



RENATA DE FÁTIMA BRETANHA ROCHA

**EXPRESSION OF GENES RELATED TO HEAT
STRESS IN TAURINE CATTLE WITH
DIFFERENT LEVELS OF ADAPTABILITY**

**LAVRAS-MG
2019**

RENATA DE FÁTIMA BRETANHA ROCHA

**EXPRESSION OF GENES RELATED TO HEAT STRESS IN TAURINE CATTLE WITH
DIFFERENT LEVELS OF ADAPTABILITY**

Dissertação apresentada a
Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia, para a obtenção do
título de Mestre.

Prof. Dr. Rilke Tadeu Fonseca de Freitas
Orientador

Prof^a. Dra. Sarah Laguna Conceição Meirelles
Coorientadora

**LAVRAS – MG
2019**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Rocha, Renata de Fátima Bretanha.

Expression of genes related to heat stress in taurine cattle with different levels of adaptability / Renata de Fátima Bretanha Rocha. - 2019.

56 p.

Orientador(a): Rilke Tadeu Fonseca de Freitas.

Coorientador(a): Sarah Laguna Conceição Meirelles.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Angus. 2. HSF1. 3. HSPA6. 4. Simental. I. Freitas, Rilke Tadeu Fonseca de. II. Meirelles, Sarah Laguna Conceição. III. Título.

RENATA DE FÁTIMA BRETANHA ROCHA

**EXPRESSION OF GENES RELATED TO HEAT STRESS IN TAURINE CATTLE WITH
DIFFERENT LEVELS OF ADAPTABILITY**

Dissertação apresentada a
Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia, para a obtenção do
título de Mestre.

APROVADA em 15 de março de 2019.

Dr. Welison Andrade Pereira UFLA
Dra. Adriana Mércia Guaratini Ibelli EMBRAPA

Prof. Dr. Rilke Tadeu Fonseca de Freitas
Orientador

Prof^ª. Dra. Sarah Laguna Conceição Meirelles
Coorientadora

**LAVRAS – MG
2019**

Aos meus pais Maria Terezinha e José Airton pelo amor, por acreditar e confiar em mim.

Às minhas irmãs Karen e Sarita e, aos meus sobrinhos, Maria Júlia e Matheus, pelo apoio e incentivo.

Aos melhores amigos, Daniel, Frederico, Matheus e Mirelli pela amizade preservada e por terem sido fonte de bom humor e distração a cada encontro.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva da vida e por ter me concedido essa vitória.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia (DZO) pela oportunidade para realização do mestrado.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por meio da concessão de bolsa de estudo e da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) por meio de auxílio financeiro para realização do projeto.

Aos professores Rilke Tadeu Fonseca de Freitas e Sarah Laguna Conceição Meirelles por permitirem a orientação para realização deste trabalho.

À Dra. Adriana Ibelli da Embrapa - SC pelo auxílio apesar da distância.

À pós-doutoranda Tathiane Gionbelli do Departamento de Zootecnia da UFLA pela transmissão do conhecimento, dedicação e profissionalismo que possibilitaram a conclusão do trabalho.

Ao Grupo Casa Branca Agropastoril, por contribuir com a realização deste trabalho.

Ao Grupo de Melhoramento Animal e Biotecnologia (GMAB) pelos conhecimentos adquiridos.

À minha mãe, Terezinha, às minhas irmãs, Karen e Sarita e aos meus sobrinhos Maria Júlia e Matheus pela paciência apesar da distância, por acreditarem em mim e por sempre me incentivarem.

Aos melhores amigos, Daniel, Frederico, Matheus e Mirelli pela amizade preservada e por terem sido fonte de bom humor e distração a cada encontro.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, muito obrigada!

RESUMO

A identificação de genes relacionados à tolerância ao calor em bovinos pode permitir a seleção vantajosa de animais evitando a queda de produtividade causada por estresse térmico. O objetivo com este trabalho foi identificar se bovinos Angus e Simental e, se animais mais e menos adaptados dentro destas raças, diferiam em frequência respiratória, temperatura do pelame e retal e na expressão dos genes HSF1 e HSPA6, quando submetidos a estresse térmico por calor. Para isso, 100 animais foram classificados por nível de adaptação, de acordo com um índice baseado na média da frequência respiratória obtida em dois dias quentes de verão. Destes, 30 touros (n = 15 Angus e n = 15 Simental), extremos “mais adaptados” e “menos adaptados” de cada raça foram selecionados para o teste de tolerância ao calor. No dia anterior ao dia do teste de tolerância ao calor, os animais foram levados para um piquete adjacente com acesso à água, pasto e sombra até as 7:00 horas do dia seguinte para as medidas da manhã (M). Os animais foram mantidos no curral sem acesso à água e sombra até às 13:00 horas, quando foram realizadas as medidas da tarde (T). Nestes períodos, foram medidas a frequência respiratória da manhã (FRM) e da tarde (FRT), temperatura do pelame da manhã (TPM) e da tarde (TPT) e temperatura retal da manhã (TRM) e da tarde (TRT) e foram coletadas amostras de sangue para análise da expressão dos genes HSF1 e HSPA6. O procedimento MIXED do SAS (SAS Inst., Inc., Cary, NC) foi utilizado em para todas as análises estatísticas. Houve interação de raça e período de adaptação para FRM (P = 0,023) e TRM (P = 0,095). Para a raça Simental, os animais menos adaptados tiveram maiores valores de FRM; entretanto, dentro da raça Angus não houve diferença entre os animais mais e menos adaptados. Os animais mais adaptados da raça Simental tiveram menores valores de FRM e TRM. A FRT foi maior (P = 0,004) nos animais menos adaptados do que nos mais adaptados. A TRT foi menor na raça Simental (P<0,001). Os animais menos adaptados tiveram maior quantidade de mRNA de HSF1 (P = 0,06) e HSPA6 (P = 0,09) do que os mais adaptados. Portanto, a frequência respiratória, a temperatura retal e a expressão dos genes HSF1 e HSPA6 podem ser indicadores de animais menos adaptados. A raça Simental é mais resistente do que a raça Angus em condição de conforto térmico, mas ambas tem comportamento semelhante sob estresse térmico.

Palavras-chave: Angus. HSF1. HSPA6. Simental.

ABSTRACT

Identification of genes related to heat tolerance in bovine may allow advantageous selection of animals avoiding productivity decrease caused by heat stress. The aim of this study was to identify whether Angus and Simmental cattle and, if more and least adapted animals within these breeds, differed in respiratory rate, coat surface and rectal temperature, and expression of the HSF1 and HSPA6 genes when subjected to heat stress. One hundred animals were classified by level of adaptation, according to an index based on the average of the respiratory rate obtained on two hot summer days. Of these, 30 bulls (n = 15 Angus and n = 15 Simmental), extreme "most adapted" and "least adapted" of each breed were selected to the heat tolerance test. In the day before the heat tolerance test day, animals were taken to a paddock with water, grass and shade until 7 a.m. of the following day for morning (M) measurements. The animals were then kept in the barn without access to water and shade until 1 p.m., when the afternoon (A) measurements were performed. Respiratory rate in the morning (MRR) and afternoon (ARR), surface temperature in the morning (MST) and afternoon (AST), rectal temperature in the morning (MRT) and afternoon (ART) were measured and blood samples were collected for expression analysis of the HSF1 and HSPA6 genes. The MIXED procedure of SAS (SAS Inst., Inc., Cary, NC) was used for all statistical analysis. There was interaction of breed and level of adaptation for MRR (P = 0.023) and MRT (P = 0.095). For Simmental, the least adapted animals had greater values of MRR; however, within the Angus breed there was no difference between high and least adapted. The high adapted Simmental group had lesser values of MRR and MRT. The ARR was greater (P = 0.004) in least adapted than in high adapted animals. The ART was lesser in the Simmental breed (P < 0.001). Least adapted had greater levels of mRNA of HSF1 (P = 0.06) and HSPA6 (P = 0.09) than high adapted animals. In conclusion, respiratory rate and rectal temperature and expression of the HSF1 and HSPA6 genes can be indicators of least adapted animals. The Simmental breed is more resistant than the Angus breed in a thermal comfort condition, but both have similar behavior under heat stress.

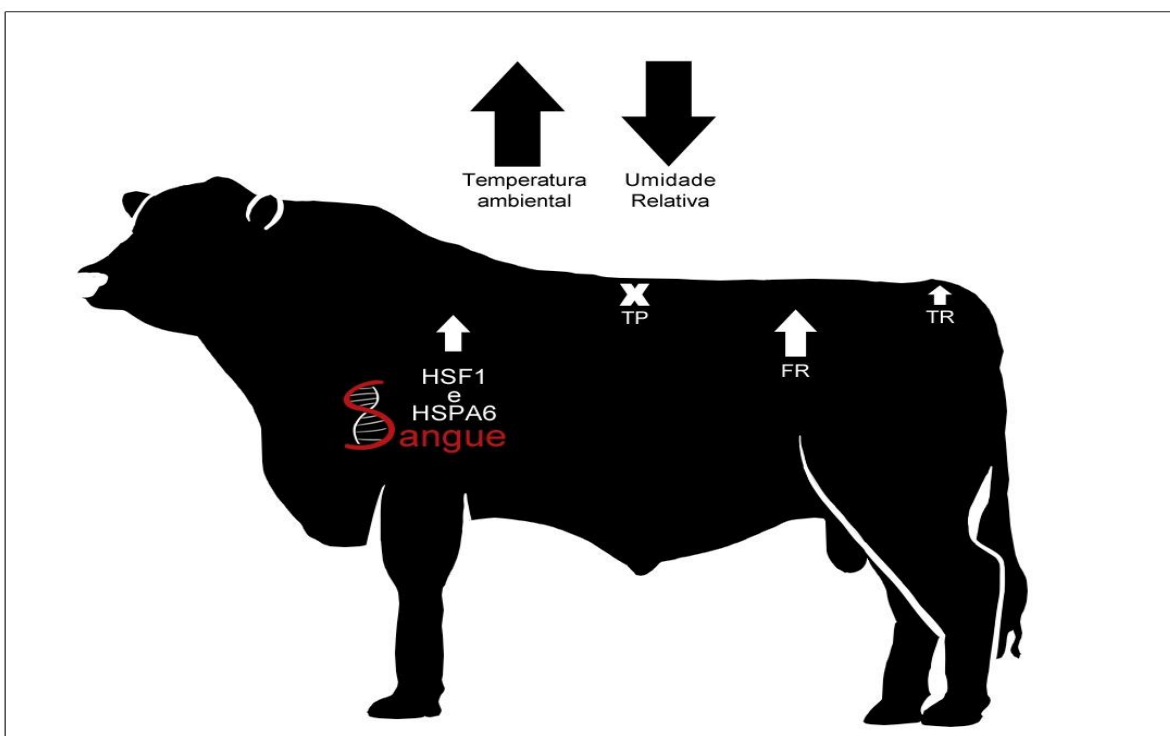
Keywords: Angus. HSF1. HSPA6. Simmental

Resumo Interpretativo e Resumo Gráfico

Características fisiológicas e expressão dos genes *HSF1* e *HSPA6* em bovinos taurinos submetidos a estresse térmico

Elaborado por **Renata de Fátima Bretanha Rocha** e orientada por **Rilke Tadeu Fonseca de Freitas**

As raças bovinas Angus e Simental têm origem em países da Europa e produzem carne macia e saborosa, por isso foram trazidas para o Brasil, com o objetivo de melhorar a qualidade da carne no país. O clima tropical do país gerou dificuldades aos animais de lidar com o calor. A capacidade de tolerar o calor, ou termotolerância, é controlada pela genética (genes). Neste trabalho foram avaliadas a frequência respiratória e as temperaturas retal e do pelame e as expressões dos genes *HSF1* e *HSPA6*, relacionados à termotolerância. A raça Simental apresentou menores valores de frequência respiratória e temperatura retal, indicando maior termotolerância do que a raça Angus. A expressão dos genes *HSF1* e *HSPA6* foi maior nos animais menos adaptados de ambas as raças. Estes genes e as características frequência respiratória e temperatura retal podem indicar animais geneticamente mais adaptados às condições climáticas subtropicais.



As características TP = temperatura do pelame, FR = frequência respiratória e TR = temperatura retal estão representadas nas regiões em que foram medidas. O X indica nenhuma alteração e as setas brancas e seus tamanhos indicam, respectivamente, aumento e intensidade do aumento nas características no animal sob estresse térmico. Os genes fator 1 de choque térmico (*HSF1*) e o gene que codifica a proteína de choque térmico 70 membro 6 (*HSPA6*).

