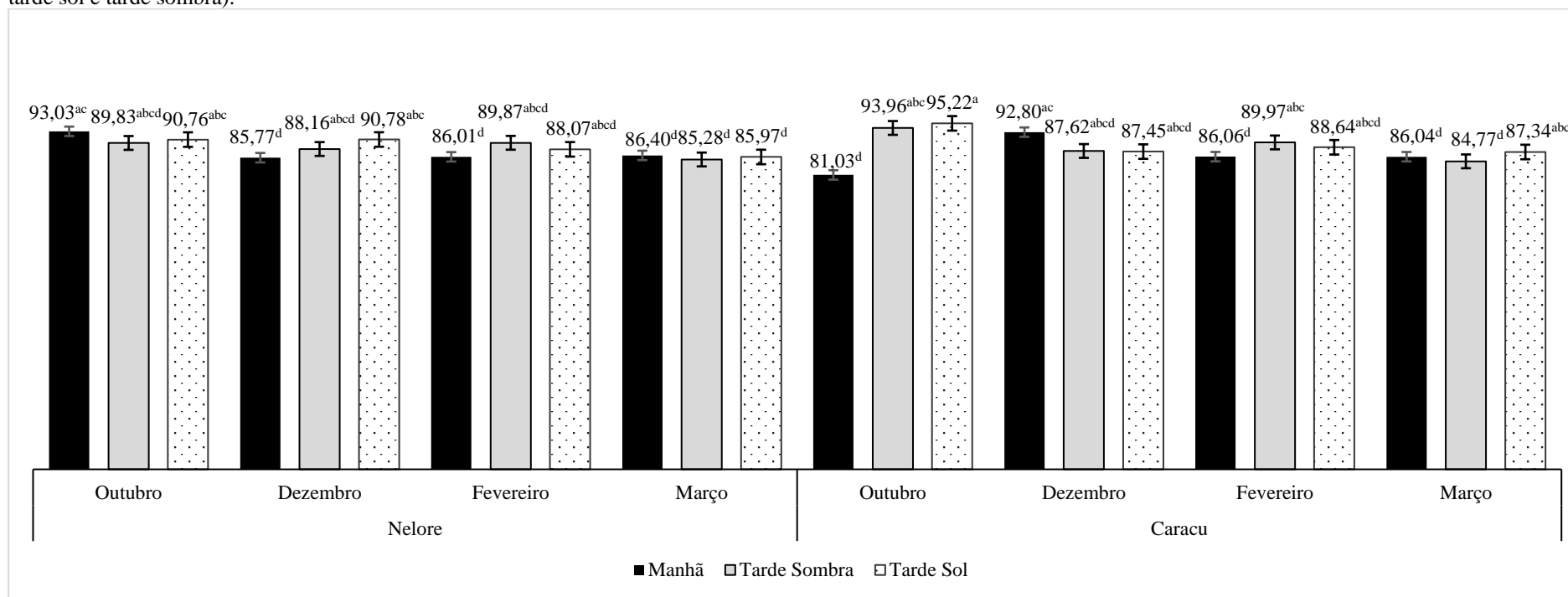
A FC nos animais Nelore e Caracu mínima foi de 81,03 bpm e máxima de 95,22 bpm, a FC normal para bovinos varia entre 48 a 80 bpm (DETWEILER, 2017), embora possa ser elevada em condições adversas. Como foi observado neste estudo, em que o aumento da temperatura ambiental e a queda na umidade observadas entre os tratamentos sol e manhã nos meses estudados afetou a TR e, conseqüentemente a FC. Ressaltando que estas características apresentaram correlação significativa positiva (0,24) nos animais estudados.

Ao analisar a interação tripla entre tratamento, raça e mês foi possível observar que a maior média de FC (95,22 bpm) foi resultante do tratamento 2 na raça Caracu no mês de outubro. Animais Caracu também apresentaram a menor média de FC (81,03 bpm) no tratamento 0 no mês de outubro (Figura 6). A FC obtida em animais da raça Nelore no tratamento 0 em outubro foi diferente ($P < 0,01$) da FC obtida na raça nos meses de dezembro e fevereiro no mesmo tratamento (Figura 6), demonstrando que a FC pode ser alterada conforme as características climáticas no momento de aferição. Sendo que a FC obteve correlação linear positiva com TA e T_GN e negativa com a UR (Tabela 1).

Diferenças entre as raças Nelore e Caracu foram observadas na FC no mês de outubro durante o tratamento 0, em que animais Nelore obtiveram maior FC em comparação com animais Caracu ($P < 0.0001$). A FC está associada a ativação do sistema nervoso autônomo, podendo ser elevada conforme a reatividade do animal (BOND et al., 2012), sabemos que a raça Nelore é caracterizada por uma maior reatividade em comparação a outras raças, como as taurinas europeias (GRANDIN, 2000), o que justifica a maior FC em animais Nelore no tratamento da manhã em comparação aos animais Caracu.

A FC obtida em ambas as raças no tratamento 1 ao longo dos meses estudados não se diferiram entre si. Na raça Caracu foi observado uma diferença estatística na FC no tratamento 0 entre os meses de outubro (81,03 bpm) e dezembro (92,80 bpm). Ao longo do estudo foi observado uma menor FC no tratamento manhã em relação aos demais tratamentos em ambas as raças (Figura 6). A alteração da FC representa a ação conjunta do organismo frente ao estresse térmico, estando associada a FR, TS e TR (WERNER et al., 2008; KLEIN, 2014; GODYŃ et al., 2019).

Figura 6. Frequência Cardíaca (bpm) obtidas a partir da interação entre raça (Nelore e Caracu), mês de coleta (outubro, dezembro, fevereiro e março) e tratamentos (manhã, tarde sol e tarde sombra).



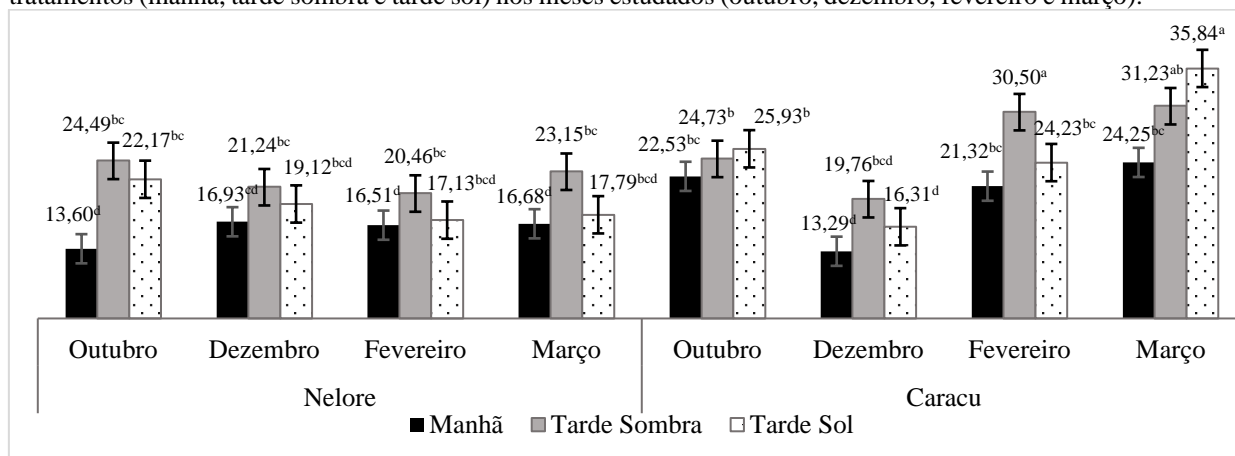
*Médias seguidas de letras diferentes, no mesmo tratamento, diferem entre si pelo teste de Tukey ($\alpha < 0,05$).

Fonte: Arquivo Pessoal (2018).

A avaliação dos níveis de cortisol sérico é utilizada por muitos autores como medida indicativa de estado de estresse do animal (COLLIER et al., 2008; COOKE et al., 2018; VEISSIER et al., 2018), porém existe grande variação nos níveis de cortisol sérico de acordo com a raça e a situação em que se encontra. No presente estudo a variação para o nível de cortisol sérico foi de 64% em ambas as raças, com mínimo de 13,29 ng/mL e máximo de 80,70 ng/mL.

Estudos anteriores com o rebanho Nelore (machos) foi observado média de 60,30 ng/mL durante o teste de reatividade (ALDRIGHI et al., 2019), enquanto em fêmeas Nelore pertencentes ao mesmo rebanho foi observado média de $43,5 \pm 6,42$ ng/mL em conforto térmico (SOUZA et al., 2019). Considerando que no presente estudo os animais foram submetidos a situação de estresse, os níveis de cortisol sérico são semelhantes aos encontrados em taurinos por Bristow e Holmes (2007), que observaram valores de cortisol sérico variando de 7 a 29 ng/mL para animais considerados calmos e estressados, respectivamente. Cooke et al. (2018) observaram valores correspondentes a 35,8 ng/mL e 50,8 ng/mL levando em consideração o temperamento de fêmeas da raça Nelore como calmo e agitado, respectivamente.

Figura 7. Nível de cortisol sérico (ng/mL) observado nos animais Nelore e Caracu de acordo com os tratamentos (manhã, tarde sombra e tarde sol) nos meses estudados (outubro, dezembro, fevereiro e março).



*Médias seguidas de letras diferentes, no mesmo tratamento, diferem entre si pelo teste de Tukey ($\alpha < 0,05$).

Fonte: Arquivo Pessoal (2018).

A interação tripla influenciou significativamente ($P = 0,0003$) o nível de cortisol sérico. Entre animais Caracu e Nelore o nível de cortisol sérico foi diferente ($P < 0,05$) no tratamento 0 nos meses de outubro e fevereiro, sendo que a raça Nelore apresentou menor nível de cortisol sérico que a raça Caracu. Na raça Caracu se notou um aumento no nível de cortisol sérico entre os tratamentos 0 (manhã), 1 (tarde sombra) e 2 (tarde sol) nos meses de outubro e março. Enquanto na raça Nelore não foi possível observar o

aumento gradativo do nível de cortisol sérico entre os tratamentos 0, 1 e 2 (Figura 7). É possível observar que o tratamento 1 na raça Nelore manteve médias superiores em relação ao tratamento 0 nos meses de outubro fevereiro e março, o que pode ser consequência da maior reatividade dos animais Nelore ao serem transferidos do piquete para o curral coberto.

O maior nível de cortisol sérico foi observado no tratamento 3, na raça Caracu no mês de março (35,80 ng/mL) enquanto na raça Nelore a maior média foi observada no tratamento 2, no mês de outubro (24,50 ng/mL) (Figura 7). É importante salientar que em março foi verificada a maior porcentagem de umidade relativa, além do fato de que diferenças entre FR e FC também foram encontradas no mês de março. Todos estes fatores em conjunto podem ter contribuído para a diferença no nível de cortisol obtida.

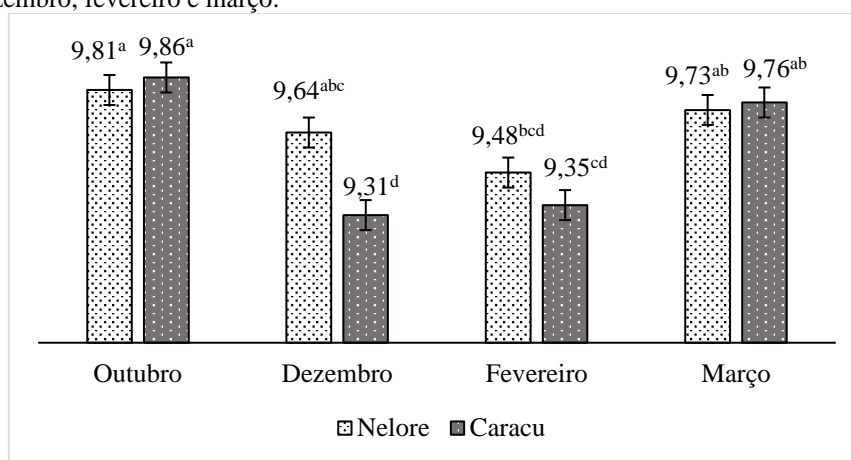
O aumento da TA e a queda na UR provocou elevação dos níveis de cortisol sérico em ambas as raças no presente estudo, como pode ser visto ao analisar a correlação linear positiva entre cortisol e TA, e negativa entre cortisol e UR (Tabela 1), demonstrando os efeitos do estresse térmico no metabolismo animal. Habeeb et al. (2001) relataram que a alta temperatura ambiente é responsável por elevar os níveis de cortisol, concordando com os resultados aqui apresentados.

O aumento dos níveis de cortisol pode ocasionar o aumento dos níveis celulares de proteínas de choque térmico (*HSPs*), que funcionam como um sinal de alerta para o sistema imunológico (AMARAL et al., 2011), além de estar associado com a redução de imonoglobulina G (STOTT et al., 1976), consumo alimentar (CANTALAPIEDRA-HIJAR et al., 2018) e características reprodutivas (DOBSON; SMITH, 2000). Portanto a avaliação do cortisol é útil na averiguação do estado de saúde dos animais em regiões tropicais.

O índice de tolerância ao calor médio obtido nos animais de ambas as raças durante o tratamento 1 foi superior ao tratamento 2 ($9,72 \pm 0,03$ e $9,50 \pm 0,03$ respectivamente), demonstrando que o ambiente sombreado oferece maior conforto animal, o que pode diminuir sua temperatura retal e aumentar o índice de tolerância ao calor. Em um estudo com as raças Harijana e Sahiwal notou-se que a estação do ano apresenta valores diferenciados para ITC, uma vez que foram identificados valores médios de ITC em torno de 8,68 durante o verão e 6,05 durante o inverno (KUMAR et al., 2018), podendo afirmar assim que durante o verão o ITC elevado é consequência do estresse térmico ao qual o animal está submetido.

Nos meses de outubro, fevereiro e março não foi observado diferenças entre o ITC obtido nos animais das raças Caracu e Nelore. O ITC da raça Nelore foi superior ao ITC da raça Caracu no mês de dezembro (Figura 8). Os valores de ITC para ambas as raças permaneceram próximos a 10 e semelhantes entre si nos meses estudados, com exceção do mês de dezembro, o que demonstra a adaptabilidade ao ambiente tropical. Vieira (2003) encontrou valor de 9,70 para o ITC em animais da raça Caracu, enquanto Barbosa et al. (2014) observaram ITC igual a 9,8 para animais da raça Nelore, sendo estes valores próximos ao encontrado no presente estudo.

Figura 8. Índice de Tolerância ao Calor para animais das raças Nelore e Caracu durante os meses de outubro, dezembro, fevereiro e março.



*Médias seguidas de letras diferentes, no mesmo mês, diferem entre si pelo teste de Tukey ($\alpha < 0,05$).

Fonte: Arquivo Pessoal (2018)

O ITC é baseado na temperatura retal antes e após a exposição ao calor, no presente estudo pode ser observado que a diferença foi percebida apenas em um mês, demonstrando que tanto os animais Caracu quanto Nelores dos rebanhos estudados respondem bem as condições climáticas elevadas da região nesta época do ano.

4. CONCLUSÃO

A partir das medidas ambientais obtidas (temperatura ambiental, temperatura globo negro e umidade relativa) foi possível concluir que as condições do meio ambiente afetam diretamente o conforto animal no sistema de produção em bovinos de corte.

Os animais Caracu, apesar de serem taurinos, demonstraram tolerância as condições ambientais da região tropical quando observado o alto valor de ITC.

De acordo com os parâmetros fisiológicos (temperatura retal, frequência respiratória e nível de cortisol sérico) podemos inferir que animais Nelore apresentaram maior adaptabilidade, os quais são de origem zebuína e, portanto, resistentes ao calor.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, B. C. et al. Heat stress abatement during the dry period influences metabolic gene expression and improves immune status in the transition period of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 1, p. 86-96, 2011.
- ALEENA, J. et al. Significance of metabolic response in livestock for adapting to heat stress challenges. **Asian Journal of Animal Sciences**, v. 10, n. 4-5, p. 224-234, 2016.
- ANGEL, S. P. et al. Climate Change and Cattle Production: Impact and Adaptation. **Journal of Veterinary Medicine and Research**, v. 5, n. 4, p. 1134, 2018.
- ARCHANA, P. R. et al. Role of Heat Shock Proteins in Livestock Adaptation to Heat Stress. **Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research**, v. 5, n. 1, 2017.
- AZEVEDO, D. M. R.; ALVES, A. A. **Bioclimatologia aplicada à produção de bovinos leiteiros nos trópicos**. 1 ed. Teresina: Embrapa, 2009, 83 p.
- BACCARI JÚNIOR, F. **Manejo ambiental da vaca leiteira em climas quentes**. Londrina: UEL, 2001, p. 142.
- 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, p. 854-865, 2014.
- BERNABUCCI, U. et al. Metabolic and hormonal acclimation to heat stress in domesticated ruminants. **Animal**, v. 4, n. 7, p. 1167-1183, 2010.
- BOND, G.B. et al. Métodos de diagnóstico e pontos críticos de bem-estar de bovinos leiteiros. **Ciência Rural**, v.42, p.1283-1293, 2012.
- BRISTOW, D. J.; HOLMES, D. S. Cortisol levels and anxiety-related behaviors in cattle. **Physiology and Behavior**, v. 90, n. 4, p. 626-628, 2007.
- BROWN-BRANDL, T. M. Understanding heat stress in beef cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 47, p. 1-9, 2018.
- CANTALAPIEDRA-HIJAR, G. et al. Review: Biological determinants of between-animal variation in feed efficiency of growing beef cattle. **Animal**, v. 12, n. 2, p. 321-335, 2018.
- CARVALHO, F. A. et al. Breed Affects Thermoregulation and Epithelial Morphology in Imported and Native Cattle Subjected to Heat Stress. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 3570-3573, 1995.
- 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.
- COOKE, R. F. et al. Effects of temperament on growth, plasma cortisol concentrations and puberty attainment in Nelore beef heifers. **Animal**, p. 1-6, 2018.
- COSTA, A. N. L. da et al. Rectal temperatures, respiratory rates, production, and reproduction performances of crossbred Girolando cows under heat stress in northeastern Brazil. **International Journal of Biometeorology**, v. 59, n. 11, p. 1647-1653, 2015.
- 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. 435-440, 2014.

DETWEILER, D. K. Regulação cardíaca. In: DUKES, H. H. (Ed.). **Fisiologia dos animais domésticos**. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. p. 942.

DOBSON, H.; SMITH, R. . What is stress, and how does it affect reproduction? **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 743-752, 2000.

FARMER, L. J.; FARRELL, D. T. Review: Beef-eating quality: a European journey. **Animal**, v. 12, n. 11, p. 2424-2433, 2018.

GAUGHAN, J. B. et al. Heat tolerance of Boran and Tuli crossbred steers. **Journal of Animal Science**, v. 77, n. 9, p. 2398-2405, 1999.

GAUGHAN, J. B. et al. A new heat load index for feedlot cattle. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 1, p. 226-234, 2008.

GAUGHAN, J. B. et al. Assessing the heat tolerance of 17 beef cattle genotypes. **International Journal of Biometeorology**, v. 54, n. 6, p. 617-627, 2010.

GODÝN, D.; HERBUT, P.; ANGRECKA, S. Measurements of peripheral and deep body temperature in cattle - A review. **Journal of Thermal Biology**, v. 79, n. November 2018, p. 42-49, 2019.

GRANDIN, T. Principios de comportamiento animal para el manejo de bovinos y otros herbívoros en condiciones extensivas. Temple Grandin (Comp.) **Livestock Handling And Transport**. Cabi Publishing, Wallingford, Oxon (Reino Unido), p. 63-85, 2000.

GRUBER, S. L. et al. Relationships of behavioral and physiological symptoms of preslaughter stress to beef longissimus muscle tenderness. **Journal of Animal Science**, v. 88, n. 3, p. 1148-1159, 2010.

HABEEB, A. A. M.; ABOULNAGA, A.; KAMAL, T. Heat-induced changes in body water concentration, Ts, cortisol, glucose and cholesterol levels and their relationships with thermoneutral body weight gain in Friesian calves. In: Proceedings of 2nd International Conference on Animal Production and Health in Semi-arid Areas, North Sinai. **Anais...** North Sinai: El-Arish, 2001.

HAMMOND, A. C. et al. Heat tolerance in two tropically adapted *Bos taurus* breeds , Senepol and Romosinuano , compared with Brahman , Angus , and Hereford cattle in Florida. **Journal of Animal Science**, v. 74, n. 2, p. 295-303, 1996.

HANSEN, P. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 349-360, 2004.

INMET – **Instituto Nacional de Meteorologia**. Disponível em: www.inmet.gov.br. Acesso em: 20 jan. 2019.

KLEIN, B. G. **Cunningham Tratado De Fisiologia Veterinária**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

KUMAR, J. et al. Impact of season on antioxidants, nutritional metabolic status, cortisol and heat shock proteins in hariana and sahiwal cattle. **Biological Rhythm Research**, v. 49, n. 1, p. 29-38, 2018.

MARQUES, J. D. A. et al. Comportamento de bovinos mestiços em confinamento com e

- sem acesso a sombra durante o verão. **Campo Digital**, v. 1, n. 1, p. 54-59, 2006.
- MAZZULLO, G. et al. Effect of different environmental conditions on some haematological parameters in cow. **Annals of Animal Science**, v. 14, n. 4, p. 947-954, 2014.
- McMANUS, C. et al. Heat tolerance in naturalized Brazilian cattle breeds. **Livestock Science**, v. 120, n. 3, p. 256-264, 2009.
- McMANUS, C. et al. Use of multivariate analyses for determining heat tolerance in Brazilian cattle. **Tropical Animal Health and Production**, v. 43, n. 3, p. 623-630, 2011.
- NAVARINI, F. C. et al. Conforto térmico de bovinos da raça nelore a pasto sob diferentes condições de sombreamento e a pleno sol. **Engenharia Agrícola**, v. 29, n. 4, p. 508-517, 2009.
- PIRES, M. F. A.; CAMPOS, A. T. **Conforto Animal para maior produção de leite**. 1. ed. Viçosa: CTP, 2008.
- RENAUDEAU, D. et al. Adaptation to hot climate and strategies to alleviate heat stress in livestock production. **Animal**, v. 6, n. 5, p. 707-728, 2012.
- RIBEIRO, A. R. B. et al. Respostas fisiológicas de bovinos Nelore, Senepol x Nelore e Angus x Nelore submetidos a teste de tolerância ao calor. **Anais...VII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal. São Carlos, SP**, v. 9, n. 7, p. 1-4, 2008.
- SCHARF, B. et al. Evaluation of physiological and blood serum differences in heat-tolerant (Romosinuano) and heat-susceptible (Angus) *Bos taurus* cattle during controlled heat challenge. **Journal of Animal Science**, v. 88, n. 7, p. 2321-2336, 2010.
- SEJIAN, V. et al. Review: Adaptation of animals to heat stress. **Animal**, v. 12, n. 2, p. 431-444, 2018.
- SOUZA, B. B. de et al. Physiological parameters and index of heat tolerance Sindhi cattle breed in semi-arid region of Paraíba. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 3, p. 883-888, 2007.
- SOUZA, L. et al. Relationship between performance, metabolic profile, and feed efficiency of lactating beef cows. **Tropical Animal Health and Production**, v. 51, n. 7, p. 2045-2055, 2019.
- SPRITZE, Á. et al. Caracterização genética da raça bovina Crioulo Lageano por marcadores moleculares RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 10, p. 1157-1164, 2003.
- STOTT, G. H. et al. Influence of Environment on Passive Immunity in Calves. **Journal of Dairy Science**, v. 59, n. 7, p. 1306-1311, jul. 1976.
- Van Iaer, E. et al. Effect of summer conditions and shade on behavioural indicators of thermal discomfort in Holstein dairy and Belgian Blue beef cattle on pasture. **Animal**, v. 9, n. 9, p. 1536-1546, 2015.
- VEISSIER, I. et al. Heat stress in cows at pasture and benefit of shade in a temperate climate region. **International Journal of Biometeorology**, v. 62, n. 4, p. 585-595, 2018.
- Vieira R. V. **Teste de tolerância ao calor em bovinos de corte de raças européias utilizadas no cruzamento industrial no Brasil**. 2003. 43 p. Dissertação (Mestrado) –

Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga. 2003.

WERNER, J.; MEKJAVIC, I. B.; TAYLOR, N. A. S. Concepts in physiological regulation: a thermoregulatory perspective. In: TAYLOR, N. A. S.; GROELLER, H. (Ed.). **Physiological bases of human performance during work and exercise**. 1. ed. Edinburgh: Elsevier, 2008. p. 325-340.

WEST, J. W. Effects of heat-stress on production in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 6, p. 2131-2144, 2003.

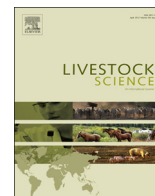
Tabela Suplementar A. Média seguida do erro padrão ($\mu \pm EP$), mínimo (min) e máximo (max) das variáveis temperatura do ambiente (TA), umidade relativa (UR) e temperatura do globo negro (T_GN) nos meses de outubro e dezembro de 2017 e fevereiro e março de 2018 de acordo com os tratamentos manhã (08:00-10:00), tarde sombra e tarde sol (11:00-13:00).

	TA - °C			UR - %			T_GN - °C		
	$\mu \pm EP$	Min	Max	$\mu \pm EP$	Min	Max	$\mu \pm EP$	Min	Max
Outubro 2017									
Manhã	30,5 ± 2,1	25,0	35,6	45,1 ± 4,3	39,1	64,0	30,9 ± 2,2	25,2	35,7
Tarde Sombra	35,8 ± 0,2	33,0	36,9	31,8 ± 4,4	24,8	32,8	35,9 ± 0,2	33,2	37,1
Tarde Sol	40,1 ± 0,1	37,1	43,2	26,4 ± 2,3	32,0	41,2	40,1 ± 0,1	36,4	45,4
Dezembro 2017									
Manhã	28,4 ± 2,9	23,0	33,8	61,4 ± 7,7	42,1	77,9	30,1 ± 4,4	22,9	38,4
Tarde Sombra	31,6 ± 0,5	29,8	33,3	49,5 ± 1,8	43,8	55,6	32,3 ± 0,6	30,5	34,2
Tarde Sol	36,4 ± 0,3	34,5	38,2	41,4 ± 1,3	31,9	43,2	41,5 ± 1,2	40,4	45,1
Fevereiro 2018									
Manhã	25,06 ± 3,1	17,1	31,2	74,9 ± 5,9	78,6	99,1	25,8 ± 3,5	17,6	33,2
Tarde Sombra	32,2 ± 0,1	28,8	33,3	48,8 ± 1,3	40,3	61,7	33,0 ± 0,1	29,6	34,5
Tarde Sol	40,5 ± 0,9	37,2	43,2	34,6 ± 2,9	27,7	44,3	37,7 ± 0,3	35,1	39,4
Março 2018									
Manhã	28,1 ± 2,6	23,6	35,3	76,5 ± 6,1	72,8	92,6	28,4 ± 2,9	23,7	36,3
Tarde Sombra	32,2 ± 0,1	29,6	33,4	57,8 ± 1,6	55,4	67,7	32,4 ± 0,1	30,3	33,6
Tarde Sol	41,9 ± 0,9	36,7	45,6	36,2 ± 4,9	34,9	50,1	46,9 ± 4,0	37,7	47,6

CAPÍTULO 3. DIFFERENTIAL EXPRESSION OF HEAT SHOCK PROTEIN GENES ASSOCIATED WITH HEAT STRESS IN NELORE AND CARACU BEEF CATTLE

Artigo publicado na revista *Livestock Science* (Online) como parte dos resultados obtidos no presente trabalho de doutorado. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2019.103839>

Received 24 July 2019; Available online 19 October 2019.



Differential expression of heat shock protein genes associated with heat stress in Nelore and Caracu beef cattle



B.V. Pires^{a,*}, N.B. Stafuzza^b, S.B.G.P.N.P. Lima^b, J.A. Negrão^c, C.C.P. Paz^{a,b}

^a Department of Genetics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto 14049-900, São Paulo, Brazil

^b Beef Cattle Center, Animal Science Institute, Sertãozinho 14174-000, São Paulo, Brazil

^c Department of Animal Sciences, College of Animals Science and Food Engineering, University of São Paulo (FZEA/USP), Pirassununga 13630-000, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Cortisol
hsp60
hsp70
hsp90
qPCR
Rectal temperature

ABSTRACT

High temperatures cause elevation of both blood cortisol concentrations and rectal temperature, which induce the action of heat shock proteins (HSPs) to regulate cell viability against heat stress. The aim of this study was to verify the effects of high temperatures on physiological parameters and to evaluate the level of relative expression of the *HSPD1* (heat shock protein family D (Hsp60) member 1), *HSPA1A* (heat shock protein family A (Hsp70) member 1A), and *HSP90AA1* (heat shock protein 90 alpha family class A member 1) genes in Nelore (*Bos taurus indicus*) and Caracu (*Bos taurus taurus*) beef cattle under high temperatures. A total of 40 Caracu and 37 Nelore steers were evaluated inside the pen in the morning, while in the afternoon the steers were evaluated in two different environments, shade and sun, for two hours to detect their rectal (RT) and skin (ST) temperatures. Blood samples were collected before (07:00 h) and after (15:00 h) the experiment to evaluate serum cortisol levels using ELISA and the relative expression of *HSPD1*, *HSPA1A*, and *HSP90AA1* using qPCR. The data were analyzed using a MIXED model with least square means. Significant differences were observed between the Nelore and Caracu breeds in relation to RT (38.8 °C and 39.2 °C, respectively), cortisol concentration (18.5 and 23.7 ng/mL, respectively), and the relative expressions of *HSPD1* (2.70 ± 0.12 and 3.05 ± 0.09, respectively) and *HSP90AA1* (1.54 ± 0.10 and 1.25 ± 0.09, respectively). The lowest cortisol concentration (17.2 ng/mL) and RT (38.7 °C) were obtained in the morning treatment. Sun exposure did not influence the relative expression of the HSPs. Significant changes were observed during the months studied, indicating that environmental conditions (temperature and humidity) influenced RT, cortisol concentrations, and expression of the HSPs. The highest cortisol levels (24.3 ng/mL) and expression of *HSPA1A* (2.65 ± 0.15) were detected during the highest relative humidity. It is well known that an increase in RT is associated with the activation of HSPs in ruminants as observed herein, and the highest RT (39.1 °C) and relative expression of *HSPD1* (3.35 ± 0.15) and *HSP90AA1* (1.98 ± 0.13) were observed during the lower relative humidity and higher air temperature conditions. The physiological parameters and HSP expression pattern indicated that Caracu, despite being a tropically adapted taurine breed, is less adapted to thermal stress as compared to Nelore, a zebuine breed.

1. Introduction

According to the World Meteorological Organization, the increase in global temperatures is an unsettling factor in livestock production, and elevations of 3 °C to 5 °C are expected during this century (WMO, 2019). Climatic conditions are one of the main factors limiting the development of animal production in tropical regions. Heat stress is directly related to animal welfare, growth, reproduction, and health in cattle (Brown-Brandl, 2018).

The mechanisms of adaptability differ among bovine breeds, some being more tolerant than others, according to the peculiarities of each

breed. Owing to their long-term adaptation to tropical climates, zebu cattle breeds (*Bos taurus indicus*) are better adapted to regulate body temperature in response to heat stress as compared to taurine breeds (*Bos taurus taurus*) (Hansen, 2004). Thermoregulation is the balance between the heat production and heat loss mechanisms responsible for maintaining a relatively constant body temperature (Bernabucci et al., 2010) when animals undergo morphological, physiological, and genetic alterations under adverse thermal conditions (Deb et al., 2014).

Blood-circulating concentrations of cortisol are commonly used as an indicator of stress response (Binsiya et al., 2017). The hypothalamic-pituitary-adrenal system is activated in response to stress and produces

* Corresponding author.

E-mail address: biancapires@usp.br (B.V. Pires).

<https://doi.org/10.1016/j.livsci.2019.103839>

Received 24 July 2019; Received in revised form 14 October 2019; Accepted 17 October 2019

Available online 19 October 2019

1871-1413/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

corticotropin-releasing hormone that triggers the secretion of adrenocorticotrophic hormone (ACTH). ACTH stimulates the adrenal gland, which synthesizes and releases adrenaline, noradrenaline, and cortisol (Binsiya et al., 2017). The increase of cortisol induces cellular adaptation, which is accomplished through synthesis of heat shock proteins (HSPs) and other proteins involved in anti-stress mechanisms (Das et al., 2016).

HSPs play an important role in an animal's metabolism, and changes in their expression can result in amino acid oxidation, increased glucose, reduced fatty acid metabolism, and immune system activation (Collier et al., 2008). The *HSPD1* gene encodes the hsp60 protein, which plays an important role in the immune response through inflammatory response induction, acting as an immunoregulatory agent and biomarker (Lebret et al., 2003). The hsp60 protein also assists many newly synthesized proteins to reach their native forms and allows the correct folding of denatured proteins under stress conditions (Singh et al., 2018).

HSPA1A encodes the hsp70 protein, which is related to cell proliferation (Feder et al., 1992), heat tolerance (Das et al., 2016), and regulation of apoptosis (Bernabucci et al., 2010). The hsp90 protein encoded by the *HSP90AA1* gene is the most abundant and conserved heat shock protein in eukaryotic organisms (Csermely et al., 1998). It is crucial to stress adaptation, heat tolerance (Kumar et al., 2018), protein degradation, signal transduction (Csermely et al., 1998), and anti-apoptotic action in mammalian cells (Garrido et al., 2001).

Differential expression of HSPs under thermal stress might partially explain the relative stress tolerance of *Bos taurus indicus* as compared to *Bos taurus taurus* cattle breeds (Hansen, 2004; Deb et al., 2014; Archana et al., 2017). The Caracu (*Bos taurus taurus*) breed was introduced to Brazil during the seventeenth century and is considered the taurine breed best adapted to the Brazilian tropical climate. The Nelore (*Bos taurus indicus*) breed is widely disseminated in Brazil (80% of the beef cattle herd) and is characterized by its adaptability to hot climatic conditions (Barbosa et al., 2014).

