



## ANÁLISE PROTEÔMICA DE PLASMA NA IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES PARA TERMOTOLERÂNCIA EM BOVINOS

Henrique Gonçalves **Reolon**<sup>1</sup>; Ana Cláudia de **Freitas**<sup>2</sup>; Claudia Cristina Paro de **Paz**<sup>3</sup>; Nedenia Bonvino **Stafuzza**<sup>4</sup>

Nº 22705

**RESUMO** – A elucidação dos mecanismos moleculares responsáveis pela termotolerância são essenciais para aumentar a eficiência na reprodução, produção e melhorar a saúde e bem-estar animal. Assim, o objetivo deste estudo foi identificar potenciais biomarcadores para estresse térmico em bovinos Caracu através da análise proteômica do soro sanguíneo. A coleta de sangue foi realizada antes e após a exposição ao sol por sete horas e os animais foram classificados com alta e baixa termotolerância, por meio de um índice de tolerância ao calor. A análise proteômica foi realizada por espectrometria de massa de alta resolução e as proteínas identificadas exclusiva ou diferencialmente expressas antes e após a exposição solar em ambos os grupos (alta e baixa termotolerância) foram investigadas quanto às suas funções nos bancos de dados Gene Ontology e KEGG. O total de 540 proteínas foram detectadas, das quais 217 e 51 foram identificadas apenas em animais com alta e baixa termotolerância, respectivamente. Dentre as diferentes proteínas expressas, destacam-se 21 proteínas que atuam em vias relacionadas ao sistema imune, complemento e cascatas de coagulação sanguínea, via de sinalização PI3K-Akt, via de sinalização MAPK, entre outras. A identificação desses potenciais biomarcadores e a elucidação de suas funções moleculares e vias metabólicas contribuem para o entendimento dos mecanismos responsáveis pela resposta ao estresse térmico em bovinos de corte.

**Palavras-chaves:** Caracu, estresse térmico, plasma sanguíneo, proteômica, vias metabólicas.

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Zootecnia, IFRO, Colorado do Oeste-RO; [henriqueg.reolon@gmail.com](mailto:henriqueg.reolon@gmail.com)

2 Colaboradora: Pós-doutoranda do Instituto de Zootecnia, Sertãozinho-SP.

3 Colaboradora: Pesquisadora do Instituto de Zootecnia, Sertãozinho-SP.

4 Orientadora: Jovem Pesquisadora do Instituto de Zootecnia, Sertãozinho-SP; [nedeniabs@gmail.com](mailto:nedeniabs@gmail.com).



**ABSTRACT** – *The elucidation of molecular mechanisms responsible for thermotolerance are essential to increase efficiency in reproduction, production and improve the animal health and welfare. Thus, the aim of this study was to identify potential biomarkers for heat stress in Caracu beef cattle through proteomic analysis of blood serum. Blood collection was performed before and after exposure to the sun for seven hours and the animals were classified as high and low thermotolerant through a heat tolerance index. Proteomic analysis was performed by high resolution mass spectrometry and the proteins identified exclusively or differentially expressed before and after sun exposure in both groups (high and low thermotolerant) were investigated for their functions in the Gene Ontology and KEGG databases. A total of 540 proteins were detected, of which 217 and 51 were detected only in high and low thermotolerant animals, respectively. Among the different expressed proteins, we highlighted 21 proteins that acts in pathways related to the immune system, complement and blood coagulation cascades, PI3K-Akt signaling pathway, MAPK signaling pathway, among others. The identification of these potential biomarkers and the elucidation of their molecular functions and metabolic pathways contribute to understanding the mechanisms behind the response to heat stress in beef cattle.*

**Keywords:** Blood serum, Caracu, heat stress, metabolic pathways, proteomics.

## 1. INTRODUÇÃO

O estresse térmico resulta do desequilíbrio na homeostase e afeta principalmente os bovinos de corte, devido à natureza extensiva dos sistemas de produção utilizado nos países com clima tropical (HERBUT et al., 2018), o qual provoca impactos negativos nas respostas físico-químicas e imunológicas, além de alterar características fisiológicas e o desempenho dos animais (MAIBAM et al., 2018; SHEIKH et al., 2017). Os bovinos são homeotérmicos e podem sofrer estresse térmico quando a temperatura é superior ou inferior à zona de termoneutralidade, a qual consiste em uma faixa de temperatura que proporciona conforto térmico com o gasto mínimo de energia para manter a homeotermia. Para que o animal consiga se manter dentro da zona de termoneutralidade, há a necessidade de aumentar ou diminuir a perda de calor conforme o ambiente e o seu estado térmico. A dissipação de calor pode ser realizada através de mecanismos como respiração (perda de calor pelo trato respiratório ou pela evaporação da umidade da superfície da pele), convecção (perda de calor do corpo para um fluido líquido ou gasoso como, por exemplo, o ar ou a água) e condução (dissipação de calor do corpo para outro objeto sólido) (BROWN-BRANDL, 2018).

A incapacidade do animal de dissipar calor através de mecanismos fisiológicos pode provocar o aumento da temperatura corporal. Segundo McDowell et al. (1976), o aumento da temperatura retal em apenas 1 °C já é suficiente para diminuir o desempenho dos animais de produção, causando alterações como diminuição na ingestão de alimentos e consequente depressão no ganho de peso. Embora os mecanismos fisiológicos de resposta ao estresse térmico garantam a sobrevivência do animal, também prejudicam o seu desempenho, pois a energia que poderia ser direcionada para a produção é redirecionada para a ativação de mecanismos termorregulatórios visando equilibrar as funções nos organismos (PRAGNA et al., 2017; BAENA et al., 2019).