LISTA DE TABELAS

Table 1. Description of the primers for the HSF1, HSPA6 and RLP19 genes in cattle.	41
---	----

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE – REFENCIAL TEÓRICO

Figura 1 – Animal da raça Simental.....	18
Figura 2 - Animal da raça Aberdeen Angus.....	20
Figura 3 - Equação de expressão gênica.....	27

SEGUNDA PARTE - ARTIGO

Figure 1. Average air temperature (AT, °C) and RH (%) for each day of the study.....	43
Figure 2. Mean RR (bpm) on the day of the heat tolerance test.....	44
Figure 3. Mean CT (°C) on the day of the heat tolerance test.....	45
Figure 4. Mean rectal temperature (°C) on the day of the heat tolerance test.....	46
Figure 5. Relative mRNA expression of the HSF1 gene on the day of the heat tolerance test.....	47
Figure 6. Relative mRNA expression of the HSPA6 gene on the day of the heat tolerance test..	48

LISTA DE ABREVIATURAS

PRIMEIRA PARTE – REFERENCIAL TEÓRICO

Mov	Movimentos
Min	Minutos
Gly	Glicina
Pro	Prolina
Glu	Glutamato (Ácido glutâmico)
Val	Valina
Asp	Aspartato (Ácido aspártico)
Ct	Do inglês <i>Threshold Cycle</i>

SEGUNDA PARTE - ARTIGO

Bpm	Do inglês <i>breaths per minute</i>
Bp	Do inglês <i>base pair</i>

LISTA DE SIGLAS

PRIMEIRA PARTE – REFERENCIAL TEÓRICO

HSP	Do inglês <i>Heat Shock Proteins</i>
ASBIA	Associação Brasileira de Inseminação Artificial
UV	Ultravioleta
mRNA	Ácido Ribonucléico Mensageiro
HSF	Do inglês <i>Heat Shock Factor</i>
HSE	Do inglês <i>Heat Shock Element</i>
RNA	Ácido Ribonucléico
DNA	Ácido Nucléico Desoxirribose
RT-qPCR	Do inglês <i>Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
cDNA	Ácido Nucléico Desoxirribose complementar
RNA-seq	Sequenciamento de Ácido Ribonucléico

SEGUNDA PARTE - ARTIGO

MG	Minas Gerais
AT	Do inglês <i>Air Temperature</i>
RH	Do inglês <i>Relative Humidity</i>
THI	Do Inglês <i>Temperature Humidity Index</i>
RR	Do inglês <i>Respiratory Rate</i>
N(n)	Número de Animais
ANG	Angus
SIM	Simental
M	Morning
A	Afternoon
MRR	Do inglês <i>Morning Respiratory rate</i>
ARR	Do inglês <i>Afternoon Respiratory Rate</i>
MST	Do inglês <i>Morning Surface Temperature</i>
AST	Do inglês <i>Afternoon Surface Temperature</i>
MRT	Do inglês <i>Morning Rectal Temperature</i>
ART	Do inglês <i>Afternoon Rectal Temperature</i>
NCBI	Do inglês <i>National Center for Biotechnology Information</i>
F	Do inglês <i>Forward</i>
R	Do inglês <i>Reverse</i>
SAS	Do inglês <i>Statistical Analysis System</i>
MIXED	Do inglês <i>Linear Mixed Models</i>
SE	Do inglês <i>Standard Error</i>
P	Probabilidade

LISTA DE SÍMBOLOS

PRIMEIRA PARTE – REFERENCIAL TEÓRICO

°C	Graus Celsius
Δ	Letra grega ‘Delta’

SEGUNDA PARTE – ARTIGO

h	Hora
mL	Militros
λ	Letra grega ‘Lambda’
ng	Nanograma
μL	Microlitro

SUMÁRIO

Resumo Interpretativo e Resumo Gráfico	8
PRIMEIRA PARTE	15
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 Raças taurinas.....	16
2.1.1 A raça Simental	17
2.1.2 A raça Aberdeen Angus	18
2.2 Adaptabilidade em bovinos	20
2.3 Proteínas de choque térmico (HSPs).....	22
2.3.1 HSF1 e HSPA6	24
2.4 Expressão Gênica.....	25
2.5 Análise quantitativa em tempo real	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
SEGUNDA PARTE – ARTIGO	35
ARTICLE - <i>Physiological responses and expression of HSF1 and HSPA6 genes in Angus and Simmental cattle</i>	35

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Tendo em vista a preocupação do suprimento de produtos de origem animal de qualidade para a população humana, despertou nos produtores, o interesse em aumentar a produtividade animal. Isto ocorre através da seleção de raças bovinas mais produtivas com o objetivo de aumentar a produtividade. O agravante é que os animais desejados para esse fim pertencem, em geral, à subespécie *Bos taurus taurus*, que têm sua origem em países de clima temperado e temperaturas mais baixas, condições diferentes daquelas encontradas no território brasileiro. Quando estes animais são criados em regiões com condições ambientais de temperaturas mais elevadas, eles precisam gastar mais energia dissipando calor do corpo, o que limita a energia suficiente para expressarem o seu máximo desempenho produtivo. Os taurinos (*Bos taurus taurus*) apresentam menor resistência ao clima tropical em relação aos zebuínos (*Bos taurus indicus*), porém, suas características de desempenho e fertilidade, qualidade da carne e carcaça, e habilidade materna são superiores em comparação aos zebuínos.

Dentre as raças bovinas destinadas para a produção de carne, destacam-se as raças Simental e Aberdeen Angus. No Brasil, essas raças são mais utilizadas visando cruzamentos, principalmente com animais da espécie zebuína, proporcionando adaptabilidade, vigor e habilidade materna. Com isso, a adaptabilidade de animais taurinos ao clima tropical tem sido alvo dos produtores no Brasil, sendo propostos vários métodos para avaliar esses animais quanto à sua capacidade de se manter em conforto térmico nessas regiões. O grupo Casa Branca Agropastoril Ltda., de onde os animais deste trabalho são provenientes, realiza seleção buscando animais das raças Simental e Angus mais adaptados ao clima tropical brasileiro.

Uma das formas de identificar animais mais adaptados a regiões de climas quentes é mensurar características relacionadas à termorregulação, ou manutenção da temperatura interna do organismo. Dentre as diversas características que podem ser estudadas, as mais encontradas nas pesquisas são a frequência respiratória e a temperatura retal e, também, pode ser avaliada a temperatura do pelame por sua fácil obtenção.

A termorregulação também pode ser verificada a nível molecular, ou seja, genes são expressos em resposta a condições de estresse, como o estresse térmico por calor.

As proteínas de choque térmico (*HSP*), como o próprio nome diz, estão relacionadas às respostas celulares a diversas condições de estresse. As proteínas da família *HSP70* são as que apresentam maiores níveis sob condições estressantes.

A análise de expressão de genes referentes a estas proteínas pode ajudar a entender o mecanismo de combate ao estresse térmico entre os animais, submetidos a condições de estresse ou não. Também pode ser uma ferramenta auxiliar na seleção de animais mais adaptados às condições ambientais e de manejo do país, aliando produtividade, adaptação e qualidade de carne.

A primeira hipótese é que as respostas fisiológicas das características frequência respiratória, temperatura do pelame e temperatura retal serão maiores nos animais classificados como menos adaptados de ambas as raças e estas respostas serão maiores na raça Angus do que na raça Simental na condição de conforto térmico, porém estas serão semelhantes na condição de estresse. A segunda hipótese é que a expressão dos genes *HSF1* e *HSPA6* será maior nos animais menos adaptados e na condição de estresse térmico, não havendo diferença entre as raças. O objetivo com este trabalho foi identificar se bovinos Angus e Simental e, se animais mais e menos adaptados dentro destas raças, diferiam em frequência respiratória, temperatura do pelame e retal e na expressão dos genes *HSF1* e *HSPA6*, quando submetidos a estresse térmico por calor.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Raças taurinas

Os primeiros taurinos, gado conhecido como *Bos taurus taurus*, de origem em países da Europa como Portugal e Espanha, foram introduzidos no Brasil a partir do início do século XVI até o final do século XVIII. De 1850 a 1910, raças britânicas foram importadas, seguidas por outras raças continentais, e depois por bovinos zebu (*Bos taurus indicus*) da Índia. Várias importações de gado zebu da Índia ocorreram nos séculos XIX e XX (DANI et al., 2008).

Os animais taurinos destacam-se por apresentar várias características desejáveis, que são indispensáveis para uma maior produtividade na pecuária de corte. Entre elas estão, a habilidade materna, a produção e qualidade da carcaça, destacando também a precocidade sexual e de terminação. Porém, em relação à tolerância ao calor e infestação de endo e ectoparasitas, são mais susceptíveis comparados aos zebuínos

quando produzidos no Brasil. O gado taurino tem pelagem mais espessa, podendo formar um “pelame de inverno” em várias raças, e algumas delas são suscetíveis a queimaduras solares (CHAN et al., 2010).

A raça Aberdeen Angus, de origem britânica e a raça Simental, de origem continental, se assemelham mais entre si do que quando comparadas às raças zebuínas (BORMANN et al., 2010). Como forma de melhorar diversas características, o cruzamento há muito tem sido amplamente usado para explorar a heterose e a variação genética aditiva entre as raças para melhorar a eficiência da produção de carne bovina (CROUSE et al., 1993).

2.1.1 A raça Simental

Dentre as raças taurinas, a raça Simental, destinada à produção de carne com porte mediano, foi trazida para o Brasil em 1911, ocorrendo em seguida várias importações para o Rio de Janeiro e Minas Gerais. Os animais desta raça receberam o registro genealógico a partir de 1960, e logo após foi criada a Associação dos Criadores. Desde então, vem crescendo a produção desta raça no Brasil (EGITO, 2007).

Nas últimas décadas, em países não europeus e em alguns países europeus, a raça Simental foi criada principalmente para uma produção especializada de carne, reproduzindo-se em raça pura ou cruzando-se com outras raças. Mesmo em alguns países da Europa, ainda existe uma tendência a reduzir o número de vacas leiteiras da raça Simental, devido à existência de outras raças especializadas na produção de leite, o que resulta num aumento de gado destinado à produção de carne (PERIŠIĆ et al., 2009).

Nas criações destinadas para leite, características como longevidade, fertilidade e resistência a mastite tem grande importância nos objetivos de seleção e programas de melhoramento para populações da raça Simental que tem alta produção média de leite na lactação (PERIŠIĆ et al., 2009). Entretanto, em raças destinadas ao corte, os objetivos de seleção são focados em características de desempenho e carcaça. Na raça Simental, características de carcaça podem ser moderadamente a altamente hereditárias (CREWS et al., 2003).

No Simental a cor da pelagem é amarelada ou vermelha, com algumas manchas brancas com distribuição característica. A cabeça desses animais é de tamanho médio e de cor branca podendo apresentar manchas amarelas ou vermelhas, sendo a extremidades dos membros, a cauda e a parte inferior do corpo igualmente branca. Em

relação aos pelos, são finos, curtos e unidos, sendo maiores e ondulados na cabeça e pescoço. O pescoço é forte e musculoso, com barbela moderada. Possuem corpo grande, robusto e pesado (FIGURA 1) (EGITO, 2007).

Figura 1 – Animal da raça Simental



Fonte: Casa Branca Agropastoril

2.1.2 A raça Aberdeen Angus

Outra raça muito utilizada no Brasil é a raça Aberdeen Angus, trazida para o sul do país após 1906. De origem britânica, apresenta precocidade de crescimento, reprodutiva e de terminação (PICCOLI et al., 2013). Os animais da raça Angus são de tamanho médio, precoces, destacam-se na fertilidade e na facilidade de parto e oferecem carcaças de qualidade (FIGURA 2). Desenvolveu-se no norte da Escócia e os animais foram selecionados a fim de melhorar a qualidade da raça, independente da pelagem, que pode variar entre preta (Aberdeen Angus) e vermelha (Red Angus). O gado Angus tem fortes características maternas, como facilidade na ordenha, alta fertilidade, parto fácil e uma natureza dócil. Além disso, o crescimento adequado e a capacidade de criação combinada com o alto marmoreio da carne resultam na geração de produtos com carne de alta qualidade. Além disso, o gado Angus é uma escolha popular nos programas de cruzamento (MCGUIRE, 2013).

Segundo a Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA, 2018), a raça Aberdeen Angus segue como líder da venda de sêmen do Brasil. Esses dados contribuem para a escolha da raça Angus pelo produtor, visando maior produtividade (WEBER et al., 2009). A popularidade da raça Angus se deve a sua capacidade de oferecer características desejáveis para o sistema produtivo, tanto maternas como de acabamento, portanto tem sido alvo de várias pesquisas. Nunez-Dominquez et al. (1985) comprovaram que a longevidade é uma das características maternas da raça Angus. Além disso, de acordo com este mesmo autor, uma parte da variação na longevidade entre raças está associada com resistência genética a doenças.

O Angus é considerado como tendo uma maior proporção de fibras musculares oxidativas (CASSAR-MALEK; PICARD, 2016) e o tipo de fibra muscular tem sido associado à qualidade da carne (LEFAUCHEUR, 2010). Rodrigues et al. (2017) ao estudar diferenças na carcaça de Angus (*Bos tarus taurus*) e Nelore (*Bos taurus indicus*) a nível proteômico, encontraram maior abundância de proteínas associadas com a maciez da carne na raça Angus e sugeriram que as diferenças entre maciez da carne entre Nelore e Angus pode ser parcialmente explicada por diferenças na apoptose. Além disso, as características de maciez da carne podem estar associadas à produção de *HSPs* (proteínas de choque térmico), as quais têm papel fundamental na proteção das células contra danos, especialmente aqueles relacionados ao estresse térmico (ZHAO et al., 2012).

Sabe-se que a raça Angus é mais susceptível ao estresse térmico, pois não é adaptada a regiões com elevadas temperaturas. Quando submetidos a estresse térmico, a temperatura retal, frequência respiratória e taxa de sudorese aumentam e os valores destas características são significativamente maiores quando comparadas com outras raças (HAMMOND et al., 1996; SCHARF et al., 2010).

Figura 2 - Animal da raça Aberdeen Angus



Fonte: Casa Branca Agropastoril

2.2 Adaptabilidade em bovinos

A adaptabilidade está relacionada com a habilidade do animal em ajustar-se às condições adversas do ambiente como, mudanças estruturais, funcionais ou comportamentais buscando a sobrevivência, reprodução e produção (TURNER, 1980).

Os bovinos são animais homeotérmicos, ou seja, conservam a temperatura corporal constante com as variações do ambiente. Isso só ocorre com o equilíbrio entre a produção e as perdas de calor, sendo possível por alterações fisiológicas, metabólicas e comportamentais, sustentando a homeostase e minimizando o efeito da hipo ou hipertermia. Em consequência disto, as funções menos vitais do organismo, como produção e reprodução, bem como o bem-estar podem ser afetadas quando os estressores ambientais extrapolam a capacidade compensatória dos animais (BERTIPAGLIA et al., 2007).

Buscando o conforto térmico, os animais adotam certos comportamentos como ingerir mais água, procurar sombra, diminuir o consumo de alimento, aumentar a frequência respiratória, produção excessiva de saliva e aumentar a sudorese (SOUZA JUNIOR, 2009).

Os *Bos indicus* são mais resistentes ao clima tropical, principalmente em relação ao calor, e à endo e ectoparasitas comparados aos bovinos *Bos taurus* (TURNER, 1980). Esta resistência se deve à menor produção de calor metabólico juntamente com a melhor capacidade de termólise. Essas características combinadas facilitam a termorregulação, reduzindo o estresse térmico nos animais *Bos indicus* (HANSEN, 2004).