Increasing our knowledge of how different breeds respond to heat stress allow to improve and develop strategies to reduce the heat stress in warm regions, besides select of animals with higher adaptability. As cattle breeds respond differently to thermal stress, we hypothesized that Caracu animals should be more susceptible to the thermal stress in comparison to Nelore animals, which may change their physiological and genetics parameters. The aims of this study were to verify the effects of high climate temperatures on cortisol concentration, physiological parameters, and the level of expression of *HSPD1*, *HSPA1A*, and *HSP90AA1* in Caracu (*Bos taurus taurus*) and Nelore (*Bos taurus indicus*) steers in tropical regions during the summer.

2. Materials and methods

All the experimental procedures involving animal were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at the Beef Cattle Center, Animal Science Institute, Sertãozinho, São Paulo, Brazil (CEUA n°237–16).

2.1. Animals and treatments

A total of 40 Caracu and 37 Nelore steers at 13–15 months of age and 277.14 ± 35.01 kg average body weight were selected from the herd at the Beef Cattle Center, Animal Science Institute, Sertãozinho, São Paulo, Brazil (21°17' S and 48°12' W). Animals were raised on grazing conditions using *Brachiaria* sp. forage and supplemented with a mixed ration based on maize silage and mineral salt.

The animals were evaluated in 2017 (October and December) and 2018 (February and March), a period characterized by high temperatures in this region of Brazil. The experiment included three treatments: morning (08:00 to 10:00 h), shade (11:00 to 13:00 h) and sun (11:00 to 13:00 h). In the morning, all animals remained in a pen with earthen

Table 1

Average, minimum and maximum of Environmental temperature (Env. Temp.), relative humidity (RH) and wet bulb temperature (Twb) and in Sertãozinho, Sao Paulo, Brazil during the months of October, December (2017) and February and March (2018) according to treatments (morning, shade and sun).

October	Env. Temp. (°C)	RH (%)	Twb (°C)
Morning	32.6 (29.4–35.6)	40.8 (36.0–52.7)	33.1 (30.0–35.7)
Shade	35.8 (30.7–38.0)	31.7 (29.3–45.1)	35.9 (31.1–38.2)
Sun	40.0 (37.0–43.2)	26.4 (24.1–32.8)	40.1 (36.4–43.4)
December	Env. Temp. (°C)	RH (%)	Twb (°C)
Morning	31.3 (27.8–33.7)	53.6 (42.0–65.9)	34.5 (30.3–38.4)
Shade	31.6 (30.2–34.3)	49.5 (41.5–55.3)	32.3 (30.9–35.0)
Sun	36.4 (34.5–38.8)	41.4 (31.8–52.6)	41.5 (40.4–44.9)
February	Env. Temp. (°C)	RH (%)	Twb (°C)
Morning	28.2 (21.1–33.6)	68.9 (55.5–94.4)	29.2 (22.4–33.4)
Shade	32.2 (28.9–34.9)	48.8 (35.5–61.7)	33.0 (29.6–35.8)
Sun	40.4 (37.2–44.4)	34.6 (24.6–40.3)	38.0 (35.1–40.4)
March	Env. Temp. (°C)	RH (%)	Twb (°C)
Morning	30.7 (27.0–35.3)	70.4 (54.8–92.6)	31.3 (24.0–36.3)
Shade	32.2 (29.6–33.9)	57.8 (49.4–67.6)	32.4 (30.3–34.6)
Sun	41.9 (36.7–45.6)	36.2 (32.8–50.1)	46.9 (37.7–47.6)

floor and some trees with exposure to the sun, similarly of environment natural the animals in extensive systems. Afterward the animals were separated in two groups randomly (1) shade: animals remained in a shaded pen, covered, concrete floor open on all of the four sides; and (2) sun: animals remained in a sun pen with earth floor and absence of trees.

Environmental temperature (Env. Temp.), relative humidity (RH) and wet bulb temperature (Twb) were recorded using a HOBO® Micro Station Data Logger (Onset®, Cape Cod, MA, USA) installed inside the shade and sun pen (Table 1). Temperature and humidity index (THI), which is used as indicator of thermal comfort for cattle, was calculated using the following equation described by Potter and Jacobsen (2000): $THI = T_{env} + 0.36 \times T_{dp} + 41.5$, where T_{env} is the environmental temperature and T_{dp} is the dew point temperature.

The rectal temperature (RT), skin temperature (ST), respiratory rate (RR), and heart rate (HR) measurements were collected during all three treatments. The skin temperature obtained was an average of three different skin sites (face, dorso, and head). The RT and ST were measured using clinical and infrared thermometers, respectively. The RR and HR were assessed with the aid of a stethoscope.

2.2. Sample collections

Blood samples were collected before (morning – 07:30 h) and after (afternoon – 15:00 h) treatments from all animals in vacutainer tubes containing heparin for cortisol analysis and vacutainer tubes containing K3 EDTA for gene expression analysis. Subsequently, the samples collected in heparin tubes were centrifuged at $1500 \times g$ for 15 min at 4 °C. The plasma samples were stored at –20 °C until their concentrations of cortisol could be determined using the AccuBind® ELISA (Monobind Inc., CA, USA) enzyme immunoassay kit, according to the manufacturer's instructions. ELISA plates were read with a LabSystems Multiskan MS (LabSystems, Helsinki, Finland) microplate reader. All samples were analyzed in duplicate and then checked for differences greater than 10% and the sensitivity of the assay was 0.25 ng/mL, and the intra-assay and inter-assay coefficients of variation were 2.5% and 5.5%, respectively. The kits were validated for use in cattle by demonstrating parallelism between standard concentrations and serially diluted sample curves.

2.3. RNA extraction

The blood samples collected in vacutainer tubes containing K3 EDTA were centrifuged at 1500 × g for 15 min at 4 °C for white blood cell isolation. The RNA was extracted using the PureLink® RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, CA, USA) according to the manufacturer's recommendations. The RNA concentration and purity were checked using Nanodrop spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, USA). The cDNA was synthesized using the GoScript Reverse transcription (RT) System, according to the manufacturer's instructions. For the assay, 2 µL total RNA, 0.5 µg oligo(dT) primer (Promega, WI, USA), 40 U ribonuclease inhibitor, 3 mM MgCl₂, 0.5 mM dNTP, 1 µL GoScript reverse transcriptase, 4 µL GoScript 1X reaction buffer, and nuclease-free water were added to reach a final volume of 20 µL. The reaction mixture solution was incubated at 42 °C for 1 h.

2.4. Real-time qPCR

Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was performed using PowerUp SYBR Green Master Mix (ThermoFisher, MA, USA) on a 7500 Real-Time PCR system (ThermoFisher, CA, USA). A total of 1 µL of the cDNA product was used in a 20 µL reaction mixture, which included 0.4 µM of each primer and 10 µL SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA). All reactions were performed in triplicate and the amplification conditions were 95 °C for 10 min for pre-denaturation and 40 cycles at 95 °C for 15 s, followed by 60 °C for 1 min. The qPCR efficiencies were determined by amplification of a standardized dilution series. The melt curves were analyzed to evaluate the accuracy of the qPCR. The amplification efficiencies obtained for all genes were 90% to 110%. Primers for targeted genes were obtained from previous studies (Table 2). The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) housekeeping gene was used to normalize RNA recovery from each sample. The relative change in mRNA expression levels was calculated using the delta Ct method (Livak and Schmittgen, 2001).

2.5. Statistical analysis

The individual animal was the experimental unit. Differences between months and treatments for THI were evaluated using ANOVA and Tukey's test. Rectal temperature (RT), skin temperature (ST), heart rate (HR), respiratory rate (RR), cortisol concentrations, and relative expression (delta Ct) of *HSPD1*, *HSPA1A*, and *HSP90AA1* were subjected to variance analysis using the MIXED procedure in SAS (version 9.2; SAS, Institute Inc., Cary, NC, USA), with the following model:

$$Y_{ijklm} = \mu + B_i + T_j + M_k + BT_{ij} + BM_{ik} + TM_{jk} + BTM_{ijkl} + \varepsilon_{ijklm} \quad (1)$$

where μ is the overall mean, B_i is the fixed effect of the i th breed (i = Nelore, Caracu), T_j is the fixed effect of the j th treatment (j = morning, shade, sun), M_k is the fixed effect of the k th month (k = October, December, February, March) and BT_{ij} is the breed × treatment interaction, BM_{ik} is the breed × month interaction, TM_{jk} is the treatment × month interaction, BTM_{ijkl} is the breed × treatment × month interaction and ε_{ijklm} is the random residual effect. The effects included in the model were performed according to the Bayesian Inference Criterion (BIC). The residuals were

Table 2
Sequence of forward (F) and reverse (R) primers for the gene expression study using qPCR.

Gene	Primer sequence (5'→ 3')	Amplicon size	Reference
<i>HSPD1</i>	F: ACTGGCTCCTCATCTCACTC R: TGTTCAATAATCACTGCTCTCC	147 bp	Kishore et al. (2014)
<i>HSPA1A</i>	F: AACATGAAGAGCGCCGTGGAGG R: GTTACACACCTGCTCCAGCTCC	171 bp	Kishore et al. (2014)
<i>HSP90AA1</i>	F: GCATTCTCAGTTCATTGGCTATCC R: GTCCTCTCTCTCTCCTCTCTCC	190 bp	Rajoriya et al. (2014)
<i>GAPDH</i>	F: GGTGATGCTGGTGTCTGAG R: TGACAATCTTGAGGGTGTG	181 bp	Rajoriya et al. (2014)

Table 3

Descriptive analysis for rectal temperature (RT), skin temperature (ST), heart rate (HR), respiratory rate (RR), cortisol levels, and relative expression (delta Ct) of *HSPD1*, *HSPA1A*, and *HSP90AA1* genes obtained from Nelore and Caracu cattle.

Traits	n ^a	Mean	SEM ^b	Min	Max
Nelore Breed					
RT	274	38.77	0.03	36.6	39.90
ST	273	35.31	0.18	23.2	44.36
HR	274	87.92	0.48	60.0	110.0
RR	274	35.01	0.49	22.0	70.0
Cortisol	266	18.92	0.74	4.24	79.40
<i>HSPD1</i>	171	2.79	0.12	-0.55	7.87
<i>HSPA1A</i>	259	1.98	0.11	-2.93	5.93
<i>HSP90AA1</i>	248	1.55	0.09	-1.72	5.85
Caracu Breed					
RT	312	38.94	0.02	37.90	40.40
ST	312	36.48	0.17	27.76	47.00
HR	312	87.74	0.53	50.00	114.00
RR	312	36.45	0.57	22.00	76.00
Cortisol	311	23.24	0.84	4.43	98.40
<i>HSPD1</i>	255	2.99	0.08	-1.91	6.97
<i>HSPA1A</i>	296	1.93	0.10	-3.19	6.89
<i>HSP90AA1</i>	292	1.18	0.09	-4.38	6.81

^an: numbers of observations.

checked for normal distribution and heteroscedasticity, and none of these assumptions were violated. Statistical differences were considered to be significant when $P < 0.05$.

3. Results

Descriptive analyses for rectal temperature (RT), skin temperature (ST), heart rate (HR), respiratory rate (RR), cortisol concentrations, and relative expression (delta Ct) of *HSPD1*, *HSPA1A*, and *HSP90AA1* are summarized in Table 3. The average daily environmental temperature and relative humidity during the experimental period were 33.06 °C and 53.59% in the morning; 33.78 °C and 44.10% in the shade, and 40.78 °C and 34.24% in the sun, respectively. The THI was higher in sun treatment than shade and morning (90.79, 82.17, 82.67, respectively $P = 0.0009$). The THI obtained in morning treatment was not significantly different from that identified in shade treatment. There was no significant difference observed among temperature-humidity (THI) in the October (84.18 ± 1.06), December (86.76 ± 1.06), February (84.24 ± 1.06) and March (85.66 ± 1.06). In the present study, the RT significantly increased according to the treatments from 38.7 °C in the morning to 38.9 °C in the shade and 39.2 °C in the sun. The Caracu steers maintained a greater RT (± 0.15 °C) as compared to the Nelore steers ($P < 0.01$) in all three treatments studied. The skin temperatures (ST) of Nelore and Caracu steers were 36.34 °C and 37.37 °C, respectively ($P < 0.001$). The treatments also contributed to differences in TS ($P < 0.01$), where the highest TS was observed in sun (39.41 ± 0.16 °C), followed by the shade (35.95 ± 0.16 °C) and morning (34.14 ± 0.12 °C) treatments.

The HR obtained from Nelore steers (88.16 beats/min) was not significantly different from that identified in Caracu steers (88.29 beats/min). After being exposed to heat stress (sun treatment - 89.27 beats/min), the HR increased significantly in relation to the absence of

heat stress (morning treatment - 86.78 beats/min).

The RR showed different results in Nelore (35.13 breaths/min) and Caracu (36.63 breaths/min) steers, and a significant difference in RR was observed between the sun (35.19 breaths/min) and morning (36.35 breaths/min) treatments. In contrast, there were no significant differences between the morning and shade treatments. The breed, treatment, and month interaction was statistically significant for HR and RR traits. The HR observed was greater in Caracu steers in the sun (95.14 beats/min), whereas the RR observed was greater in Caracu steers in the shade (56.68 breaths/min), both in October.

The cortisol concentration obtained from Caracu steers (23.74 ng/mL) was higher than that obtained from Nelore steers (18.52 ng/mL). The cortisol was similar between shade and sun treatments, but the cortisol in the morning treatment was significantly different as compared to the shade and sun treatments. The interaction between breed and month demonstrated that the elevation of environment and rectal temperatures could modify animal adaptability and consequently the cortisol concentration, which was significantly lower for Caracu in December (16.38 ng/mL) and for Nelore in March (17.97 ng/mL).

Our study showed that the expression of *HSPD1* (*hsp60*) was significantly ($P < 0.05$) higher in Caracu as compared to Nelore steers. In the present study, *HSPD1* had higher levels of expression as compared to *HSPA1A* and *HSP90AA1* in all treatments. *HSPD1* expression showed no significant ($P > 0.05$) difference among the three treatments, suggesting that the high temperature exposure (sun treatment) was not sufficient to provide changes in *HSPD1* gene expression.

The *HSPD1* expression levels were modified according to the month, with the highest level of relative expression obtained in October; this level was significantly different from those observed in February and March ($P < 0.05$). Although October had lower environmental temperature and relative humidity conditions, the RT was higher than those observed in the other months, which could have influenced the expression of *HSPD1*. Regarding the breed and month interaction, a higher expression of *HSPD1* in Nelore steers in October as compared to the other months was observed (Fig. 1).

Significant differences were identified in *HSPD1* relative expression between Caracu and Nelore steers in October and February. Nelore showed higher expression in October while Caracu exhibited higher expression in February. The levels of expression of *HSPD1* in October and February can be associated with the cortisol concentration obtained

during these periods, as the cortisol concentrations in Nelore and Caracu were higher in October and February, respectively. Our findings revealed that *HSPD1* was upregulated at the beginning of summer in both the Caracu and Nelore breeds.

The relative expression of *HSPA1A* was influenced by month ($P < 0.05$), with the highest expression level in December and the lowest in February for both breeds. The month and treatment interaction modified *HSPA1A* expression ($P < 0.05$) (Fig. 2). There was no significant difference observed in the expression of *HSPA1A* between cattle breeds, which indicates that knowledge of thermoregulatory traits in the Caracu breed could be related to its adaptation to tropical climate.

The highest and lowest average *HSPA1A* expressions were observed in March and February, respectively. It is important to highlight that the cortisol concentrations and relative humidity conditions were higher in March in relation to other months, while the highest RT was observed in February.

The increase in environmental temperature among treatments (morning < shade < sun) caused the enhancement of *HSPA1A* expression in October, but this did not occur in December, February, or March (Fig. 2). In December, *HSPA1A* expression in the morning, shade, and sun treatments was not significantly different. The results obtained in February and March showed that the elevation of temperature was not enough to affect the heat shock protein production. However, the expression of *HSPA1A* observed in the morning treatment was similar to its expression in the sun treatment in all months studied (Fig. 2).

Regarding *HSP90AA1* expression, the Nelore steers (1.53) presented significantly ($P < 0.05$) higher levels of *HSP90AA1* expression as compared to Caracu steers (1.23). *HSP90AA1* gene expression was not significantly altered in any of the treatments. The highest levels of expression of *HSP90AA1* were obtained in October and December, the months in which the highest rectal and environmental temperatures were detected.

In the present study, the increase in climatic conditions caused the upregulation of *HSP90AA1*. The month and treatment interaction (Fig. 3A) showed a tendency toward increasing *HSP90AA1* gene expression according to the intensification of environmental temperature during the morning to sun treatments in October and December, which was not observed during February and March.

Considering the interaction illustrated on Fig. 3B, the Nelore and

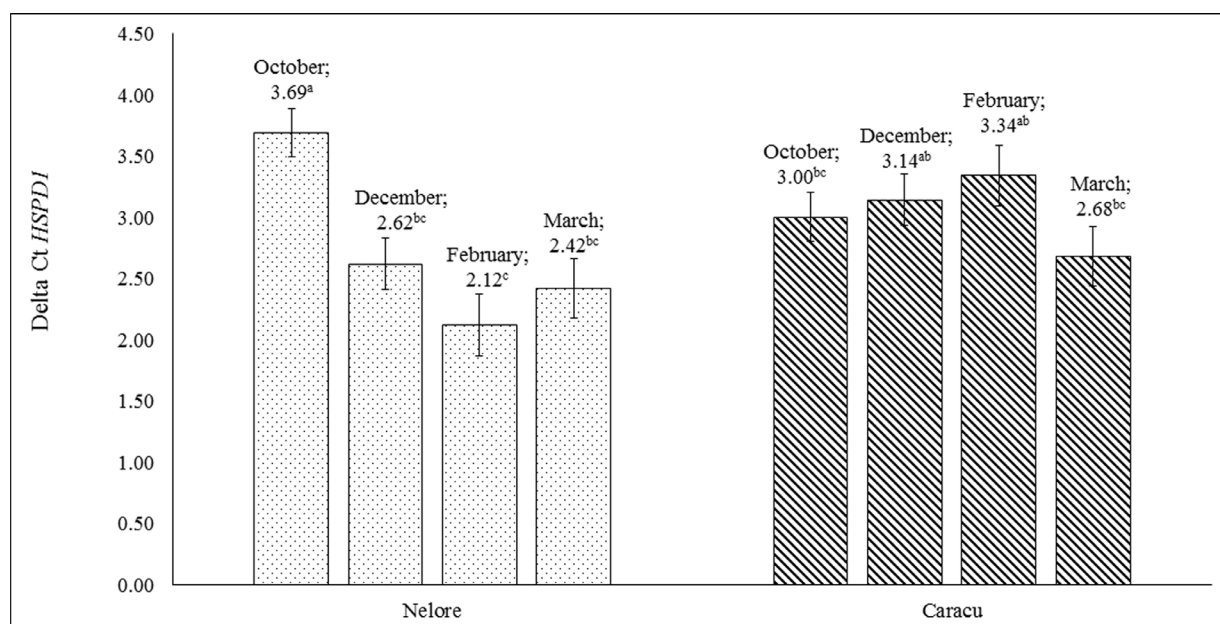


Fig. 1. Means estimates for relative expression of *HSPD1* according to Nelore or Caracu breed and month interaction. Different superscript letters denote significant differences ($P < 0.05$).

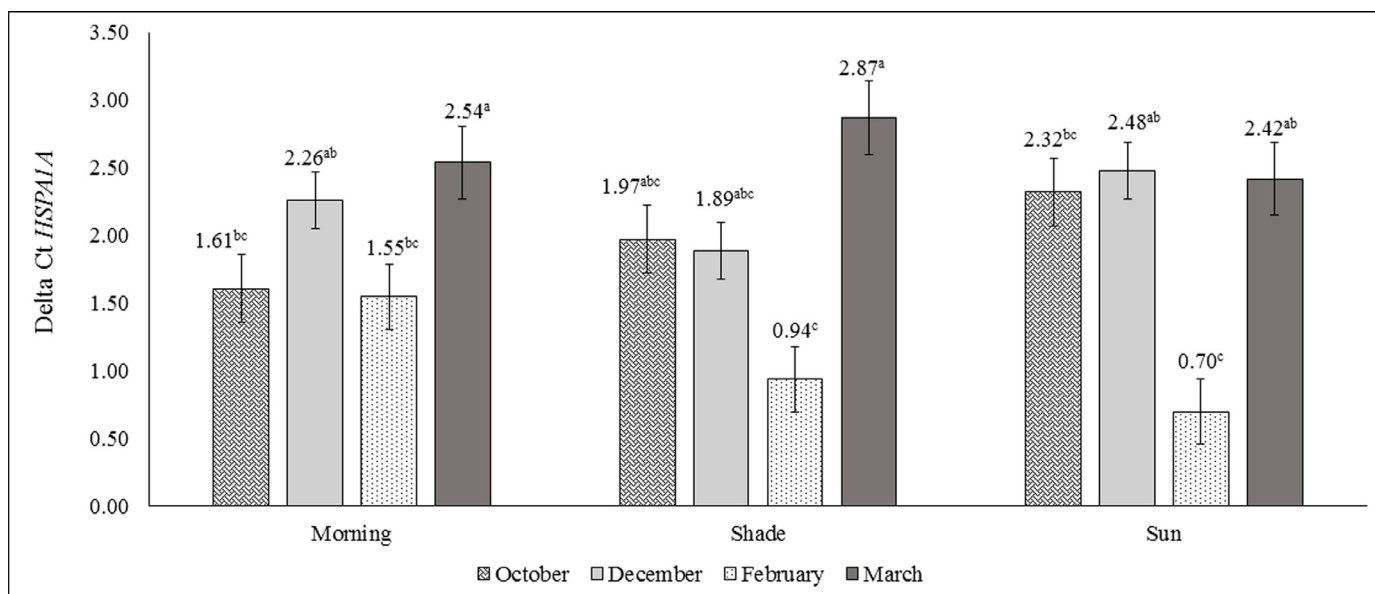


Fig. 2. Means estimates for relative expression of *HSPA1A* according to treatments and month interaction in Nelore and Caracu steers. Different superscript letters denote significant differences ($P < 0.05$).

Caracu steers demonstrated the highest and the lowest expression of *HSP90AA1* in October and February, and the highest environmental temperatures and the lowest relative humidity were recorded in October.

4. Discussion

The changes in the physiological parameter profiles observed in the Nelore and Caracu breeds suggest that there are significant differences in biological responses between these breeds. It is known that the intensification of climatic conditions can affect animal metabolism, modifying rectal and skin temperatures, heart and respiratory rates,

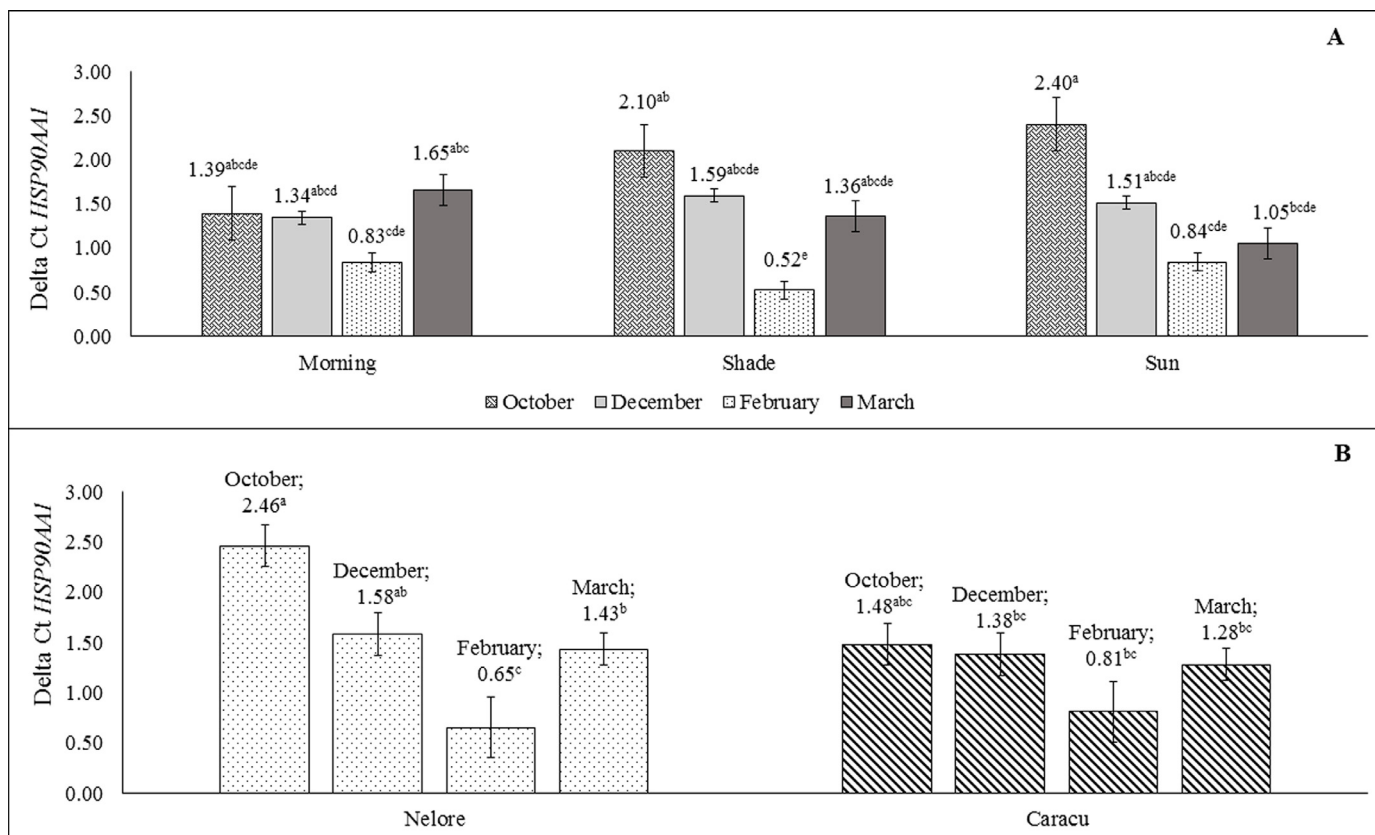


Fig. 3. A. Means estimates for relative expression of *HSP90AA1* according to treatment and month interaction in Nelore and Caracu steers. B. Means estimates for relative expression of *HSP90AA1* according to Nelore or Caracu breed and month interaction. Different superscript letters denote significant differences ($P < 0.05$).

hormone functions, and gene expression patterns (Abdelnour et al., 2018; Sejian et al., 2018). These results were expected, given that Nelore is one of the zebuine breeds, which are characterized by higher heat tolerance as compared to taurine breeds.

Differences observed between temperature-humidity index in shade and sun treatments demonstrated the highest stress in animals in sun environment. According to the classification of the U.S. Livestock Weather Safety Index (LCI, 1970) the THI were not within the thermal comfort zone, which is classified as emergency situation with values of 84 or greater because can cause heat stress in the animals and affect their productive performance (Santana et al., 2016; Baena et al., 2019). Studies evaluating cattle in tropical climates reported THI ranging from 65 to 90 (Menegassi et al., 2016; Santana et al., 2016), which are values similar to our study. Therefore, it is important to point out that the THI equations did not includes the solar radiation and wind speed, which limits the heat stress estimation in beef cattle on pasture systems (Brown-Brandl, 2018; Baena et al., 2019).

We observed that increasing the environmental temperature resulted in an RT increase, as reported by Scharf et al. (2010); in Angus (taurine) and Romosinuano (tropical taurine) steers submitted to heat stress conditions, they found that RT increased 0.17 °C under heat stress conditions, and Romosinuano maintained their RT at approximately 0.30 °C lower as compared to Angus steers.

The ST was directly influenced by coat and hair characteristics such as color, length, and density (Sejian et al., 2018). Baena et al. (2019), studying the Angus and Simmental taurine breeds, showed that differences in morphological traits are associated with animal adaptation, according to the season. A high content of melanin in the hair and skin hampers the reflection of heat waves to the surface, and consequently the animal absorbs greater radiation and increases its body temperature faster (Bianchini et al., 2006; Baena et al., 2019). It was previously observed in a study with Caracu steers, which are characterized by dark long hairs and light skin, that the high length of hair is a disadvantage in tropical environments, because it hampers heat transfer owing to the physical barrier imposed by its fibers (Barbosa et al., 2014).

The increase in RT and ST resulted in elevation of the heart and respiration rates of both breeds, as observed in previous studies (Renaudeau et al., 2012; Brown-Brandl, 2018). The values of HR observed in Nelore steers in our study were higher as compared to those reported previously for Nelore beef cattle by Barbosa et al. (2014) and McManus et al. (2011), which were 61.2 beats/min and 67.4 beats/min, respectively. Baena et al. (2019) found that the respiratory rate was greater in Angus as compared to Simmental taurine breeds, indicating that physiological conditions in cattle are influenced by both the genetic composition of the herd and the elevation of temperature due to sun exposure in hot climates (Collier et al., 2008; Misztal, 2017).

Although Nelore and Caracu breeds presented similar RR, significant differences in RR was observed between breeds. It is important to highlight that RR exhibited high variation in both population studied and it could be influenced by several factors such as adaptability, reactivity, healthy, body and genetic traits. The similar thermal stress level showed by Nelore and Caracu steers could be resulted from their adaptability to tropical regions because both breeds were submitted to high environmental temperatures during their development in Brazil.

In this study, the cortisol concentration was greater in Caracu as compared to Nelore steers. Similar studies have shown differences in cortisol concentrations between cattle breeds, where the highest cortisol concentration was observed in Romosinuano (36.54 ng/mL) and the lowest in Angus (30.72 ng/mL) (Chase et al., 2017), and the cortisol concentration observed in Brahman (35.6 ng/mL) was higher compared to that of Senepol (21.7 ng/mL) (Hammond et al., 1996).

Increasing the circulating cortisol concentration causes elevated cellular levels of heat shock proteins, which are associated with the intracellular heat shock response (Brown-Brandl, 2018). In addition, air temperature conditions result in changes in thermoregulation with an imbalance between the heat production and heat loss mechanisms

(Archana et al., 2017).

Differences in *HSPD1* and *HSP90AA1* relative expression were observed between Caracu and Nelore breeds, corroborating that zebu cattle are naturally adapted to different climatic conditions. Hooper et al. (2018), in a study of Nelore cows, described the expression of *HSPD1* fluctuating from 0.93 (42 °C) to 1.20 (40 °C), while we observed that the relative expression of *HSPD1* ranged from 0.17 to 7.87 in Nelore and from -1.91 to 6.97 in Caracu steers during sun exposure (36.35 °C to 41.96 °C) in all months studied.

In the current study, the hsp60 expression level was relatively constant regardless of treatment. Kumar et al. (2015) observed that the expression of hsp60 (*HSPD1*) in zebu cattle did not differ between winter and summer seasons. Kishore et al. (2014), studying Sahiwal (*Bos taurus indicus*) cows, detected that hsp60 (*HSPD1*) expression levels increased after two hours of sun exposure and decreased after four hours without sun exposure.

The action of HSPs protects cells from the deleterious effects of heat stress, and their activation is dependent on multiple factors, including interaction with the environment (Rajoriya et al., 2014). Studies have shown a specific association between *HSPA1A* (hsp70) expression and thermotolerance mechanisms, in which high temperatures can stimulate *HSPA1A* (hsp70) transcription (Singh et al., 2014; Archana et al., 2017; Abdelnour et al., 2018).

We demonstrated that breed and treatment did not influence the relative expression of *HSPA1A*. Hooper et al. (2018) also did not find significant differences in the expression of hsp70 in Nelore cows that were efficient or inefficient at dissipating heat. Rajoriya et al. (2014), in a study on Tharparkar (zebu cattle) bull sperm, did not detect significant differences in *HSPA1A* expression between the summer and winter seasons.

However, DiGiacomo et al. (2014) studied beef cattle exposure to sun and shade for 120 days and detected an increase in the expression of *HSPA1A* (hsp70) in adipocytes of animals exposed to the sun. Singh et al. (2014) reported that the relative expression of the *HSPA1A* gene was significantly higher ($P = 0.0026$) in Karan-Fries (crossbreed Holstein × Tharparkar) as compared to the Tharparkar (Zebu) breed. Indeed, the difference observed in the expression of HSPs shows the high variability in animals within and between breeds, which is influenced by environmental, genetic, and evolutionary mechanisms.

Regarding hsp90 (*HSP90AA1*) expression, we found that breed could have an influence. Deb et al. (2014) found that the Sahiwal (*Bos taurus indicus*) breed of cattle have higher *HSP90AA1* (hsp90) gene expression as compared to Frieswal (*Bos taurus indicus* × *Bos taurus taurus*) cattle during summer stress. Kumar et al. (2015) reported that *HSP* expression in zebu breeds has a close relationship with that of taurine breeds. Responses to thermal stress are enhanced in *Bos taurus indicus* breeds, which are better able to regulate their metabolism in response to heat stress as compared to *Bos taurus taurus* breeds (Hansen, 2004; Charoensook et al., 2012; Kishore et al., 2014). A study performed on Bali beef cattle (*Bos sondaicus*) found that differences in environmental conditions in the morning and afternoon did not affect hsp90 expression (Aritonang et al., 2017). Deb et al. (2014) observed that *HSP90AA1* (hsp90) gene expression was significantly higher during heat stress at 45 °C in Sahiwal (*Bos taurus indicus*) and Frieswal (*Bos taurus indicus* × *Bos taurus taurus* crossbreed) breeds in comparison to the heat stress at 39 °C. In our study, the environmental conditions (month and treatment) also influenced the expression of *HSP90AA1*.

The *HSP90AA1* upregulation during heat stress resulted from fast induction of hsp90 protein translation to protect the cells from heat stress (Collier et al., 2008). Previous studies also reported that *HSP90AA1* is upregulated owing to climatic conditions and physiological characteristics in taurine and zebuine cattle breeds (Charoensook et al., 2012; Kumar et al., 2015; Hooper et al., 2018). The lower expression of *HSP90AA1* detected in February can be associated with physiological parameters and climatic conditions. *HSP90AA1* gene expression was not significantly different between Nelore and Caracu

breeds when considering the month and breed interaction, showing that both breeds are adapted to a tropical climate.

5. Conclusion

The expression of HSPs and physiological parameters measured (cortisol concentration, rectal and skin temperatures, heart and respiratory rates) showed that Nelore and Caracu steers respond differentially under heat stress conditions; therefore, both breeds are tolerant to tropical climates. The significant variation observed in *HSPD1*, *HSPA1A*, and *HSP90AA1* gene expression in Nelore and Caracu breeds demonstrated that heat tolerance is dependent on the different characteristics of each breed, showing a strong influence of environmental conditions. The intense genetic breeding and selection of Nelore cattle in Brazil has increased their adaptability to tropical conditions and production efficiency. Although genetic breeding programs have also been applied in the Caracu breed, with less emphasis, the history of Caracu breeding has allowed their adaptive mechanisms to improve through the selection of animals that are tolerant to hot environments.

Research data for this article

The data that support the findings of this study are available for exclusive research purpose. Requests to access data should be sent to Dr. Claudia C. Paro de Paz (email: claudiapaz@iz.sp.gov.br).

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge the São Paulo Research Foundation (FAPESP, Brazil, grant number #2016/19222-1) and National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq, Brazil, grant number #409485/2018-7) to provide the financial support to conduct the research. B. V. Pires and S. B. G. P. N. P. Lima received a fellowship from CNPq and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil, Finance Code 001), respectively. N. B. Stafuzza received FAPESP grants (#2018/19216-7 and #2019/10438-0). J. A. Negrão and C. C. P. Paz were supported by productivity research fellowship from CNPq.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.livsci.2019.103839.

References

Abdelnour, S.A., Abd El-Hack, M.E., Khafaga, A.F., Arif, M., Taha, A.E., Noreldin, A.E., 2018. Stress biomarkers and proteomics alteration to thermal stress in ruminants: a review. *J. Therm. Biol.* 79, 120–134. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.12.013>.

Archana, P.R., Aleena, J., Pragna, P., Vidya, M.K., Abdul Niyas, P.A., Bagath, M., Krishnan, G., Manimaran, A., Beena, V., Kurien, E.K., Sejian, V., Bhatta, R., 2017. Role of heat shock proteins in livestock adaptation to heat stress. *J. Dairy Vet. Anim. Res.* 5, 13–19. <https://doi.org/10.15406/jdvar.2017.05.00127>.

Aritonang, S.B., Yuniati, R., Abinawanto, Imron, M., Bowolaksono, A., 2017. Effect of thermal stress on *HSP90* expression of Bali cattle in Barru district, South Sulawesi. In: AIP Conference Proceedings. AIP, Birmingham, pp. 1862. <https://doi.org/10.1063/1.4991208>.

Baena, M.M., Costa, A.C., Vieira, G.R., Rocha, R., de, F.B., Ribeiro, A.R.B., Ibelli, A.M.G., Meirelles, S.L.C., 2019. Heat tolerance responses in a *Bos taurus* cattle herd raised in a Brazilian climate. *J. Therm. Biol.* 81, 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2019.02.017>.

Barbosa, B.R.P., Santos, S.A., Abreu, U.G.P.de, Egito, A.A., Filho, J.A.C., Juliano, R.S., Paiva, S.R., McManus, C.M., 2014. Tolerância ao calor em bovinos das raças Nelore branco, Nelore vermelho e Pantaneira. *Rev. Bras. Saúde e Produção Anim.* 15, 854–865. <https://doi.org/10.1590/S1519-99402014000400010>.

Bernabucci, U., Lacetera, N., Baumgard, L.H., Rhoads, R.P., Ronchi, B., Nardone, A., 2010. Metabolic and hormonal acclimation to heat stress in domesticated ruminants. *Animal* 4, 1167–1183. <https://doi.org/10.1017/S175173111000090X>.

Bianchini, E., McManus, C., Lucci, C.M., Fernandes, M.C.B., Prescott, E., Mariante, A.D.S., Do Egito, A.A., 2006. Características corporais associadas com a adaptação ao calor em bovinos naturalizados brasileiros. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 41, 1443–1448. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2006009000014>.

Binsiya, T.K., Sejian, V., Bagath, M., Krishnan, G., Hyder, I., Manimaran, A., Lees, A.M., Gaughan, J.B., Bhatta, R., 2017. Significance of hypothalamic-pituitary-adrenal axis to adapt to climate change in livestock. *Int. Res. J. Agric. Food Sci.* 2, 1–20.

Brown-Brandl, T.M., 2018. Understanding heat stress in beef cattle. *Rev. Bras. Zootec.* 47, 1–9. <https://doi.org/10.1590/rbz4720160414>.

Charoensook, R., Gatphayak, K., Sharifi, A.R., Chaisongkram, C., Brenig, B., Knorr, C., 2012. Polymorphisms in the bovine *HSP90A1* gene are associated with heat tolerance in *Thai indigenous* cattle. *Trop. Anim. Health Prod.* 44, 921–928. <https://doi.org/10.1007/s11250-011-9989-8>.

Chase, C.C., Randel, R.D., Riley, D.G., Coleman, S.W., Phillips, W.A., 2017. Evaluation of tropically adapted straightbred and crossbred beef cattle: cortisol concentration and measures of temperament at weaning and transport. *J. Anim. Sci.* 95, 5253–5262. <https://doi.org/10.2527/jas2017.1924>.

Collier, R.J., Collier, J.L., Rhoads, R.P., Baumgard, L.H., 2008. Invited review: genes involved in the bovine heat stress response. *J. Dairy Sci.* 91, 445–454. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0540>.

Csermely, P., Schnaider, T., Soti, C., Prohászka, Z., Nardai, G., 1998. The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacol. Ther.* 79, 129–168. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(98\)00013-8](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(98)00013-8).

Das, R., Sailo, L., Verma, N., Bharti, P., Saikia, J., Imtiwati, Kumar, R., 2016. Impact of heat stress on health and performance of dairy animals: a review. *Vet. World* 9, 260–268. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.260-268>.

Deb, R., Sajjanar, B., Singh, U., Kumar, S., Singh, R., Sengar, G., Sharma, A., 2014. Effect of heat stress on the expression profile of *hsp70* among Sahiwal (*Bos indicus*) and Frieswal (*Bos indicus* × *Bos taurus*) breed of cattle: a comparative study. *Gene* 536, 435–440. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.11.086>.

DiGiacomo, K., Leury, B.J., Dunshea, F.R., 2014. Potential nutritional strategies for the amelioration or prevention of high rigor temperature in cattle – a review. *Anim. Prod. Sci.* 54, 430–443. <https://doi.org/10.1071/AN13303>.

Feder, J.H., Rossi, J.M., Solomon, J., Solomon, N., Lindquist, S., 1992. The consequences of expressing *hsp70* in *Drosophila* cells at normal temperatures. *Genes Dev.* 6, 1402–1413. <https://doi.org/10.1101/gad.6.8.1402>.

Garrido, C., Gurbuxani, S., Ravagnan, L., Kroemer, G., 2001. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 286, 433–442. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5427>.

Hammond, A.C., Olson, T.A., Chase, C.C., Bowers, E.J., Randel, R.D., Murphy, C.N., Vogt, D.W., Tewolde, A., 1996. Heat tolerance in two tropically adapted *Bos taurus* breeds, Senepol and Romosinuano, compared with Brahman, Angus and Hereford cattle in Florida. *J. Anim. Sci.* 74, 295–303. <https://doi.org/10.2527/1996.742295x>.

Hansen, P., 2004. Physiological and cellular adaptations of Zebu cattle to thermal stress. *Anim. Reprod. Sci.* 82–83, 349–360. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.011>.

Hooper, H.B., Titto, C.G., Gonella-Díaz, A.M., Henrique, F.L., Pulido-Rodríguez, L.F., Longo, A.L.S., Leme-dos-Santos, T.M., da, C., Geraldo, A.C.A.P., de, M., Pereira, A.M.F., Binelli, M., Balieiro, J.C., de, C., Titto, E.A.L., 2018. Heat loss efficiency and *HSPs* gene expression of Nelore cows in tropical climate conditions. *Int. J. Biometeorol.* <https://doi.org/10.1007/s00484-018-1576-5>.

Kishore, A., Sodhi, M., Kumari, P., Mohanty, A.K., Sadana, D.K., Kapila, N., Khate, K., Shandilya, U., Kataria, R.S., Mukesh, M., 2014. 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* 19, 613–621. <https://doi.org/10.1007/s12192-013-0486-z>.

Kumar, A., Ashraf, S., Goud, T.S., Grewal, A., Singh, S.V., Yadav, B.R., Upadhyay, R.C., 2015. Expression profiling of major heat shock protein genes during different seasons in cattle (*Bos indicus*) and buffalo (*Bubalus bubalis*) under tropical climatic condition. *J. Therm. Biol.* 51, 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2015.03.006>.

Kumar, J., Madan, A.K., Kumar, M., Sirohi, R., Yadav, B., Reddy, A.V., Swain, D.K., 2018. Impact of season on antioxidants, nutritional metabolic status, cortisol and heat shock proteins in Harijana and Sahiwal cattle. *Biol. Rhythm Res.* 49, 29–38. <https://doi.org/10.1080/09291016.2017.1332842>.

Lebret, T., Watson, R.W.G., Molinié, V., O'Neill, A., Gabriel, C., Fitzpatrick, J.M., Botto, H., 2003. Heat shock proteins *HSP27*, *HSP60*, *HSP70*, and *HSP90*: expression in bladder carcinoma. *Cancer* 98, 970–977. <https://doi.org/10.1002/cncr.11594>.

LCI – Livestock Conservation Inc, 1970. Patterns of Transit Losses. Livestock Conservation, Inc., Omaha, NE.

Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. *Methods* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.

McManus, C., Castanheira, M., Paiva, S.R., Louvandini, H., Fioravanti, M.C.S., Paludo, G.R., Bianchini, E., Corrêa, P.S., 2011. Use of multivariate analyses for determining heat tolerance in Brazilian cattle. *Trop. Anim. Health Prod.* 43, 623–630. <https://doi.org/10.1007/s11250-010-9742-8>.

Misztal, I., 2017. Breeding and genetics Symposium: resilience and lessons from studies in genetics of heat stress. *J. Anim. Sci.* 95, 1780. <https://doi.org/10.2527/jas2016.0953>.

Menegassi, S.R.O., Pereira, G.R., Bremm, C., Koetz Jr, C., Lopes, F.G., Fiorentini, E.C., McManus, C., Dias, E.A., Rocha, M.K., Lopes, R.B., Barcellos, J.O.J., 2016. Effects of

- ambient air temperature, humidity, and wind speed on seminal traits in Braford and Nellore bulls at the Brazilian Pantanal. *Int. J. Biometeorol.* 60, 1787–1794. <https://doi.org/10.1007/s00484-016-1167-2>.
- Potter, C.F., Jacobsen, K.L., 2000. La riduzione dello stress da calore in un allevamento di bovine da latte del nord-est degli USA. *Large Anim. Rev.* 6, 35–41.
- Rajoriya, J.S., Prasad, J.K., Ghosh, S.K., Perumal, P., Kumar, A., Kaushal, S., Ramteke, S.S., 2014. Studies on effect of different seasons on expression of *HSP70* and *HSP90* gene in sperm of Tharparkar bull semen. *Asian Pacific J. Reprod.* 3, 192–199. [https://doi.org/10.1016/S2305-0500\(14\)60025-7](https://doi.org/10.1016/S2305-0500(14)60025-7).
- Renaudeau, D., Collin, A., Yahav, S., De Bascilio, V., Gourdiere, J.L., Collier, R.J., 2012. Adaptation to hot climate and strategies to alleviate heat stress in livestock production. *Animal* 6, 707–728. <https://doi.org/10.1017/S1751731111002448>.
- Santana, M.L., Bignardi, A.B., Eler, J.P., Ferraz, J.B.S., 2016. Genetic variation of the weaning weight of beef cattle as a function of accumulated heat stress. *J. Anim. Breed. Genet.* 133, 92–104. <https://doi.org/10.1111/jbg.12169>.
- Scharf, B., Carroll, J.A., Riley, D.G., Chase, C.C., Coleman, S.W., Keisler, D.H., Weaber, R.L., Spiers, D.E., 2010. Evaluation of physiological and blood serum differences in heat-tolerant (Romosinuano) and heat-susceptible (Angus) *Bos taurus* cattle during controlled heat challenge. *J. Anim. Sci.* 88, 2321–2336. <https://doi.org/10.2527/jas.2009-2551>.
- Sejian, V., Bhatta, R., Gaughan, J.B., Dunshea, F.R., Lacetera, N., 2018. Review: adaptation of animals to heat stress. *Animal* 12, 431–444. <https://doi.org/10.1017/S1751731118001945>.
- Singh, A.K., Upadhyay, R.C., Malakar, D., Kumar, S., Singh, S.V., 2014. Effect of thermal stress on *HSP70* expression in dermal fibroblast of zebu (Tharparkar) and crossbred (Karan-Fries) cattle. *J. Therm. Biol.* 43, 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2014.04.006>.
- Singh, R., Rajesh, C., Mishra, S.K., Gurao, A., Vohra, V., Niranjana, S.K., Kataria, R.S., 2018. Comparative expression profiling of heat-stress tolerance associated *HSP60* and *GLUT-1* genes in Indian Buffaloes. *Indian J. Dairy Sci.* 71, 183–186.
- WMO, 2019. World Meteorological Day. World Meteorol. Organ. <https://worldmetday.wmo.int/en/secretary-generals-message> (accessed 2 May 2019).

CAPÍTULO 4. EXPRESSION OF CANDIDATE GENES FOR RESIDUAL FEED INTAKE IN TROPICALLY ADAPTED *BOS TAURUS TAURUS* AND *BOS INDICUS* BULLS UNDER THERMONEUTRAL AND HEAT STRESS ENVIRONMENTAL CONDITIONS.

Artigo publicado na revista *Journal of Thermal Biology* (Online) como parte dos resultados obtidos no presente trabalho de doutorado. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2021.102998>

Received 30 March 2021; Available online 21 May 2021



Expression of candidate genes for residual feed intake in tropically adapted *Bos taurus* and *Bos indicus* bulls under thermoneutral and heat stress environmental conditions

Bianca Vilela Pires^{a,*}, Nedenia Bonvino Stafuzza^b, Luara Afonso de Freitas^a,
Maria Eugênia Zerlotti Mercadante^b, Ester Silveira Ramos^a, Claudia Cristina Paro Paz^{a,b}

^a Department of Genetics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, 14049-900, Brazil

^b Beef Cattle Research Center, Animal Science Institute, Sertãozinho, São Paulo, 14174-000, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Beef cattle
Feed efficiency
qPCR
Heat stress

ABSTRACT

The objectives of this study were to measure the relative expression of the *ATP1A1*, *NR3C1*, *POMC*, *NPY*, and *LEP* genes in Caracu (*Bos taurus*) and Nelore (*Bos indicus*) bulls submitted to feed efficiency tests at high environmental temperatures, and to evaluate differences in adaptability to tropical conditions between breeds. Thirty-five Caracu and 30 Nelore bulls were submitted to a feed efficiency test using automated feeding stations. At the end of the test, the animals were subjected to thermoneutral (TN) and heat stress (HS) conditions. Blood samples were collected after the exposure to the TN and HS conditions and the relative expression of genes was measured by qPCR. The bulls exhibited lower expression of *ATP1A1* in the HS condition than in the TN condition (1.98 ± 0.27 and 2.86 ± 0.26 , $P = 0.02$), while the relative expression of *NR3C1*, *POMC*, and *LEP* did not differ ($P > 0.05$) between climatic conditions. The breed and feed intake influenced *NPY* and *LEP* expression levels ($P < 0.05$). Different climate conditions associated with residual feed intake can modify the gene expression patterns of *ATP1A1* and *NPY*. The association observed among all genes studied shows that they are involved in appetite control. *Bos taurus* and *Bos indicus* bulls exhibited similar adaptability to tropical climate conditions.

1. Introduction

Feed efficiency and thermotolerance are important traits of livestock animals, which are influenced by several genetic, environmental, and physiological factors (Abreu et al., 2019; Casas and Kehrl, 2016; Sneling et al., 2011). Feed efficiency is measured by residual feed intake (RFI) (Koch et al., 1963) and, recently, by residual intake and gain (RIG). The latter is a feed efficiency index that associates RFI with residual gain (RG) (Crowley et al., 2010), classifying animals with high average daily gain and concomitantly low feed intake. The animals with higher values are most efficient (Berry and Crowley, 2012).

The environmental temperature negatively affects feed intake, in which animals that are outside the thermoneutrality zone show a

decrease in dry matter intake (DMI); consequently, the appetite center of the hypothalamus needs to reduce metabolic heat production for body temperature maintenance (Angel et al., 2018; Cantalapiedra-Hijar et al., 2018; Curtis et al., 2017; Habeeb et al., 2018). With respect to the association between environmental conditions and feed intake in cattle, Summer et al. (2019) suggest that heat stress affects the growth rate and meat quality. A study using crossbred steers reported a higher average daily gain and DMI in steers kept in a shaded environment compared to those without access to shade (Winders et al., 2020). Reduced feed intake was reported in different cattle breeds during sun exposure (Aleena et al., 2016). This finding can be explained by a lower feed intake to reduce metabolic heat production (Habeeb et al., 2018; Sejian et al., 2018).

Abbreviations: thermoneutral conditions, (TN); heat stress conditions, (HS); residual intake and gain, (RIG); dry matter intake, (DMI); *ATP1A1*, (ATPase Na⁺/K⁺ transporting subunit alpha 1); *NR3C1*, (nuclear receptor subfamily 3 group C member 1); *POMC*, (proopiomelanocortin); *NPY*, (neuropeptide Y); *LEP*, (leptin); body weight, (BW); average daily gain, (ADG); mid-test metabolic body weight, (BW^{0.75}); feed conversion ratio, (FCR); feed efficiency, (FE); environmental temperature, (ET); relative humidity, (RH); wet bulb temperature, (Twb); principal component analysis, (PCA); first principal component, (PC1); second principal component, (PC2); third principal component, (PC3).

* Corresponding author.

E-mail addresses: bianca2510@outlook.com, biancapires@usp.br (B.V. Pires).

<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2021.102998>

Received 30 March 2021; Received in revised form 14 May 2021; Accepted 16 May 2021

Available online 21 May 2021

0306-4565/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Feed efficiency is characterized by a complex biology and regulatory mechanisms, with many genes contributing to the variation in feed efficiency indexes (Al-Husseini et al., 2014; Oliveira et al., 2018; Ramayo-Caldas et al., 2018; Takeda et al., 2020). Studies on Angus (Al-Husseini et al., 2014; Perkins et al., 2014) and Nelore breeds (Oliveira et al., 2014; Santana et al., 2014) have identified several genomic regions and candidate genes that are associated with feed efficiency and growth traits (Snelling et al., 2011). Candidate genes such as *ATP1A1* (ATPase Na⁺/K⁺ transporting subunit alpha 1), *NR3C1* (nuclear receptor subfamily 3 group C member 1), *POMC* (proopiomelanocortin), *NPY* (neuropeptide Y), and *LEP* (leptin) are highlighted in the literature.

The *ATP1A1* gene plays an important role in the regulation of energy requirement, in substance and nutrient transport, and in the electrical excitability of nerve and muscles, affecting meat quality (Barendse et al., 2007; Kashyap et al., 2015; Sejian et al., 2018). Besides, a role of this gene in thermotolerance has been reported in cattle (Das et al., 2015; Kaushik et al., 2019; Liu et al., 2011). The *NR3C1* gene encodes a glucocorticoid receptor and is associated with plasma cortisol concentration, stress conditions, and meat quality in mammals (Huber et al., 2020; Li et al., 2017; Majewska et al., 2012; Xi et al., 2015).

The *POMC* gene has been associated with homeostasis and feed behavior and efficiency (Afsal et al., 2018; Deobald and Buchanan, 2011). It is considered an anorexigenic gene and its upregulation has been linked to the downregulation of the *NPY* gene and upregulation of the *LEP* gene (Paeger et al., 2017; Perkins et al., 2014). The *NPY* gene influences several biological pathways that regulate appetite, ingestive behavior, and energy homeostasis in humans and animals (Chung et al., 2011; Santana et al., 2014; Yu et al., 2017). Likewise, its expression is linked to increased plasma levels of insulin and corticosteroids, which mediate some actions of leptin in the hypothalamus (Anubhuti, 2006; Diniz-Magalhães et al., 2017). Several studies reported the importance of the *LEP* gene in animal growth, energy balance, immune system, fat deposition, reproductive traits, and heat stress (Casas and Kehrl, 2016; Foote et al., 2016; Kononoff et al., 2017; Woronuk et al., 2012).

Previous studies have compared feed efficiency and adaptability between zebuine and taurine breeds (Hansen, 2004; Sejian et al., 2018). Caracu (*Bos taurus*) and Nelore (*Bos indicus*) cattle are important breeds in Brazil. The Caracu (*Bos taurus*) is a taurine breed adapted to the Brazilian tropical climate and its rusticity are advantages in the production system (Campos et al., 2017; Pereira et al., 2008), while Nelore (*Bos indicus*) breed is characterized by adaptability to hot climates and corresponding to 80% of the beef cattle herd in Brazil (Barbosa et al., 2014).

We hypothesize that the heat stress (HS) is lowest in high feed efficient animals, the variation in gene expression patterns is high under HS conditions, and that Caracu bulls are more susceptible to HS than Nelore bulls. Thus, the objectives of this study were to measure the relative expression of the *ATP1A1*, *NR3C1*, *POMC*, *NPY*, and *LEP* genes in Caracu (*Bos taurus*) and Nelore (*Bos indicus*) bulls submitted to feed efficiency tests at high environmental temperatures, to evaluate differences in adaptability to tropical conditions between taurine and zebuine breeds, and to identify variability and interrelationship among all traits analyzed.

2. Materials and methods

2.1. Animals

The experimental procedures were conducted following the recommendations of the Institutional Animal Care and Use Committee of the Beef Cattle Center, Animal Science Institute, Sertãozinho, São Paulo, Brazil (CEUA No. 237–16). Thirty-five Caracu and 30 Nelore bulls aged 8.90 ± 0.8 months from the Animal Science Institute, Sertãozinho, Brazil, were used in this study.

2.2. Feed intake and performance traits

Feed intake was measured for each animal using two automated feeding stations: Intergado® for Caracu bulls and GrowSafe Systems® for Nelore bulls. During a 56-day adaptation period before the test, the diets were adjusted and the bulls were accustomed to the feed in the automated feeding stations. The individual DMI was recorded daily for 64 days. Animals were fed twice daily a maize-based ensilage diet (Table 1). The amount of feed offered to each animal was adjusted daily to target approximately 10% leftovers.

Body weights (BW) were collected every 14 days using a calibrated weight scale. Daily DMI was calculated as the mean of valid days of feed intake previously multiplied by weekly dry matter (DM) content of the diet. For calculation of the DM content of the diet, two weekly samples were obtained to compose weekly dry matter.

Average daily gain (ADG) was calculated by linear regression of weights throughout the days on test (DOT) as follows: $\gamma_i = \alpha + \beta^* DOT_i + \varepsilon_i$, where γ_i is the animal's body weight in the *i*th observation; α is the intercept, which indicates the initial weight; β is the linear regression coefficient representing ADG; DOT_i is the days on test in the *i*th observation, and ε_i is the random error associated with each observation. The mid-test metabolic body weight ($BW^{0.75}$) was calculated as:

$$BW^{0.75} = \left[\alpha + \left(\frac{1}{2} ADG * DOT \right) \right]^{0.75}$$

where α is the intercept of the regression equation which indicates the initial BW, and DOT is the days on test.

The feed conversion ratio (FCR) was obtained as the ratio between DMI and ADG; on the other hand, feed efficiency (FE) was calculated as the ratio between ADG and DMI. Dry matter intake, $BW^{0.75}$, and ADG were used to estimate RFI and RG in each breed (Caracu and Nelore) using linear regressions of DMI (1) and ADG (2) according to Koch et al. (1963): $DMI = \beta_0 + \beta_1 ADG + \beta_2 BW^{0.75} + \varepsilon$ (1) and $ADG = \beta_0 + \beta_1 DMI + \beta_2 BW^{0.75} + \varepsilon$ (2), where β_0 is the intercept; β_1 is the regression coefficient for ADG (RFI) and DMI (RG); β_2 is the regression coefficient for $BW^{0.75}$, and ε is RFI and RG in equation 1 and 2, respectively.

The RIG index included RFI and RG whose variance is adjusted to 1 using the equation proposed by Berry and Crowley (2012): $RIG = \frac{RG}{\sigma_{RG}} - \frac{RFI}{\sigma_{RFI}}$. Based on the RIG index, the animals were classified into three groups: high efficiency - HE (>mean + 0.5 σ_{RIG}), medium efficiency - ME (mean ± 0.5 σ_{RIG}), and low efficiency - LE (<mean - 0.5 σ_{RIG}).

2.3. Environmental conditions

Data were collected from all animals at the end of the feed efficiency test in October. The day was selected according to the highest

Table 1
Ingredient and chemical composition of the total mixed ration.

Ingredient composition (% as fed)	Percentage
Maize silage	70.00
<i>Brachiaria brizantha</i> hay	6.00
Ground maize	15.00
Soybean meal	8.00
Mineral ^b	1.00
Chemical composition (% of DM ^a)	
Dry matter	42.75
Crude protein	6.70
Neutral detergent fiber	51.29
Acid detergent fiber	20.46
Ether extract	3.39
Total digestible nutrients	64.36

^a DM: dry matter.

^b Composition per kilogram: phosphorus 8.0 g/day; calcium 17.0 g/day; sodium 6.5 g/day; sulfur 2.2 g/day; magnesium 0.8 g/day; zinc 360.0 mg/day; copper 100.0 mg/day; manganese 70.0 mg/day; cobalt 8.0 mg/day; iodine 8.0 mg/day; selenium 1.8 mg/day.

environmental temperature (ET) and wet bulb temperature (Twb). Relative humidity (RH), ET and Twb were recorded using two HOBO® Micro Station Data Logger (Onset®, Cape Cod, MA, USA) installed inside the barn (thermoneutral condition: TN) and outside the barn (HS condition). The rainfall during the data collection period was 52.7 mm, the ET was 28.7 °C, and the RH was 49.45% (Fig. 1).

The animals were divided into two groups according to breed and subjected to the TN and HS conditions. For 2 h (11:00 to 13:00 h), 35 bulls (21 Caracu and 14 Nelore) were kept in a shaded barn consisting of a covered area open on all four sides and a concrete floor, and 30 bulls (14 Caracu and 16 Nelore) remained in a sun-exposed open corral with dirt floor and without trees. All animals had *ad libitum* access to feed and water.

2.4. RNA extraction

The blood samples were collected by jugular vein puncture into vacutainer tubes (4 mL) containing K₃EDTA after the exposure of all animals to the TN and HS conditions. The samples were centrifuged at 1500×g for 15 min at 4 °C for the separation of white blood cells. The RNA was extracted using the PureLink® RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) according to the manufacturer's recommendations. RNA concentration and purity were checked in a Nanodrop spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). The RNA samples were stored at -80 °C until cDNA synthesis by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

RT-PCR was performed using the GoScript Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions. For the assay, RNA was first incubated with 0.5 µg oligo (dT) primer (Promega, Madison, WI, USA) for 5 min at 70 °C, followed by the addition of 3 mM MgCl₂, 0.5 mM dNTP, 40 U ribonuclease inhibitor, 4 µL GoScript 1X reaction buffer, 1 µL GoScript reverse transcriptase, and nuclease-free water up to 20 µL. The reaction mixture was incubated at 42 °C for 1 h, followed by 15 min at 70 °C.

2.5. Real-time quantitative PCR

The real-time quantitative PCR assays were performed in a StepOnePlus equipment (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using PowerUp SYBR Green Master Mix (ThermoFisher, Waltham, MA, USA). The reaction mixture contained 1 µL cDNA, 0.8 µL of each primer (final concentration 0.4 µM), 10 µL SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and 7.4 µL of sterile distilled water in a total volume of 20 µL. In all plates, samples were tested in triplicate and a negative control was included. The amplification conditions were pre-denaturation at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles at 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. The melting curves were analyzed to evaluate the accuracy of RT-qPCR. The efficiency of the primers was provided by

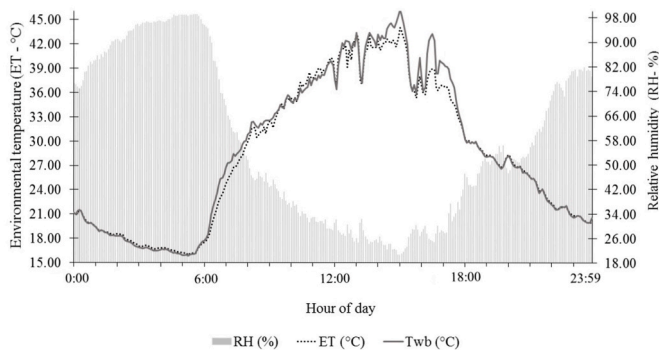


Fig. 1. Variation in environmental temperature (ET), relative humidity (RH), and wet bulb temperature (Twb) over the sampling day in Sertãozinho, SP, Brazil.

the StepOnePlus software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Only an efficiency between 90 and 110% was accepted.

Primers for the target genes were obtained from previous studies (Table 2). The *GAPDH* housekeeping gene was used to normalize RNA recovery in each sample. The relative change in mRNA expression levels was calculated using the Δ Ct method (Livak and Schmittgen, 2001).

2.6. Statistical analysis

The performance traits (DMI, ADG, BW^{0.75}, FCR, and FE) were evaluated using the GLM procedure of SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). The statistical model included the fixed effects of breed according to automated feeding station (GrowSafe® and Intergado®), RIG group, and the interaction between breed (feeding station) and RIG group. The relative expression of the *ATP1A1*, *NR3C1*, *POMC*, *LEP* and *NPY* genes was analyzed using the MIXED procedure of SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). The model included breed according to automated feeding station (GrowSafe® and Intergado®), RIG group, environmental condition (TN and HS), and their interactions as fixed effects. The normal distribution and heteroscedasticity of residuals were verified and residuals were transformed on a base 10 logarithmic scale when the null hypotheses were rejected. Statistical differences were considered to be significant when $p < 0.05$ (Supplementary Table A).

The goal of multivariate principal component analysis (PCA) was to reduce the information contained in the 11 variables (DMI, ADG, BW^{0.75}, FCR, FE, RIG group, and relative expression of *ATP1A1*, *NR3C1*, *POMC*, *NPY*, and *LEP* genes) to a smaller number of principal components, with minimal loss of information (Hair et al., 2009). Principal components are linear combinations of the original variables, which are constructed with the eigenvalues of the covariance matrix. The eigenvalues represent the length and the total variance contained in the principal components. A unit module vector, called an eigenvector, is associated with each eigenvalue. The eigenvectors represent the intensity, direction and sense of the contribution of the variance of each variable within the principal components. Principal component analysis was performed using a correlation matrix and the PRINCOMP procedure of SAS. In a data set with p variables, the principal component i (PC_i) is given by: $PC_i = a_{i2}X_1 + a_{i2}X_2 + I + a_{ij}X_j$ ($i = 1, 2, \dots, 10; j = 1, 2, \dots, 10$), where a_{ij} is the j th eigenvector and X_j is the j th value of the original variable.

3. Results

3.1. Environmental conditions

In the TN condition, the average ET, RH and Twb were 36.18 °C,

Table 2
Sequence of the primers used for qPCR.

Gene ^a	Primer sequence (5'-3')	Reference
GAPDH	F: GGTGATGCTGGTGTGAG	Rajoriya et al. (2014)
	R: TGACAATCTTGAGGGTGTTG	
ATP1A1	F: CAGCAGGGGATGAAGAACAAG	Kashyap et al. (2015)
	R: GGAAGGCACAGAACCACCA	
NR3C1	F: CCATTCTGTTCACGGTGTG	Verma et al. (2018)
	R: CTGAACCGACAGGAATTGGT	
POMC	F: GCCGCTGAACATCCTCGCCC	Perkins et al. (2014)
	R: CTCACAGGCACCAACCACGCA	
NPY	F: TAGCCGAGCGTGATTGCCCG	Perkins et al. (2014)
	R: GGGGGTGTCCGGAGCAGGTT	
LEP	F: ATGCGGTGTGGACCCCTGTATC	Olbromski et al. (2013)
	R: TGGTGTCTATCCTGGACCTTCC	

^a *GAPDH*: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *ATP1A1*: ATPase Na⁺/K⁺ transporting subunit alpha 1; *NR3C1*: nuclear receptor subfamily 3 group C member 1; *POMC*: proopiomelanocortin; *NPY*: neuropeptide Y; *LEP*: leptin.

30.46% and 36.25 °C, respectively. The highest ET (40.07 °C) and Twb (40.56 °C) and the lowest RH (25.53%) were observed in the HS condition.

3.2. Feed intake and performance traits

The mean initial body weight was 276.60 ± 45.06 kg in Caracu bulls and 277.75 ± 19.10 kg in Nelore bulls. Twenty-two animals were classified as HE based on RIG (14 Caracu and 8 Nelore bulls), 21 animals as ME (9 Caracu and 12 Nelore), and 22 animals as LE (12 Caracu and 10 Nelore). There was no significant difference ($P = 0.28$) in DMI (8.44 ± 0.16 and 8.18 ± 0.17 kg/day, respectively) between Caracu and Nelore animals in their respective automated feeding stations. The ADG was influenced by breed and RIG group, in which the ADG was higher for Caracu than for Nelore animals (1.48 ± 0.03 and 1.16 ± 0.03 kg/day; $P = 0.0001$). Animals classified as HE exhibited higher ADG than animals classified as LE (1.40 and 1.25 kg/day, $se = 0.03$, $P = 0.009$). The ADG of animals classified as ME (1.30 kg/day) did not differ from the ADG obtained for animals of the LE and HE groups.