O estresse térmico resulta na alteração da secreção de vários hormônios essenciais para o metabolismo animal, diminuindo a secreção do hormônio de crescimento, com conseqüente queda na produtividade (MORAIS et al., 2008). Segundo Souza Junior (2009), com o aumento da umidade relativa do ar as perdas de calor por evaporação são prejudicadas, ocasionando em maior estresse térmico.

Avaliando a transmissão da radiação ultravioleta através do pelame e epiderme em bovinos, em ambiente com altos níveis de radiação ultravioleta (UV), Silva et al. (2001) descobriram que a combinação de um pelame de cor branca, sobre a epiderme de cor negra é o ideal. Na impossibilidade desta combinação, o desejável seria um pelame de cor negra em relação à penetração da radiação UV, porém este pelame gera grande absorvidade da radiação térmica, resultando em maior temperatura da superfície cutânea comparada com pelame branco.

A zona termoneutra é a faixa de temperatura onde ocorre o gasto mínimo de energia para manutenção pelos animais, pois eles se encontram em conforto térmico. Quando a temperatura está acima desse limite superior, o animal começa a sofrer estresse pelo calor, denominado hipertermia, quando o gasto de energia para manter a homeostase é alto (BACCARI JUNIOR, 1998). As raças taurinas saem de sua zona de conforto térmico em ambientes com temperatura do ar acima de 25°C (HAHN et al., 1992).

Em temperatura ambiente amena, as formas de dissipar calor como evaporação, através da pele, condução ou convecção, são suficientes para manter a homeostase do animal. Caso ele não consiga dissipar o calor excessivo a temperatura corporal aumenta, agravando o estresse térmico por calor, e isso reflete na queda da produtividade. Mecanismos como temperatura retal, frequência respiratória e o nível de sudação promovem a termorregulação dos animais (NÓBREGA et al., 2011).

Segundo Martello (2002), o primeiro sinal visível em um animal submetido ao estresse térmico é o aumento ou diminuição da frequência respiratória. Esse aumento ou diminuição depende da intensidade e da duração do estresse em que os animais são

expostos. Os valores de frequência respiratória de 40 a 60, 60 a 80 e 80 a 120 mov/min demonstram baixo, médio e alto estresse para ruminantes, respectivamente, sendo que acima de 200 mov/min é considerado como estresse severo (SILANIKOVE, 2000).

A radiação solar afeta diretamente a superfície da pele do animal e influencia as trocas térmicas através da pele. Ela afeta a temperatura do pelame, aumentando os valores e alterando os gradientes térmicos, entre a superfície e o meio ambiente, inibindo a dissipação de calor e afetando o processo termorregulatório (MEDEIROS et al., 2001). O gradiente de temperatura entre a pele e o ar é importante na perda de calor através da pele. A temperatura superficial apresenta alta correlação com a frequência respiratória, e é uma medida que representa o microambiente ao redor do animal (COLLIER et al., 2006).

Além do número de movimentos respiratórios, a temperatura do corpo é outra importante medida para avaliar a tolerância dos animais às condições adversas do clima, pois aumentos na temperatura do ar ocasionam aumentos da temperatura retal e frequência respiratória dos bovinos. Com o aumento da temperatura do ar, o animal se esforça mais para perder calor, para que não ocorra o aumento da temperatura do seu corpo (FURTADO et al., 2012). Existe uma relação entre a resposta ao estresse e a temperatura retal (HAMMOND et al., 1996), sendo a temperatura retal um bom indicador de tolerância ao calor (SCHARF et al., 2010).

2.3 Proteínas de choque térmico (*HSPs*)

A exposição das células a um aumento na temperatura resulta na elevação da síntese de um grupo específico de proteínas, as quais são denominadas proteínas de choque térmico (*HSPs* - “heat shock proteins”) (CRAIG; SCHLESINGER, 1985; KIANG; TSOKOS, 1998). As proteínas de choque estão presentes no citosol, mitocôndria, retículo endoplasmático e núcleo, e em geral possuem uma meia-vida de 48h em células epidermóides humanas (KIANG; TSOKOS, 1998). Essas proteínas possuem a capacidade de agir como chaperonas moleculares, evitando a agregação inadequada de proteínas e auxiliando o transporte de proteínas imaturas às organelas-alvo para empacotamento final, degradação ou reparo. As *HSPs* preservam a viabilidade das células através da proteção contra danos e isso é possível por permitir rápido reestabelecimento das atividades normais (TIRELLI et al., 2005). Com isso as células apresentam a capacidade de se adaptar às mudanças nas condições do ambiente *in vivo* e

in vitro (EDWARDS et al., 2001).

As proteínas de choque são classificadas em cinco famílias, de acordo com seu peso molecular (*Hsp100*, *Hsp90*, *Hsp70*, *Hsp60*, e grupo das pequenas *HSPs*). Estes grupos de proteínas são induzíveis, algumas das quais são constitutivamente expressas e aumentam em resposta ao estresse, enquanto que outras são expressas somente após o estresse (SINGH et al., 2014) e estão envolvidas na estabilização de células expostas a altas temperaturas, ligando-se a outras proteínas e mediando a agregação, o transporte e a interação destas com demais moléculas (JONAK et al., 2006). Segundo Solomon et al. (1991), células com ausências ou baixo nível dessas proteínas irão tolerar menores níveis de estresse do que outras com níveis normais.

As proteínas de choque térmico 70 (*HSP70*) são mais abundantes e pertencem à família que é a melhor caracterizada das proteínas de choque térmico, pois consiste de proteínas de estresse altamente conservadas, expressas em resposta ao estresse, e tem papel fundamental na tolerância ao estresse ambiental e adaptação (BANERJEE et al., 2014). As proteínas produzidas pelos genes das *HSPs70* possuem alta homologia entre si. Os segmentos conservados nessas proteínas provavelmente representam regiões funcionalmente importantes. Uma delas está na sua porção final, seguida por um segmento rico em *Gly-Pro*, próximo a uma sequência *Glu-Glu-Val-Asp*. Esses quatro aminoácidos terminais estão presentes em todas as *HSP70* de células eucarióticas, e afetam a quantidade de mRNA que será transcrito durante o choque térmico (KIANG; TSOKOS, 1998).

Para que haja estimulação da expressão de *HSP* em resposta ao choque térmico, a transcrição é regulada por quatro fatores de transcrição de choque térmico (*HSFs*), que incluem *HSF1*, *HSF2*, *HSF3* e *HSF4*, os quais se ligam a elementos de choque térmico (*HSE*) no DNA (FUJIMOTO; NAKAI, 2010). O *HSE* é uma sequência repetida (de três a seis vezes) de cinco pares de bases, localizados na região promotora das *HSP70*, e é necessária para indução por calor do gene da *HSP70* (FERNANDES et al., 1994; MORIMOTO et al., 1994).

O choque térmico induz a uma rápida ligação dos *HSFs* à região dos *HSEs*. Quando em condição não estressante, os *HSFs* são mantidos em uma forma não ligada ao DNA. Contudo, o choque térmico e outros fatores estressores iniciam os eventos que removem a influência regulatória negativa sobre a atividade de ligação dos *HSFs* ao DNA. Os *HSFs* entram no núcleo, se ligam aos *HSEs* e se tornam fosforilados pelas

HSFs quinases. Assim, inicia-se a transcrição e depois a tradução (SCHLESINGER, 1990; MORIMOTO, 1993; MORIMOTO et al., 1994; KIANG; TSOKOS, 1998).

A expressão de proteínas de choque térmico foi relacionada com a qualidade da carne. Carvalho et al. (2014) encontraram expressão diferencial de proteínas de choque térmico associadas com a maciez da carne. Guillemin et al. (2011) identificaram vias celulares envolvidas nos processos de amaciamento: apoptose, funções das *HSP* e resistência ao estresse oxidativo, diferindo entre tipos de músculo. Interessantemente, Zhao et al. (2012) identificaram efeito epigenético das proteínas de choque térmico em bovinos taurinos. Estudando animais da raça Angus, estes autores identificaram que com a regulação epigenética, os eventos de estresse muito cedo na vida poderiam persistir e influenciar na rigidez da carne de bovinos saudáveis e não estressados no momento do abate.

2.3.1 HSF1 e HSPA6

Os quatro tipos de *HSF* foram relatados em estudos de grandes eucariontes, dos quais o *HSF1* foi diretamente correlacionado com a termotolerância em bovinos. O *HSF1* e o *HSF3* são ativados durante o estresse térmico e o *HSF1* está principalmente correlacionado com a indução da expressão do gene *HSP70* (ARCHANA et al., 2017).

A família das *HSP70* é composta por vários genes como *HSPA1A*, *HSPA1B*, *HSPA1L*, *HSPA2*, *HSPA4*, *HSPA5*, *HSPA6* e *HSPA8* (HYDER et al., 2017). Dentre os vários genes da família *HSP70*, Banerjee et al. (2014) encontraram maior nível de expressão de *HSPA6* e *HSPA1L* no verão, sendo que nesta estação do ano, a expressão dos genes da família *HSP70* foi maior em raças de caprinos mais adaptadas ao frio do que nas raças adaptadas ao calor. De forma semelhante, Mohanarao et al. (2014), estudando a mesma espécie, obtiveram maiores níveis de expressão do gene *HSPA6* em células de caprinos submetidas a um desafio térmico por calor.

Existe um padrão de substituição de aminoácidos de diferentes *HSP* e isto indicou que *HSPA6* e *HSP1L*, comparadas a outras *HSP*, evoluíram independentemente em mamíferos (BANERJEE et al., 2014). Baseado em estudos funcionais do *HSPA6*, foi descrito que embora este gene não possua propriedades genéricas como chaperonas, ele foi desenvolvido para manter funções vitais específicas sob condições de estresse severo (HAGEMAN et al., 2011). Além disso, a proteína *Hsp70-6*, codificada pelo gene *HSPA6*, está quase indetectável na maioria dos tecidos durante condições normais sem

estresse, exceto para determinadas células do sangue, onde é expressa em níveis substanciais (DAUGAARD et al., 2007).

2.4 Expressão Gênica

A expressão gênica nada mais é do que o nível de produção de proteínas definidas por um gene (SINGH; SIVABALAKRISHNAN, 2015). A expressão gênica é regulada em diferentes estágios, incluindo: transcrição, modificações pós-transcricionais, tradução e modificações pós-traducionais (KUANG et al., 2018). As células podem, quando necessário, sintetizar rapidamente uma grande quantidade de proteína, a fim de produzir muitas cópias idênticas de RNA a partir do mesmo gene. Porém, cada gene também pode ser transcrito e traduzido sob taxas diferentes, permitindo que a célula faça enormes quantidades de certas proteínas e mínimas de outras, o que é regulado de acordo com as necessidades da célula (ALBERTS et al., 2010).

Monitorar a expressão do DNA é uma das abordagens fundamentais da genética. A técnica para medir a expressão do DNA é medir o mRNA ao invés da proteína, porque as sequências de mRNA hibridizam com suas sequências complementares de RNA ou DNA (SINGH; SIVABALAKRISHNAN, 2015). Três técnicas primárias estão sendo utilizadas em pesquisas atuais com animais para análise de expressão gênica, incluindo PCR quantitativa em tempo real utilizando transcrição reversa (RT-qPCR), microarranjos de cDNA e tecnologia de RNA-seq (THOMSON, 2016).

A qPCR é uma abordagem comum para medir a expressão dos genes alvo em uma ampla variedade de amostras de muitas fontes, assim como tecidos, sangue e cultura de células originárias de humanos, animais, plantas e bactérias. Ao usar a técnica de qPCR para quantificar a expressão, o RNA total precisa ser extraído da amostra experimental para obter e medir o nível de mRNA, este precisa ser convertido em DNA complementar (cDNA) através do processo chamado transcrição reversa, que é então usado como o modelo para a reação de qPCR. A base da qPCR é monitorar o processo de amplificação de DNA dirigido pela DNA polimerase, o qual é conhecido com o reação em cadeia polimerase (PCR), em “tempo real”. Em uma reação de PCR, uma enzima DNA polimerase termoestável é usada para sintetizar novas fitas de DNA complementar à sequência DNA alvo. Ao contrário da PCR convencional, a qPCR permite verificar a amplificação dos amplicons da PCR ao final de cada ciclo de

amplificação usando um sistema de corante fluorescente e um termociclador com capacidade para detectar a fluorescência (KUANG et al., 2018).

2.5 Análise quantitativa em tempo real

A quantificação por PCR geralmente é realizada de duas formas possíveis, a quantificação relativa baseada na comparação com um gene de referência, que permite avaliar alterações fisiológicas na expressão de um gene e é adequada para a maioria das avaliações e a quantificação absoluta, baseada em curvas de calibração externas e internas (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). A escolha do método de quantificação depende da sequência alvo, a quantidade de mRNA presente no tecido e o grau de acurácia necessária e se a quantificação precisa ser relativa ou absoluta (PFAFFL, 2001). Em algumas situações, é desnecessário determinar o número absoluto de cópias do transcrito, sendo suficiente a mudança relativa na expressão gênica (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Entretanto, é certo que o cálculo das concentrações iniciais na análise de qPCR requer uma estimativa da eficiência da PCR, a definição de um limiar de fluorescência e a determinação do valor de Ct, que é o número do ciclo fracionário necessário para atingir esse limite (RUIJTER et al., 2009).

Na quantificação relativa é necessário utilizar um gene de controle endógeno para realizar a normalização da quantidade de RNA adicionado na reação da transcriptase reversa. Os genes endógenos, ou de referência, estão presentes em todas as células nucleadas, uma vez que são necessários para a sobrevivência das células, sendo alguns exemplos o *GAPDH*, a *β -actina*, o *18S rRNA*, o *28S rRNA*, entre outros. A síntese de mRNA destes genes é considerada estável em vários tecidos mesmo em condições experimentais (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; PFAFFL, 2001).