According to automated feeding station, the breed influenced $BW^{0.75}$ ($P = 0.02$). Caracu bulls had a higher $BW^{0.75}$ than Nelore bulls (77.94 ± 1.17 and 73.97 ± 1.26 kg, respectively). Caracu and Nelore bulls had a FCR of 5.73 ± 0.10 and 7.15 ± 0.11 kg DM/kg BW gain ($P = 0.0001$), respectively. The FCR was 5.84 ± 0.13 kg DM/kg BW gain for HE bulls, 6.39 ± 0.13 kg DM/kg BW gain for ME bulls, and 7.09 ± 0.13 kg DM/kg BW gain for LE bulls ($P < 0.01$). Caracu bulls had a FE of 0.18 ± 0.002 kg BW gain/kg DM, while Nelore bulls had a FE of 0.14 ± 0.002 kg BW gain/kg DM ($P < 0.05$). The FE was higher in LE bulls ($P < 0.01$) compared to the ME and HE groups (Fig. 2).

3.3. Gene expression

The relative expression of the *ATP1A1*, *NR3C1*, or *POMC* gene did not differ between Caracu and Nelore bulls ($P > 0.05$). The bulls showed lower expression of the *ATP1A1* gene in the HS condition than in the TN

condition (1.98 ± 0.27 and 2.86 ± 0.26, $P = 0.02$), while the relative expression of the *NR3C1*, *POMC*, or *LEP* gene was not different ($P > 0.05$) between the TN and HS conditions. The RIG group did not influence the relative expression of *ATP1A1*, *NR3C1*, or *POMC* in the animals studied.

The interaction between breed and environmental condition influenced the relative expression of the *NPY* gene ($P = 0.005$). Caracu bulls in the HS condition exhibited lower *NPY* expression levels than Caracu in the TN condition (0.46 ± 0.34 and 2.95 ± 0.44). In the TN condition, no significant difference in *NPY* expression levels was observed between Caracu and Nelore bulls (2.95 ± 0.44 and 2.46 ± 0.59, respectively). There was no significant difference ($P > 0.05$) in *NPY* expression levels between Nelore bulls submitted to the TN and HS (2.95 ± 0.44 and 3.21 ± 0.52) (Fig. 3).

The interaction between breed and RIG group influenced ($P < 0.05$) *NPY* and *LEP* expression levels (Fig. 3). High *NPY* expression was observed in Nelore bulls of the LE group (3.20 ± 0.67), while the same was not observed in Caracu bulls of the same RIG group (0.42 ± 0.38). No differences in *NPY* expression was found between HE and ME animals of either breed. Expression of the *LEP* gene in Caracu bulls differed ($P = 0.04$) between the ME (4.03 ± 0.75) and LE groups (2.26 ± 0.59). In the HE group, no difference in *LEP* gene expression was observed between Caracu and Nelore bulls ($P = 0.49$). The expression of this gene was also similar ($P > 0.05$) between Nelore bulls RIG groups.

Principal component analysis resulted in three principal components, which together explained 77.7% of the variability of the traits. The traits of the first principal component (PC1) explained 30.15% of the variability. The *ATP1A1*, *NR3C1*, *POMC*, *NPY*, and *LEP* genes had eigenvectors in the same direction, which indicated a medium strength of the association among the genes studied. In the second principal component (PC2), ADG, FCR, FE, and RIG obtained the greatest vector length and highest correlation, explaining 28.37% of the variability. The association among these traits was of medium strength. The DMI and $BW^{0.75}$ traits composed the third principal component (PC3) and explained 19.18% of the variability (Table 3, Figs. 4 and 5).

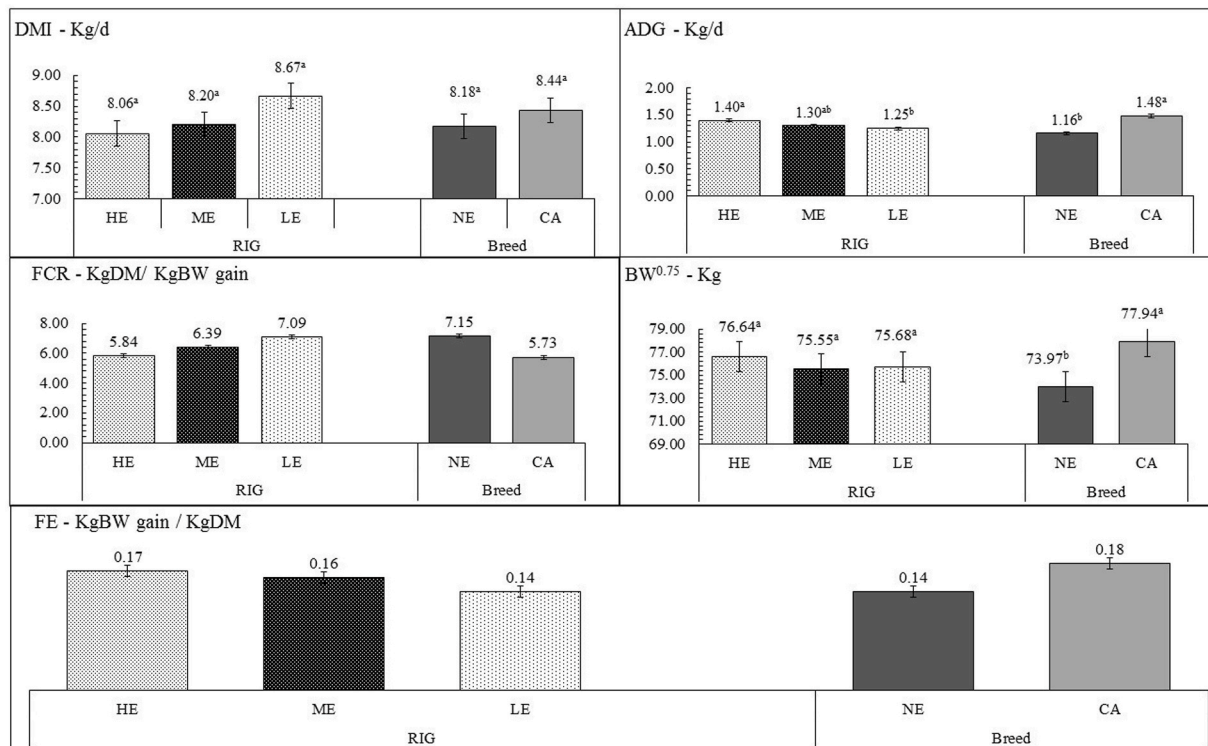


Fig. 2. Values of the traits obtained in Nelore and Caracu bulls: dry matter intake (DMI), average daily gain (ADG), feed conversion ratio (FCR), mid-test metabolic body weight ($BW^{0.75}$) and feed efficiency (FE) according to breed and residual intake and gain (RIG - HE: high efficiency, ME: medium efficiency, LE: low efficiency).

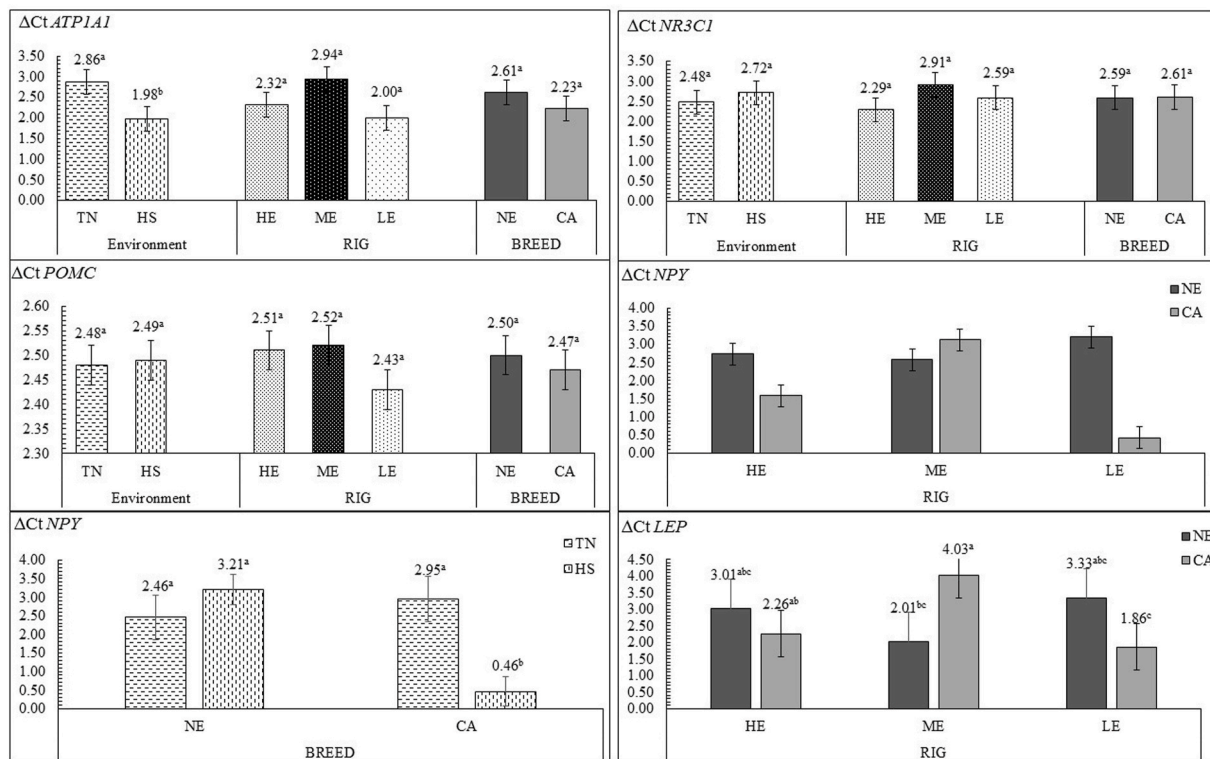


Fig. 3. Effects of breed (Ne: Nelore, Ca: Caracu), environmental condition (TN: thermoneutral, HS: heat stress), and residual intake and gain (HE: high efficiency, ME: medium efficiency, LE: low efficiency) and their interactions on the relative expression (ΔCt) of the *ATP1A1*, *NR3C1*, *POMC*, *NPY*, and *LEP* genes.

Table 3

Weighting coefficients of the three principal components (PC1, PC2, PC3) for productive performance traits and relative expression (ΔCt) of the *ATP1A1*, *NR3C1*, *POMC*, *NPY*, and *LEP* genes in Nelore and Caracu bulls.

Characteristics ^a	PC1	PC2	PC3
<i>ATP1A1</i>	0.4260	-0.0778	-0.0143
<i>NR3C1</i>	0.4346	-0.0489	0.0924
<i>POMC</i>	0.3946	0.0489	0.0106
<i>NPY</i>	0.4882	-0.1022	-0.0806
<i>LEP</i>	0.4670	-0.0397	0.0482
DMI	0.0157	0.0213	0.6644
ADG	0.0617	0.4901	0.2911
BW ^{0.75}	-0.0481	0.0950	0.6205
FCR	-0.0835	-0.5394	0.1132
FE	0.0634	0.5276	-0.1751
RIG	-0.0034	0.3973	-0.1659

^a *ATP1A1*: ATPase Na⁺/K⁺ transporting subunit alpha 1; *NR3C1*: nuclear receptor subfamily 3 group C member 1; *POMC*: proopiomelanocortin; *NPY*: neuropeptide Y; *LEP*: leptin; DMI: dry matter intake; ADG: average daily gain; FCR: feed conversion ratio; BW^{0.75}: mid-test metabolic body weight; FE: feed efficiency; RIG: residual intake and gain.

4. Discussion

Feed efficiency is a complex trait and animals reared under similar conditions have different efficiency levels. Factors such as breed, diet, thermal stress, and feed intake represent a challenge in beef cattle herds (Aleena et al., 2016; Curtis et al., 2017). In this study, differences in ADG, FE and FCR were observed between animals classified as high, medium and low efficiency, demonstrating the existence of genetic variability in Caracu and Nelore bulls (Abreu et al., 2019; Figueiredo et al., 2019). Previous studies reported that more efficient animals consume less feed over the same period than animals with low efficiency (Aldrighi et al., 2019; Santana et al., 2014).

The ADG was similar to that reported in other studies on beef cattle

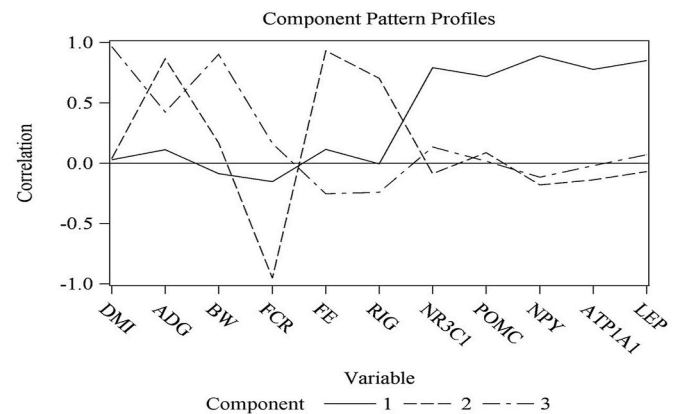


Fig. 4. Correlation among traits of the Nelore and Caracu bulls according to principal components (1, 2, and 3).

(Santana et al., 2019; Thompson et al., 2018). The growth of Caracu bulls in this study was higher than that of Nelore bulls. The ADG and FE were lower in Nelore compared to Caracu bulls, and Caracu bulls showed a lower FCR, demonstrating that this breed is able to digest coarse fibers and utilizes diets with a low nutritional value (Campos et al., 2017). The difference in performance traits might be related to genetic variability and environment conditions. According to Al-Husseini et al. (2014), growth traits are influenced by many genes and do not necessarily show a linear correlation with genes associated to feed efficiency, where the genes may act differently depending on herd conditions.

The *ATP1A1* gene plays a role in basal metabolism. This sodium-potassium pump maintains the thermodynamic equilibrium of cells and is involved in the binding of steroid hormones, glucocorticoid biosynthesis, and positive regulation of striated muscle contraction and

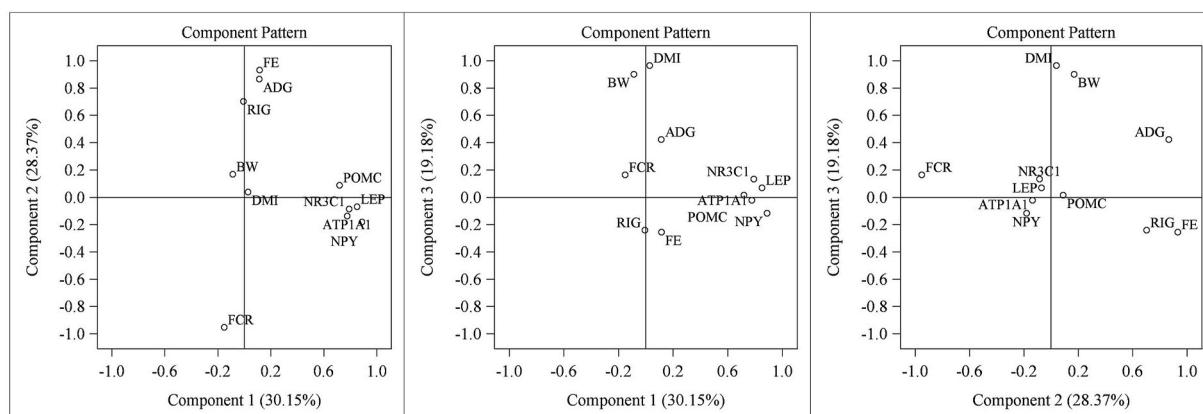


Fig. 5. Principal components of traits studied: dry matter intake (DMI), average daily gain (ADG), mid-test metabolic body weight ($BW^{0.75}$), feed conversion ratio (FCR), feed efficiency (FE), residual intake and gain (RIG), and relative expression (ΔCt) of the *ATP1A1*, *NR3C1*, *POMC*, *NPY*, and *LEP* genes.

thermal stress (Liu et al., 2011; Pearce et al., 2015). The variation observed in the relative expression of *ATP1A1* in the HS and TN environments indicates that Caracu and Nelore bulls alter the maintenance of the Na^+ and K^+ gradients across the plasma membrane at different air temperatures (Kashyap et al., 2015).

Liu et al. (2011) studied the expression of *ATP1A1* in peripheral blood lymphocytes of dairy cows and found higher expression in the TN condition compared to the HS condition, in agreement with the results obtained for the Caracu and Nelore breeds in our study. Previous studies demonstrated that thermal stress influences the relative expression of the *ATP1A1* gene in goats (Kaushik et al., 2019) and dairy cows (Angel et al., 2018; Das et al., 2015; Kashyap et al., 2015). Our findings show that high temperatures can cause alterations in the expression of the *ATP1A1* gene in beef cattle through oxidative stress and consequently induce changes in homeostasis (Kaushik et al., 2019).

Although the expression of the *NR3C1* gene in Caracu and Nelore bulls was not influenced by breed, RIG group or heat challenge, this gene plays an important role in the physiological responses to stress (Wiley et al., 2016; Xi et al., 2015). Under stress conditions, the hypothalamic-pituitary-adrenal axis secretes corticotrophin-releasing hormone and stimulates adrenocorticotrophic hormone secretion, events that culminate in the release of cortisol (Bartlett et al., 2019; Wiley et al., 2016). These hormone cascades promote the down-regulation of *NR3C1* expression (Liu and Nusslock, 2018; Oakley and Cidlowski, 2013; Turecki and Meaney, 2016).

In contrast to expectations, HS conditions did not affect *NR3C1* expression in this study. A number of limitations may have influenced the results obtained. First, the heat challenge was not sufficient to cause changes in the expression of the gene. The second limitation is that only blood samples were used, while other studies analyzed pituitary glands (Li et al., 2017), liver (Depke et al., 2009), and hypothalamus (Cucuzza et al., 2020). Furthermore, the possible adaptation of the Caracu and Nelore breeds to HS conditions may have influenced *NR3C1* expression.

Previous studies reported that *NR3C1* expression is inhibited by corticosterone in broilers (Rimoldi et al., 2015) and is negatively associated with *POMC* expression in cattle and rats (Li et al., 2017; Turecki and Meaney, 2016). We observed that the relative expression of the *POMC* gene was higher than the relative expression of the *NR3C1* gene in Caracu and Nelore bulls.

The relative expression of the *POMC* gene in Caracu and Nelore bulls was not affected by HS or feed efficiency index in the present study. Expression of the *POMC* gene is related to satiety, control of glucose homeostasis, and stress responses in mammals (Drouin, 2016; Ginsberg et al., 2006; Muráni et al., 2010; Perkins et al., 2014; van der Kolk et al., 2016). The environmental adaptation of the animals studied may explain the lack of a relationship between *POMC* expression and thermal stress. Perkins et al. (2014) showed that *POMC* mRNA expression was

42% lower in Angus steers with low efficiency compared to high efficiency animals, while we found no difference between feed efficiency indexes (RIG groups) in either breed. Another factor to be considered is that the high *NPY* expression in bulls may be associated with the expression of the *POMC* gene. According to Wynne et al. (2005), *NPY* can inhibit *POMC* neuropeptide in appetite control. Both genes act antagonistically, with *NPY* promoting feed intake and *POMC* signaling satiety (Paeger et al., 2017; Sohn et al., 2013).

In the present study, the interaction between environmental condition and breed influenced *NPY* expression, with the lowest expression of the gene being observed in Caracu bulls in the HS condition, while expression was higher in Nelore bulls in the HS condition. In human and rodents, previous studies reported that the cold pressor test promotes upregulation of the *NPY* gene in plasma and platelets (Hirsch and Zukowska, 2012). There is a high probability that sun exposure causes changes in the expression pattern of *NPY* in cattle, as does the cold in rodents. These variations in *NPY* expression can be explained by HS, as well as by the phenotypic variance in the bovine *NPY* gene reported in previous studies (Bahar and Sweeney, 2008; Zhang et al., 2011).

The expression of *NPY* differed between RIG groups in Caracu and Nelore bulls. In view of the function and importance of the *NPY* gene in appetite control, an increase in feed intake is expected and, consequently, its influence on RIG, explaining the low *NPY* expression and high feed efficiency of Caracu bulls. This finding is consistent with the results reported by Perkins et al. (2014) for Angus sires. According to Chung et al. (2011), the *NPY* gene shows a strong marker significantly associated with growth and carcass traits in Hanwoo cattle. The importance of the *NPY* gene in cattle efficiency has been reported for different breeds, including Nelore (Santana et al., 2014; Diniz-Magalhães et al., 2017), Hanwoo (Chung et al., 2011), Yunling and Leiqiong (Lu et al., 2020), and Brahman (Cardoso et al., 2015).

The *LEP* gene is associated with appetite control and energy, fat, and glucose metabolism in cattle (Collis et al., 2012; Melmed, 2017). Relative expression of the *LEP* gene was similar in Caracu (*Bos taurus*) and Nelore (*Bos indicus*) bulls with high efficiency. This finding is consistent with the action of leptin on animal metabolism in which high concentrations of this hormone in adipocytes reduce feed intake (Mota et al., 2017; Sohn et al., 2013), resulting in more efficient animals. Higher *LEP* expression was observed in Caracu bulls classified as medium or high RIG compared to bulls classified as low RIG, demonstrating the association of leptin with body fat mass and ADG in cattle. Studies in the literature have shown differences in allele frequencies, genetic polymorphisms, and *LEP* gene mutations among breeds and highlight their association with growth traits in beef cattle (Anugratama and Hartatik, 2020; Foote et al., 2016; Kelly et al., 2010; Trujillo et al., 2013).

The hypothalamus is a key area involved in the control of energy balance and feed intake in ruminants. The relationship between the

relative expression of the *ATP1A1*, *NR3C1*, *POMC*, *NPY*, and *LEP* genes found in PC1 indicates the joint actions of genes on appetite control.

It is common knowledge that glucocorticoid levels are inversely related to stress responsiveness. The *NR3C1* gene encodes the glucocorticoid receptor and influences cortisol levels in pigs (Murani et al., 2010), cows (Das et al., 2015), and humans (Liu and Nusslock, 2018; Pliieger et al., 2018). The *ATP1A1* gene is associated with the response to stress and is essential for homeostasis (Das et al., 2015). Both *NR3C1* acting through cortisol and *ATP1A1* in homeostasis have important role in situations of heat stress, which was demonstrated by the correlation of these genes in PC1, exhibiting vectors in the same direction.

The important association between the *POMC*, *NPY*, and *LEP* genes, responsible for appetite control, was confirmed by PCA. These genes showed a similar intensity and vector direction and composed the same principal component (PC1). Furthermore, the *NR3C1* gene negatively regulates *POMC* expression during exposure to stress (Drouin, 2016; van der Kolk et al., 2016). *LEP* is an anorexigenic gene (loss of appetite), while *NPY* is an orexigenic gene (Melmed, 2017; Watterson et al., 2013). The important association of these genes in feed metabolism is confirmed by the higher variability (33.56%) explained by the principal component (PC1) containing these genes.

The ADG, FCR, FE, and RIG traits are strongly associated as evidenced in PC2. The ADG influenced FE and FCR and these traits showed a similar correlation with PC2. An increase in ADG leads to an increase in FE. This is confirmed by the same vector direction in PCA. On the other hand, the increase in FE causes a decrease in FCR, which was confirmed by the opposite direction of the vector in PCA. These traits are used in livestock production as one of the measures to evaluate feed efficiency based on RIG (Cantalapiedra-Hijar et al., 2018; Santana et al., 2019).

The third principal component (PC3) contained DMI and $BW^{0.75}$ and the same vector direction and a high correlation between these traits are expected. The DMI of Caracu and Nelore bulls was similar, whereas the $BW^{0.75}$ was highest in the Caracu breed, demonstrating that metabolic weight is more associated with energy for maintenance than with feed intake (Del Claro et al., 2012). In addition, these breeds are characterized by high feed efficiency and low feed requirements (McManus et al., 2011; Santana et al., 2019). The metabolic weight describes the relationship between body surface area and volume and is associated with DMI. Smaller bulls produce more heat and consume more feed per unit body size than large bulls; consequently, the energy for maintenance varies according to size and feed intake (Valadares Filho et al., 2016). Metabolic weight has been used in cattle breeding programs.

Feed efficiency is associated with many physiological and genetics factors in ruminants. The breeds studied here did not differ significantly in terms of the expression pattern of the *ATP1A1*, *NR3C1*, or *POMC* gene. The *ATP1A1* and *NPY* genes are important candidate genes for feed efficiency in Caracu and Nelore cattle. The exposure of Caracu and Nelore bulls to heat stress was probably not sufficient to cause changes at the cellular level, for example in the relative expression of *NR3C1*, *POMC* and *LEP*, indicating adaptation of these animals to the tropical environment.

5. Conclusions

Different climate conditions associated with RIG can modify the expression patterns of the *ATP1A1* and *NPY* gene. The differences in *NPY* and *LEP* gene expression between RIG groups and breeds suggest that growth performance is more influenced by the environment than by breed. The associations among the relative expression of the *ATP1A1*, *NR3C1*, *POMC*, *NPY* and *LEP* genes found in the first principal component show that these genes are involved in appetite control. Both Caracu and Nelore cattle breeds exhibited good growth performance and similar adaptability to tropical climate conditions.

Author statement

All authors contributed to the study. Bianca Vilela Pires: conceptualization, methodology, formal analysis, investigation, validation and writing- original draft preparation. Nedenia Bonvino Stafuzza: conceptualization, methodology and writing: review and editing. Luara Afonso de Freitas: formal analysis and writing: review and editing. Maria Eugênia Zerlotti Mercadante: formal analysis and writing: review and editing. Ester Silveira Ramos: writing: review and editing. Claudia Cristina Paro Paz: writing: review and editing, validation, supervision and funding acquisition.

Data accessibility

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no conflict of interests.

Acknowledgements

The authors thank the São Paulo Research Foundation (FAPESP, Brazil, grant number #19222-1/2016) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil, grant number #409485/2018-7) for financial support. Bianca V. Pires received a fellowship from CNPq (grant number #141619/2017-1). Nedenia B. Stafuzza received FAPESP grants (#19216-7/2018 and #10438-0/2019). L. A. Freitas was supported by a FAPESP scholarship (#01540-2/2018). Maria E. Z. Mercadante, Ester S. Ramos and Claudia C. P. Paz received productivity research fellowship from CNPq.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2021.102998>.

References

- Abreu, L.R.A., Martins, P.G.M.A., Ribeiro, V.M.P., Gouveia, G.C., Moraes, G.F., 2019. Genetic association between residual feed intake and carcass traits in a herd of Nelore beef cattle. *Livest. Sci.* 225, 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2019.04.020>.
- Afsal, A., Sejian, V., Bagath, M., Devaraj, C., Bhatta, R., 2018. Heat stress and livestock adaptation: neuro-endocrine regulation. *Int. J. Vet. Anim. Med.* 1, 1–7.
- Al-Husseini, W., Gondro, C., Quinn, K., Herd, R.M., Gibson, J.P., Chen, Y., 2014. Expression of candidate genes for residual feed intake in Angus cattle. *Anim. Genet.* 45, 12–19. <https://doi.org/10.1111/age.12092>.
- Aldrighi, J., Branco, R.H., Dos Santos Gonçalves Cyrillo, J.N., Magnani, E., Do Nascimento, C.F., Bonilha, S.F.M., Mercadante, M.E.Z., 2019. Ingestive behavior and temperament of Nelore cattle classified for residual feed intake. *Semin. Agrar.* 40, 457–468. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2019v40n1p457>.
- Aleena, J., Pragna, P., Archana, P.R., Sejian, V., Bagath, M., Krishnan, G., Manimaran, A., Beena, V., Kurien, E.K., Varma, G., Bhatta, R., 2016. Significance of metabolic response in livestock for adapting to heat stress challenges. *Asian J. Anim. Sci.* 10, 224–234. <https://doi.org/10.3923/ajas.2016.224.234>.
- Angel, S.P., Amitha, J.P., Rashamol, V.P., Vandana, G.D., Savitha, S.T., 2018. Climate change and cattle production: impact and adaptation. *J. Vet. Med. Res.* 5, 1134.
- Anubhuti, A.S., 2006. Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity – a review. *Neuropeptides* 40, 375–401. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2006.07.001>.
- Anugratama, L.E., Hartatik, T., 2020. Short communication: identification of leptin gene in crossbred beef cattle. *Biodiversitas* 21, 226–230. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210129>.
- Bahar, B., Sweeney, T., 2008. Mapping of the transcription start site (TSS) and identification of SNPs in the bovine neuropeptide Y (*NPY*) gene. *BMC Genet.* 9, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-9-91>.
- Barbosa, B.R.P., Santos, S.A., Abreu, U.G.P. de, Egito, A.A., Comastri Filho, J.A., Juliano, R.S., Paiva, S.R., McManus, C., 2014. Tolerância ao calor em bovinos das raças Nelore branco, Nelore vermelho e Pantaneira. *Rev. Bras. Saúde e Produção Anim.* 15, 854–865. <https://doi.org/10.1590/S1519-99402014000400010>.
- Barendse, W., Reverter, A., Bunch, R.J., Harrison, B.E., Barris, W., Thomas, M.B., 2007. A validated whole-genome association study of efficient food conversion in cattle. *Genetics* 176, 1893–1905. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.072637>.

- Bartlett, A.A., Lapp, H.E., Hunter, R.G., 2019. Epigenetic mechanisms of the glucocorticoid receptor. *Trends Endocrinol. Metabol.* 30, 807–818. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2019.07.003>.
- Berry, D.P., Crowley, J.J., 2012. Residual intake and body weight gain: a new measure of efficiency in growing cattle. *J. Anim. Sci.* 90, 109–115. <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4245>.
- Campos, B.M., Carmo, A.S., Silva, T.B.R., Verardo, L.L., Simoni Gouveia, J.J., Mendes Malhado, C.H., Barbosa da Silva, M.V.G., Souza Carneiro, P.L., 2017. Identification of artificial selection signatures in Caracu breed lines selected for milk production and meat production. *Livest. Sci.* 206, 82–87. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2017.10.014>.
- Cantalapiedra-Hijar, G., Abo-Ismael, M., Carstens, G.E., Guan, L.L., Hegarty, R., Kenny, D.A., McGee, M., Plastow, G., Relling, A., Ortigues-Martí, I., 2018. Review: biological determinants of between-animal variation in feed efficiency of growing beef cattle. *Animal* 12, 321–335. <https://doi.org/10.1017/S1751731118001489>.
- Cardoso, C.C., Peripolli, V., Amador, S.A., Brandão, E.G., Esteves, G.I.F., Sousa, C.M.Z., França, M.F.M.S., Gonçalves, F.G., Barbosa, F.A., Montalvão, T.C., Martins, C.F., Neto, A.M.M.F., McManus, C., 2015. Physiological and thermographic response to heat stress in zebu cattle. *Livest. Sci.* 182, 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2015.10.022>.
- Casas, E., Kehrlí, M.E., 2016. A review of selected genes with known effects on performance and health of cattle. *Front. Vet. Sci.* 3 <https://doi.org/10.3389/fvets.2016.00113>.
- Chung, E.-R., Shin, S.-C., Heo, J.-P., 2011. Association analysis between SNP marker in neuropeptide Y (*NPY*) gene and carcass and meat quality traits in Korean cattle. *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.* 31, 537–542. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2011.31.4.537>.
- Collis, E., Fortes, M.R.S., Zhang, Y., Tier, B., Schutt, K., Barendse, W., Hawken, R., 2012. Genetic variants affecting meat and milk production traits appear to have effects on reproduction traits in cattle. *Anim. Genet.* 43, 442–446. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2011.02272.x>.
- Crowley, J.J., McGee, M., Kenny, D.A., Crews, D.H., Evans, R.D., Berry, D.P., 2010. Phenotypic and genetic parameters for different measures of feed efficiency in different breeds of Irish performance-tested beef bulls. *J. Anim. Sci.* 88, 885–894. <https://doi.org/10.2527/jas.2009-1852>.
- Cucuzza, L.S., Divari, S., Biolatti, B., Cannizzo, F.T., 2020. Expression of corticosteroid hormone receptors, pre-receptors, and molecular chaperones in hypothalamic-pituitary-adrenal axis and adipose tissue after the administration of growth promoters in veal calves. *Domest. Anim. Endocrinol.* 72, 106473 <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2020.106473>.
- Curtis, A.K., Scharf, B., Eichen, P.A., Spiers, D.E., 2017. Relationships between ambient conditions, thermal status, and feed intake of cattle during summer heat stress with access to shade. *J. Therm. Biol.* 63, 104–111. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2016.11.015>.
- Das, R., Gupta, I., Verma, A., Singh, A., Chaudhari, M., Sailo, L., Upadhyay, R., Goswami, J., 2015. Genetic polymorphisms in *ATPIA1* gene and their association with heat tolerance in Jersey crossbred cows. *Indian J. Dairy Sci.* 68, 50–54.
- Del Claro, A.C., Mercadante, M.E.Z., Silva, J.A.I.V., 2012. Meta-análise de parâmetros genéticos relacionados ao consumo alimentar residual e a suas características componentes em bovinos. *Pesqui. Agropecuária Bras.* 47, 302–310. <https://doi.org/10.1590/S0104X2012000200020>.
- Deobald, H.M., Buchanan, F.C., 2011. Characterization of two Pro-opiomelanocortin gene variants and their effects on carcass traits in beef cattle. *BMC Genet.* 12, 2. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-12-2>.
- Depke, M., Steil, L., Domanska, G., Völker, U., Schütt, C., Kiank, C., 2009. Altered hepatic mRNA expression of immune response and apoptosis-associated genes after acute and chronic psychological stress in mice. *Mol. Immunol.* 46, 3018–3028. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2009.06.014>.
- Diniz-Magalhães, J., Mesquita, L.G., Carvalho, M.V., Machado, A.B.E., Pimentel, J.R.V., Prada e Silva, L.F., 2017. Effect of high energy intake on carcass composition and hypothalamic gene expression in *Bos indicus* heifers. *Rev. Bras. Zootec.* 46, 664–669. <https://doi.org/10.1590/s1806-92902017000800006>.
- Drouin, J., 2016. Transcriptional and epigenetic regulation of *POMC* gene expression. *J. Mol. Endocrinol.* 56, T99–T112. <https://doi.org/10.1530/JME-15-0289>.
- Figueiredo, D.M., Mercadante, M.E.Z., Pires, A.V., Branco, R.H., Ribeiro, E.G., Dallago, G.M., Schorer, M., Rocha, P.R., 2019. The phenotypic relationship between residual intake and gain and other feed efficiency traits in Nelore cattle. *Trop. Anim. Health Prod.* 51, 449–456. <https://doi.org/10.1007/s11250-018-1714-4>.
- Foote, A.P., Tait, R.G., Keisler, D.H., Hales, K.E., Freetly, H.C., 2016. Leptin concentrations in finishing beef steers and heifers and their association with dry matter intake, average daily gain, feed efficiency, and body composition. *Domest. Anim. Endocrinol.* 55, 136–141. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2015.12.007>.
- Ginsberg, A.B., Frank, M.G., Francis, A.B., Rubin, B.A., O'Connor, K.A., Spencer, R.L., 2006. Specific and time-dependent effects of glucocorticoid receptor agonist RU28362 on stress-induced pro-opiomelanocortin hnRNA, c-fos mRNA and zif268 mRNA in the pituitary. *J. Neuroendocrinol.* 18, 129–138. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2005.01396.x>.
- Habeeb, A., Gad, A., El-Tarabany, A., Atta, M., 2018. Negative effects of heat stress on growth and milk production of farm animals. *J. Anim. Husb. Dairy Sci.* 2, 1–12.
- Hair, J.F., Black, W.C., Babin, B.J., Anderson, R.E., 2009. *Multivariate Data Analysis*, seventh ed. (Upper Saddle River, New York).
- Hansen, P., 2004. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. *Anim. Reprod. Sci.* 349–360. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.011>, 82–83.
- Hirsch, D., Zukowska, Z., 2012. *NPY* and stress 30 years later: the peripheral view. *Cell. Mol. Neurobiol.* 32, 645–659. <https://doi.org/10.1007/s10571-011-9793-z>.
- Huber, E., Notaro, U.S., Recce, S., Rodríguez, F.M., Ortega, H.H., Salvetti, N.R., Rey, F., 2020. Fetal programming in dairy cows: effect of heat stress on progeny fertility and associations with the hypothalamic-pituitary-adrenal axis functions. *Anim. Reprod. Sci.* 216, 106348 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106348>.
- Kashyap, N., Kumar, P., Deshmukh, B., Bhat, S., Kumar, A., Chauhan, A., Bhushan, B., Singh, G., Sharma, D., 2015. Association of *ATPIA1* gene polymorphism with thermotolerance in Tharparkar and Vrindavani cattle. *Vet. World* 8, 892–897. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2015.892-897>.
- Kaushik, R., Goel, A., Rout, P.K., 2019. Differential expression and characterization of *ATPIA1* exon17 gene by high resolution melting analysis and RT-PCR in Indian goats. *Mol. Biol. Rep.* 46, 5273–5286. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04984-4>.
- Kelly, A.K., McGee, M., Crews, D.H., Fahey, A.G., Wylie, A.R., Kenny, D.A., 2010. Effect of divergence in residual feed intake on feeding behavior, blood metabolic variables, and body composition traits in growing beef heifers. *J. Anim. Sci.* 88, 109–123. <https://doi.org/10.2527/jas.2009-2196>.
- Koch, R.M., Swiger, L.A., Chambers, D., Gregory, K.E., 1963. Efficiency of feed use in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 22, 486–494. <https://doi.org/10.2527/jas1963.222486x>.
- Kononoff, P.J., Defoor, P.J., Engler, M.J., Swingle, R.S., Gleghorn, J.F., James, S.T., Marquess, F.L.S., 2017. Impacts of a leptin SNP on growth performance and carcass characters in finishing steers studied over time. *J. Anim. Sci.* 95, 194–200. <https://doi.org/10.2527/jas2016.0926>.
- Li, Q., Hegge, R., Bridges, P.J., Matthews, J.C., 2017. Pituitary genomic expression profiles of steers are altered by grazing of high vs. low endophyte-infected tall fescue forages. *PLoS One* 12, 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184612>.
- Liu, P.Z., Nusslock, R., 2018. How stress gets under the skin: early life adversity and glucocorticoid receptor epigenetic regulation. *Curr. Genom.* 19, 653–664. <https://doi.org/10.2174/1389202919666171228164350>.
- Liu, Y., Li, D., Li, H., Zhou, X., Wang, G., 2011. A novel SNP of the *ATPIA1* gene is associated with heat tolerance traits in dairy cows. *Mol. Biol. Rep.* 38, 83–88. <https://doi.org/10.1007/s11033-010-0080-8>.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Lu, X., Arabab, A.A.I., Zhang, Z., Fan, Y., Han, Z., Gao, Q., Sun, Y., Yang, Z., 2020. Comparative transcriptomic analysis of the pituitary gland between cattle breeds differing in growth: Yunling cattle and Leiqiong cattle. *Animals* 10, 1271. <https://doi.org/10.3390/ani10081271>.
- Majewska, M., Lee, H.Y., Tasaki, Y., Acosta, T.J., Szostek, A.Z., Siemieniuch, M., Okuda, K., Skarzynski, D.J., 2012. Is cortisol a modulator of interferon tau action in the endometrium during early pregnancy in cattle? *J. Reprod. Immunol.* 93, 82–93. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2012.01.004>.
- McManus, C., Castanheira, M., Paiva, S.R., Louvandini, H., Fioravanti, M.C.S., Paludo, G.R., Bianchini, E., Corrêa, P.S., 2011. Use of multivariate analyses for determining heat tolerance in Brazilian cattle. *Trop. Anim. Health Prod.* <https://doi.org/10.1007/s11250-010-9742-8>.
- Melmed, S., 2017. *The Pituitary*, fourth ed. Academic Press, San Diego.
- Mota, L.F.M., Bonafé, C.M., Alexandre, P.A., Santana, M.H., Novais, F.J., Toriyama, E., Pires, A.V., da Luz Silva, S., Leme, P.R., Ferraz, J.B.S., Fukumasu, H., 2017. Circulating leptin and its muscle gene expression in Nelore cattle with divergent feed efficiency. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 8, 71. <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0203-3>.
- Muráni, E., Ponsuksili, S., D'Eath, R.B., Turner, S.P., Kurt, E., Evans, G., Thölkling, L., Klont, R., Foury, A., Mormède, P., Wimmers, K., 2010. Association of HPA axis-related genetic variation with stress reactivity and aggressive behaviour in pigs. *BMC Genet.* 11, 74. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-11-74>.
- Oakley, R.H., Cidlowski, J.A., 2013. The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 132, 1033–1044. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.09.007>.
- Olbromski, R., Siadkowska, E., Zelazowska, B., Zwierzchowski, L., 2013. Allelic gene expression imbalance of bovine *IGF2*, *LEP* and *CCL2* genes in liver, kidney and pituitary. *Mol. Biol. Rep.* 40, 1189–1200. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-2161-3>.
- Oliveira, P.S., Cesar, A.S., do Nascimento, M.L., Chaves, A.S., Tizioto, P.C., Tullio, R.R., Lanna, D.P., Rosa, A.N., Sonstegard, T.S., Mourao, G.B., Reecy, J.M., Garrick, D.J., Mudadu, M.A., Coutinho, L.L., Regitano, L.C., 2014. Identification of genomic regions associated with feed efficiency in Nelore cattle. *BMC Genet.* 15, 100. <https://doi.org/10.1186/s12863-014-0100-0>.
- Oliveira, P.S.N., Coutinho, L.L., Tizioto, P.C., Cesar, A.S.M., Oliveira, G.B., Diniz, W.J.S., Lima, A.O., Reecy, J.M., Mourão, G.B., Zerlotini, A., Regitano, L.C.A., 2018. An integrative transcriptome analysis indicates regulatory mRNA-miRNA networks for residual feed intake in Nelore cattle. *Sci. Rep.* 8, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35315-5>.
- Paeger, L., Karakaslioti, I., Altmüller, J., Frommolt, P., Brüning, J., Kloppenburg, P., 2017. Antagonistic modulation of *NPY/AgRP* and *POMC* neurons in the arcuate nucleus by noradrenalin. *Elife* 6, 1–18. <https://doi.org/10.7554/eLife.25770>.
- Pearce, S.C., Lonergan, S.M., Huff-Lonergan, E., Baumgard, L.H., Gabler, N.K., 2015. Acute heat stress and reduced nutrient intake alter intestinal proteomic profile and gene expression in pigs. *PLoS One* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143099>.
- Pereira, M.C., Mercadante, M.E.Z., Razook, A.G., Figueiredo, L.A., Albuquerque, L.G., 2008. Results of 23 years of selection for post-weaning weight in a Caracu beef herd. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 38, 136–144.

- Perkins, S.D., Key, C.N., Marvin, M.N., Garrett, C.F., Foradori, C.D., Bratcher, C.L., Kriese-Anderson, L.A., Brandebourg, T.D., 2014. Effect of residual feed intake on hypothalamic gene expression and meat quality in Angus-sired cattle grown during the hot season1,2. *J. Anim. Sci.* 92, 1451–1461. <https://doi.org/10.2527/jas.2013-7020>.
- Plieger, T., Felten, A., Splittgerber, H., Duke, É., Reuter, M., 2018. The role of genetic variation in the glucocorticoid receptor (*NR3C1*) and mineralocorticoid receptor (*NR3C2*) in the association between cortisol response and cognition under acute stress. *Psychoneuroendocrinology* 87, 173–180. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2017.10.020>.
- Rajoriya, J.S., Prasad, J.K., Ghosh, S.K., Perumal, P., Kumar, A., Kaushal, S., Ramteke, S. S., 2014. Studies on effect of different seasons on expression of *HSP70* and *HSP90* gene in sperm of Tharparkar bull semen. *Asian Pacific J. Reprod.* 3, 192–199. [https://doi.org/10.1016/S2305-0500\(14\)60025-7](https://doi.org/10.1016/S2305-0500(14)60025-7).
- Ramayo-Caldas, Y., Ballester, M., Sánchez, J.P., González-Rodríguez, O., Revilla, M., Reyher, H., Wimmers, K., Torrallardona, D., Quintanilla, R., 2018. Integrative approach using liver and duodenum RNA-Seq data identifies candidate genes and pathways associated with feed efficiency in pigs. *Sci. Rep.* 8, 558. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-19072-5>.
- Rimoldi, S., Lasagna, E., Sarti, F.M., Marelli, S.P., Cozzi, M.C., Bernardini, G., Terova, G., 2015. Expression profile of six stress-related genes and productive performances of fast and slow growing broiler strains reared under heat stress conditions. *Meta Gene* 6, 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.mgene.2015.08.003>.
- Santana, M.H.A., Polizel, G.H.G., Grigoletto, L., Fernandes, A.C., Bonin, M.N., Gomes, R. C., Carvalho, M.E., Silva, S.L., Leme, P.R., Junior, P.R., Ferraz, J.B.S., 2019. The genetic and genomic effects of Nelore lineages on feed efficiency, intake and performance. *Livest. Sci.* 228, 104–108. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2019.08.003>.
- Santana, M.H.A., Utsunomiya, Y.T., Neves, H.H.R., Gomes, R.C., Garcia, J.F., Fukumasu, H., Silva, S.L., Oliveira Junior, G.A., Alexandre, P.A., Leme, P.R., Brassaloti, R.A., Coutinho, L.L., Lopes, T.G., Meirelles, F.V., Eler, J.P., Ferraz, J.B.S., 2014. Genome-wide association analysis of feed intake and residual feed intake in Nelore cattle. *BMC Genet.* 15, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-15-21>.
- Sejian, V., Bhatta, R., Gaughan, J.B., Dunshea, F.R., Lacetera, N., 2018. Review: adaptation of animals to heat stress. *Animal* 12, 431–444. <https://doi.org/10.1017/S1751731118001945>.
- Snelling, W.M., Allan, M.F., Keele, J.W., Kuehn, L.A., Thallman, R.M., Bennett, G.L., Ferrell, C.L., Jenkins, T.G., Freetly, H.C., Nielsen, M.K., Rolfe, K.M., 2011. Partial-genome evaluation of postweaning feed intake and efficiency of crossbred beef cattle. *J. Anim. Sci.* 89, 1731–1741. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3526>.
- Sohn, J.W., Elmquist, J.K., Williams, K.W., 2013. Neuronal circuits that regulate feeding behavior and metabolism. *Trends Neurosci.* 36, 504–512. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.05.003>.
- Summer, A., Lora, I., Formaggioni, P., Gottardo, F., 2019. Impact of heat stress on milk and meat production. *Anim. Front.* 9, 39–46. <https://doi.org/10.1093/af/vfy026>.
- Takeda, M., Uemoto, Y., Inoue, K., Ogino, A., Nozaki, T., Kurogi, K., Yasumori, T., Satoh, M., 2020. Genome-wide association study and genomic evaluation of feed efficiency traits in Japanese Black cattle using single-step genomic best linear unbiased prediction method. *Anim. Sci. J.* 91, 1–11. <https://doi.org/10.1111/asj.13316>.
- Thompson, S., Schaefer, A.L., Crow, G.H., Basarab, J., Colyn, J., Ominski, K., 2018. Relationship between residual feed intake and radiated heat loss using infrared thermography in young beef bulls. *J. Therm. Biol.* 78, 304–311. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.10.007>.
- Trujillo, A.I., Casal, A., Peñagaricano, F., Carriquiry, M., Chilibraste, P., 2013. Association of SNP of neuropeptide Y, leptin, and *IGF-1* genes with residual feed intake in confinement and under grazing condition in Angus cattle. *J. Anim. Sci.* 91, 4235–4244. <https://doi.org/10.2527/jas.2013-6254>.
- Turecki, G., Meaney, M.J., 2016. Effects of the social environment and stress on glucocorticoid receptor gene methylation: a systematic review. *Biol. Psychiatr.* 79, 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.11.022>.
- Valadares Filho, S.C., Silva, L.F.C., Gionbelli, M.P., Rotta, P.P., Marcondes, M.L., Chizzotti, M.L., Prados, L.F., 2016. Nutrient Requirements of Zebu and Crossbred Cattle - BR-CORTE, third ed. Editora UFV, Viçosa. <https://doi.org/10.5935/978-85-8179-111-1.2016B002>.
- van der Kolk, J.H., Fouché, N., Gross, J.J., Gerber, V., Bruckmaier, R.M., 2016. A comparison between the equine and bovine hypothalamus-pituitary-adrenocortical axis. *Domest. Anim. Endocrinol.* 56, S101–S111. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2016.02.008>.
- Verma, P., Sharma, A., Sodhi, M., Thakur, K., Bharti, V.K., Kumar, P., Giri, A., Kalia, S., Swami, S.K., Mukesh, M., 2018. Overexpression of genes associated with hypoxia in cattle adapted to Trans Himalayan region of Ladakh. *Cell Biol. Int.* 42, 1141–1148. <https://doi.org/10.1002/cbin.10981>.
- Watterson, K.R., Bestow, D., Gallagher, J., Hamilton, D.L., Ashford, F.B., Meakin, P.J., Ashford, M.L.J., 2013. Anorexigenic and orexigenic hormone modulation of mammalian target of rapamycin complex 1 activity and the regulation of hypothalamic agouti-related protein mRNA expression. *Neurosignals* 21, 28–41. <https://doi.org/10.1159/000334144>.
- Wiley, J.W., Higgins, G.A., Athey, B.D., 2016. Stress and glucocorticoid receptor transcriptional programming in time and space: implications for the brain-gut axis. *Neuro Gastroenterol. Motil.* 28, 12–25. <https://doi.org/10.1111/nmo.12706>.
- Winders, T.M., Boyd, B.M., Macken, C., Watson, A.K., MacDonald, J.C., Erickson, G.E., 2020. Impact of shade in beef feedyards on performance, body temperature, and heat stress measures. *Nebraska Beef Cattle Reports* 65–70.
- Woronuk, G.N., Marquess, F.L., James, S.T., Palmer, J., Berryere, T., Deobald, H., Howie, S., Kononoff, P.J., 2012. Association of leptin genotypes with beef cattle characteristics. *Anim. Genet.* 43, 608–610. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2012.02320.x>.
- Wynne, K., Stanley, S., McGowan, B., Bloom, S.R., 2005. Appetite control. *J. Endocrinol.* 184, 291–318. <https://doi.org/10.1677/joe.1.05866>.
- Xi, Y.M., Yang, Z., Wu, F., Han, Z.Y., Wang, G.L., 2015. Gene expression profiling of hormonal regulation related to the residual feed intake of Holstein cattle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 465, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.07.092>.
- Yu, C.H., Chu, S.C., Chen, P.N., Hsieh, Y.S., Kuo, D.Y., 2017. Participation of ghrelin signalling in the reciprocal regulation of hypothalamic *NPY/POMC*-mediated appetite control in amphetamine-treated rats. *Appetite* 113, 30–40. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2017.02.010>.
- Zhang, L., Zhang, A.L., Zhang, L.Z., Zhang, Q., Zhang, C.L., Lan, X.Y., Chen, H., 2011. Association analysis between variants in bovine *NPY* gene and growth traits in Nanyang cattle (*Bos taurus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 170, 189–192. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.10.004>.

Supplement A - Fixed effects and their significance for variables dry matter intake (DMI), average daily gain (ADG), mid-test metabolic body weight ($BW^{0.75}$), feed conversion ratio (FCR), feed efficiency (FE), residual intake and gain (RIG), relative expression (ΔCt) of *ATPIAI*, *NR3CI*, *POMC*, *NPY*, and *LEP* genes.

Traits	Breed(System)	RIG	Environmental condition	Breed(System)* RIG	Breed(System)* Environmental condition	RIG*Environmental condition	Breed(System)* RIG*Environmental condition
DMI	0.2891	0.0971	-	0.5492	-	-	-
ADG	0.0001	0.0098	-	0.6420	-	-	-
$BW^{0.75}$	0.8554	0.0249	-	0.1706	-	-	-
FCR	0.0001	0.0001	-	0.8329	-	-	-
FE	0.0001	0.0001	-	0.4717	-	-	-
ΔCt <i>ATPIAI</i>	0.3003	0.1026	0.0228	0.0910	0.4529	0.3045	0.1445
ΔCt <i>NR3CI</i>	0.6815	0.4195	0.9338	0.3874	0.1553	0.8476	0.3306
ΔCt <i>POMC</i>	0.5893	0.2780	0.9523	0.5382	0.4750	0.8544	0.1222
ΔCt <i>NPY</i>	0.0358	0.2179	0.0865	0.0402	0.0050	0.2817	0.6023
ΔCt <i>LEP</i>	0.9480	0.8123	0.6647	0.0475	0.8123	0.4192	0.5036

CAPÍTULO 5. CLUSTER ANALYSIS OF HEAT TOLERANCE AND FEED EFFICIENCY IN CARACU AND NELORE BEEF CATTLE

Artigo submetido a revista *Research in Veterinary Science* (online) como parte dos resultados obtidos no presente trabalho de doutorado.

Cluster analysis of heat tolerance and feed efficiency traits in Caracu and Nelore beef cattle

Bianca V. Pires^{a*}, Luara A. Freitas^a, Nedenia Bonvino Stafuzza^b, Claudia C. P. Paz^{a,b}

^a Department of Genetics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, 14049-900.

^b Beef Cattle Research Center, Animal Science Institute, Sertãozinho, São Paulo, Brazil, 14174-000.

*Corresponding author: bianca2510@outlook.com

Abstract.

A major challenge of livestock farming in tropical regions is the selection of animals that are heat tolerant and have high efficiency in weight gain. Multivariate analyses allow to simultaneously evaluate animals based on a set of traits. The aim of this study was to identify Caracu (*Bos taurus taurus*) and Nelore (*Bos taurus indicus*) animals that are simultaneously tolerant to heat and have high feed efficiency. The following traits were selected for cluster analysis: expression of the *HSP70*, *HSP90*, *ATP1A1* and *NPY* genes and phenotypic measures of rectal and skin temperature, heat tolerance index, dry matter intake, average daily gain, feed efficiency ratio, and residual intake and gain. Forty-one Caracu males and 37 Nelore males were evaluated after exposure to solar radiation on summer days (black globe temperature >45°C). Hierarchical and non-hierarchical cluster analyses were performed using the R software. Hierarchical clustering of the traits studied divided the population into two groups: 59 animals in group 1 and 19 animals in group 2. Non-hierarchical analysis showed that group 1 was formed by animals with lower heat tolerance and higher feed efficiency, while group 2 comprised animals with greater heat tolerance and lower feed efficiency. This study demonstrates the existence of phenotypic variability within and between Caracu and Nelore breeds. The evidence that animals with high feed efficiency are also tolerant to heat stress was not confirmed in this study.

Keywords: *Bos taurus indicus*; *Bos taurus taurus*; gene expression; heat stress; weight gain

1. Introduction

Increasing the productivity of a herd is the main goal in livestock production, which can be affected by environmental and genetic factors. Animal breeding programs provide data that can be used to improve productivity; however, these data must be related to animal nutrition, welfare, and environment in order to increase the productive efficiency (Chud et al., 2014; Costa et al., 2021; Gathura et al., 2020).

A major challenge of livestock farming in tropical regions is the selection of animals that are simultaneously tolerant to heat and efficient in productive and reproductive traits (Dikmen et al., 2020; Misztal, 2017). Feed efficiency, which is measured by calculating feed intake and weight gain, can be used to select more efficient animals in a population (Cantalapiedra-Hijar et al., 2018). The animal's tolerance to heat is measured mainly from the internal and external body temperature. However, heat tolerance is influenced by many factors, including breed, environment, diet, water intake, coat color and size, and the physiological, neuroendocrine and morphological adaptation of each animal (Angel et al., 2018; Rashamol et al., 2018).

Several studies have addressed the phenotypic and genotypic variability in performance and heat tolerance traits within and between breeds (Bradford et al., 2016; Brown-Brandl, 2018; Thompson et al., 2018). The inclusion of heat tolerance traits in animal breeding programs is difficult since the animals originate from different herds and are under the effect of different environments, factors that result in a low response to selection (Bradford et al., 2016; Misztal, 2017).

The expression pattern of candidate genes associated with heat tolerance and feed efficiency can assist in the selection of genetically superior animals through breeding programs. These candidate genes include those encoding heat shock proteins (HSPs) and genes related to metabolic homeostasis, feed intake, appetite control, and

hormone regulation, among others (Almeida et al., 2020; Archer et al., 1999; Augenstein et al., 2020; Teles et al., 2019; Thompson et al., 2018).

Multivariate analyses allow to simultaneously evaluate animals based on a set of traits. The individuals are grouped in such a way to achieve maximum homogeneity within groups and maximum heterogeneity between groups (Hair et al., 2009). This analysis allows to detect and describe structural patterns in the sample and to simplify the structure of the dataset. This methodology is an alternative for identifying animals that are simultaneously tolerant to heat and highly efficient in weight gain, improving productive efficiency and contributing to animal breeding programs through the selection of these animals.

Therefore, the aim of this study was to identify Caracu (*Bos taurus taurus*) and Nelore (*Bos taurus indicus*) animals that are simultaneously tolerant to heat and have high feed efficiency by multivariate analysis including the following traits: expression of the *HSP70*, *HSP90*, *ATP1A1* and *NPY* genes, as well as phenotypic traits rectal temperature, skin temperature, heat tolerance index, dry matter intake, average daily weight gain, feed efficiency ratio, and residual intake and gain.

2. Materials and methods

2.1 Data

The experimental procedures were carried out in accordance with the guidelines of the Animal Care and Use Ethics Committee of the Animal Science Institute, Sertãozinho, SP, Brazil (Approval number 237-16). The average temperature in Sertãozinho is 24.3°C and the average rainfall is 1,450 mm (INMET, 2020). The climate of the region is tropical savanna climate.

Forty-one Caracu and 37 Nelore males, approximately 13 months old, were evaluated. The animals belonged to the same contemporary group and were reared on pasture, with supplements given in troughs.

The phenotypic data were obtained after exposure of the animals to solar radiation between 8:00 and 13:00 h on typical summer days characterized by an average temperature of 39.5°C and an average relative humidity of 42%. The rectal temperature (RT), skin temperature (ST), heat tolerance index (HTI) and relative expression of the *HSP70*, *HSP90* and *ATP1A1* genes were used to characterize the animals in terms of tolerance to heat stress. For characterization regarding feed efficiency, dry matter intake (DMI), average daily weight gain (ADG), feed efficiency ratio (FER), residual intake and gain (RIG), and relative expression of the *NPY* gene were measured.

2.1.1 Physiological Traits

The RT (°C) was measured with a veterinary thermometer inserted into the rectum of the animal (depth of 3.5 cm) for 2 minutes. The ST was measured with an ITTI 380 infrared thermometer (Instrutemp, BR) at three different sites (near the eyes, dorsum, and near the anal mucosa). These measurements were used to obtain the mean ST (°C) of each animal.

The HTI proposed by Baccari Junior et al. (1986) was used to evaluate heat stress and is expressed using the following formula: $HTI = 10 - (RT_2 - RT_1)$, in which the result is represented by the inverse of the elevation of the rectal temperature after exposure to direct solar radiation on a scale from 0 to 10. The closer the index is to 10, the more tolerant is the animal.

2.1.2 Performance Traits

The DMI was calculated considering 62 days of feed intake multiplied by the weekly dry matter content of the diet offered (Table 1). The ADG was calculated by linear regression of weights measured along the days on test (DOT) using the equation:

$$y_i = \alpha + \beta * DOT_i + \varepsilon_i,$$

where y_i is the animal's weight in the i^{th} observation; α is the intercept of the regression equation and represents the initial weight; β is the linear regression coefficient and represents the ADG, and ε_i is the random error associated with each observation. The FER is the difference between weight gain (kg) and DMI of the animals (kg).

The RIG is expressed as the sum of residual feed intake (RFI) and residual weight gain (RG), in which RFI is multiplied by -1 and both are adjusted for a variance of 1 (Berry and Crowley, 2012; Crowley et al., 2010). The DMI, metabolic body weight ($BW^{0.75}$) and ADG were used to estimate RFI and RG using the following regressions:

$$BW^{0.75} = \left[\alpha + \left(\frac{1}{2} ADG * DOT \right) \right]^{0.75} \quad (1)$$

$$DMI = \beta_0 + \beta_1 ADG + \beta_2 BW^{0.75} + \varepsilon \quad (2)$$

$$ADG = \beta_0 + \beta_1 DMI + \beta_2 BW^{0.75} + \varepsilon \quad (3)$$

The $BW^{0.75}$ was obtained with equation 1, where α is the intercept of the regression equation and represents the initial weight, and DOT are the days on test. The RFI (equation 2) was calculated as proposed by Koch et al. (1963), where DMI corresponds to the observed dry matter intake, β_0 to the intercept of the equation, β_1 to the regression coefficient of ADG, β_2 to the regression coefficient of $BW^{0.75}$, and ε to the residual (RFI). The RG was estimated as the difference between observed ADG and predicted based on DMI and $BW^{0.75}$ (equation 3), where β_0 is the intercept of the equation, β_1 is the regression coefficient of DMI, β_2 is the regression coefficient of $BW^{0.75}$, and ε is the residual (RG).

2.1.3 Relative Gene Expression

For the analysis of relative gene expression, 4 mL peripheral blood was collected into vacuum tubes containing EDTA-K₃. Total RNA was extracted from the buffy-coat layer using the PureLink RNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to manufacturer instructions.

After RNA extraction and cDNA synthesis, the samples were submitted to real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) using the SYBR Green Master Mix (Life Technologies, USA). The relative expression levels of the *HSP70*, *HSP90*, *ATPIA1* and *NPY* genes were calculated by the $\Delta\Delta C_t$ method (Livak and Schmittgen, 2001) using the *GAPDH* gene (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) as endogenous control. The detailed results of the relative quantification of the genes are described in Pires et al. (2021, 2019).

2.2 Cluster Analysis

Hierarchical and non-hierarchical cluster analyses were performed to detect different patterns for heat tolerance and feed efficiency in Caracu and Nelore cattle using the R software (Development Core Team, 2018). The data were standardized by subtracting the values from their mean and dividing them by the standard deviation using the “scale” function. The best number of clusters in the population was determined using the NbClust package (Charrad et al., 2014).

The formation of possible groups with the heat tolerance and feed efficiency traits was evaluated by hierarchical cluster analysis, in which the Euclidean distance was used as a dissimilarity measure. Ward’s method (1963) was used for multivariate clustering in order to obtain maximum homogeneity within groups.

Based on the dendrogram of hierarchical analysis, non-hierarchical clustering was performed by the *k*-means method. After the formation of the groups, the animals were identified simultaneously according to feed efficiency and tolerance to heat stress.

3. Results

The mean RT and ST of the animals were 39.15°C and 39.53°C, respectively. The HTI ranged from 8.55 to 9.90, with values close to 10 indicating animals that are more tolerant to heat. The average relative expression of the *HSP70*, *HSP90*, *ATP1A1* and *NPY* genes was 1.97, 1.47, 3.98 and 1.16, respectively. The mean DMI was 8.41 kg/day, ADG ranged from 0.75 to 1.83 kg/day, and the mean observed FE was 0.16 kg gain/kg DM. The RIG of Caracu and Nelore animals ranged from -3.79 to 4.36 (Table 2).

Hierarchical cluster analysis based on the traits studied divided the population into two groups: 52 animals belonging to group 1 and 26 animals belonging to group 2 (Figure 1). Based on the dendrogram, non-hierarchical clustering by the *k*-means method resulted in group 1, composed of 32.6% Caracu animals and 67.4% Nelore animals, and in group 2, composed of 92% Caracu animals and 8% Nelore animals.

Animals of group 1 exhibited a higher RT and ST, higher expression levels of the *HSP90* and *ATP1A1* genes and a lower HTI than animals of group 2, indicating lower heat tolerance. Based on the feed efficiency traits, group 1 comprised animals with lower DMI and higher ADG, FER, RIG, and *NPY* gene expression (Figure 2).

Animals of group 2 had a higher HTI and lower RT, ST, and expression levels of the *HSP70*, *HSP90* and *ATP1A1* genes than animals of group 1. At the same time, these animals exhibited higher DMI and lower ADG, FER, RIG, and relative expression of

the *NPY* gene. Therefore, group 2 included animals that were more tolerant to heat and that had low feed efficiency (Figure 2).

4. Discussion

Heat tolerance and feed efficiency are traits that determine the productivity of a herd. The selection of heat-tolerant animals with high feed efficiency is a major challenge for livestock farming. The results of the present study indicate high within-breed and between-breed phenotypic variability for the traits studied.

Observing the phenotypes obtained in this study, animals of group 1 can be classified as less tolerant to heat stress. Increases in RT and ST occur to dissipate additional heat and to maintain the thermal status of the animal in response to heat exposure, keeping the body's heat balance (Augenstein et al., 2020; El-Tarabany et al., 2017; Sarlo Davila et al., 2019).

The *HSP70* gene is the first gene that is induced in response to different stressors (Angel et al., 2018; Archana et al., 2017). Although the hsp70 protein is a reliable indicator for assessing heat stress in cattle, doubts remain regarding its differential gene expression between taurine and indicine cattle breeds at high temperatures (Angel et al., 2018; Gaughan, 2012; Sejian et al., 2018). In the present study, the expression levels of the *HSP70* gene were similar between the groups formed and between the breeds studied. Similar *HSP70* gene expression results have been reported in Nelore females subjected to heat stress, with no difference between heat-tolerant and non-tolerant animals (Hooper et al., 2019). The expression levels of the *HSP70* gene did also not differ between Simmental and Angus animals (Rocha et al., 2019).

The expression of the *HSP90* gene was lower in animals of group 2, which were classified as tolerant to heat stress. Several studies involving breeds raised for milk and

meat production have suggested an association of the *HSP90* gene with heat tolerance (Charoensook et al., 2012; Katiyatiya et al., 2017; Kim et al., 2020), which has been indicated as a biomarker of heat stress in cattle (Abdelnour et al., 2018; Lee et al., 2020; Sejian et al., 2018).

The *ATPIA1* gene is a potential marker of heat tolerance for selection in cattle (Angel et al., 2018; Sejian et al., 2018), and is fundamental to combat the effects of heat stress. This can be observed in animals of group 2 that were more tolerant to heat. Polymorphic regions of the *ATPIA1* gene were identified in Jersey (Das et al., 2015), Holstein (Liu et al., 2010) and Tharparkar cattle (Kashyap et al., 2015), which promoted genetic variability and consequently different physiological mechanisms during exposure to heat stress. Our findings suggest the existence of variability in the expression of the *ATPIA1* gene between Caracu and Nelore animals.

Animals of group 1 exhibited high efficiency, i.e., animals consume less dry matter and reach the expected average daily weight gain. In this study, heat stress did not affect weight gain of the animals since feed efficiency remained constant despite the significant increase in body temperature. No differences in surface temperature obtained by infrared thermography were observed in Angus cattle exposed to heat and classified based on RFI (Thompson et al., 2018). In contrast, decreases in weight gain and feed intake were found in Tharparkar and Karan Fries heifers and crossbred beef cattle exposed to heat stress (Banerjee and Ashutosh, 2011; Melton et al., 2018).

Feed efficiency is related to diet quality, age, management, and genetics of the animal (Kenny et al., 2018; Silveira et al., 2018). Group 1, which largely consisted of Nelore animals, exhibited high growth performance compared to group 2. This finding can be explained by the high productivity of Nelore animals, which are characterized by their rusticity, carcass conformation, high productive efficiency, and high feed

efficiency (Moraes et al., 2017; Oliveira et al., 2002; Tizioto et al., 2016). The Nelore breed is widely distributed in Brazil and has been improved through long-term breeding programs (Silva Neto et al., 2020; Silveira et al., 2018). On the other hand, the Caracu breed is less intensely used for beef production in Brazil when compared to Nelore cattle but breeding programs of herds were implemented decades ago. The Caracu animals used in the present study have participated in a genetic breeding program since 1976 (Instituto de Zootecnia, 2021).

Among the many genes associated with feed efficiency, the *NPY* gene is particularly interesting because of its relationship with carcass traits, energy balance, and feed intake (Chung et al., 2011; Zhang et al., 2011). In addition to high feed efficiency, animals of group 1 exhibited higher expression levels of the *NPY* gene, corroborating the role of this gene in dietary metabolism described in the literature and characterizing it as a candidate gene for feed efficiency traits (Lu et al., 2020; Perkins et al., 2014).