O cálculo da expressão relativa do gene pode ser realizado através do método $2^{-\Delta\Delta CT}$, e para este método, a eficiência de amplificação do gene alvo e do gene referência precisam ser iguais. Caso esta eficiência não seja semelhante, a análise de dados pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ deve ser executado por quantificação absoluta, além disso, este método requer calibração para que possa ser utilizado (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Segundo Pfaffl (2001) o modelo de $2^{-\Delta\Delta CT}$ só é aplicável para estimações rápidas de taxa de expressão relativa. Então, no intuito de aumentar a acurácia das quantificações dos ácidos nucléicos permitindo maior reprodutibilidade dos dados e aplicação de modelo matemático adequado para sua avaliação, o método de Pfaffl, ou

método de calibração da eficiência foi desenvolvido. Este método apresenta modelos de cálculo corrigidos da eficiência, baseados em múltiplas amostras e/ou múltiplos genes de referência, levando em conta as diferenças na eficiência de amplificação entre genes alvo e de referência (FIGURA 3).

Figura 3 - Equação de expressão gênica

$$Raz\tilde{a}o = \frac{(E_{alvo})^{\Delta Ct_{alvo}}}{(E_{refer\tilde{e}ncia})^{\Delta Ct_{refer\tilde{e}ncia}}}$$

E = eficiência; Ct = *Cycle threshold* ou ciclo limiar.

Fonte: Adaptado de Pfaffl (2001).

Onde,

$\Delta Ct_{alvo} = Ct_{amostra\ controle} - Ct_{amostra\ alvo}$

$\Delta Ct_{refer\tilde{e}ncia} = Ct_{amostra\ controle} - Ct_{amostra\ refer\tilde{e}ncia}$.

Para o modelo matemático de Pfaffl é necessária a determinação do *Cycle threshold* (Ct) ou ponto de cruzamento para cada transcrito. O Ct é o ponto em que a fluorescência aumenta sensivelmente. O cálculo do teste de precisão e teste de variabilidade é baseado na variação do Ct em relação ao valor médio de Ct (PFAFL, 2001).

2.6 Genes de referência

Escolher os genes de referência corretos para normalizar a expressão gênica em uma PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) é essencial se os resultados devem refletir verdadeiramente os processos biológicos. Tipicamente, um gene de referência endógeno é usado, o qual é expresso constitutivamente em níveis constantes (GARCÍA VALLEJO et al., 2004). No entanto, após vários trabalhos com variação de genes endógenos supostamente estáveis (SCHMID et al., 2003; SCHMITTGEN e ZAKRAJSEK, 2000; RADONIC et al., 2004; HUGGETT et al., 2005) ficou claro que nenhum gene de referência pode ser considerado adequado para qualquer conjunto de condições.

Com isso, alguns estudos têm validado genes de referência em programas específicos para uso em PCRs em tempo real. Vorachek et al. (2013) utilizaram os programas *BestKeeper*, *Norm Finder*, e *geNorm* para avaliar 11 genes endógenos, incluindo *GAPDH*, *RPL19* e a *β -actina* em sangue de bovinos. O gene *RPL19* foi ranqueado como um dos genes mais estáveis no sangue de taurinos, o *GAPDH* teve uma variação maior e a *β -actina* apresentou resultados não confiáveis. O mesmo foi observado por Crookenden et al. (2017), que validaram o par de genes *RPL13A* e *RPL19* como o mais estável usando o programa *geNorm* e, usando o *Normfinder*, o par mais estável manteve o gene *RPL19* juntamente com o *YWHAZ*, os quais foram considerados os mais adequados em amostras de sangue de vacas de leite.

Trabalhos anteriores aos estudos de validação dos genes de referência já haviam sido realizados usando o gene *RPL19* como constitutivo em estudos com bovinos, como o de Ribeiro et al. (2009), estudando proteínas de choque térmico em bovinos zebuínos e zebu X taurino.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 5 ed. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2010.
- 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, p. 13-19, 2017.
- ASBIA**. Associação Brasileira de Inseminação Artificial. Disponível em: <http://www.asbia.org.br/>. Acesso em: 07 out. 2018.
- BACCARI JUNIOR, F. Adaptação de sistemas de manejo na produção de leite em clima quente. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AMBIÊNCIA NA PRODUÇÃO DE LEITE, 1., 1998, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 24-67.
- BANERJEE, D. et al. Seasonal variation in expression pattern of genes under HSP70: Seasonal variation in expression pattern of genes under HSP70 family in heat and cold-adapted goats (*Capra hircus*). **Cell Stress Chaperones**, Dordrecht, v. 19, n. 3, p. 401-408, 2014.
- BERTIPAGLIA, E. C. A. et al. Estimativas de parâmetros genéticos e fenotípicos de características do pelame e de desempenho reprodutivo de vacas holandesas em clima tropical. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, n. 2, p. 350-359, 2007.
- BORMANN, J. M. et al. **Beef Sire Selection Manual**. 2. ed. In: National Beef Cattle Evaluation Consortium, 2010.
- CARVALHO, M. E. et al. Heat shock and structural proteins associated with meat tenderness in Nellore beef cattle, a *Bos indicus* breed. **Meat Science**, Barking, v. 96, n. 3, p. 1318-1324, 2014.
- CASSAR-MALEK, I.; PICARD, B. Expression Marker-Based Strategy to Improve Beef Quality. **The Scientific World Journal**, New York, v. 2016, 2016. Paginação irregular.
- CHAN, E. K. F.; NAGARAJ, S. H.; REVERTER, A. The evolution of tropical adaptation: Comparing taurine and zebu cattle. **Animal Genetics**, Malden, v. 41, n. 5, p. 467-477, 2010.
- COLLIER, R.; DAHL, G.; VANBAALE, M. Major advances associated with environmental effects on dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, n. 4, p. 1244-1253, 2006.
- CRAIG, E. A.; SCHLESINGER, M. J. The Heat Shock Response. **Critical Reviews in Biochemistry**, Cleveland, v. 18, n. 3, p. 239-280, 1985.

CREWS, D. H. et al. Genetic parameters for carcass traits and their live animal indicators in Simmental cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 81, n. 6, p. 1427–1433, 2003.

CROOKENDEN, M. A. et al. Technical note: Evaluation of endogenous control gene expression in bovine neutrophils by reverse-transcription quantitative PCR using microfluidics gene expression arrays. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 100, n. 8, p. 6763–6771, 2017.

CROUSE, J. D. et al. Comparisons of *Bos indicus* and *Bos taurus* Inheritance for Carcass Beef Characteristics and Meat Palatability. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 67, n. 10, p. 2661–2668, 1989.

DANI, M. A. C.; HEINNEMAN, M. B.; DANI, S. U. Brazilian Nelore cattle: A melting pot unfolded by molecular genetics. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 7, n. 4, p. 1127–1137, 2008.

DAUGAARD, M.; ROHDE, M.; JAATTELA, M. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 581, p. 3702-3710, 2007.

EDWARDS, J. L. et al. Responsiveness of early embryos to environmental insults: potential protective roles of hsp70 and glutathione. **Theriogenology**, New York, v. 55, n. 1, p. 2009-223, 2001.

EGITO, A. A. **Diversidade Genética, ancestralidade individual, miscigenação nas raças bovinas do Brasil com base em microssatélites e haplótipos de DNA mitocondrial**: Subsídios para a conservação. 2007. 232 p. Tese (Doutorado em Biologia Molecular)-Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

FERNANDES, M.; O'BRIEN, T.; LIS J. T. Structure and regulation of heat shock gene promoters. In: MORIMOTO, R. I.; TISSIÈRES, A.; GEORGOPOULOS, C. **The biology of heat shock proteins and molecular chaperones**. 1994. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, dec. 1994. V. 19, n. 12, p. 375-393.

FUJIMOTO, M.; NAKAI, A. The heat shock factor family and adaptation to proteotoxic stress. **The FEBS Journal**, Oxford, v. 277, n. 20, p. 4112-4125, 2010.

FURTADO, D. A. et al. Environmental comfort in constructions for Sindi and Guzera calves in the agreste region of the state of Paraíba. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v. 32, n. 1, p.1-9, 2012.

GARCÍA-VALLEJO, J. J. et al. Approach for defining endogenous reference genes in gene expression experiments. **Analytical Biochemistry**. San Diego, v. 329, n. 2, p. 293–299, 2004.

GUILLEMIN, N. et al. Functional analysis of beef tenderness. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 75, n. 2, p. 352-365, 2011.

- HAGEMAN, J. et al. The diverse members of the mammalian HSP70 machine show distinct chaperone-like activities. **The Biochemical Journal**, London, v. 435, n. 1, p. 127-142, 2011.
- HAHN, G. L. et al. Characterizing animal stress through fractal analysis of thermoregulatory responses. **Journal of Thermal Biology**, Oxford, v. 17, n. 2, p. 115–120, 1992.
- 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**, Champaign, v. 74, n. 2, p. 295–303, 1996.
- HANSEN, P. J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 82-83, p. 349-360, 2004.
- HUGGETT, J. et al. Real-time RT-PCR normalization; Strategies and considerations. **Genes & Immunity**, Hampshire, v. 6, n. 4, p. 279-284, 2005.
- HYDER, I. et al. Thermotolerance in Domestic Ruminants: A HSP70 Perspective. **Heat Shock Proteins in Veterinary Medicine and Sciences**. v. 12, p. 3-35, 2017.
- JONAK, C.; KLOSNER, G.; TRAUTINGER, F. Heat shock proteins in skin. **International Journal of Cosmetic Science**, Oxford, v. 28, n. 4, p. 233-241, 2006.
- KIANG, J. G.; TSOKOS, G. C. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. **Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 80, n. 2, p. 183-201, 1998.
- KUANG, J. et al. An overview of technical considerations when using quantitative real-time PCR analysis of gene expression in human exercise research. **PloS One**, San Francisco v. 13, n. 5, 2018. Paginação irregular.
- LEFAUCHEUR, L. A second look into fibre typing - Relation to meat quality. **Meat Science**, Barking, v. 84, n. 2, p. 257–270, 2010.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, San Diego, v. 25, n. 4, p. 402-8, 2001.
- MARTELLO, L. S. **Diferentes recursos de climatização e sua influência na produção de leite, na termorregulação dos animais e no investimento das instalações**. 2002. 67 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Universidade de São Paulo Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Pirassununga, 2002.
- MCGUIRE, D. **Common Beef Breeds of Oregon**. Beef Cattle Library, Oregon, 2013. Paginação irregular.
- MEDEIROS, L. F. D. et al. Frequência respiratória e cardíaca em caprinos de diferentes raças e idades. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 5,

p. 199-202, 2001.

MOHANARAO, G. J. et al. HSP70 family genes and HSP27 expression in response to heat and cold stress in vitro in peripheral blood mononuclear cells of goat (*Capra Hircus*). **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 116, n. 2-3, p. 94–99, 2014.

MORAIS, D. A. E. F. et al. Variação anual de hormônios tireoideanos e características termorreguladoras de vacas leiteiras em ambiente quente. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, n. 3, p. 538-545, 2008.

MORIMOTO, R. I. et al. Regulation of heat shock gene transcription by a family of heat shock factors. In: MORIMOTO, R. I., TISSIÈRES, A., GEORGOPOULOS, C. **The biology of heat shock proteins and molecular chaperones**. 1994. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994. V. 19, n. 12, p. 417-455.

MORIMOTO, R. I. Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. **Science**, Washington, v. 259, n. 5100, p. 1409-1410, 1993.

NÓBREGA, G. H. et al. A produção animal sob a influência do ambiente nas condições do semiárido nordestino. **Revista verde de agroecologia e desenvolvimento sustentável**, Mossoró, v. 6, n. 1, p. 67-73, 2011.

NUNEZ-DOMINQUEZ, R. et al. Effects of Heterosis on Longevity in Beef Cattle. **Roman L. Hruska U.S. Meat Animal Research Center**, Lincoln, v. 40, n. 2, p. 13-14, 1985.

PERIŠIĆ, P. et al. Simmental cattle breed in different production systems. **Biotechnology in Animal Husbandry**, Zemun, v. 25, n. 5-6, p. 315-326, 2009.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RTPCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 29, n. 9, p. 2002-2007, 2001.

PICCOLI, M. L. et al. Estrutura populacional da raça Angus criada no Brasil. In: X SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO ANIMAL, 10., 2013, Uberaba. **Anais...** Uberaba: SBMA, ago. 2013.

PIERCE, B. A. **Genética: um enfoque conceitual**. 3 ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2011.

RIBEIRO, A. R. B. et al. Expressão de genes das proteínas de choque térmico em bovinos Nelore, Senepol X Nelore e Angus X Nelore após estresse térmico. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 55., 2009. Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia: SBG, 2009. Paginação irregular.

RODRIGUES, R. T. de S. et al. Differences in beef quality between Angus (*Bos taurus taurus*) and Nelore (*Bos taurus indicus*) cattle through a proteomic and phosphoproteomic approach. **PLoS One**, San Francisco, v. 12, n. 1, p. 1-13, 2017.

RUIJTER, J. M. et al. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 37, n. 6, 2009. Paginação irregular.

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**, Champaign, v. 88, n. 7, p. 2321-2336, 2010.

SCHLESINGER, M. J. Heat shock proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 265, n. 21, p. 12111-12114. 1990.

SILANIKOVE, N. Effects of heat stress on the welfare of extensively managed domestic ruminants. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 67, n. 1, p.1-18, 2000.

SILVA, R. G.; SCALA, J. R. N. L.; POCAI, P. L. B. Transmissão de Radiação Ultravioleta Através do Pelame e da Epiderme de Bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 30, n. 6, p. 1939-1947, 2001.

SINGH, U. et al. Molecular markers and their applications in cattle genetic research: A review. **Biomarkers and Genomic Medicine**, Amsterdam, v. 6, n. 2, p. 49-58, 2014.

SINGH, R. K.; SIVABALAKRISHNAN, M. Feature Selection of Gene Expression Data for Cancer Classification: A Review. **Procedia Computer Science**, Amsterdam, v. 50, p. 52-57, 2015.

RADONIĆ, A. et al. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 313, n. 4, p. 856-862, 2004.

SCHMID, H. et al. Validation of endogenous controls for gene expression analysis in microdissected human renal biopsies. **Kidney International**, New York, v. 64, n. 1, p. 356-360, 2003.

SCHMITTGEN, T. D.; ZAKRAJSEK, B. A. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, Amsterdam, v. 46, n. 1-2, p. 69-81, 2000.

SOLOMON, J. M. et al. Changes in hsp70 alter thermotolerance and heat-shock regulation in *Drosophila*. **The New Biologist**, Philadelphia, v. 3, n. 11, p. 1106-1120, 1991.