To our knowledge, this is the first study comparing heat tolerance and feed efficiency between Caracu and Nelore cattle breeds. The results demonstrated that, although a taurine breed, Caracu cattle are tolerant to the heat stress in the tropical savanna climate but are less feed efficient than Nelore animals. On the other hand, Nelore animals are at the same time susceptible to heat stress and exhibit greater feed efficiency, demonstrating phenotypic variability in both breeds for the traits studied.

5. Conclusion

Cluster analysis demonstrated the existence of phenotypic variability within and between the Caracu and Nelore cattle breeds. There is no evidence that the animals of this population are simultaneously feed efficient and tolerant to heat.

Acknowledgements

The authors thank the São Paulo Research Foundation (FAPESP, Brazil; #2016/19222-1) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil; #409485/2018-7) for financial support. Bianca V. Pires received a fellowship from CNPq (#141619/2017-1) and L. A. Freitas from FAPESP (#2018/01540-2). Nedenia B. Stafuzza received FAPESP grants (#2018/19216-7 and #2019/10438-0). Claudia C. P. Paz received a productivity research fellowship from CNPq.

References

- Abdelnour, S.A., Abd El-Hack, M.E., Khafaga, A.F., Arif, M., Taha, A.E., Noreldin, A.E., 2018. Stress biomarkers and proteomics alteration to thermal stress in ruminants: a review. *J. Therm. Biol.* 79, 120–134.
<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.12.013>
- Almeida, J.V.N., Marques, L.R., Marques, T.C., Guimarães, K.C., Leão, K.M., 2020. Influence of thermal stress on the productive and reproductive aspects of cattle - Review. *Res. Soc. Dev.* 9, 1–29. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i7.3837>
- Angel, S.P., Amitha, J.P., Rashamol, V.P., Vandana, G.D., Savitha, S.T., 2018. Climate change and cattle production: impact and adaptation. *J. Vet. Med. Res.* 5, 1134.
- Archana, P.R., Aleena, J., Pragna, P., Vidya, M.K., Abdul Niyas, P.A., Bagath, M., Krishnan, G., Manimaran, A., Beena, V., Kurien, E.K., Sejian, V., Bhatta, R., 2017. Role of heat shock proteins in livestock adaptation to heat stress. *J. Dairy, Vet. Anim. Res.* 5, 13–19. <https://doi.org/10.15406/jdvar.2017.05.00127>
- Archer, J.A., Richardson, E.C., Herd, R.M., Arthur, P.F., 1999. Potential for selection to improve efficiency of feed use in beef cattle: A review. *Aust. J. Agric. Res.* 50,

- 147–161. <https://doi.org/10.1071/a98075>
- Augenstein, S.M., Harrison, M.A., Klopatek, S.C., Oltjen, J.W., 2020. Heat stress alleviation and dynamic temperature measurement for growing beef cattle. *Transl. Anim. Sci.* 4, S178–S181. <https://doi.org/10.1093/tas/txaa144>
- Baccari Junior, F., Polastre, R., Fré, C.A., Assis, P.S., 1986. Um novo índice de tolerância ao calor para bubalinos: correlação com o ganho de peso, in: SBZ (Ed.), Reunião Anual da Sociedade de Zootecnia. Anais, Campo Grande, pp. 316.
- Banerjee, D., Ashutosh, 2011. Effect of thermal exposure on diurnal rhythms of physiological parameters and feed, water intake in Tharparkar and Karan Fries heifers. *Biol. Rhythm Res.* 42, 39–51. <https://doi.org/10.1080/09291011003726490>
- Berry, D.P., Crowley, J.J., 2012. Residual intake and body weight gain: A new measure of efficiency in growing cattle. *J. Anim. Sci.* 90, 109–115. <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4245>
- Bradford, H.L., Fragomeni, B.O., Bertrand, J.K., Lourenco, D.A.L., Misztal, I., 2016. Genetic evaluations for growth heat tolerance in Angus cattle. *J. Anim. Sci.* 94, 4143–4150. <https://doi.org/10.2527/jas.2016-0707>
- Brown-Brandl, T.M., 2018. Understanding heat stress in beef cattle. *Rev. Bras. Zootec.* 47, 1–9. <https://doi.org/10.1590/rbz4720160414>
- Cantalapiedra-Hijar, G., Abo-Ismael, M., Carstens, G.E., Guan, L.L., Hegarty, R., Kenny, D.A., McGee, M., Plastow, G., Relling, A., Ortigues-Marty, I., 2018. Review: Biological determinants of between-animal variation in feed efficiency of growing beef cattle. *Animal* 12, 321–335. <https://doi.org/10.1017/S1751731118001489>
- Charoensook, R., Gatphayak, K., Sharifi, A.R., Chaisongkram, C., Brenig, B., Knorr, C., 2012. Polymorphisms in the bovine *HSP90AB1* gene are associated with heat

- tolerance in Thai indigenous cattle. *Trop. Anim. Health Prod.* 44, 921–928.
<https://doi.org/10.1007/s11250-011-9989-8>
- Charrad, M., Ghazzali, N., Boiteau, V., Niknafs, A., 2014. "NbClust: An R Package for Determining the Relevant Number of Clusters in a Data Set". *J. Stat. Softw.* 61: 1-36.
- Chud, T.C.S., Caetano, S.L., Buzanskas, M.E., Grossi, D.A., Guidolin, D.G.F., Nascimento, G.B., Rosa, J.O., Lôbo, R.B., Munari, D.P., 2014. Genetic analysis for gestation length, birth weight, weaning weight, and accumulated productivity in Nelore beef cattle. *Livest. Sci.* 170. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2014.09.024>
- Chung, E.R., Shin, S.C., Heo, J.P., 2011. Association analysis between SNP marker in neuropeptide Y (*NPY*) gene and carcass and meat quality traits in Korean cattle. *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.* 31, 537–542.
<https://doi.org/10.5851/kosfa.2011.31.4.537>
- Costa, C.M., Difante, G.S., Costa, A.B.G., Gurgel, A.L.C., Ferreira, M.A., Santos, G.T., 2021. Grazing intensity as a management strategy in tropical grasses for beef cattle production: a meta-analysis. *Animal* 100192.
<https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100192>
- Crowley, J.J., McGee, M., Kenny, D.A., Crews, D.H., Evans, R.D., Berry, D.P., 2010. Phenotypic and genetic parameters for different measures of feed efficiency in different breeds of Irish performance-tested beef bulls. *J. Anim. Sci.* 88, 885–894.
<https://doi.org/10.2527/jas.2009-1852>
- Das, R., Gupta, I., Verma, A., Singh, A., Chaudhari, M., Sailo, L., Upadhyay, R., Goswami, J., 2015. Genetic polymorphisms in *ATPIA1* gene and their association with heat tolerance in Jersey crossbred cows. *Indian J. Dairy Sci* 68, 50–54.
- Dikmen, S., Larson, C.C., De Vries, A., Hansen, P.J., 2020. Effectiveness of tunnel

ventilation as dairy cow housing in hot climates: rectal temperatures during heat stress and seasonal variation in milk yield. *Trop. Anim. Health Prod.*

<https://doi.org/10.1007/s11250-020-02309-3>

El-Tarabany, M.S., El-Tarabany, A.A., Atta, M.A., 2017. Physiological and lactation responses of Egyptian dairy Baladi goats to natural thermal stress under subtropical environmental conditions. *Int. J. Biometeorol.* 61, 61–68.

<https://doi.org/10.1007/s00484-016-1191-2>

Gathura, D.M., Muasya, T.K., Kahi, A.K., 2020. Meta-analysis of genetic parameters for traits of economic importance for beef cattle in the tropics. *Livest. Sci.* 242, 104306. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2020.104306>

Gaughan, J.B., 2012. Basic Principles Involved in Adaption of Livestock to Climate Change, in: Sejian, V., Naqvi, S., Ezeji, T., Lakritz, J., Lal, R. (Eds.), *Environmental Stress and Amelioration in Livestock Production*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 245–261. https://doi.org/10.1007/978-3-642-29205-7_10

Hair, J.F., Black, W.C., Babin, B.J., Anderson, R.E., Tatham, R.L., 2009. *Multivariate Data Analysis*, 7th ed. Upper Saddle River, New York.

Hooper, H.B., Titto, C.G., Gonella-Diaza, A.M., Henrique, F.L., Pulido-Rodríguez, L.F., Longo, A.L.S., Leme-dos-Santos, T.M. da C., Geraldo, A.C.A.P. de M., Pereira, A.M.F., Binelli, M., Balieiro, J.C. de C., Titto, E.A.L., 2019. Heat loss efficiency and *HSPs* gene expression of Nelore cows in tropical climate conditions. *Int. J. Biometeorol.* 63, 1475–1486. <https://doi.org/10.1007/s00484-018-1576-5>

INMET – Instituto Nacional de Meteorologia, 2020. URL: www.inmet.gov.br.

Instituto de Zootecnia, 2021. Centro Avançado de Pesquisa de Bovinos de Corte: raça Caracu. Secr. Agric. e Abast. São Paulo. URL:

<http://www.iz.sp.gov.br/pagina.php?id=33>

Kashyap, N., Kumar, P., Deshmukh, B., Bhat, S., Kumar, A., Chauhan, A., Bhushan, B., Singh, G., Sharma, D., 2015. Association of *ATPIA1* gene polymorphism with thermotolerance in Tharparkar and Vrindavani cattle. *Vet. World* 8, 892–897.
<https://doi.org/10.14202/vetworld.2015.892-897>

Katiyatiya, C.L.F., Bradley, G., Muchenje, V., 2017. Thermotolerance, health profile and cellular expression of *HSP90AB1* in Nguni and Boran cows raised on natural pastures under tropical conditions. *J. Therm. Biol.* 69, 85–94.
<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2017.06.009>

Kenny, D.A., Fitzsimons, C., Waters, S.M., McGee, M., 2018. Invited review: Improving feed efficiency of beef cattle - The current state of the art and future challenges. *Animal* 12, 1815–1826. <https://doi.org/10.1017/S1751731118000976>

Kim, W.S., Ghassemi Nejad, J., Peng, D.Q., Jung, U.S., Kim, M.J., Jo, Y.H., Jo, J.H., Lee, J.S., Lee, H.G., 2020. Identification of heat shock protein gene expression in hair follicles as a novel indicator of heat stress in beef calves. *Animal* 1–8.
<https://doi.org/10.1017/s1751731120000075>

Kishore, A., Sodhi, M., Kumari, P., Mohanty, A.K., Sadana, D.K., Kapila, N., Khate, K., Shandilya, U., Kataria, R.S., Mukesh, M., 2014. 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* 19, 613–621.
<https://doi.org/10.1007/s12192-013-0486-z>

Koch, R.M., Swiger, L.A., Chambers, D., Gregory, K.E., 1963. Efficiency of feed use in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 22, 486–494. <https://doi.org/10.2527/jas1963.222486x>

Lee, J., Lee, Soohyun, Son, J., Lim, H., Kim, E., Kim, D., Ha, S., Hur, T., Lee,

- Seunghwan, Choi, I., 2020. Analysis of circulating-microRNA expression in lactating Holstein cows under summer heat stress. *PLoS One* 15.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231125>
- Liu, Y.X., Zhou, X., Li, D.Q., Cui, Q.W., Wang, G.L., 2010. Short Communication Association of *ATPIA1* gene polymorphism with heat tolerance traits in dairy cattle. *Genet. Mol. Res.* 9, 891–896. <https://doi.org/10.4238/vol9-2gmr769>
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25, 402–408.
<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lu, X., Arbab, A.A.I., Zhang, Z., Fan, Y., Han, Z., Gao, Q., Sun, Y., Yang, Z., 2020. Comparative transcriptomic analysis of the pituitary gland between cattle breeds differing in growth: Yunling cattle and Leiqiong cattle. *Animals* 10, 1-18.
<https://doi.org/10.3390/ani10081271>
- Melton, B.M., Winders, T., Boyd, B.M., Macken, C.N., Watson, A.K., MacDonald, J.C., Erickson, G.E., 2018. Impact of shade on performance, body temperature, and heat stress of finishing cattle in eastern Nebraska. *10th Int. Livest. Environ. Symp. ILES 2018*. <https://doi.org/10.13031/iles.ILES18-098>
- Misztal, I., 2017. Breeding and Genetics Symposium: Resilience and lessons from studies in genetics of heat stress. *J. Anim. Sci.* 95, 1780.
<https://doi.org/10.2527/jas2016.0953>
- Moraes, G.F. de, Abreu, L.R.A., Ferreira, I.C., Pereira, I.G., 2017. Genetic analysis of residual feed intake adjusted for fat and carcass and performance traits in a Nelore herd. *Ciência Rural* 47. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20151505>
- Oliveira, J.H.F., Magnabosco, C.U., Borges, A.M.S.M., 2002. Nelore: base genética e evolução seletiva no Brasil. *Embrapa Cerrados* 50.

- Perkins, S.D., Key, C.N., Marvin, M.N., Garrett, C.F., Foradori, C.D., Bratcher, C.L., Kriese-Anderson, L.A., Brandebourg, T.D., 2014. Effect of residual feed intake on hypothalamic gene expression and meat quality in Angus-sired cattle grown during the hot season. *J. Anim. Sci.* 92, 1451–1461. <https://doi.org/10.2527/jas.2013-7020>
- Pires, B.V., Stafuzza, N.B., Lima, S.B.G.P.N.P., Negrão, J.A., Paz, C.C.P.P., 2019. Differential expression of heat shock protein genes associated with heat stress in Nelore and Caracu beef cattle. *Livest. Sci.* 230, 103839. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2019.103839>
- Pires, B.V., Stafuzza, N.B., Freitas, L.A., Meracadante, M.E.Z., Ramos, E.S., C.C.P.P., 2021. Expression of candidate genes for residual feed intake in tropically adapted *Bos taurus* and *Bos indicus* bulls under thermoneutral and heat stress. *J. Therm. Biol.* <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2021.102998>.
- Rajoriya, J.S., Prasad, J.K., Ghosh, S.K., Perumal, P., Kumar, A., Kaushal, S., Ramteke, S.S., 2014. Studies on effect of different seasons on expression of *HSP70* and *HSP90* gene in sperm of Tharparkar bull semen. *Asian Pacific J. Reprod.* 3, 192–199. [https://doi.org/10.1016/S2305-0500\(14\)60025-7](https://doi.org/10.1016/S2305-0500(14)60025-7)
- Rashamol, V.P., Sejian, V., Bagath, M., Krishnan, G., Archana, P.R., Bhatta, R., 2018. Physiological adaptability of livestock to heat stress: an updated review. *J. Anim. Behav. Biometeorol.* 6, 62–71. <https://doi.org/10.26667/2318-1265jabb.v6n2p62-71>
- Rocha, R. de F.B., Baena, M.M., Estopa, A. de C., Gervásio, I.C., Ibelli, A.M.G., Gionbelli, T.R.S., Gionbelli, M.P., Freitas, R.T.F. de, Meirelles, S.L.C., 2019. Differential expression of *HSF1* and *HSPA6* genes and physiological responses in Angus and Simmental cattle breeds. *J. Therm. Biol.* 84, 92–98. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2019.06.002>

- Sarlo Davila, K.M., Hamblen, H., Hansen, P.J., Dikmen, S., Oltenacu, P.A., Mateescu, R.G., 2019. Genetic parameters for hair characteristics and core body temperature in a multibreed Brahman-Angus herd. *J. Anim. Sci.* 97, 3246–3252.
<https://doi.org/10.1093/jas/skz188>
- Sejian, V., Bhatta, R., Gaughan, J.B., Dunshea, F.R., Lacetera, N., 2018. Review: Adaptation of animals to heat stress. *Animal* 12, 431–444.
<https://doi.org/10.1017/S1751731118001945>
- Silva Neto, J.B., Peripollia, E., Silva, E.V.C., Espigolan, R., Neira, J.D.R., Schettinia, G., Filho, L.C.C.C., Barbosa, F.B., Macedo, G.G., Costa-Brunese, L., Lobo, R.B., Pereira, A.S.C., Baldi, F., 2020. Genetic correlation estimates between age at puberty and growth, reproductive, and carcass traits in young Nelore bulls. *Livest. Sci.* 241, 104266. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2020.104266>
- Silveira, D.D., Vargas, L., Pereira, R.J., Lôbo, R.B., Souza, F.R.P., Boligon, A.A., 2018. Beef cattle growth deceleration parameters and its correlations with growth, carcass and morphological composition traits. *Livest. Sci.* 214, 167–174.
<https://doi.org/10.1016/j.livsci.2018.06.002>
- Teles, C.G.S., Gates, R.S., Barbari, M., Conti, L., Rossi, G., Vilela, M.O., Souza, C.F.F., Tinôco, I.F.F., 2019. A software to estimate heat stress impact on dairy cattle productive performance. *Agron. Res.* 17, 872–878.
<https://doi.org/10.15159/AR.19.110>
- Thompson, S., Schaefer, A.L., Crow, G.H., Basarab, J., Colyn, J., Ominski, K., 2018. Relationship between residual feed intake and radiated heat loss using infrared thermography in young beef bulls. *J. Therm. Biol.* 78, 304–311.
<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.10.007>
- Tizioto, P.C., Coutinho, L.L., Oliveira, P.S.N., Cesar, A.S.M., Diniz, W.J.S., Lima,

A.O., Rocha, M.I., Decker, J.E., Schnabel, R.D., Mourão, G.B., Tullio, R.R., Zerlotini, A., Taylor, J.F., Regitano, L.C.A., 2016. Gene expression differences in Longissimus muscle of Nelore steers genetically divergent for residual feed intake. *Sci. Rep.* 6, 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep39493>

Zhang, L., Zhang, A.L., Zhang, L.Z., Zhang, Q., Zhang, C.L., Lan, X.Y., Chen, H., 2011. Association analysis between variants in bovine *NPY* gene and growth traits in Nanyang cattle (*Bos taurus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 170, 189–192. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.10.004>

Tables

Table 1. Ingredient and chemical composition of the total mixed ration.

Ingredient composition (% as fed)	Percentage
Maize silage	70.0
<i>Brachiaria brizantha</i> hay	6.0
Ground maize	15.0
Soybean meal	8.0
Mineral ²	1.0
Chemical composition (% of DM ¹)	
Dry matter	42.75
Crude protein	6.7
Neutral detergent fiber	51.29
Acid detergent fiber	20.46
Ether extract	3.39
Total digestible nutrients	64.36

¹DM: dry matter.

²Composition per kilogram: phosphorus 8.0 g/day; calcium 17.0 g/day; sodium 6.5 g/day; sulfur 2.2 g/day; magnesium 0.8 g/day; zinc 360.0 mg/day; copper 100.0 mg/day; manganese 70.0 mg/day; cobalt 8.0 mg/day; iodine 8.0 mg/day; selenium 1.8 mg/day.

Table 2. Mean (μ), standard error (SE), and minimum and maximum values of phenotypes evaluated in 78 Caracu and Nelore animals during sun exposure.

Trait	μ	SE	Minimum	Maximum
RT	39.15	0.29	38.65	40.10
ST	39.53	1.68	36.93	45.15
HTI	9.47	0.29	8.55	9.90
<i>HSP70</i>	1.97	1.24	-0.52	4.91
<i>HSP90</i>	1.47	1.27	-2.73	4.70
<i>ATPIA1</i>	3.98	1.21	1.15	7.79
<i>NPY</i>	1.16	1.59	-2.45	4.62
DMI	8.41	0.93	5.99	10.66
ADG	1.34	0.24	0.75	1.83
FER	0.16	0.02	0.10	0.24
RIG	0.08	1.85	-3.79	4.36

*RT: rectal temperature, ST: skin temperature, HTI: heat tolerance index, *HSP70*: heat shock protein family A (Hsp70) member 1A, *HSP90*: heat shock protein 90 alpha family class A member 1, *ATPIA1*: ATPase Na⁺/K⁺ transporting subunit alpha 1, *NPY*: neuropeptide Y, DMI: dry matter intake, ADG: average daily gain, FER: feed efficiency ratio, RIG: residual intake and gain.

Figure Captions

Figure 1. Dendrogram obtained by hierarchical cluster analysis using Ward’s method based on traits associated with tolerance to heat stress and feed efficiency in Caracu and Nelore cattle.

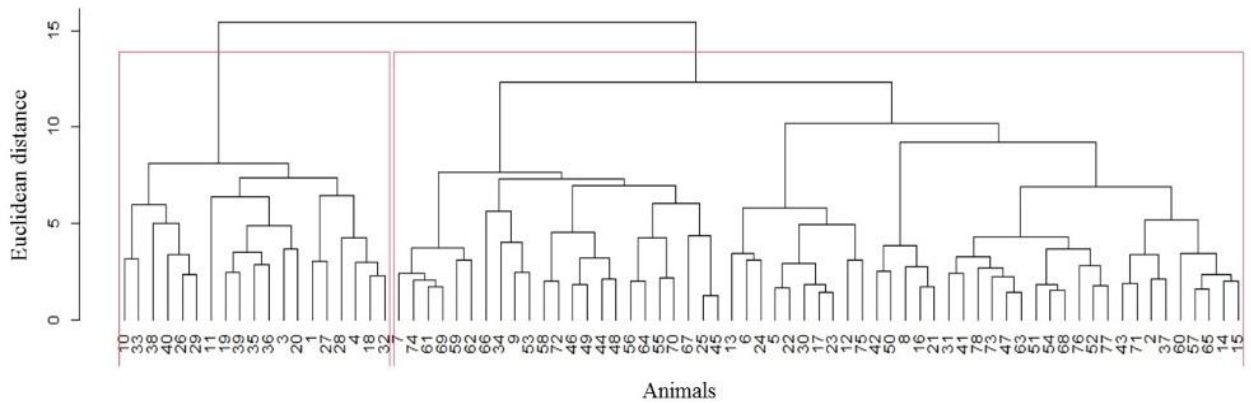
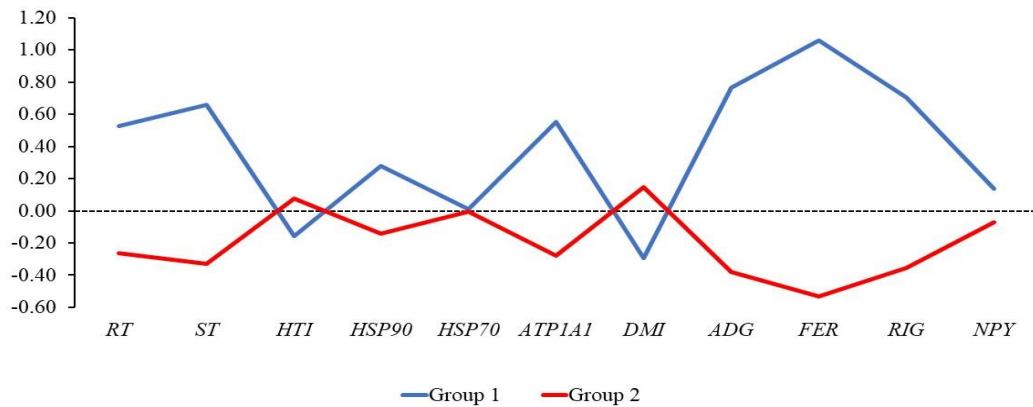


Figure 2. Standardized means of phenotypic values of rectal temperature (RT), skin temperature (ST), heat tolerance index (HTI), relative expression of the *HSP70*, *HSP90*, *ATP1A1* and *NPY* genes, dry matter intake (DMI), average daily weight gain (ADG), feed efficiency ratio (FER), and residual intake and gain (RIG) of Caracu and Nelore animals obtained by non-hierarchical clustering using the *k*-means method.



CAPÍTULO 6. A IMPORTÂNCIA E USO DA TEMPERATURA INTERNA FRENTE AO ESTRESSE TÉRMICO EM BOVINOS TAURINOS E ZEBUÍNOS: META-ANÁLISE.

Artigo a ser submetido na revista *Journal of Thermal Biology* (online) como parte dos resultados obtidos no presente trabalho de doutorado.

Temperatura interna como parâmetro indicador de estresse térmico em bovinos taurinos e zebuínos: um estudo de meta-análise.

**Bianca Vilela Pires¹, Ana Cláudia Freitas², John Lenon Klein³, Thaise Pinto Melo³,
Claudia Cristina Paro de Paz^{1,2}**

¹Department of Genetics, Ribeirão Preto Medical School (FMRP), University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, 140349-900, São Paulo, Brazil

²Beef Cattle Research Center, Animal Science Institute, Sertãozinho, 14160-900, São Paulo, Brazil

³Department of Animal Science, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, 97105-900, Rio Grande do Sul.

Corresponding author: Bianca Vilela Pires, E-mail: bianca2510@outlook.com

Resumo. O estresse térmico afeta os índices produtivos na pecuária, sendo avaliado através da mensuração da temperatura retal e vaginal na maioria dos estudos. O objetivo deste estudo foi avaliar o impacto do estresse térmico sobre as temperaturas retais e vaginais de bovinos *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* utilizando a metodologia da meta-análise. As análises estatísticas seguiram a recomendação PRISMA. A diferença média da temperatura interna (DTI) entre o ambiente de estresse térmico e termoneutro foi utilizada como tamanho de efeito, considerando um intervalo de confiança de 95%. Foi empregado o modelo aleatório, seguido das análises de subgrupo e metaregressão. A seleção de artigos resultou em um total de 89 estudos incluídos na meta-análise. O teste *Q* de Cochran e a estatística *I*² demonstraram alta variabilidade entre os estudos. A

quantidade estimada da variância entre estudos τ^2 , foi de 0,2978. O efeito médio da DTI foi igual a 0,85, indicando uma resposta fisiológica dos animais ao estresse térmico. As covariáveis grupo genético e clima explicaram 21,19% da heterogeneidade dos estudos analisados. Não foi observada diferença significativa na DTI entre taurinos e zebuínos (0,8136; 0,8881) e entre animais com diferentes aptidões produtivas (0,8491; 0,8069) dentre os estudos avaliados. A classificação climática apresentou uma tendência a afetar a DTI ($P=0,0714$). As temperaturas retal e vaginal de bovinos, utilizada como indicador do estresse térmico apresentou elevada heterogeneidade entre os rebanhos avaliados. O grupo genético e a aptidão produtiva explicaram uma pequena proporção da variabilidade encontrada entre estudos nesta meta-análise. As temperaturas retal e vaginal podem ser utilizadas como parâmetro avaliador do estresse térmico em bovinos.

Keywords: *Bos taurus taurus*, *Bos taurus indicus*, meta-regressão, temperatura retal e vaginal, termotolerância.

Introdução

A exposição de animais homeotérmicos a altas temperaturas, provocam alterações comportamentais e genéticas a fim de manter a homeostase animal. A exposição de bovinos a altas temperaturas afeta os índices produtivos, prejudicando o sistema de produção agropecuário (Brown-Brandl, 2018), sendo necessário o desenvolvimento de estratégias que amenizem os efeitos do estresse térmico nos rebanhos de leite e corte.

Estudos avaliando o estresse térmico tem ganhado relevância nos últimos anos e um dos indicadores utilizados é a mensuração da temperatura retal dos animais (Galán et al., 2018). Animais homeotérmicos apresentam uma faixa de temperatura ambiental na qual se encontram em conforto térmico denominada zona de termoneutralidade, a qual varia em função da espécie, raça, nível de produção, estágio fisiológico e dieta (Hansen, 2004). A temperatura retal média para bovinos é próxima a 38,5°C em termoneutralidade, podendo ser maior ou menor de acordo com a raça e adaptação do animal ao ambiente (Ammer et al., 2016; Godyń et al., 2019; Luo et al., 2021). O aumento na temperatura interna é considerado uma alteração fisiológica tardia ao estresse térmico e indica que os demais mecanismos de liberação de calor (taxa de sudorese, batimentos cardíacos, frequência respiratória, vasodilatação) foram ineficientes (Rashamol et al., 2018; Amamou et al., 2019).

As temperaturas retal e vaginal estão positivamente associadas com correlação entre 0,82 a 0,97, portanto ambas podem ser consideradas ao avaliar a temperatura interna em bovinos (Burdick et al., 2012; Leles et al., 2017; Hooper et al., 2019). A temperatura retal está positivamente correlacionada com a temperatura do rúmen (Bewley et al., 2008), com a temperatura superficial (Katiyatiya and Muchenje, 2017; Hansen, 2020),

além de outros mecanismos fisiológicos como frequência cardíaca, frequência respiratória e carga térmica radiante (Burfeind et al., 2012; Kovács et al., 2018).

A temperatura vaginal média entre bovinos é próxima a 39°C (Garner et al., 2016; Weng et al., 2018; Levit et al., 2020). Em vacas da raça Holandesa foi observado um acréscimo na temperatura vaginal à medida que a temperatura do ambiente aumentou (Pate et al., 2020). Alterações na temperatura vaginal são descritas conforme a estação do ano (Leles et al., 2017; Correa-Calderón et al., 2020), dieta (Pate et al., 2020) e raça (Dikmen et al., 2012; Sarlo Davila et al., 2019). Estas variações na temperatura interna, seja retal ou vaginal, podem também estar associadas ao sexo, a reatividade do animal, a adaptação deste ao ambiente e as características do pelame (Bell et al., 2020).

A avaliação de parâmetros como a temperatura interna podem auxiliar no melhoramento animal, buscando animais menos susceptíveis ao estresse por calor, que poderão apresentar melhores índices produtivos (Al-kanaan, 2016; König and May, 2019). Além de que sabemos que o impacto ambiental tem afetado a temperatura do globo terrestre, sendo estimado um aumento de 1,5°C a partir de 2024 (WMO, 2021), o que afeta diretamente a produção animal. Assim a avaliação do estresse térmico por meio das temperaturas retal e vaginal em animais homeotérmicos, permitem a busca de animais tolerantes e soluções que amenizem o efeito da temperatura ambiental sobre a produção (Bell et al., 2020; Brito et al., 2020).

Estudos divergentes sobre a alteração da temperatura interna em bovinos sob ação do estresse térmico são encontrados na literatura. Augenstein et al. (2020) estudando a raça Angus não observou diferença na temperatura retal entre o período da manhã e da tarde. Já Jacob et al. (2014) na mesma raça observou diferenças na temperatura corporal ao longo do dia. A temperatura retal média em animais da raça Nelore foi de 38.5°C, em uma variação da temperatura ambiental de 18.6°C a 29.6°C ao longo do dia, não

indicando estresse térmico nesses animais (Martello et al., 2016). Já em fêmeas Nelore, o ambiente afetou a temperatura vaginal nos períodos da manhã e da tarde (Hooper et al., 2019). Em vacas holandesas gestantes submetidas ao calor antes e após o parto a temperatura retal não diferiu entre 07:00 h, 13:00 h e 19:00 h (Dado-Senn et al., 2020). Em contrapartida, ao avaliar vacas holandesas um aumento de 0.25°C na temperatura retal foi observada entre os ambientes com aspersores e sombra em comparação com o ambiente ensolarado (Fabris et al., 2017).

A avaliação de resultados divergentes em diferentes estudos ao longo dos anos, pode ser realizada através da meta-análise. A meta-análise consiste em um método que combina resultados de diversos experimentos que examinaram uma mesma característica, fazendo uma síntese das evidências e quantificando os dados. A partir de uma visão geral, este método ajusta os estudos conforme a sua heterogeneidade e estima com precisão o efeito dos tratamentos (Pai et al., 2004; Lovatto et al., 2007; Martinez, 2007), auxiliando na conclusão a respeito dos resultados reportados na literatura.

O presente estudo teve como objetivo avaliar o impacto do estresse térmico sobre as temperaturas retais e vaginais de bovinos *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* utilizando a metodologia da meta-análise e assim, chegar num consenso sobre o uso deste parâmetro como ferramenta de identificação de estresse térmico em bovinos. Além de determinar se parâmetros como grupo genético, aptidão produtiva e clima explicariam a variabilidade entre os estudos.

Material e Métodos

Com o objetivo de produzir estimativas que resumam as condições de termotolerância de bovinos em estudos já publicados nos últimos 20 anos foi realizado

um estudo de meta-análise. A busca de publicações em revistas indexadas nas bases Elsevier, Periódicos Capes, Scielo partiu das seguintes palavras-chave em inglês: *thermal stress* ou *heat stress*, *rectal temperature* ou *vaginal temperature* ou *body temperature* e *cattle* ou *beef cattle* ou *bovine*. Trabalhos publicados entre 2000 a 2021 foram considerados.

A revisão sistemática foi definida a partir do conceito do PICO, ou seja, população (P): bovinos taurinos e zebuínos; intervenção (I): exposição ao estresse térmico; comparador (C): ambiente termoneutro e *outcome*/desfecho (O): temperatura retal e/ou vaginal.

Para serem incluídos no banco de dados, os estudos agrupados precisaram atender aos seguintes critérios: (i) artigos publicados no idioma inglês, em periódicos revisados por pares; (ii) bovinos foram usadas como animais experimentais; (iii) índice de umidade da temperatura (THI) ou a temperatura ambiente e a umidade relativa relatados para cada ambiente experimental; (iv) para cada grupo experimental, a raça e o local de estudo deveriam ser indicados; (v) para cada grupo experimental, a estratégia aplicada de exposição ao estresse térmico deveria ser detalhada; (vi) a avaliação do estresse térmico deveria ter sido realizada por meio da coleta da temperatura retal e/ou vaginal. Trabalhos baseados na comparação entre raças bovinas, adotou-se o critério em que cada raça constituiria um estudo separadamente, desta forma a partir de um mesmo artigo publicado poder-se-ia obter dois ou mais estudos.

Após a seleção e construção do banco de dados foi determinado os critérios de exclusão que compreenderam: (i) tamanho amostral menor que 10; (ii) temperatura do ambiente termoneutro inferior a 10°C; (iii) temperatura do ambiente de estresse térmico inferior a 20°C e (iv) diferença entre temperatura do ambiente termoneutro e estresse térmico menor que 5°C (Figura 1). O aumento de 0,6°C na temperatura ambiente provoca

um aumento de 10% aproximadamente na quantidade de calor produzida pelo animal, sendo assim o desempenho de animais homeotérmicos ocorre dentro de um limite mínimo e máximo de temperatura (McDowell, 1975; Curtis, 1983). Diante da variabilidade de estudos abordados e cientes das diferenças na tolerância térmica em bovinos foi considerado estudos em que as diferenças entre as temperaturas dos ambientes termoneutro e de estresse térmico diferiam em no mínimo 5°C.

Títulos e resumos dos estudos identificados pelas pesquisas foram avaliados por dois revisores independentemente seguindo os critérios de inclusão e exclusão. Os dados de cada artigo selecionado para o estudo foram extraídos e organizados em uma tabela que continha os seguintes pontos: autores e ano de publicação, número amostral, grupo genético (GG 1: *Bos taurus taurus*, GG 2: *Bos taurus indicus*), aptidão produtiva (1: corte, 2: leite), média da temperatura retal/vaginal no ambiente de estresse térmico e termoneutro seguidos do erro padrão correspondente. Além da classificação climática baseada na temperatura média anual (TA) obtida pelos sites *Climate Data* e *Average Weather*, em que A: $TA < 12^{\circ}\text{C}$; B: $12^{\circ}\text{C} \leq TA < 18^{\circ}\text{C}$; C: $18^{\circ}\text{C} \leq TA < 25^{\circ}\text{C}$ e D: $TA \geq 25^{\circ}\text{C}$.

Em situações em que o estudo utilizou o desvio padrão, o erro padrão foi obtido por meio da fórmula: $EP = \frac{DP}{\sqrt{n}}$ em que: *EP* corresponde ao erro padrão, *DP* ao desvio padrão e *n* ao tamanho amostral. Para os estudos em que os resultados foram apresentados apenas em forma de gráficos utilizou-se o software *WebPlotDigitizer* (Rohatgi, 2017) para aferir a média da temperatura retal/vaginal dos animais. Estudos cuja temperatura foi apresentada em unidade diferente de graus Celsius foi realizada a conversão.

Análises Estatísticas

As análises estatísticas seguiram a recomendação PRISMA. Foi utilizado o software R (Development Core Team, 2018), pacotes meta (Balduzzi et al., 2019) e

metafor (Viechtbauer, 2010) para realizar as análises. A diferença média da temperatura interna (retal ou vaginal) (DTI) entre o ambiente de estresse térmico e termoneutro foi utilizada como tamanho do efeito, considerando intervalo de confiança de 95%.

A presença de viés de publicação foi analisada visualmente através do gráfico de funil e estatisticamente através do teste de Egger (Egger et al., 1997). A partir da evidência de viés o teste de “trim and fill” foi realizado para estimar e corrigir o viés de publicação, este método tem como objetivo identificar e corrigir a assimetria do gráfico funil resultante do viés de publicação (Duval and Tweedie, 2000).

Para avaliar a homogeneidade/heterogeneidade dos tamanhos de efeitos estimados foram realizados os testes de heterogeneidade de Cochran (Q) e a Estatística I^2 . O teste de Cochran (Q) considera como hipótese nula que os estudos inclusos na metanálise são homogêneos: $Q = \sum_{j=1}^J w_j (\hat{\theta}_j - \hat{\theta}_M)^2$, em que $\hat{\theta}_M$ é a estimativa para a medida metanalítica θ_M e o peso w_j é dado pelo inverso da variância da medida para o j -ésimo estudo.

A estatística I^2 descreve a proporção da variação total que é devida a heterogeneidade, sendo calculada por meio da equação: $I^2 = \frac{Q - (J-1)}{Q} 100\%$, onde Q é a estatística do teste de Cochran e J é o número de estudos contidos na meta-análise (Higgins and Thompson, 2002). Foi considerado que I^2 próximo de 0% indica ausência de heterogeneidade, próximo a 25% baixa heterogeneidade, próximo a 50% heterogeneidade moderada e a partir de 75% alta heterogeneidade entre os estudos (Higgins et al., 2003).

Diante da evidência de heterogeneidade observada entre os estudos foi utilizado o modelo de efeito aleatório, dado por: $Y_j = \theta_M + \zeta_j + \varepsilon_j$, onde θ_M é a medida metanalítica, ζ_j é o efeito aleatório de cada estudo j e ε_j é o erro aleatório do estudo j e considerou o método de DerSimonian and Laird (1986) para o ajuste dos efeitos

aleatórios. A fim de explicar e discutir a heterogeneidade foi realizada a análise de subgrupos, que consiste na divisão dos dados em grupos com base em covariáveis de interesse determinadas a priori, em que as comparações entre os subgrupos expliquem a heterogeneidade dos estudos (Spineli and Pandis, 2020). Esta análise foi realizada recalculando a DTI considerando as covariáveis: grupo genético, aptidão e clima.

Por fim, foi realizada a metaregressão que avaliou a contribuição de cada covariável para a explicação da heterogeneidade. Na metaregressão o peso de cada estudo (w_i) incorpora a variância dentro de estudos ($SE(\theta_i)^2$) e entre estudos (τ^2): $w_i = \frac{1}{SE(\theta_i)^2 + \tau^2}$. O modelo de metaregressão com efeitos aleatórios utiliza o índice $R^2_{ajustado}$ calculado pelo quociente da estimativa da variância entre estudos do modelo com covariáveis (τ_{cov}^2) e a variância total entre estudos (τ_{tot}^2): $R^2_{ajustado} = \tau_{cov}^2 / \tau_{tot}^2$ (Jackson et al., 2013). Para a análise por metaregressão foram consideradas como covariáveis: grupo genético (taurinos e zebuínos), aptidão produtiva (1: corte, 2: leite) e clima (A, B, C e D).

Resultados

Os artigos foram lidos na íntegra, seguindo os critérios de inclusão e exclusão estabelecidos, resultando ao final em 89 estudos (Tabela Suplementar A). Para os estudos com informação faltante (média, tamanho amostral ou desvio padrão), os autores foram contatados para a coleta das informações.

O ano de publicação dos estudos variou de 2001 a 2021, sendo que a maior frequência (19%) foi no ano de 2020. Dentre os estudos selecionados, 73% utilizaram animais *Bos taurus taurus* e 27% *Bos taurus indicus* e 62% foram destinados a produção de leite e 38% à produção de carne (Tabela 1).

A temperatura interna média observada nos estudos no ambiente de estresse térmico foi 39,45°C enquanto no ambiente termoneutro foi 38,62°C. A variação da temperatura ambiental no estresse foi de 25°C a 45°C. No ambiente termoneutro a temperatura ambiental mínima foi de 11°C e a máxima de 37°C. A classificação climática com maior número de estudos foi a classe C ($18^{\circ}\text{C} \leq \text{TA} < 25^{\circ}\text{C}$) englobando 40 estudos. Dentre os 89 estudos foi observada diferença estatística significativa ($P < 0,05$) para 65 estudos entre a temperatura interna no ambiente de estresse térmico e no ambiente termoneutro (Tabela 1).

O teste Q de Cochran e a estatística I^2 demonstraram alta variabilidade entre os estudos. A quantidade estimada da variância entre os estudos τ^2 , foi de 0,2978 [0,2324; 0,5612]. O efeito médio da DTI foi igual a 0,85 [0,7113; 0,9909], a temperatura interna relatada em 69 estudos indica que os animais estão sob estresse térmico, enquanto 20 estudos não apresentaram diferença na DTI entre o ambiente termoneutro e de estresse térmico (Figura 2). A avaliação visual do gráfico de funil bem como o teste Egger ($P = 0,01$) indicou assimetria dos dados, assim a aplicação do método “trim and fill” realizou o ajuste dos efeitos, adicionando 22 estudos para minimizar o viés de publicação. Após a adição destes 22 estudos, o tamanho do efeito médio da DTI passou para 1,06 [0,9274; 1,2042], e o teste de Egger passou a indicar simetria dos dados ($t = -0,98$, $P = 0,33$).

Animais *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* não apresentaram diferença significativa ($P = 0,6223$) em relação à temperatura interna entre os ambientes estudados. A grande variabilidade do ambiente termoneutro e estresse térmico considerado em cada trabalho pode ter contribuído para este resultado. Os 65 estudos com o grupo *Bos taurus taurus* apresentaram DTI igual a 0,8136, com intervalo de confiança de 0,6894; 0,9378, com heterogeneidade máxima entre os estudos ($I^2 = 100\%$). O grupo *Bos taurus indicus*

incluiu 24 estudos, tendo resultado em DTI igual a 0,8881 e intervalo de confiança de 0,6190 a 1,1571 (Figura 3).

A aptidão animal não influenciou significativamente a DTI entre o ambiente de estresse térmico e termoneutro nos estudos inseridos na meta-análise ($P = 0,7364$). Animais com aptidão para produção de leite incluiu 55 estudos (47 raças taurinas e 8 raças zebuínas) que apresentaram DTI igual a 0,8491 com intervalo de confiança de 0,7364 a 0,9617. Enquanto 24 estudos (16 com raças zebuínas e 8 com raças taurinas) com animais com aptidão para produção de carne apresentaram DTI igual a 0,8069 [IC: 0,5888; 1,0250] (Figura 4). Apesar de não ter sido observada diferença significativa, observa-se que a DTI foi maior em animais com aptidão para produção de leite. Os animais taurinos corresponderam a 85,4% dos animais destinados a produção de leite dentre os 55 estudos abordados, sendo que os rebanhos taurinos são caracterizados por uma menor adaptação ao estresse térmico.

A classificação climática apresentou uma tendência a afetar a temperatura interna entre os estudos analisados ($P = 0,0714$). Os estudos agrupados no clima A apresentaram DTI igual a 1,1820 [0,7406; 1,6234], no clima B foi observado DTI igual a 0,6775 [IC: 0,5143; 0,8407], enquanto que no clima C foi obtido DTI igual a 0,7762 [0,6179; 0,9345] e por último no clima D a DTI foi igual a 0,9465 [0,7376; 1,1554].

Desta maneira é possível averiguar que temperaturas ambientais extremas apresentam diferenças superiores na temperatura interna dos animais em estudo, considerando que os locais pertencentes ao clima A são caracterizados por médias anuais de TA menor que 12°C, enquanto que para o clima D a média anual é superior a 25°C. Demonstrando que o ambiente afeta o metabolismo animal e sua forma de regulação das trocas de calor (Figura 5).

Os resultados do modelo de metaregressão de efeitos aleatórios demonstram que as covariáveis grupo genético e clima explicaram em conjunto 21,19% da heterogeneidade dos estudos analisados. Apesar de não terem sido observadas diferenças significativas entre as respostas fisiológicas ao estresse térmico em *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*, o grupo genético explicou 3,24% da variabilidade. O clima contribuiu significativamente ($P = 0,05$) com a heterogeneidade observada entre estudos. Pela análise percebe-se que foram os climas B e C os responsáveis por esta diferença. Explicando assim 17,95% da variabilidade observada.

Discussão

A diversidade de estudos ao avaliar o estresse térmico em bovinos é grande, apontando várias maneiras de mensurar e caracterizar o animal em estresse térmico (Baek et al., 2019; Godyń et al., 2019). A diferença na temperatura interna dos bovinos obtida nos estudos indica que estes estão propensos ao estresse térmico. A mensuração da temperatura interna animal é amplamente utilizada para avaliar as condições fisiológicas e caracterizar animais durante o estresse térmico. A raça, o ambiente, a dieta, a idade, as práticas de manejo, o histórico evolutivo, as condições fisiológicas são fatores que interferem na termotolerância dos bovinos (Carabaño et al., 2019; Lees et al., 2019; Otto et al., 2019), o que justifica a variabilidade observada nos estudos agrupados nesta meta-análise.

A partir dos estudos analisados não foi possível observar diferenças no tamanho do efeito entre animais *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*, assim como para a aptidão produtiva. Uma explicação para este fato pode ser a diferença no número de estudos,

animais taurinos e com aptidão leiteira apresentam uma literatura mais abundante referente ao estresse térmico. Sabe-se que taurinos e zebuínos se comportam diferentemente em relação as condições climáticas (Charoensook et al., 2012; Archana et al., 2017), porém é preciso considerar outros fatores que estão envolvidos nos mecanismos fisiológicos da homeostase. A diferença nestes mecanismos é comparada dentro e entre raças (componente genético), e nem sempre demonstra diferença significativa entre os animais, o que aponta a adaptação do animal ao meio e conseqüentemente a variabilidade fenotípica existente nas características de termotolerância (Rashamol et al., 2018).

As diferenças na temperatura interna entre animais taurinos e zebuínos foram relatadas entre animais das raças Sahiwal e Frieswal (Deb et al., 2014); Brahman e Angus (Dikmen et al., 2018); Simmental e Angus (Baena et al., 2019) e Angus e Nelore (Paim et al., 2018). Enquanto estudos comparando Bosmara e Hereford (Taborda et al., 2018), Tharparkar e Karan Fries (Maibam et al., 2017), Nelore e Angus (Valente et al., 2015) não observaram diferenças na temperatura interna entre os animais. Diante do exposto fica evidente que o estresse térmico é peculiar a cada região, raça e animal estudado. É preciso considerar todos os aspectos utilizados na experimentação, desde o protocolo de mensuração da temperatura interna até fatores genéticos do animal.

As características morfológicas e genéticas do animal definem sua aptidão, estando esta associada a eficiência produtiva do animal em um rebanho (Munro et al., 2017; Thompson et al., 2018). A similaridade entre a diferença média da temperatura interna para os grupos de diferentes aptidões corrobora com o fato do grupo genético também não ter apresentado significância em relação a diferença na temperatura interna. Independente da aptidão do animal (carne ou leite) os mecanismos fisiológicos utilizados

para manter o equilíbrio homeostático é o mesmo, diferindo na intensidade (Aleena et al., 2016; Brown-Brandl, 2018).

O clima da região afeta diretamente as características de termotolerância do animal, estudos comparando duas ou mais estações do ano demonstraram o efeito da variação na temperatura ambiental, velocidade do vento e umidade relativa sobre a temperatura interna dos bovinos (Pereira et al., 2014; Maurya et al., 2018; Veissier et al., 2018; Almeida et al., 2020). Ao observar a diferença média na temperatura interna entre ambiente de estresse térmico e termoneutro, nota-se que os estudos classificados nos climas extremos A ($< 12^{\circ}\text{C}$) e D ($> 25^{\circ}\text{C}$) apresentaram maior diferença na temperatura interna em relação aos climas B e C. Na raça holandesa foi observado que a diferença na temperatura ambiental, altera a taxa de produção do calor do animal e conseqüentemente sua temperatura interna (Veissier et al., 2018). Ao avaliar animais com aptidão para leite nos meses de agosto e setembro em três regiões diferentes, Allen et al. (2015) notaram que a temperatura do ambiente acima de 25°C promove um aumento da temperatura corporal. Em animais Curraleiro, Junqueira, Pantaneira, Nelore e Criola Lageana foi observado um coeficiente de correlação positivo entre a temperatura do ar e a temperatura retal (0,57) (Cardoso et al., 2016).

Ao avaliar fêmeas Nelore foi observado que o Índice de Temperatura e Umidade (ITU) afeta diretamente a homeostase animal, em que o maior ITU resulta em um aumento na temperatura interna do animal (Hooper et al., 2019). Em bovinos de leite é indicado ITU próximo a 65 para manter o conforto térmico animal e não prejudicar a produção de leite (Pinto et al., 2020), para bovinos de corte este valor é superior indicando que ITU próximo a 74 mantém as condições fisiológicas estáveis (Gaughan et al., 2010; Valente et al., 2015; Sousa et al., 2018). O ITU é um índice preciso para avaliar o estresse por calor em animais homeotérmicos, porém o mesmo é sensível ao efeito da umidade do

ar em ambientes de clima quente e úmido (Berman et al., 2016). Os resultados do presente estudo corroboram com a literatura, demonstrando a relação do clima com os mecanismos de controle da homeostase.

A comparação de estudos que avaliam a termotolerância em bovinos requer cautela e rigor, cada estudo utiliza um grupo amostral que comumente apresenta variação no perfil de termotolerância entre os animais estudados, cada raça apresenta formas diferenciadas para manter a homeostase a depender do ambiente que está inserida, ou seja a resposta ao estresse térmico é resultado do genótipo (raça), do ambiente que o animal se encontra e da interação entre ambos os fatores.

O ambiente de experimentação tem peculiaridades que nem sempre são compartilhadas entre os estudos. É importante destacar o grande número de estudos em raças com aptidão leiteira em comparação a raças com aptidão de corte. Isso ocorre por vários fatores, como maior número de rebanhos, maior tempo de estudo, maior enfoque do melhoramento genético em determinadas raças, além de que se acredita que os prejuízos do estresse térmico sobre a produção de leite sejam maiores em comparação a produção de carne. É preciso considerar as características fenotípicas de cada animal que interfere nas manifestações fisiológicas diante do estresse térmico, como número de glândulas sudoríparas, propriedades do pelo, cor da pele, ingestão hídrica, temperamento. Portanto, a alta heterogeneidade apresentada era esperada, sendo justificada pela elevada variabilidade existente entre os estudos incluídos na presente meta-análise.

Conclusão

As temperaturas retal e vaginal auxiliam na descrição do estado fisiológico do animal, sendo importantes parâmetros para se avaliar o estresse térmico em bovinos

taurinos e zebuínos. O efeito médio da DTI baseado na temperatura interna indicou uma propensão a condição de estresse térmico dos animais nos estudos utilizados. O ambiente (clima) afetou a temperatura interna dos bovinos, sendo necessário investimento em estratégias que amenizem os prejuízos do estresse por calor na produção animal.

O estresse térmico em bovinos avaliado a partir da temperatura retal e vaginal apresenta uma grande heterogeneidade entre os rebanhos avaliados. O grupo genético e a aptidão produtiva não explicaram satisfatoriamente a variabilidade encontrada entre os estudos nesta meta-análise. O que nos leva a concluir que a variância obtida está associada a outros fatores não considerados no presente estudo.

Agradecimentos

Às agências de fomento, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (CNPq), pelo auxílio financeiro na realização do presente trabalho.

Conflito de Interesse

Os autores declaram que não há conflitos de interesse.

Acesso aos dados

Os dados que suportam as conclusões deste estudo estão disponíveis com o autor correspondente, mediante solicitação.

Contribuições dos Autores

Todos os autores contribuíram neste estudo. Bianca Vilela Pires: conceituação, metodologia, análises estatísticas, investigação, validação e redação - preparação do esboço original. Ana Claudia Freitas: conceituação, metodologia e redação: revisão e edição. John Lenon Klein: redação e análises estatísticas. Thaise Pinto Melo: análises estatísticas e redação: revisão e edição. Claudia Cristina Paro Paz: redação (revisão e edição), validação, supervisão e obtenção de financiamento.

Referências

- Al-kanaan, A.J.J., 2016. Heat stress response for physiological traits in dairy and dual-purpose cattle populations on phenotypic and genetic scales. Thesis Ph. D.
- Aleena, J., Pragna, P., Archana, P.R., Sejian, V., Bagath, M., Krishnan, G., Manimaran, A., Beena, V., Kurien, E.K., Varma, G., Bhatta, R., 2016. Significance of metabolic response in livestock for adapting to heat stress challenges. *Asian J. Anim. Sci.* 10, 224–234. <https://doi.org/10.3923/ajas.2016.224.234>
- Allen, J.D., Hall, L.W., Collier, R.J., Smith, J.F., 2015. Effect of core body temperature, time of day, and climate conditions on behavioral patterns of lactating dairy cows experiencing mild to moderate heat stress. *J. Dairy Sci.* 98, 118–127. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7704>

- Almeida, J.V.N., Marques, L.R., Marques, T.C., Guimarães, K.C., Leão, K.M., 2020. Influence of thermal stress on the productive and reproductive aspects of cattle - Review. *Res. Soc. Dev.* 9, 1–29. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i7.3837>
- Amamou, H., Beckers, Y., Mahouachi, M., Hammami, H., 2019. Thermotolerance indicators related to production and physiological responses to heat stress of holstein cows. *J. Therm. Biol.* 82, 90–98. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2019.03.016>
- Ammer, S., Lambertz, C., Gauly, M., 2016. Comparison of different measuring methods for body temperature in lactating cows under different climatic conditions. *J. Dairy Res.* 83, 165–172. <https://doi.org/10.1017/S0022029916000182>
- Archana, P.R., Aleena, J., Pragna, P., Vidya, M.K., Abdul Niyas, P.A., Bagath, M., Krishnan, G., Manimaran, A., Beena, V., Kurien, E.K., Sejian, V., Bhatta, R., 2017. Role of Heat Shock Proteins in Livestock Adaptation to Heat Stress. *J. Dairy, Vet. Anim. Res.* 5, 13–19. <https://doi.org/10.15406/jdvar.2017.05.00127>
- Augenstein, S.M., Harrison, M.A., Klopatek, S.C., Oltjen, J.W., 2020. Heat stress alleviation and dynamic temperature measurement for growing beef cattle. *Transl. Anim. Sci.* 4, S178–S181. <https://doi.org/10.1093/tas/txaa144>
- Baek, Y.-C., Kim, M., Jeong, J.-Y., Oh, Y.-K., Lee, S.-D., Lee, Y.-K., Ji, S.-Y., Choi, H., 2019. Effects of short-term acute heat stress on physiological responses and heat shock proteins of Hanwoo steer (Korean cattle). *J. Anim. Reprod. Biotechnol.* 34, 173–182. <https://doi.org/10.12750/JARB.34.3.173>
- Baena, M.M., Costa, A.C., Vieira, G.R., Rocha, R. de F.B., Ribeiro, A.R.B., Ibelli, A.M.G., Meirelles, S.L.C., 2019. Heat tolerance responses in a *Bos taurus* cattle herd raised in a Brazilian climate. *J. Therm. Biol.* 81, 162–169. <https://doi.org/10.1016/J.JTHERBIO.2019.02.017>
- Balduzzi S., Rücker G., Schwarzer G., 2019. How to perform a meta-analysis with R: a practical tutorial. *Evidence-Based Mental Health.* 22, 153-160. <http://dx.doi.org/10.1136/ebmental-2019-300117>
- Bell, D.J., Macrae, A.I., Mitchell, M.A., Mason, C.S., Jennings, A., Haskell, M.J., 2020. Comparison of thermal imaging and rectal temperature in the diagnosis of pyrexia in pre-weaned calves using on farm conditions. *Res. Vet. Sci.* 131, 259–265. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.05.004>
- Berman, A., Horovitz, T., Kaim, M., Gacitua, H., 2016. A comparison of THI indices leads to a sensible heat-based heat stress index for shaded cattle that aligns temperature and humidity stress. *Int. J. Biometeorol.* 60, 1453–1462. <https://doi.org/10.1007/s00484-016-1136-9>
- Bewley, J.M., Einstein, M.E., Grott, M.W., Schutz, M.M., 2008. Comparison of reticular and rectal core body temperatures in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91, 4661–4672. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0835>
- Brito, L.C., Peixoto, M.G.C.D., Carrara, E.R., Fonseca e Silva, F., Ventura, H.T., Bruneli, F.A.T., Lopes, P.S., 2020. Genetic parameters for milk, growth, and reproductive traits in Guzerá cattle under tropical conditions. *Trop. Anim. Health Prod.* 52, 2251–2257. <https://doi.org/10.1007/s11250-020-02255-0>

- Brown-Brandl, T.M., 2018. Understanding heat stress in beef cattle. *Rev. Bras. Zootec.* 47, 1–9. <https://doi.org/10.1590/rbz4720160414>
- Burdick, N.C., Carroll, J.A., Dailey, J.W., Randel, R.D., Falkenberg, S.M., Schmidt, T.B., 2012. Development of a self-contained, indwelling vaginal temperature probe for use in cattle research. *J. Therm. Biol.* 37, 339–343. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2011.10.007>
- Burfeind, O., Suthar, V.S., Heuwieser, W., 2012. Effect of heat stress on body temperature in healthy early postpartum dairy cows. *Theriogenology* 78, 2031–2038. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.07.024>
- Carabaño, M.J., Ramón, M., Menéndez-Buxadera, A., Molina, A., Díaz, C., 2019. Selecting for heat tolerance. *Anim. Front.* 9, 62–68. <https://doi.org/10.1093/af/vfy033>
- Cardoso, C.C., Lima, F.G., Fioravanti, M.C.S., do Egito, A.A., e Silva, F.C. de P., Tanure, C.B., Peripolli, V., McManus, C., 2016. Heat tolerance in Curraleiro Pé-duro, Pantaneiro and Nelore cattle using thermographic images. *Animals* 6, 1–11. <https://doi.org/10.3390/ani6020009>
- Charoensook, R., Gatphayak, K., Sharifi, A.R., Chaisongkram, C., Brenig, B., Knorr, C., 2012. Polymorphisms in the bovine *HSP90AB1* gene are associated with heat tolerance in *Thai indigenous* cattle. *Trop. Anim. Health Prod.* 44, 921–928. <https://doi.org/10.1007/s11250-011-9989-8>
- Correa-Calderón, A., Angulo-Valenzuela, I., Betancourth, F., Oroz-Rojo, F., Fierros-Castro, K., Macías-Cruz, U., Díaz-Molina, R., Avendaño-Reyes, L., 2020. Conception rate following artificial insemination with sexed semen in Holstein heifers under artificial cooling during summer compared with winter season. *Trop. Anim. Health Prod.* 52, 203–209. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-01998-9>
- Curtis, S.E. Environmental management in animal agriculture. 2nd. ed. Ames: Iowa: Iowa State University Press, 1983. 407p.
- Dado-Senn, B., Vega Acosta, L., Torres Rivera, M., Field, S.L., Marrero, M.G., Davidson, B.D., Tao, S., Fabris, T.F., Ortiz-Colón, G., Dahl, G.E., Laporta, J., 2020. Pre- and postnatal heat stress abatement affects dairy calf thermoregulation and performance. *J. Dairy Sci.* 103, 4822–4837. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17926>
- Deb, R., Sajjanar, B., Singh, U., Kumar, S., Singh, R., Sengar, G., Sharma, A., 2014. Effect of heat stress on the expression profile of Hsp90 among Sahiwal (*Bos indicus*) and Frieswal (*Bos indicus* × *Bos taurus*) breed of cattle: A comparative study. *Gene* 536, 435–440. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.11.086>
- DerSimonian, R. and Laird, N., 1986. Meta-analysis in clinical trials. *Control. Clin. Trials.* 7, 177–188. [https://doi.org/10.1016/0197-2456\(86\)90046-2](https://doi.org/10.1016/0197-2456(86)90046-2)
- Dikmen, S., Cole, J.B., Null, D.J., Hansen, P.J., 2012. Heritability of rectal temperature and genetic correlations with production and reproduction traits in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4306>
- Dikmen, S., Mateescu, R.G., Elzo, M.A., Hansen, P.J., 2018. Determination of the optimum contribution of brahman genetics in an Angus-Brahman multibreed herd for regulation of body temperature during hot weather. *J. Anim. Sci.* 96, 2175–2183.

<https://doi.org/10.1093/jas/sky133>

- Duval, S., Tweedie, R., 2000. Trim and fill: A simple funnel-plotbased method of testing and adjusting for publication bias in meta-analysis. *Biometrics*, 56, 455–463. <https://doi.org/10.1111/j.0006-341X.2000.00455.x>
- Egger, M., Smith, G.D., Schneider, M., Minder, C., 1997. Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test. *BMJ*, 315, 629–634. <https://doi.org/10.1136/bmj.315.7109.629>
- Fabris, T.F., Laporta, J., Corra, F.N., Torres, Y.M., Kirk, D.J., McLean, D.J., Chapman, J.D., Dahl, G.E., 2017. Effect of nutritional immunomodulation and heat stress during the dry period on subsequent performance of cows. *J. Dairy Sci.* 100, 6733–6742. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12313>
- Galán, E., Llonch, P., Villagrà, A., Levit, H., Pinto, S., Del Prado, A., 2018. A systematic review of non-productivityrelated animal-based indicators of heat stress resilience in dairy cattle. *PLoS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206520>
- Garner, J.B., Douglas, M.L., Williams, S.R.O., Wales, W.J., Marett, L.C., Nguyen, T.T.T., Reich, C.M., Hayes, B.J., 2016. Genomic selection improves heat tolerance in dairy cattle. *Sci. Rep.* 6, 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep34114>
- Gaughan, J.B., Mader, T.L., Holt, S.M., Sullivan, M.L., Hahn, G.L., 2010. Assessing the heat tolerance of 17 beef cattle genotypes. *Int. J. Biometeorol.* 54, 617–627. <https://doi.org/10.1007/s00484-009-0233-4>
- Godyń, D., Herbut, P., Angrecka, S., 2019. Measurements of peripheral and deep body temperature in cattle – A review. *J. Therm. Biol.* 79, 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.11.011>
- Hansen, P.J., 2004. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. *Anim. Reprod. Sci.* 82–83, 349–360. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.011>
- Hansen, P.J., 2020. Prospects for gene introgression or gene editing as a strategy for reduction of the impact of heat stress on production and reproduction in cattle. *Theriogenology* 154, 190–202. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.05.010>
- Higgins J.P.T., Thompson S.G., Deeks J.J., Altman D.G., 2003. Measuring inconsistency in meta-analyses. *BMJ*. 327, 557–560. <https://doi.org/10.1136/bmj.327.7414.557>
- Higgins, J. P.T. and Thompson, S.G., 2004. Controlling the risk of spurious findings from meta-regression. *Stat Med*, 23,1663–1682. <https://doi.org/10.1002/sim.1752>
- Hooper, H.B., Titto, C.G., Gonella-Diaza, A.M., Henrique, F.L., Pulido-Rodríguez, L.F., Longo, A.L.S., Leme-dos-Santos, T.M. da C., Geraldo, A.C.A.P. de M., Pereira, A.M.F., Binelli, M., Balieiro, J.C. de C., Titto, E.A.L., 2019. Heat loss efficiency and HSPs gene expression of Nellore cows in tropical climate conditions. *Int. J. Biometeorol.* <https://doi.org/10.1007/s00484-018-1576-5>
- Jacob, R.H., SurrIDGE, V.S.M., Beatty, D.T., Gardner, G.E., Warner, R.D., 2014. Grain feeding increases core body temperature of beef cattle. *Anim. Prod. Sci.* 54, 444–449. <https://doi.org/10.1071/AN13463>

- Jackson, D., White, I. R., Riley, R. D., 2013. A matrix-based method of moments for fitting the multivariate random effects model for meta-analysis and meta-regression. *Biom. J.*, 55, 231–245. <https://doi.org/10.1002/bimj.201200152>
- Katiyatiya, C.L.F., Muchenje, V., 2017. Hair coat characteristics and thermophysiological stress response of Nguni and Boran cows raised under hot environmental conditions. *Int. J. Biometeorol.* 61, 2183–2194. <https://doi.org/10.1007/s00484-017-1424-z>
- König, S., May, K., 2019. Invited review: Phenotyping strategies and quantitative-genetic background of resistance, tolerance and resilience associated traits in dairy cattle. *Animal* 13, 897–908. <https://doi.org/10.1017/S1751731118003208>
- Kovács, L., Kézér, F.L., Ruff, F., Jurkovich, V., Szenci, O., 2018. Heart rate, cardiac vagal tone, respiratory rate, and rectal temperature in dairy calves exposed to heat stress in a continental region. *Int. J. Biometeorol.* 62, 1791–1797. <https://doi.org/10.1007/s00484-018-1581-8>
- Lees, A.M., Sejian, V., Wallage, A.L., Steel, C.C., Mader, T.L., Lees, J.C., Gaughan, J.B., 2019. The impact of heat load on cattle. *Animals* 9, 1–20. <https://doi.org/10.3390/ani9060322>
- Leles, J.S., Rodrigues, I.C.S., Neto, M.F.V., Neto, A.M.V., Rocha, D.R. da, Costa, A.N.L. da, Salles, M.G.F., Araújo, A.A. de, 2017. Heat stress and body temperature in Brown Swiss cows raised in semi-arid climate of Ceará state, Brazil. *Acta Sci. Vet.* 45, 8. <https://doi.org/10.22456/1679-9216.80470>
- Levit, H., Pinto, S., Amon, T., Gershon, E., Kleinjan-Elazary, A., Bloch, V., Ben Meir, Y.A., Portnik, Y., Jacoby, S., Arnin, A., Miron, J., Halachmi, I., 2020. Dynamic cooling strategy based on individual animal response mitigated heat stress in dairy cows. *Animal* 15, 100093. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2020.100093>
- Lovatto, P.A., Lehnen, C.R., Andretta, I., Carvalho, A.D., Hauschild, L., 2007. Meta-análise em pesquisas científicas: enfoque em metodologias. *Rev. Bras. Zootec.* 36, 285–294. <https://doi.org/10.1590/s1516-35982007001000026>
- Luo, H., Li, X., Hu, L., Xu, W., Chu, Q., Liu, A., Guo, G., Liu, L., Brito, L.F., Wang, Y., 2021. Genomic analyses and biological validation of candidate genes for rectal temperature as an indicator of heat stress in Holstein cattle. *J. Dairy Sci.* 104, 4441–4451. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18725>
- Maibam, U., Hooda, O.K., Sharma, P.S., Mohanty, A.K., Singh, S. V., Upadhyay, R.C., 2017. Expression of *HSP70* genes in skin of zebu (Tharparkar) and crossbred (Karan Fries) cattle during different seasons under tropical climatic conditions. *J. Therm. Biol.* 63, 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2016.11.007>
- Martello, L.S., da Luz e Silva, S., da Costa Gomes, R., da Silva Corte, R.R.P., Leme, P.R., 2016. Infrared thermography as a tool to evaluate body surface temperature and its relationship with feed efficiency in *Bos indicus* cattle in tropical conditions. *Int. J. Biometeorol.* 60, 173–181. <https://doi.org/10.1007/s00484-015-1015-9>
- Martinez, E.Z., 2007. Meta-analysis of randomized controlled trials: Quantitative aspects. *Medicina (B. Aires).* 40, 223–235. <https://doi.org/10.11606/issn.2176-7262.v40i2p223-235>