SOUZA JUNIOR, M. D. **Características de Adaptabilidade em Bovinos de Corte**. 2009. Monografia (Especialização em Ciência Animal)-Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2009.

THOMSON, J. M. Impacts of environment on gene expression and epigenetic modification in grazing animals. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 94, n. S6, p. 63-73, 2016.

TIRELLI, M. et al. Cryopreservation of pig granulosa cells: effect of FSH addition to freezing medium. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 28, n. 1, p. 17-33, 2005.

TURNER, J. W. Genetic and biological aspects of zebu adaptability. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 50, n. 6, p. 1201-1205, 1980.

VORACHEK, W. R.; BOBE, G.; HALL, J. A. Reference gene selection for quantitative PCR studies in bovine neutrophils. **Scientific Research**, v. 4, n. 10, p. 6-14, 2013.

WEBER, T. et al. Parâmetros genéticos e tendências genéticas e fenotípicas para características produtivas e de conformação na fase pré-desmama em uma população da raça Aberdeen Angus. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 38, n. 5, p. 832-842, 2009.

ZHAO, C. et al. Functional genomic analysis of variation on beef tenderness induced by acute stress in Angus cattle. **Comparative and Functional Genomics**, Cairo, v. 2012, 2012. Paginação irregular.

1 **SEGUNDA PARTE – ARTIGO**

2
3 **ARTICLE - *Physiological responses and expression of HSF1 and HSPA6 genes***
4 ***in Angus and Simmental cattle****

5
6
7 Formatado de acordo com as normas do periódico *Journal of Thermal Biology*.

8
9 Renata de Fátima Bretanha Rocha^(a), Marielle Moura Baena^(a), Aline de Cássia
10 Estopa^(a), Izally Carvalho Gervásio^(b), Adriana Mércia Guaratini Ibelli^(c), Tathyane
11 Ramalho Santos Gionbelli^(a), Mateus Pies Gionbelli^(a), Rilke Tadeu Fonseca de
12 Freitas^(a), Sarah Laguna Conceição Meirelles^(a)

13
14 ^a Universidade Federal de Lavras, Department of Animal Science, University Campus,
15 postal code 3037, Downtown, CEP 37200000, Lavras/MG, Brazil; E-mail:
16 renatarocha02@hotmail.com, marielle_moura@hotmail.com, alineestopa@gmail.com,
17 tathytt@yahoo.com.br, mateus.pg@ufla.br, rilke@ufla.br, sarah@ufla.br*;

18 ^b Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - ESALQ/ USP, Department of
19 Animal Science - LZT , University Campus, CEP 13418-260; Piracicaba - SP; Brazil;
20 E-mail: izallygervasio@gmail.com.

21 ^c Embrapa Embrapa Suínos e Aves, Highway BR 153, Km 110, District de Tamanduá,
22 Postal code 321, CEP 89700991, Concórdia/ SC, Brazil; E-mail:
23 adriana.ibelli@gmail.com.

24 *Corresponding author: Sarah Laguna Conceição Meirelles, University Campus, Postal
25 address 3037, CEP 37200-000, Lavras/MG, telephone: +553538291230; E-mail:
26 sarah@ufla.com

27
28 Declarations of interest: none'

29 Abbreviations1

30
31
32 1 respiratory rate (RR); morning (M); afternoon (A); hair coat surface temperature (ST);
33 temperature-humidity index (THI); air temperature (AT); relative humidity (RH); Angus
34 (ANG); Simmental (SIM); Angus most adapted (ANGmost); Angus least adapted (ANGleast);
35 Simmental most adapted (SIMmost); Simmental least adapted (SIMleast); respiratory rate in the
36 morning (MRR); respiratory rate in the afternoon (ARR); hair coat surface temperature in the
37 morning (MST); hair coat surface temperature in the afternoon (AST); rectal temperature in the
38 morning (MRT); rectal temperature in the afternoon (ART).

Abstract

The aim of this study was to identify whether most and least adapted Angus and Simmental cattle differed in physiological responses and expression of the heat shock protein 1 (HSF1) and the heat shock 70 kDa protein 6 (HSPA6), when subjected to heat stress. Thirty bulls (n = 15 ANG; n = 15 SIM), extremes "most adapted" and "least adapted" within each breed were selected to the heat tolerance test. They were selected according to an index based on the average of the respiratory rate obtained on two hot summer days from one hundred bulls. Before the heat tolerance test day, animals were taken to a paddock with water, grass and shade until 7 a.m. of the following day for morning measurements. They were kept in the barn without access to water and shade until 1 p.m. for the afternoon measurements. Respiratory rate in the morning (MRR) and afternoon (ARR), hair coat surface temperature in the morning (MST) and afternoon (AST), rectal temperature in the morning (MRT) and afternoon (ART) were measured and blood samples were collected for expression analysis of the HSF1 and HSPA6 genes. The MIXED procedure of SAS was used for all statistical analysis. The most adapted Simmental group had lesser values of MRR (P = 0.023) and MRT (P = 0.095), but there was no difference within Angus breed. The ARR was greater (P = 0.004) in least adapted animals for both breeds. The ART was lower in the Simmental breed (P<0.001). Least adapted had greater levels of mRNA of HSF1 (P = 0.06) and HSPA6 (P = 0.09). In conclusion, respiratory rate and rectal temperature and expression of the HSF1 and HSPA6 genes can be indicators of adaptation level. The Simmental breed is better adapted to the heat tolerance test than the Angus breed.

Keywords: adaptability; Angus; heat stress; HSP; Simmental

89 1. Introduction

90

91 Heat stress decreases animal production and reproductive efficiency affecting adversely
92 livestock health (Hyder et al., 2017a). It induces a series of thermoregulatory responses that allow
93 animals to regulate homeostasis. These responses may be physiological, such as the respiratory
94 rate, rectal temperature, heart rate and surface temperature, or molecular, involving changes in
95 the protein expression that are essential to preserve cell survival (Gupta et al. 2013).

96 Unlike taurine cattle (*Bos taurus*), which originate in Europe, the Zebu cattle (*Bos indicus*)
97 evolved in areas with warm climates, allowing them to acquire thermotolerance genes. Therefore,
98 zebu breeds have a superior ability to regulate body temperature relative to taurine breeds
99 (Hansen, 2004). One way to assess the cattle adaptation level undergoing thermal challenges is to
100 measure physiological, being the most important the respiratory rate, because its change is the
101 first visible sign of an animal in heat stress (Martello, 2006). Additionally, rectal temperature and
102 surface temperature proved to be relevant characteristics in the evaluation of heat tolerance in
103 cattle (Cardoso et al., 2015).

104 The stress response involves the action of heat shock proteins (HSPs). An increase in the level
105 of these proteins in damaged cells contributes to protein repair and maintenance of cell viability
106 because they inhibit cell death (Castro et al., 2013). These are a highly conserved protein family
107 that play a vital role in guiding the initial folding of proteins and subsequent refolding of partially
108 denatured structures, conferring cell protection against stressful environments (Moura et al.,
109 2018). Among all HSPs, HSP70 is an indicator of the amount of stress, mainly heat stress,
110 experienced by the animal (Hyder et al., 2017b). Moreover, other coding genes for the HSPs
111 production, the heat transfer protein transcription factor 1 (*HSF1*) is activated during thermal
112 stress and is mainly correlated with the induction of HSP70 gene expression (Archana et al.,
113 2017). The *HSPA6* gene, which encodes the HSP70 family of protein 6, had expression levels in
114 goats subjected to thermal stress conditions (Banerjee et al., 2014 Mohanarao et al., 2014). This
115 may be due to the fact that the *HSPA6* gene has differential expression to maintain specific vital

116 functions under severe stress conditions (Hageman et al., 2011). In addition, this gene is almost
117 undetectable in most tissues during normal stress-free conditions, except for certain blood cells,
118 where it is expressed at substantial levels (Daugaard et al., 2007). Therefore, selecting for more
119 heat-tolerant animals or breeds will be effective when thermotolerance indicators can be used to
120 select the animals and breed them to generate heat-resistant herds.

121 The first hypothesis is that the physiological responses for respiratory rate, surface
122 temperature and rectal temperature will be higher in animals classified as least adapted,
123 regardless of breed. These responses will have greater magnitude in the Angus breed than in the
124 Simmental breed under thermal comfort but will be similar under stress. The second hypothesis is
125 that the expression of the HSF1 and HSPA6 genes will be higher in the least adapted animals and
126 under the heat stress condition, with no difference between the breeds. The aim of this study was
127 to identify whether Angus and Simmental cattle and, if more and least adapted animals within
128 these breeds, differed in physiological responses and expression of the heat shock protein 1
129 (HSF1) and the heat shock 70 kDa protein 6 (HSPA6), when subjected to heat stress by heat.

130

131 **2. Materials and Methods**

132

133 **2.1 Location**

134

135 All procedures were approved by the Animal Ethics Committee of the Federal University of
136 Lavras, protocol number 018/13. The animals were from Santa Ester farm, which belongs to the
137 *Casa Branca Agropastoril Ltda.* group, located in the region of Pouso Alegre, in the municipality
138 of Silvianópolis, Minas Gerais (MG), Brazil (22° 01 '46 " South, 45 ° 50' 06" West, altitude of
139 897 meters). During the heat tolerance test period, the animals were kept under semi-confinement
140 feedlot, receiving the same diet three times a day.

141

142 **2.2 Climate conditions**

143

144 On the days when the respiratory rate (RR) was measured to classify the animals according to
145 adaptation level and on the heat tolerance test day, air temperature (AT, °C) and relative humidity
146 (RH, %) data were collected using a Minipa® MT-242 digital thermohygrometer to obtain the
147 Temperature and Humidity Index (THI), developed by Thom (1958).

148

149 **2.3 Sample collection**

150

151 Thirty bulls (n = 15 Angus; ANG and n = 15 Simmental; SIM) were selected for the heat
152 tolerance test. For the selection of these animals, the respiratory rate (RR) of 100 young bulls (n =
153 40 ANG and n = 60 SIM) was measured in the afternoon of two hot summer days. At the
154 beginning of January 2016 (day 1) and end of January 2016 (day 2), the RR of the animals was
155 measured by counting the number of respiratory movements in the flank region for 15 seconds
156 twice, averaging the two counts and multiplying the result by four, giving the number of breaths
157 per minute (bpm) (Silva, 2000). Animals of each breed were ranked from the lowest RR (the
158 most adapted) to the highest RR (the least adapted), according to the mean RR over those two
159 days. All Angus bulls were black, and the Simmental bull breed was from a South African
160 lineage and was red-white, which is a standard coat color for the breed.

161 One day prior to the heat tolerance test, which was conducted in early March 2016, the
162 animals were taken to a paddock adjacent to the corral with access to water, pasture and shade
163 where they remained until 7 am on the day of the test for the morning (M) measurements. The
164 animals were kept in the corral without access to water and shade until 1 pm, when the afternoon
165 (A) measurements were taken. The measurements taken were respiratory rate in the morning
166 (MRR, bpm) and afternoon (ARR, bpm), surface temperature in the morning (MST, °C) and
167 afternoon (AST, °C) and rectal temperature in the morning (MRT, °C) and in the afternoon
168 (ART, °C). Furthermore, blood samples were collected via jugular venipuncture into Tempus®

169 Blood RNA (Applied Biosystems, USA) tubes to analyze the heat shock protein 1 (HSF1) and the
170 heat shock 70 kDa protein 6 (HSPA6) gene expression.

171 Surface temperature (ST) was measured using an infrared digital thermometer (Minipa®, MT-
172 360), which was pointed at the coat surface of the animal in the dorsal region, one hand below the
173 spine, and the rectal temperature (RT) was recorded using digital thermometer by keeping the
174 thermometer in contact with the rectal mucosa of animal until the thermometer beeped and
175 displayed the temperature.

176

177 **2.4 Gene expression analysis**

178

179 Total RNA was extracted from 10ml of blood using TRIzol® reagent (Ambion, Foster City,
180 CA, USA). The purity of the RNA was verified by the ratio of the absorbance values at λ_{260} and
181 λ_{280} and was > 1.8 . The RNA integrity was verified after 1.0% agarose gel electrophoresis,
182 observing the two bands corresponding to 28S and 18S. The amount (ng/ μ l) and quality of total
183 RNA were verified in a DeNovix DS-11 spectrophotometer (DeNovix, Wilmington, DE, USA).

184 Genomic DNA contamination was removed from RNA by adding 1.5 μ l of 10 \times DNase I
185 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The samples were
186 stored in a freezer at -80°C until cDNA synthesis (complementary DNA), which was performed
187 using the Superscript® III First-Strand Synthesis SuperMix Kit (Invitrogen) according to the
188 manufacturer's instructions.

189 Sequences for the target genes, heat shock factor 1 (HSF1) and heat shock protein member 6
190 (HSPA6), as well as for the Ribosomal Protein L19 (RPL19) reference gene, were obtained from
191 the National Center of Biotechnology Information (NCBI) public database. The forward and
192 reverse primers of the three genes were designed using primer 3 plus software
193 (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). Table 1 shows the primer
194 sequences for the genes used, as well as the amplicon size (bp) and annealing temperature (°C).

195 Each primer was designed to be complementary to two adjacent exons to prevent DNA
196 amplification.

197 The gene expression analysis was performed followed by real-time quantitative reverse
198 transcription polymerase chain reaction (RT- qPCR) using the SYBR Green PCR Master mix
199 (Fermentas, Waltham, MA, USA) with the following amplification parameters: 50°C for 2
200 minutes, 95°C for 10 minutes, 40 cycles of 95°C for 15 seconds, 60°C for 1 minute, ending with
201 95°C for 15 seconds. The melting curve was 95°C for 15 seconds, 60°C for 15 seconds and 95°C
202 for 15 seconds.

203 The reactions were carried out in duplicate. The amplification efficiency of the genes was
204 obtained using LinRegPCR version 2017.1 (Ruijter *et al.*, 2009). The relative expression of the
205 target genes was obtained according to Pfaffl (2001).

206

207 Table 1. Description of the primers for the HSF1, HSPA6 and RLP19 genes in *Bos taurus*.

Gene	Primer sequence (5' - 3')	Fragment size (bp)	Annealing temperature (C°)
HSF1	F - CCAGCAACAGAAAGTCGTCA R - GGGGGATCTTTCTCTTCACC	92	60
HSPA6	F- GAGCAAGATGAAGGAGACGG R - GTGGGCTCGTTGATGATTCT	159	60
RLP19	F - ACCTGGATGAGGAGGATGAG R - GTACAGGCTGTGATACATGTGG	92	60

208 F = forward; R = Reverse; pb = base pairs.

209

210

211

212

213

214

215 **2.5 Statistical Analyses**

216

217 The data presented in this study showed a normal distribution, as verified by the Shapiro-Wilk
 218 test. The SAS version 9.0 (SAS Inst., Inc., Cary, NC, USA) MIXED procedure was used in all
 219 statistical analyses. Data from different experiments are presented as the means \pm standard error
 220 (SE). A p-value <0.10 was considered statistically significant. A pairwise comparison of means
 221 was performed using Tukey's multiple comparison test. The following statistical model was used
 222 to estimate the effects of breed, period and level of adaptation, and their interactions:

$$223 Y_{ijkl} = \mu + B_i + P_j + A_k + (B \times P)_{ij} + (B \times A)_{ik} + (P \times A)_{jk} + (B \times P \times A)_{ijk} + e_{ijkl}$$

224 where Y_{ijkl} is the dependent variable, μ is the general population mean, B_i is the mean effect of the
 225 breeds ($i = 1, \dots, 2$), P_j is the average effect of period (morning and afternoon) ($j = 1, \dots, 2$), A_k is the
 226 average effect of adaptation level (most adapted and least adapted) ($k = 1, \dots, 2$), and e_{ijkl} is the
 227 residual assumed to be independent and to have a normal distribution.

228

229 **3. Results**

230

231 **3.1 Climate**

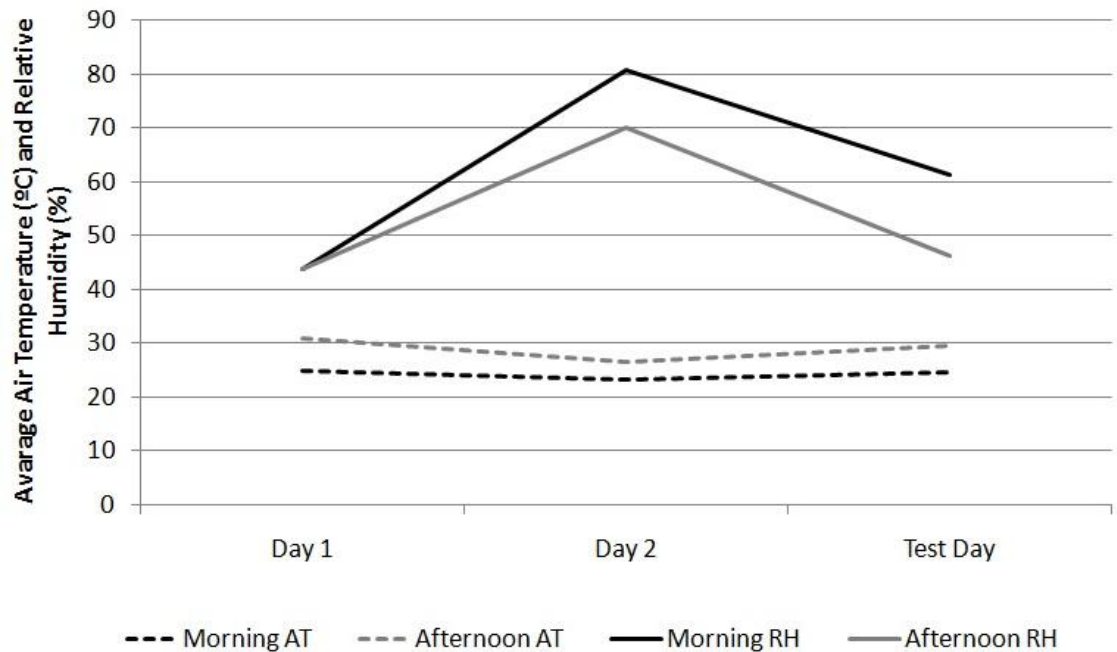
232

233 A difference was found in the air temperature (AT) and relative humidity (RH) between the
 234 periods of the day and between the days of evaluation of the RR for the classification of animals
 235 and the day of the test, but the Day X Period interaction was not significant (Figure 1). In general,
 236 AT increased from the morning (24.20°C) to the afternoon (28.88°C) ($P < 0.001$); by contrast, AT
 237 was higher in the morning (58.04%) than in the afternoon (49.37%) ($P = 0.0039$).

238 On the first day of RR evaluation at the beginning of January 2016 (day 1), the AT was higher
 239 (27.83°C) ($P = 0.0068$) and RH was the lowest (38.49%) ($P < 0.0001$) compared with the other
 240 days. On day 2, at the end of January 2016, the AT of 24.80°C was the lowest among all days;
 241 however, RH was the highest (70.11%). On the day of the heat tolerance test, the AT (27.00°C)

242 did not differ from day 1, and the RH (50.03%) was lower than that on day 2 but higher than that
 243 on day 1.

244 The THI was significantly different only between the periods of the day, being 70.29 in the
 245 morning and 75.63 in the afternoon ($P < 0.0001$). No difference was found in THI among day 1
 246 (74.37), day 2 (73.72) and test day (74.52) ($P > 0.05$).



247
 248 Figure 1. Average air temperature (AT, °C) and RH (%) for each day of the study. The dashed
 249 lines represent air temperature, and the solid lines represent RH in the morning (black) and
 250 afternoon (gray) periods on day 1 (beginning of January 2016), day 2 (end of January 2016) and
 251 the heat tolerance test day.
 252

253 3.2 Physiological measures

254

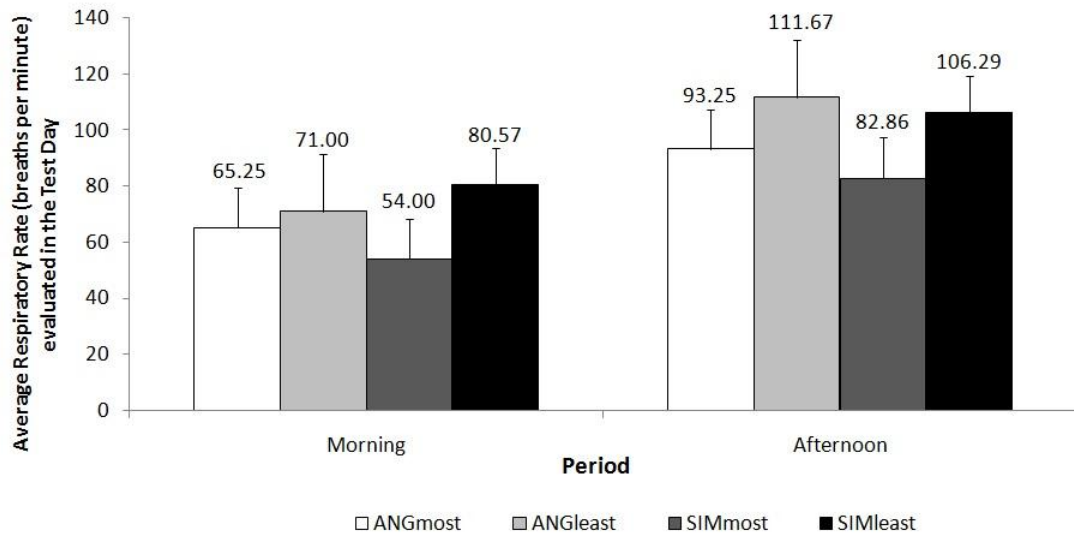
255 On days when 100 animals were classified according to the RR, this characteristic decreased
 256 from 67.13 ± 2.08 bpm on day 1 to 42.02 ± 2.08 bpm on day 2. Among the 15 Angus bulls
 257 selected for the heat tolerance test, nine were classified as most adapted, with a mean RR of
 258 43.00 bpm, while six were classified as least adapted with a mean RR of 71.33 bpm. The mean

259 RR for the eight most adapted was 37.25 bpm, and that for the seven least adapted Simmental
 260 bulls was 66.71 bpm.

261 The mean respiration rate for the 30 extreme animals in the heat tolerance test day is shown in
 262 Figure 2. In the evaluation of the physiological characteristics, differences were found for MRR
 263 ($P = 0.023$) and MRT ($P = 0.095$) between breeds at each level of adaptation. For both breeds, the
 264 animals classified as least adapted had higher RR (ANG = 71.0 ± 4.64 and SIM = 80.6 ± 4.30 bpm),
 265 followed by the most adapted group of the ANG breed (65.3 ± 4.02 bpm), and the lowest mean RR
 266 was obtained for the most adapted SIM (54.0 ± 4.30 bpm).

267 A significant difference was found in RR under the heat stress condition according to
 268 adaptation level, but not according to breed, and the means were higher in the least adapted
 269 animals (109.0 ± 4.92 bpm) than in the most adapted ones (88.1 ± 4.57 bpm).

270



271

272

273

274

275

Figure 2. Mean RR (bpm) on the day of the heat tolerance test. The vertical lines above each bar indicate +1 SE, and the values above indicate the most adapted (ANGmost) and least adapted (ANGleast) Angus and most adapted (SIMmost) and least adapted (SIMleast) Simmental bulls in the morning and afternoon periods.

276

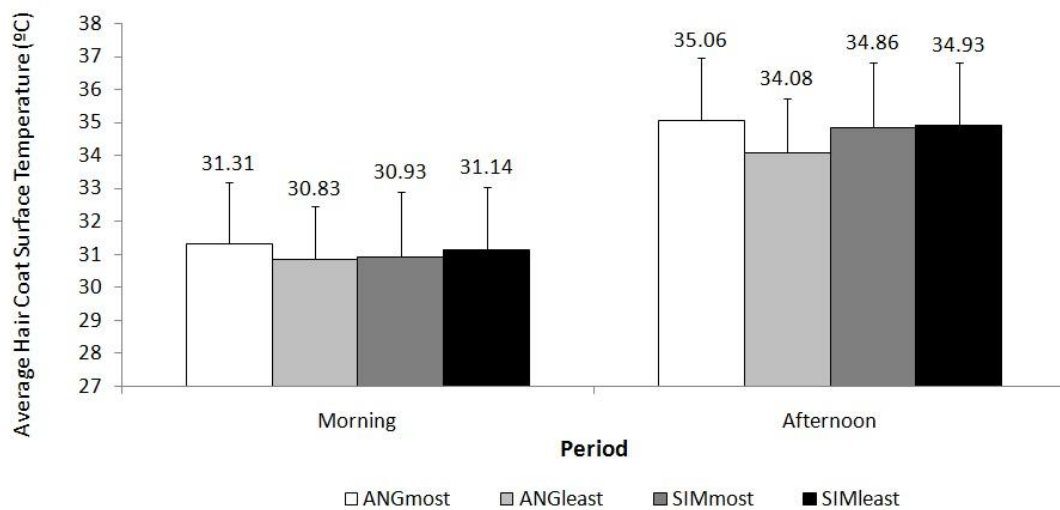
277

278

The mean surface temperature (ST) is shown in Figure 3. The surface temperature showed no significant differences in the factors studied. The mean ST of $31.07 \pm 0.28^\circ\text{C}$ for the Angus breed

279 did not differ from $31.04 \pm 0.28^\circ\text{C}$ for the Simmental breed. No significant differences were noted
 280 in the mean ST between the most adapted animals ($31.12 \pm 0.27^\circ\text{C}$) and least adapted animals
 281 ($30.98 \pm 0.29^\circ\text{C}$). The mean STs for the most adapted Angus ($31.31 \pm 0.36^\circ\text{C}$) and Simmental
 282 ($30.93 \pm 0.39^\circ\text{C}$) bulls were statistically the same as those of the least adapted Angus
 283 ($30.83 \pm 0.42^\circ\text{C}$) and Simmental ($31.14 \pm 0.39^\circ\text{C}$) bulls.

284
 285



286
 287
 288
 289
 290
 291

Figure 3. Mean ST ($^\circ\text{C}$) on the day of the heat tolerance test. The vertical lines above each bar indicate +1 SE, and the values above the vertical lines indicate the means of the most adapted (ANGmost) and least adapted (ANGLEast) Angus and most adapted (SIMmost) and least adapted (SIMleast) Simmental groups in the morning and afternoon periods.

292 The mean rectal temperatures (RT) are shown in Figure 4. The highest rectal temperatures
 293 were similar between the least adapted ANG ($39.87 \pm 0.18^\circ\text{C}$) and SIM ($39.89 \pm 0.16^\circ\text{C}$) groups
 294 and most adapted ANG ($39.88 \pm 0.15^\circ\text{C}$) group, and the lowest rectal temperature was obtained
 295 from the most adapted SIM group ($39.33 \pm 0.16^\circ\text{C}$).

296 Under the heat stress condition, rectal temperature showed only differences between breeds,
 297 but not between the adaptation levels, being lower in the SIM breed ($40.06 \pm 0.15^\circ\text{C}$) than in the
 298 ANG breed ($40.99 \pm 0.15^\circ\text{C}$) ($P < 0.001$).