- Maurya, V., Bharti, P.K., Singh, M., Brijesh Patel, G.K., Dutt, G. and T., 2018. Performance of crossbred calves under modified housing system during hot-humid season. *Vet. Pract.* 19, 286–291. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.21071.43684>
- McDowell, R.E., 1975. *Bases biológicas de la producción animal en zonas tropicales*, 1st ed. ACRIBIA, Zaragoza.
- Moher D., Liberati A., Tetzlaff J., Altman D.G., 2009. The PRISMA Group (2009). Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. *PLoS Med*, 6, e1000097. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000097>
- Munro, J.C., Schenkel, F.S., Physick-Sheard, P.W., Fontoura, A.B.P., Miller, S.P., Tennessen, T., Montanholi, Y.R., 2017. Associations of acute stress and overnight heart rate with feed efficiency in beef heifers. *animal* 11, 452–460. <https://doi.org/10.1017/S1751731116001695>
- Otto, P.I., Guimarães, S.E.F., Verardo, L.L., Azevedo, A.L.S., Vandenplas, J., Sevillano, C.A., Marques, D.B.D., Pires, M. de F.A., de Freitas, C., Verneque, R.S., Martins, M.F., Panetto, J.C.C., Carvalho, W.A., Gobo, D.O.R., da Silva, M.V.G.B., Machado, M.A., 2019. Genome-wide association studies for heat stress response in *Bos taurus* × *Bos indicus* crossbred cattle. *J. Dairy Sci.* 102, 8148–8158. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15305>
- Pai, M., McCulloch, M., Gorman, J.D., Pai, N., Enanoria, W., Kennedy, G., Tharyan, P., Colford, J.M., 2004. Systematic reviews and meta-analyses: An illustrated, step-by-step guide *Natl. Med. J. India.* 17, 86–95.
- Paim, T.P., Goulart, R. de O., da Silva, D.A.L., Sousa, J. de A., Gonçalves, L.F., Claudio, F.L., Calgaro Júnior, G., Gléria, A.A., Santos, L.C., Alves, E.M., 2018. Relationship of weight gain with infrared temperatures in Nelore and F1 (Nelore × Angus) heifers reared in two forage production systems. *J. Anim. Sci.* 96, 4002–4011. <https://doi.org/10.1093/jas/sky242>
- Pate, R.T., Luchini, D., Murphy, M.R., Cardoso, F.C., 2020. Effects of rumen-protected methionine on lactation performance and physiological variables during a heat stress challenge in lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 103, 2800–2813. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17305>
- Pereira, A.M.F., Titto, E.L., Infante, P., Titto, C.G., Geraldo, A.M., Alves, A., Leme, T.M., Baccari, F., Almeida, J.A., 2014. Evaporative heat loss in *Bos taurus*: Do different cattle breeds cope with heat stress in the same way? *J. Therm. Biol.* 45, 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2014.08.004>
- Pinto, S., Hoffmann, G., Ammon, C., Amon, T., 2020. Critical THI thresholds based on the physiological parameters of lactating dairy cows. *J. Therm. Biol.* 88, 102523. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2020.102523>
- Rashamol, V.P., Sejian, V., Bagath, M., Krishnan, G., Archana, P.R., Bhatta, R., 2018. Physiological adaptability of livestock to heat stress: an updated review. *J. Anim. Behav. Biometeorol.* 6, 62–71. <https://doi.org/10.26667/2318-1265jabb.v6n2p62-71>
- Rohatgi, A. WEBPLOTDIGITIZER. Version 4.1, Austin, Texas, USA.
- Sarlo Davila, K.M., Hamblen, H., Hansen, P.J., Dikmen, S., Oltenacu, P.A., Mateescu,

- R.G., 2019. Genetic parameters for hair characteristics and core body temperature in a multibreed Brahman-Angus herd. *J. Anim. Sci.* 97, 3246–3252. <https://doi.org/10.1093/jas/skz188>
- Sousa, R.V. de, Rodrigues, A.V. da S., Abreu, M.G. de, Tabile, R.A., Martello, L.S., 2018. Predictive model based on artificial neural network for assessing beef cattle thermal stress using weather and physiological variables. *Comput. Electron. Agric.* <https://doi.org/10.1016/j.compag.2017.11.033>
- Spineli, L. M.; Pandis, N., 2020. Exploring heterogeneity in meta-analysis: Subgroup analysis. Part 1. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 158, 302-304. <https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2020.04.002>
- Taborda, P.A.B., Saravia, C.T., Espasandin, A.C., 2018. Physiological responses and animal behavior in Bonsmara-Hereford crosses vs. Hereford purebred on environment stress. *Sci. Agric.* 75, 479–485. <https://doi.org/10.1590/1678-992x-2017-0042>
- Thompson, S., Schaefer, A.L., Crow, G.H., Basarab, J., Colyn, J., Ominski, K., 2018. Relationship between residual feed intake and radiated heat loss using infrared thermography in young beef bulls. *J. Therm. Biol.* 78, 304–311. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.10.007>
- Valente, É.E.L., Chizzotti, M.L., Oliveira, C.V.R. de, Galvão, M.C., Domingues, S.S., Rodrigues, A.D.C., Ladeira, M.M., 2015. Intake, physiological parameters and behavior of Angus and Nellore bulls subjected to heat stress. *Semin. Ciências Agrárias* 36, 4565. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2015v36n6Supl2p4565>
- Veissier, I., Van laer, E., Palme, R., Moons, C.P.H., Ampe, B., Sonck, B., Andanson, S., Tuytens, F.A.M., 2018. Heat stress in cows at pasture and benefit of shade in a temperate climate region. *Int. J. Biometeorol.* <https://doi.org/10.1007/s00484-017-1468-0>
- Viechtbauer, W., 2010. Conducting meta-analyses in R with the metafor package. *J Stat Softw.* 36, 1-48. <https://doi.org/10.18637/jss.v036.i03>
- Weng, X., Monteiro, A.P.A., Guo, J., Li, C., Orellana, R.M., Marins, T.N., Bernard, J.K., Tomlinson, D.J., DeFrain, J.M., Wohlgemuth, S.E., Tao, S., 2018. Effects of heat stress and dietary zinc source on performance and mammary epithelial integrity of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 101, 2617–2630. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13484>
- WMO - World Meteorological Organization, 2021. 2020 was one of three warmest years on record. <https://public.wmo.int/en/media/press-release/2020-was-one-of-three-warmest-years-record>. Accessed in 06 June 2021.

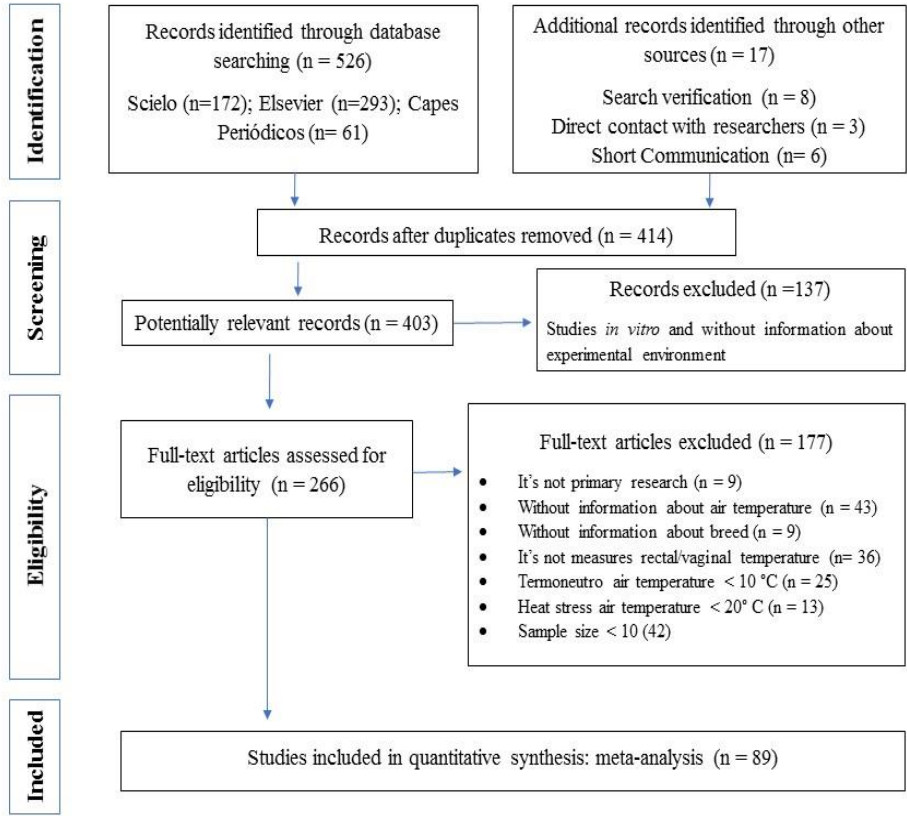


Figura 1.

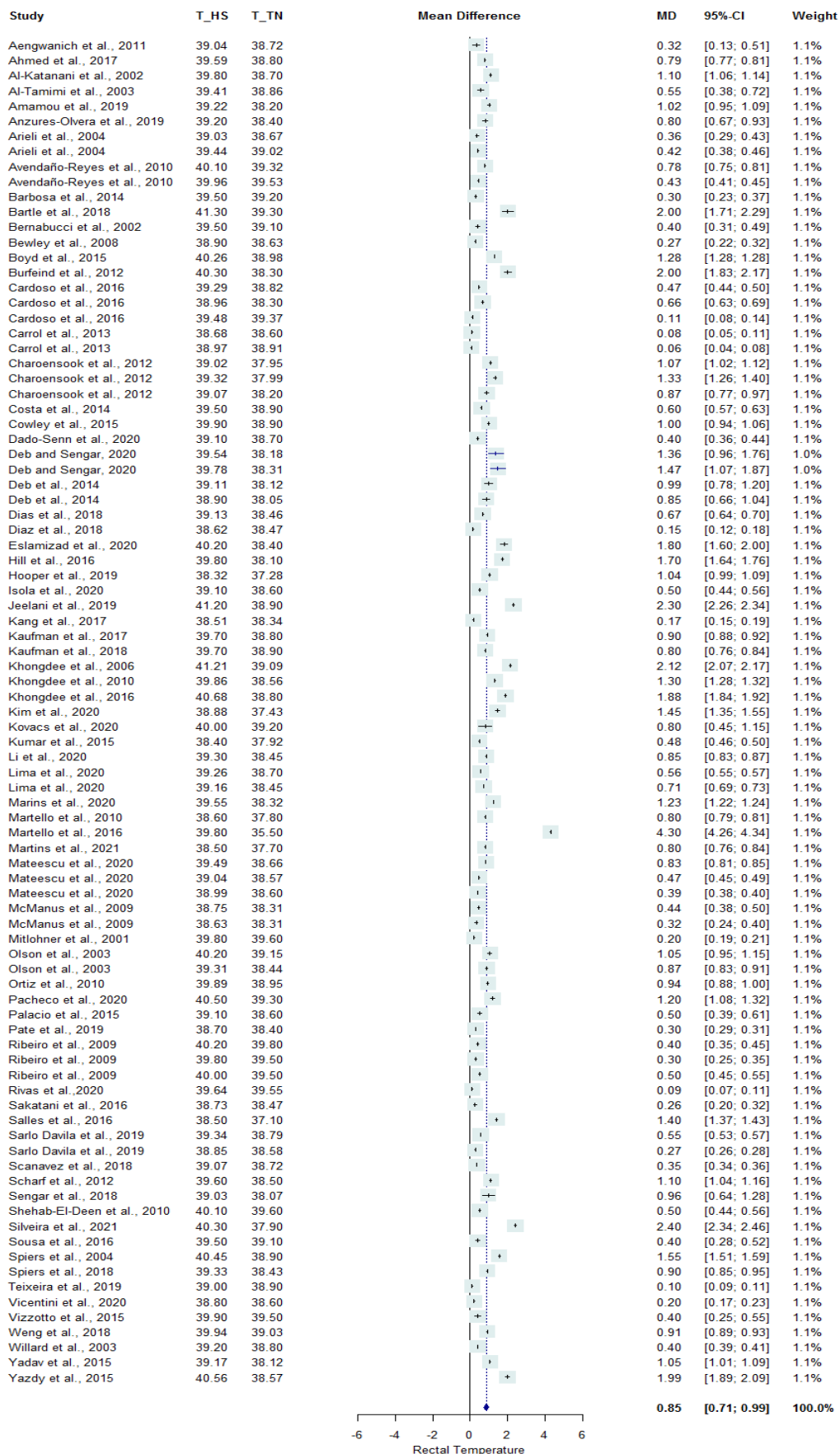


Figura 2.

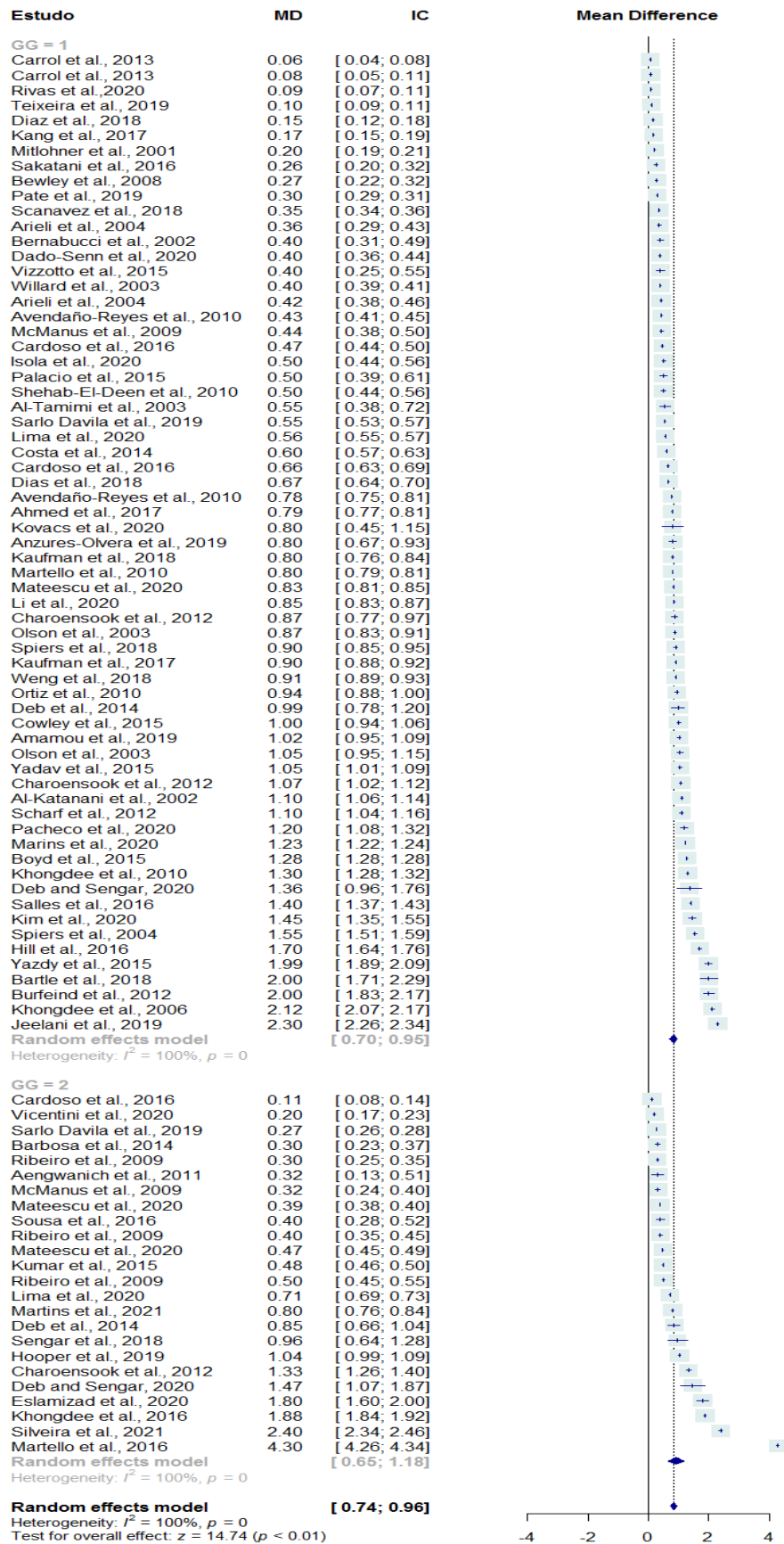


Figura 3.

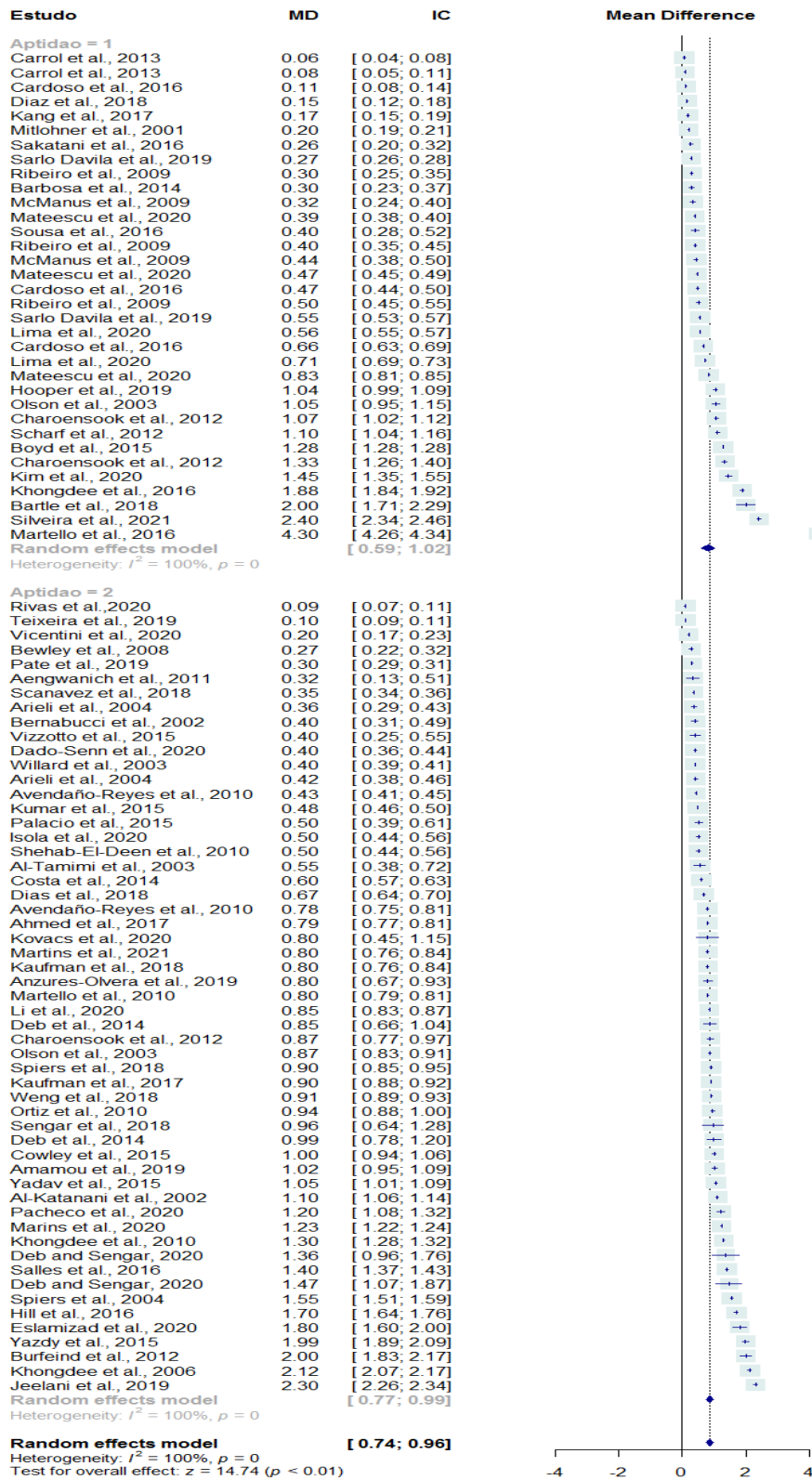


Figura 4.

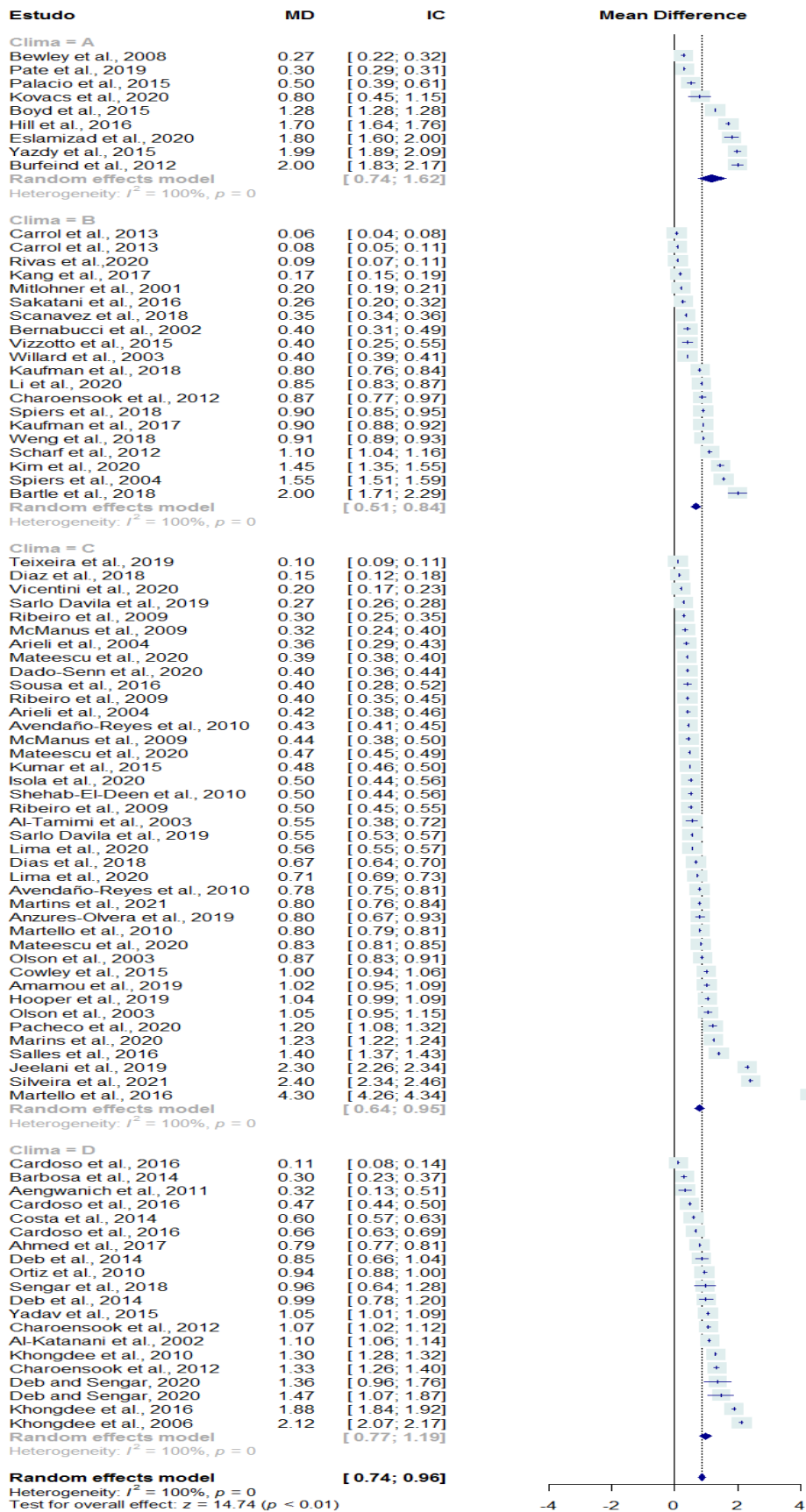


Figura 5.

Table 1. Distribuição dos estudos de acordo com as classes de grupo genético, sexo, aptidão, classificação climática e diferença estatística.

	Características	n° de Estudos
Grupo Genético	<i>Bos taurus taurus</i>	65
	<i>Bos taurus indicus</i>	24
Sexo	Macho	27
	Fêmeas	62
Aptidão	Leite	55
	Corte	24
Classificação Climática	A	9
	B	20
	C	40
	D	20
Diferença Estatística	P-value > 0.05	24
	P-value < 0.05	65
Ano de publicação	2001	1
	2002	2
	2003	4
	2004	3
	2006	1
	2008	1
	2009	5
	2010	6
	2011	1
	2012	5
	2013	2
	2014	4
	2015	7
	2016	9
	2017	3
	2018	8
2019	8	
2020	17	
2021	2	

Figuras

Figura 1. Fluxograma para seleção dos estudos observacionais avaliando o uso da temperatura retal/vaginal em ambiente de estresse térmico e termoneutro em bovinos. Adaptado de PRISMA (Moher *et al.*, 2009).

Figura 2. Forest plot demonstrando tamanhos de efeito para diferença média (MD) na temperatura interna entre os ambientes de estresse térmico (T_HS) e termoneutro (T_TN), acompanhadas do intervalo de confiança de 95% (95%-IC) e peso do estudo (weight).

Figura 3. Forest plot demonstrando tamanhos de efeito para diferença média (MD) na temperatura interna entre os ambientes de estresse térmico e termoneutro acompanhadas do intervalo de confiança de 95% (IC) de acordo com o grupo genético (GG 1 = taurinos, GG2 = zebuínos).

Figura 4. Forest plot demonstrando tamanhos de efeito para diferença média (MD) na temperatura interna entre os ambientes de estresse térmico e termoneutro acompanhadas do intervalo de confiança de 95% (IC) de acordo com a aptidão produtiva animal (1: corte, 2: leite).

Figura 5. Forest plot demonstrando tamanhos de efeito para diferença média (MD) na temperatura interna entre os ambientes de estresse térmico e termoneutro acompanhadas do intervalo de confiança de 95% (IC) de acordo com a classificação do clima (A: $TA < 12^{\circ}\text{C}$; B: $12^{\circ}\text{C} \leq TA < 18^{\circ}\text{C}$; C: $18^{\circ}\text{C} \leq TA < 25^{\circ}\text{C}$ e D: $TA \geq 25^{\circ}\text{C}$).

Tabela Suplementar A. Estudos utilizados na meta-análise (Autor e ano), classificação climática (Clima: A,B,C e D), grupo genético (GG: 1 taurino, 2 zebuino), número amostral (n), temperatura interna no ambiente estresse (T_HS) e no ambiente termoneutro (T_TN).

	Clima	GG	Aptidaeo	n	T_HS	T_TN
Aengwanich et al., 2011	D	2	2	21	39.04	38.72
Ahmed et al., 2017	D	1	2	12	39.59	38.80
Al-Katanani et al., 2002	D	1	2	40	39.80	38.70
Al-Tamimi et al., 2003	C	1	2	10	39.41	38.86
Amamou et al., 2019	C	1	2	80	39.22	38.20
Anzures-Olvera et al., 2019	C	1	2	178	39.20	38.40
Arieli et al., 2004	C	1	2	40	39.03	38.67
Arieli et al., 2004	C	1	2	100	39.44	39.02
Avendaño-Reyes et al., 2010	C	1	2	32	40.10	39.32
Avendaño-Reyes et al., 2010	C	1	2	38	39.96	39.53
Barbosa et al., 2014	D	2	1	10	39.50	39.20
Bartle et al., 2018	B	1	1	30	41.30	39.30
Bernabucci et al., 2002	B	1	2	20	39.50	39.10
Bewley et al., 2008	A	1	2	280	38.90	38.63
Boyd et al., 2015	A	1	1	480	40.26	38.98
Burfeind et al., 2012	A	1	2	32	40.30	38.30
Cardoso et al., 2016	D	1	1	15	39.29	38.82
Cardoso et al., 2016	D	1	1	15	38.96	38.30
Cardoso et al., 2016	D	2	1	15	39.48	39.37
Carrol et al., 2013	B	1	1	10	38.68	38.60
Carrol et al., 2013	B	1	1	11	38.97	38.91
Charoensook et al., 2012	D	1	1	16	39.02	37.95
Charoensook et al., 2012	D	2	1	17	39.32	37.99
Charoensook et al., 2012	B	1	2	14	39.07	38.20
Costa et al., 2014	D	1	2	80	39.50	38.90
Cowley et al., 2015	C	1	2	24	39.90	38.90
Dado-Senn et al., 2020	C	1	2	60	39.10	38.70
Deb and Sengar, 2020	D	1	2	10	39.54	38.18
Deb and Sengar, 2020	D	2	2	10	39.78	38.31
Deb et al., 2014	D	1	2	20	39.11	38.12
Deb et al., 2014	D	2	2	20	38.90	38.05
Dias et al., 2018	C	1	2	32	39.13	38.46
Diaz et al., 2018	C	1	1	12	38.62	38.47
Eslamizad et al., 2020	A	2	2	10	40.20	38.40
Hill et al., 2016	A	1	2	56	39.80	38.10
Hooper et al., 2019	C	2	1	16	38.32	37.28
Isola et al., 2020	C	1	2	30	39.10	38.60
Jeelani et al., 2019	C	1	2	33	41.20	38.90
Kang et al., 2017	B	1	1	20	38.51	38.34
Kaufman et al., 2017	B	1	2	48	39.70	38.80
Kaufman et al., 2018	B	1	2	20	39.70	38.90
Khongdee et al., 2006	D	1	2	14	41.21	39.09
Khongdee et al., 2010	D	1	2	16	39.86	38.56
Khongdee et al., 2016	D	2	1	10	40.68	38.80
Kim et al., 2020	B	1	1	16	38.88	37.43
Kovacs et al., 2020	A	1	2	16	40.00	39.20
Kumar et al., 2015	C	2	2	100	38.40	37.92
Li et al., 2020	B	1	2	72	39.30	38.45
Lima et al., 2020	C	1	1	40	39.26	38.70
Lima et al., 2020	C	2	1	37	39.16	38.45
Marins et al., 2020	C	1	2	20	39.55	38.32
Martello et al., 2010	C	1	2	37	38.60	37.80
Martello et al., 2016	C	2	1	36	39.80	35.50
Martins et al., 2021	C	2	2	20	38.50	37.70
Mateescu et al., 2020	C	1	1	54	39.49	38.66
Mateescu et al., 2020	C	2	1	33	39.04	38.57
Mateescu et al., 2020	C	2	1	53	38.99	38.60
McManus et al., 2009	C	1	1	19	38.75	38.31
McManus et al., 2009	C	2	1	10	38.63	38.31
Mitlohner et al., 2001	B	1	1	48	39.80	39.60
Olson et al., 2003	C	1	1	10	40.20	39.15
Olson et al., 2003	C	1	2	93	39.31	38.44
Ortiz et al., 2010	D	1	2	48	39.89	38.95
Pacheco et al., 2020	C	1	2	35	40.50	39.30
Palacio et al., 2015	A	1	2	24	39.10	38.60
Pate et al., 2019	A	1	2	32	38.70	38.40
Ribeiro et al., 2009	C	2	1	15	40.20	39.80
Ribeiro et al., 2009	C	2	1	15	39.80	39.50
Ribeiro et al., 2009	C	2	1	15	40.00	39.50
Rivas et al., 2020	B	1	2	52	39.64	39.55
Sakatani et al., 2016	B	1	1	10	38.73	38.47
Salles et al., 2016	C	1	2	24	38.50	37.10
Sarlo Davila et al., 2019	C	1	1	54	39.34	38.79
Sarlo Davila et al., 2019	C	2	1	89	38.85	38.58
Scanavez et al., 2018	B	1	2	104	39.07	38.72
Scharf et al., 2012	B	1	1	23	39.60	38.50
Sengar et al., 2018	D	2	2	10	39.03	38.07
Shehab-El-Deen et al., 2010	C	1	2	10	40.10	39.60
Silveira et al., 2021	C	2	1	53	40.30	37.90
Sousa et al., 2016	C	2	1	18	39.50	39.10
Spiers et al., 2004	B	1	2	12	40.45	38.90
Spiers et al., 2018	B	1	2	12	39.33	38.43
Teixeira et al., 2019	C	1	2	70	39.00	38.90
Vicentini et al., 2020	C	2	2	57	38.80	38.60
Vizzotto et al., 2015	B	1	2	14	39.90	39.50
Weng et al., 2018	B	1	2	72	39.94	39.03
Willard et al., 2003	B	1	2	37	39.20	38.80
Yadav et al., 2015	D	1	2	20	39.17	38.12
Yazdy et al., 2015	A	1	2	14	40.56	38.57

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Alterações na temperatura ambiental e umidade relativa provocam mudanças nos mecanismos fisiológicos dos animais, afetando o conforto animal e consequentemente o bem-estar de bovinos Nelore e Caracu. Os animais Caracu, apesar de serem taurinos, demonstraram tolerância as condições ambientais da região tropical. Entretanto os animais Nelore apresentaram maior adaptabilidade, os quais são de origem zebuína e, portanto, apresentam resistência ao calor.

Ao se avaliar as respostas moleculares e celulares através da expressão relativa dos genes *HSPD1*, *HSPA1A* e *HSP90AA1* é observada uma variação significativa nas raças Nelore e Caracu, demonstrando que a tolerância ao calor depende de diferentes características associadas ao animal e ao ambiente. Genes associados ao consumo alimentar podem ser afetados pelo estresse térmico ao qual o animal está exposto, porém é preciso considerar a seleção natural que o animal está submetido ao longo de sua existência. Os efeitos do estresse térmico baseados na avaliação da eficiência alimentar em conjunto com a expressão dos genes *NPY* e *LEP* sugeriram que o crescimento animal é mais influenciado pelo ambiente do que pela raça neste estudo.

A temperatura ambiental elevada para uma determinada raça pode não ser elevada para outra, não afetando o crescimento e desenvolvimento animal. Este fato pode ser observado neste estudo, que em contradição a hipótese inicial, animais tolerantes ao calor nem sempre apresentam alta eficiência alimentar. A seleção do animal para eficiência alimentar, acarreta a seleção indireta de outras características, podendo ocasionar uma maior susceptibilidade deste aos fatores ambientais adversos. Por meio da meta-análise constatou-se que a variabilidade fenotípica e genética dos animais frente ao estresse térmico é alta.

Em síntese, a avaliação do estresse térmico em bovinos requer cautela e rigor, são muitos os fatores que interferem no modo de ação de cada animal em cada raça, a adaptabilidade está intrinsicamente associada ao histórico evolutivo do animal. Ambas as raças Nelore e Caracu apresentaram eficiência alimentar e adaptabilidade semelhantes às condições de clima tropical.