299

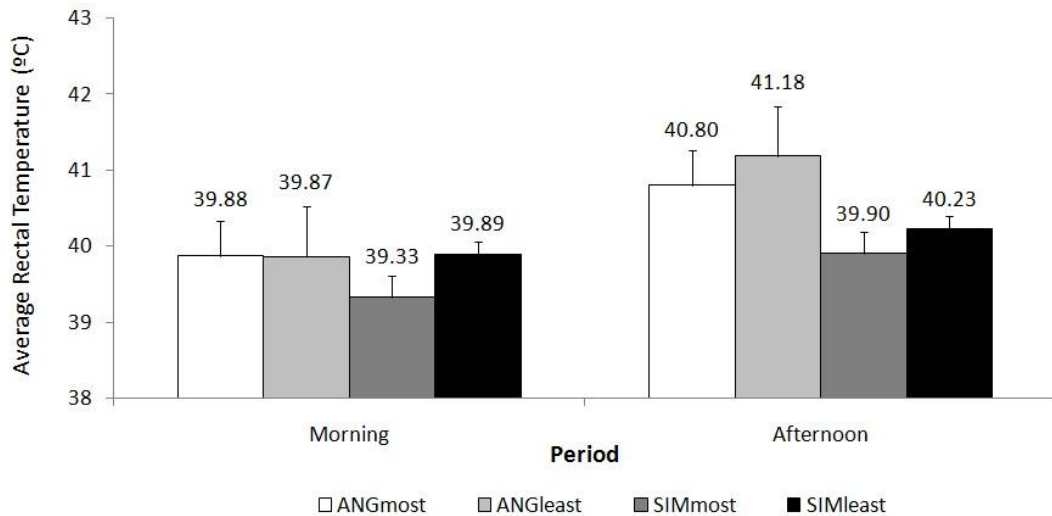
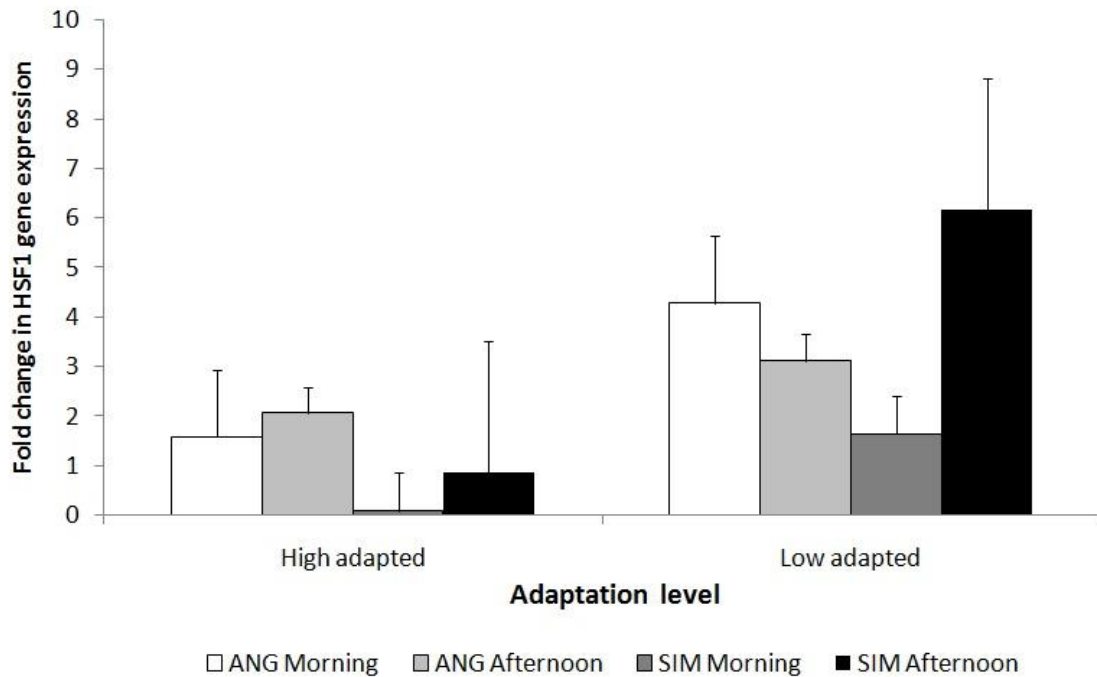


Figure 4. Mean rectal temperature (°C) on the day of the heat tolerance test. The vertical lines above each bar indicate +1 SE, and the values above the vertical lines indicate the means of the most adapted (ANGmost) and least adapted (ANGleast) Angus and most adapted (SIMmost) and least adapted (SIMleast) Simmental groups in the morning and afternoon periods.

3.3 Gene expression

The relative expression of the HSF1 gene is shown in Figure 5. Expression of HSF1 gene differed between the adaptation levels ($P = 0.06$), where there was a 4.32 fold increase from the most adapted to the least adapted animals. No significant difference was found in HSF1 expression between breeds ($P = 0.363$) or period ($P = 0.394$). Additionally, no difference was noted between the Breed \times Adaptation Level interaction ($P = 0.423$), Breed \times Period interaction ($P = 0.260$), Adaptation Level \times Period interaction ($P = 0.957$) and triple interaction Breed \times Adaptation Level \times Period ($P = 0.495$).

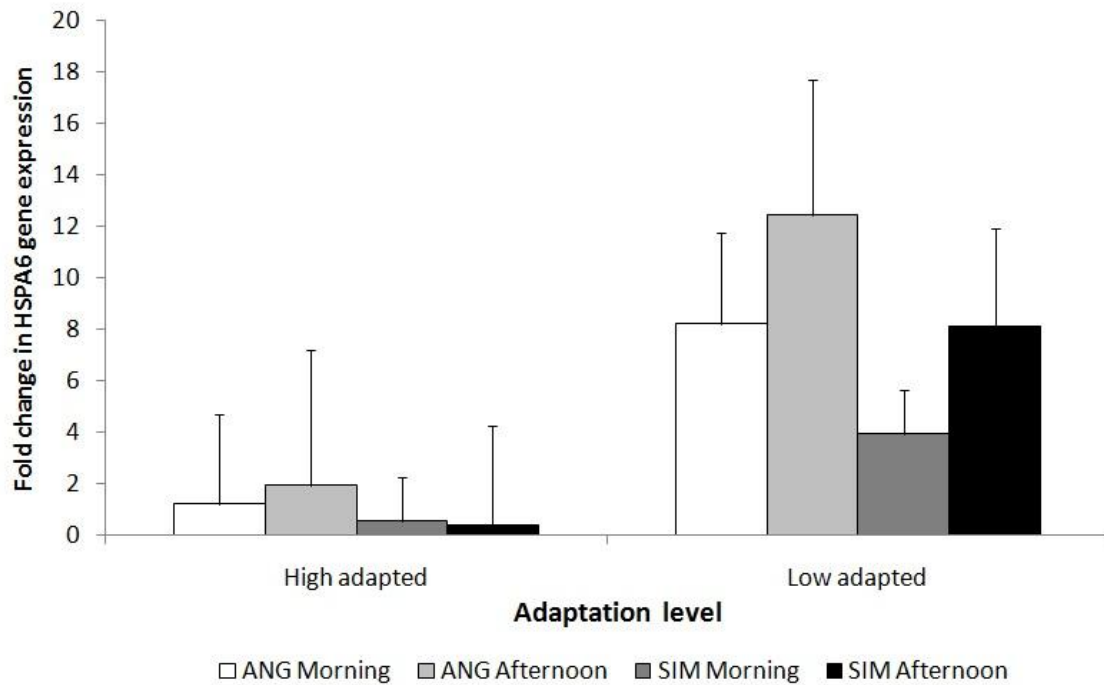


318
 319 Figure 5. Relative expression of the HSF1 gene mRNA on the day of the heat tolerance test.
 320 The vertical lines above each bar indicate +1 SE in the gene expression of the Angus (ANG)
 321 and Simmental (SIM) groups in the morning and afternoon periods.

322
 323 The relative expression of the HSPA6 gene is shown in Figure 6. Similar to the HSF1 gene
 324 expression profile, a significant difference was observed between the adaptation levels ($P = 0.09$)
 325 for the HSPA6 gene. There was a 7.86 fold increase from the most adapted to the least adapted
 326 animals. The gene expression between breeds ($P = 0.338$) or between periods ($P = 0.503$), and
 327 between Breed \times Adaptation level ($P = 0.491$), Breed \times Period ($P = 0.882$), adaptation level \times
 328 Period ($P = 0.436$) and Breed \times Adaptation Level \times Period ($P = 0.731$) was not significantly
 329 different.

330

331



332
333 Figure 6. Relative mRNA expression of the HSPA6 gene on the day of the heat tolerance test.
334 The vertical lines above each bar indicate +1 SE in the gene expression of the Angus (ANG)
335 and Simmental (SIM) groups in the morning and afternoon periods.
336

337 4. Discussion

338
339 The air temperature (AT) increased from the morning to the afternoon period and, conversely,
340 the relative humidity (RH) decreased, findings that are supported by the relationship between the
341 temperature increase and atmospheric RH decrease (Ambaum, 2010).

342 From day 1, at the beginning of January, to day 2, at the end of the same month, the air
343 temperature decreased and the RH increased during the RR evaluation. On the day of the test, the
344 temperature was as high as that on day 1, but the RH was intermediate between days 1 and 2.
345 Under low temperature conditions, the animals can perform heat exchange with the environment
346 by radiation and convection; however, with an increasing temperature and decreasing RH, body
347 heat dissipation changes to evaporation (Silanikove, 2000). This finding indicates that, in the
348 afternoon, evaporation was the predominant form of heat exchange, considering that the

349 temperatures were higher than that in the morning period. Similarly, for day 1 and test day, high
350 temperatures and low to moderate RH are observed.

351 According to the classification of the U.S. Livestock Weather Safety Index (LWSI; LCI,
352 1970), THI values up to 74 indicate thermal comfort, values from 74 to 79 indicate heat stress
353 alert, values between 79 and 84 indicate a hazardous situation and values higher than 84 indicate
354 an emergency. In this experiment, a THI of 70.29 in the morning kept the animals under thermal
355 comfort, whereas the increase to 75.63 in the afternoon led to heat stress for the animals. Despite
356 the change in the environmental condition, the ambient temperature may not have reached
357 significant levels, causing changes in the physiological characteristics and gene expression.

358 Although no significant difference was found in THI between the days, the respiratory rate
359 (RR) decreased from day 1 to day 2, which can be explained by the temperature decreasing and
360 the RH increasing. A higher ambient temperature on day 1 coupled with low RH caused a greater
361 physiological response to stress through respiratory evaporative loss; however, on day 2, the
362 predominant heat exchange was non evaporative.

363 The RR did not differ between the breeds but differed between the adaptation levels in both
364 periods of the day, and the means were higher in least adapted animals. A RR increase is the first
365 physiological response to heat stress that helps in heat dissipation by evaporative cooling
366 (Martello, 2006). In this case, RR indicated genetic differences within each breed for each level
367 of adaptation because the means for the heat tolerance test day were consistent with those for the
368 days when animals were classified. Johnson et al. (2012) found that the thermo sensitive Angus
369 cattle showed a higher respiratory rate than the thermo tolerant Romanusiano breed during
370 summer, with air temperatures ranging from 12.67°C to 36.2°C and THI values from 55.42 to
371 91.85, a variation much larger than that observed in the present study. Changes in physiological
372 responses such as the respiratory rate and rectal temperature vary with changes within the season
373 to maintain normal body temperature independent of air temperature variation (Hyder et al.,
374 2017b). A more homogeneous condition observed by the similarity of THI between the days
375 studied in the present study allowed the breeds to behave physiologically similar in response to

376 stress. Sivotwa et al. (2007) identified that, in the thermoneutral condition ($THI = 68.9 \pm 4.2$), the
377 Simmental breed had a lower surface and rectal temperature; however, the RR was higher than
378 those of the Brahman and Mashona breeds, which were similar in their physiological responses.
379 According to the author, the Simmental heat tolerance was inferior to that of the other breeds.
380 Under a thermoneutral condition, the Simmental breed may be better adapted to climatic
381 conditions, although it is still inferior to zebu breeds; however, under heat stress, the
382 physiological responses of the Simmental breed are similar to the British breeds, such as the
383 Angus.

384 In the morning, the least adapted groups of both breeds had a higher respiratory rate, followed
385 by the most adapted Angus group and most adapted Simmental group with the lowest RR. This
386 finding indicates that, within these breeds, genetic variations may persist, allowing adaptation to
387 the high heat conditions of the environment. This is important for showing differences between
388 animals so that we can select the superior animals to be sires, thus achieving the selection
389 response for these characteristics.

390 The Surface Temperature did not differ between the breeds or adaptation level or in the
391 interaction between these two factors; therefore, regardless of whether the animal is under heat
392 stress, and despite the black coat of the Angus animals, no difference was found between the
393 genetic groups evaluated.

394 The mean ST for all treatments varied up to 35°C , except for the most adapted Angus group
395 under heat stress (35.06°C). According to Collier et al. (2006), the temperature gradient between
396 the core and skin is sufficiently large in cattle with a skin temperature below this value, so the
397 animals can still use other heat exchange mechanisms effectively.

398 In the present study, the Angus breed had higher values than the Simmental breed for rectal
399 temperature both under thermal comfort and heat stress conditions. This finding indicates that
400 genetic differences can exist between breeds in this thermoregulatory response. In a study by
401 Scharf et al. (2010), the rectal temperature and respiratory rate increased when the environment
402 changed from thermal comfort (21°C) to heat stress (26 to 36°C) in Angus and Romanusiano

403 breeds. Moreover, under both ambient conditions, Angus cattle exhibited higher values for these
404 characteristics.

405 Rectal temperatures increase when they reduce evaporative heat losses, and this is due to the
406 increase in RH (Silanikove, 2000). On Test Day, humidity showed the highest variation from the
407 morning to the afternoon, indicating that the Angus bulls may have had more difficulty coping
408 with the climate changes than the Simmental breed; therefore, the rectal temperature of Angus
409 bulls was higher. In addition to the RR, the Simmental breed also showed greater resistance. This
410 may be due to the Simmental breed studied here belonging to a lineage of South African origin.

411 In a similar experiment, Ribeiro et al. (2009) observed the induction of HSF1 gene expression
412 in Angus × Nelore (AN) crossbred animals in the afternoon in relation to the morning, with the
413 Nelore and Senepol × Nelore crosses not showing increased expression from morning to
414 afternoon. Senepol is an adapted and thermotolerant taurine breed capable of dissipating heat
415 under high ambient temperatures, and the Nelore breed is a zebu breed known to exhibit high
416 heat tolerance (Silva et al., 2018). Animals with some Angus blood, representing a breed
417 exhibiting less adaptation to heat conditions than the other breeds, have been shown to be more
418 sensitive to heat stress because they express more HSPs under stress conditions. This finding
419 agrees with our study results, in which animals physiologically classified as least adapted
420 expressed HSPs with greater intensity than the most adapted groups, regardless of breed.

421 In addition to the level of adaptation, one of the objectives of this study was to identify
422 whether an effect of the time period exists on the expression of the HSF1 and HSPA6 genes. No
423 difference was observed in gene expression for comfort or heat stress conditions. The heat stress
424 response is triggered rapidly after acute heat stress and takes approximately 24 hours for a
425 significant change in HSP expression (Maloyan et al., 1999).

426 The change in time period in one day was not sufficient to observe an increase in the
427 expression of HSPs, as demonstrated by Bharati et al. (2017), who observed constant stress for
428 more than one day by changing the thermal comfort condition ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$) of six *Bos indicus*
429 animals to 42°C for 23 days.

430 However, Ribeiro et al. (2009) identified higher expression of the HSF1 gene and a trend of
431 HSPA6 expression with higher intensity in the afternoon under the condition of heat stress for the
432 Angus × Nelore, Senepol × Nelore and Nelore groups than in the morning. Under *in vitro*
433 conditions, Kamwanja et al. (1994) subjected blood lymphocytes from 36 Angus, Brahman and
434 Senepol heifers (12 from each breed) to heat shock at 42°C for one hour. A 2- to 3-fold increase
435 was observed in the intracellular concentrations of HSP70, which was induced although there
436 was no significant effect between breed × temperature. HSP70 may be indicative of chronic stress
437 in cattle because it is correlated with higher temperatures (Gaughan et al., 2013).

438 Although the taurine breeds were outside their thermal comfort zone in environments with an
439 air temperature above 25°C (Hahn et al., 1992), the heat stress condition with an ambient
440 temperature up to 30.75°C in this experiment was not sufficient to induce increased expression of
441 the HSPs *in vivo*.

442 Wang et al. (2017) observed increased expression of several HSP genes, including the HSPA6
443 gene, in the liver of taurine milk cows under summer conditions with high temperatures and THI
444 values between 77 and 81, compared with cows under thermal comfort, with THI values between
445 50 and 61. Compared with this study, the THI values were lower for cows under thermal comfort,
446 while they were similar under heat stress (Figure 1). The expression of the HSP70 family genes
447 varies with species, breeds, age and tissue type depending on the stress experienced by the cell,
448 explaining the variations in thermotolerance (Hyder et al., 2017b).

449 One of the objectives of this study was to identify breed effects on gene expression. Banerjee
450 et al. (2014) reported an increase in the summer expression of HSP70 family genes, such as
451 HSPA8, HSPA1A and HSPA6, in goat breeds adapted to cold weather. However, the expression
452 increased in the winter for the breeds adapted to heat. The Angus and Simmental breeds are
453 European origin, animals adapted to a cold climate; therefore, an increase in the expression of the
454 HSF1 and HSPA6 genes was expected from the period of thermal comfort to heat stress with
455 higher temperatures, which did not occur. However, the same author reported that, due to

456 variations in the adaptation of animals to different environmental conditions, the pattern of
457 HSP70 gene expression is specific to breed and species.

458 With (afternoon) or without (morning) stress condition and regardless of breed, the stress
459 response at the molecular level was similar. However, physiologically least adapted animals
460 express a higher level of these genes, suggesting that the HSF1 and HSPA6 genes may be
461 indicators of genetically superior animals with respect to the level of adaptation. It may also
462 indicate that the expression of these genes is related to the metabolic pathway that regulates the
463 RR because the least adapted animals had a higher RR and higher expression of these genes.

464

465 **5. Conclusion**

466

467 The Simmental breed has proven to be more resistant than the Angus breed, under conditions
468 of thermal comfort, when the Temperature and Humidity Index is less than 74. However, both
469 breeds present physiologically similar responses under heat stress conditions.

470 Considering that higher expression of the HSF1 and HSPA6 genes was observed in animals
471 classified as least adapted, which means those with a higher respiratory rate, it is believed that
472 these genes can be used as thermotolerance indicators in taurine cattle because they are indicators
473 of animals physiologically most adapted, within each breed, to the subtropical climate conditions.

474 Moreover, the physiological traits such as respiratory rate and rectal temperature also were
475 considered to be good indicators of biotypes better adapted of cattle raised under subtropical
476 climate conditions.

477

478 **References**

479

480 Ambaum, M.H.P., 2010. Thermal physics of the atmosphere. Advancing Weather and Climate
481 Science. Wiley-Blackwell, Chichester, pp240.

482

483 Archana, P.R., Aleena, J., Pragna, P., Vidya, M.K., Abdul Niyas, P.A., Bagath, M., Krishnan, G.,
484 Manimaran, A., Beena, V., Kurien, E.K., Sejian, V., Bhatta, R., 2017. Role of Heat Shock
485 Proteins in Livestock Adaptation to Heat Stress. *J. Dairy, Vet. Anim. Res.* 5, 13–19.
486 <https://doi.org/10.15406/jdvar.2017.05.00127>

487

488 Banerjee, D., Upadhyay, R.C., Chaudhary, U.B., Kumar, R., Singh, S., Ashutosh, Mohanarao,
489 J.G., Polley, S., Mukherjee, A., Das, T.K., De, S., 2014. Seasonal variation in expression
490 pattern of genes under HSP70: Seasonal variation in expression pattern of genes under
491 HSP70 family in heat- and cold-adapted goats (*Capra hircus*). *Cell Stress Chaperones* 19,
492 401–408. <https://doi.org/10.1007/s12192-013-0469-0>

493

494 Bharati, J., Dangi, S.S., Bag, S., Maurya, V.P., Singh, G., Kumar, P., Sarkar, M., 2017.
495 Expression dynamics of HSP90 and nitric oxide synthase (NOS) isoforms during heat stress
496 acclimation in Tharparkar cattle. *Int. J. Biometeorol.* 61, 1461–1469.
497 <https://doi.org/10.1007/s00484-017-1323-3>

498

499 Cardoso, C.C., Peripolli, V., Amador, S.A., Brandão, E.G., Esteves, G.I.F., Sousa, C.M.Z.,
500 França, M.F.M.S., Gonçalves, F.G., Barbosa, F.A., Montalvão, T.C., Martins, C.F., Fonseca
501 Neto, A.M., McManus, C., 2015. Physiological and thermographic response to heat stress in
502 zebu cattle. *Livest. Sci.* 182, 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2015.10.022>

503

504 Castro, S. V., Lobo, C.H., Figueiredo, J.R. de, Rodrigues, A.P.R., 2013. Proteínas de choque
505 térmico hsp 70: Estrutura e atuação em resposta ao estresse celular. *Acta Vet. Bras.* 7, 261–
506 271. <https://doi.org/10.21708/avb.2013.7.4.3273>

507

508 Collier, R.J., Dahl, G.E., VanBaale, M.J., 2006. Major Advances Associated with Environmental
509 Effects on Dairy Cattle. *J. Dairy Sci.* 89, 1244–1253. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72193-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72193-2)

510

511
512 Daugaard, M., Rohde, M., Jäätelä, M., 2007. The heat shock protein 70 family: Highly
513 homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett.* 581, 3702–3710.
514 <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.05.039>

515

516 Gaughan, J.B., Bonner, S.L., Loxton, I., Mader, T.L., 2013. Effects of chronic heat stress on
517 plasma concentration of secreted heat shock protein 70 in growing feedlot cattle. *J. Anim.*

- 518 Sci 91, 120–129. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5294>
519
- 520 Gupta, M., Kumar, S., Dangi, S.S., Jangir, B.L., 2013. Physiological, Biochemical and Molecular
521 Responses to Thermal Stress in Goats. *Int. J. Livest. Res.* 3.
522 <https://doi.org/10.5455/ijlr.20130502081121>
523
- 524 Hageman, J., van Waarde, M.A.W.H., Zylicz, A., Walerych, D., Kampinga, H.H., 2011. The
525 diverse members of the mammalian HSP70 machine show distinct chaperone-like activities.
526 *Biochem. J.* 435, 127–142. <https://doi.org/10.1042/BJ20101247>
527
- 528 Hahn, G.L., Chen, Y.R., Nienaber, J.A., Eigenberg, R.A., Parkhurst, A.M., 1992. Characterizing
529 animal stress through fractal analysis of thermo-regulatory responses. *J. Therm. Biol.* 17,
530 115–120. [https://doi.org/10.1016/0306-4565\(92\)90008-4](https://doi.org/10.1016/0306-4565(92)90008-4)
531
- 532 Hansen, P.J., 2004. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. *Anim.*
533 *Reprod. Sci.* 82–83, 349–360. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.011>
534
- 535 Hyder, I., Sejian, V., Bhatta, R., Gaughan, J.B., 2017a. Biological role of melatonin during
536 summer season related heat stress in livestock. *Biol. Rhythm Res.* 48, 297–314.
537 <https://doi.org/10.1080/09291016.2016.1262999>
538
- 539 Hyder, I., Pasumarti, M., Reddy, P.R., Prasad, C.S., Kumar, K.A., Sejian, V., 2017b.
540 Thermotolerance in Domestic Ruminants: A HSP70 Perspective, in: *Heat Shock Proteins in*
541 *Veterinary Medicine and Sciences*. pp. 3–35. https://doi.org/10.1007/978-3-319-73377-7_1
542
- 543 Johnson, J.S., Scharf, B., Weaver, R.L., Eichen, P.A., Spiers, D.E., 2012. Patterns of heat
544 response and adaptation on summer pasture: A comparison of heat-sensitive (Angus) and -
545 tolerant (Romosinuano) cattle. *J. Therm. Biol.* 37, 344–350.
546 <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2011.10.014>
547
- 548 Kamwanja, L.A., Chase, C.C., Gutierrez, J.A., Guerriero, V., Olson, T.A., Hammond, A.C.,
549 1994. Responses of Bovine Lymphocytes to Heat Shock as Modified by Breed and
550 Antioxidant Status. *J. Anim. Sci.*, 72: 438–444. <https://doi.org/10.2527/1994.722438x>
551
- 552 LCI – Livestock conservation Inc. Patterns of transit losses. Omaha, NE, 1970.
553
- 554 Maloyan, A., Palmon, A., Horowitz, M., 1999. Heat acclimation increases the basal HSP72 level
555 and alters its production dynamics during heat stress. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp.*
556 *Physiol.* 276, R1506–R1515. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1999.276.5.R1506>
557
- 558 Martello, L.S., 2006. 113p. Interação animal-ambiente: efeito do ambiente climático sobre as

- 559 respostas fisiológicas e produtivas de vacas holandesas em free-stall. Univ. São Paulo Fac.
560 Zootec. E Eng. Aliment, Pirassununga. [https://doi.org/10.11606/T.74.2006.tde-05102006-](https://doi.org/10.11606/T.74.2006.tde-05102006-091637)
561 091637
- 562
- 563 Mohanarao, G.J., Mukherjee, A., Banerjee, D., Gohain, M., Dass, G., Brahma, B., Datta, T.K.,
564 Upadhyay, R.C., De, S., 2014. HSP70 family genes and HSP27 expression in response to
565 heat and cold stress in vitro in peripheral blood mononuclear cells of goat (*Capra hircus*).
566 *Small Rumin. Res.* 116, 94–99. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2013.10.014>
- 567
- 568 Moura, C.S., Lollo, P.C.B., Morato, P.N., Amaya-Farfan, J., 2018. Dietary nutrients and
569 bioactive substances modulate heat shock protein (HSP) expression: A review. *Nutrients* 10,
570 1–13. <https://doi.org/10.3390/nu10060683>
- 571
- 572 Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.
573 *Nucleic Acids Res.* 29, 2002–2007. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- 574
- 575 Ribeiro, A.R.B., Alencar, M.M., Ibelli, A.M.G., Carvalho, F.M., Souza, J.R.T., Regitano, L.C.A.,
576 2009. Expressão de genes das proteínas de choque térmico em bovinos Nelore, Senepol X
577 Nelore e Angus X Nelore após estresse térmico. *Anais. 55º Congresso Brasileiro de*
578 *Genética, Águas de Lindóia.*
- 579
- 580 Ruijter, J.M., Ramakers, C., Hoogaars, W.M.H., Karlen, Y., Bakker, O., van den hoff, M.J.B.,
581 Moorman, A.F.M., 2009. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis
582 of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res.* 37. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp045>
- 583
- 584 Scharf, B., Carroll, J.A., Riley, D.G., Chase, C.C., Coleman, S.W., Keisler, D.H., Weaber, R.L.,
585 Spiers, D.E., 2010. Evaluation of physiological and blood serum differences in heat-tolerant
586 (romosinuano) and heat-susceptible (angus) *bos taurus* cattle during controlled heat
587 challenge. *J. Anim. Sci.* 88, 2321–2336. <https://doi.org/10.2527/jas.2009-2551>
- 588
- 589 Silanikove, N., 2000. Effects of heat stress on the welfare of extensively managed domestic
590 ruminants. *Livest. Prod. Sci.* 67, 1–18. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(00\)00162-7](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(00)00162-7)
- 591
- 592 Silva, R.G. da., 2000. *Introdução à bioclimatologia animal*, first ed. Nobel, São Paulo.
- 593
- 594 Silva, A.L. da, Sato, G.Y.P., Bordin, R.A., Reis, H.M.G., 2018. A Raça Senepol Como Opção
595 Para Melhoramento Genético Em Adaptabilidade Ao Clima Tropical. *Tekhne e Logos* 9,
596 16–30.
- 597
- 598 Svotwa, E., Makarau, A., Hamudikuwanda, H., 2007. Heat tolerance of Mashona, Brahman and
599 Simmental cattle breeds under warm humid summer conditions of Natural Region II area of

- 600 Zimbabwe. Electron. J. Environ. Agric. Food Chem. 6, 1934–1944.
601
- 602 Thom, E.C., 1958. Cooling degree: day air conditioning, heating and ventilating, first ed.
603 Transactions of the American Society of Heat Refrigeration and Air-Condition Engineering,
604 St. Joseph.
- 605
- 606 Wang, Q., Zhao, X., Zhang, Z., Zhao, H., Huang, D., Cheng, G., Yang, Y., 2017. Proteomic
607 analysis of physiological function response to hot summer in liver from lactating dairy cows.
608 J. Therm. Biol. 65, 82–87. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2017.02.010>
609