Diante do estresse térmico, as células do sistema imunológico são essenciais para ativação da resposta inflamatória e para o estímulo da expressão de moléculas pró-inflamatórias (citocinas), protegendo os animais contra fatores estressores (CARROLL; FORSBERG, 2007). As citocinas estimulam a liberação adicional de glicocorticoides, evidenciando a associação entre estresse e resposta inflamatória (ELENKOV; CHROUSOS, 2002). Alguns hormônios também desempenham papéis fundamentais na termorregulação, principalmente em ambientes com elevadas temperaturas. Quando o animal é exposto a temperaturas acima da zona de termoneutralidade, uma das principais alterações fisiológicas implica na ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, o que resulta em alterações no sistema endócrino (BINSIYA et al., 2017). O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal é essencial para o início das respostas fisiológicas e endócrinas frente ao estresse, uma vez que mudanças nas condições ambientais estimulam o sistema nervoso periférico que é integrado ao

sistema nervoso central, onde ocorre a liberação do hormônio liberador de corticotrofina e vasopressina (BOVA et al., 2014). O aumento na concentração desses hormônios ativa o eixo adrenal e estimulam a síntese e secreção do hormônio adrenocorticotrófico, que atua no córtex adrenal para sintetizar e secretar cortisol (SANIN et al., 2016). Além disso, os tecidos têm a capacidade de inativar localmente o cortisol disponível dentro das células através da enzima 11 $\beta$ -hidroxiesteróide-desidrogenase, que converte cortisol em cortisona (STUBSJOEN et al., 2015).

Embora os bovinos possam se adaptar a diferenças na temperatura ambiental, os mecanismos de resposta que garantem sua sobrevivência também prejudicam seu desempenho, pois a energia que seria direcionada para a produção é redirecionada para a ativação de mecanismos termorregulatórios que atuarão no equilíbrio metabólico do organismo, causando alterações como diminuição na ingestão de alimentos e consequente diminuição de ganho de peso (PRAGNA et al., 2017; BAENA et al., 2019). Sabe-se que animais zebuínos (*Bos taurus indicus*) possuem maior capacidade de tolerância ao calor em relação aos taurinos (*Bos taurus taurus*) (SEJIAN et al., 2018). Entretanto, raças taurinas também podem desenvolver tolerância às condições climáticas tropicais como é o exemplo de algumas raças crioulas, como a Caracu, que foi formada após cruzamentos não controlados entre bovinos europeus introduzidos no Brasil a partir de 1534 e desenvolveram adaptações ao ambiente tropical ao longo de quatro séculos de seleção natural (LIMA et al., 1992).

A raça Caracu apresenta o maior rebanho efetivo entre as raças crioulas (ABC CARACU, 2022). Apesar de se tratar de uma raça taurina, os animais apresentam adaptação ao clima tropical e subtropical brasileiro, apresentando características de qualidade de carne de animais taurinos (maciez), combinada com a habilidade de se desenvolver em qualquer região do país, característica típica dos zebuínos (MCMANUS et al., 2010). Tal fato tem favorecido o uso da raça Caracu em cruzamentos industriais produzindo animais com alto grau de heterose e excelentes características produtivas, melhorando a eficiência nutricional e a qualidade da carne (REIS et al., 2015; MENEZES et al., 2016). Além disso, a raça destaca-se também quanto à rusticidade, termotolerância, resistência a parasitas, habilidade materna, facilidade de parto e longevidade dos reprodutores, que se destacam no cruzamento a campo com bom desempenho na monta natural (MCMANUS et al., 2010). Tais características tornam a raça Caracu uma opção bastante viável para o pecuarista em relação a outras raças taurinas (MENEZES et al., 2016). A preservação da raça Caracu em rebanhos puros também é importante, pois o material genético de raças crioulas pode se tornar mais produtivo em seus próprios ambientes que raças exóticas melhoradas, por terem sofrido rigorosa seleção natural.

Diante da importância da raça Caracu na pecuária nacional, bem como a relevância de se entender os mecanismos moleculares responsáveis pelas mudanças fisiológicas frente ao estresse

térmico, o objetivo deste estudo foi identificar potenciais biomarcadores para termotolerância em bovinos Caracu por meio da análise proteômica do plasma sanguíneo de animais submetidos ao estresse térmico.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Centro Avançado de Pesquisa e Desenvolvimento de Bovinos de Corte do Instituto de Zootecnia (IZ), Sertãozinho-SP. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA nº 237-16) do IZ.

Foram utilizados 91 animais Caracu com cerca de 17 meses de idade, do mesmo grupo de contemporâneos. Visando minimizar o estresse provocado pelo manejo, foi realizada a adaptação dos animais ao tronco de contenção que consistiu na passagem e permanência de cada animal por 2 minutos no tronco, em horários próximos aos que seriam realizadas as coletas, durante 20 dias. O experimento consistiu em manter todos os animais em um piquete com disponibilidade de água e alimento, os quais foram submetidos a dois tratamentos: 1) manhã: coleta de sangue e mensuração da temperatura retal entre 4:00 e 6:00 h, sem que os animais tenham sido expostos ao sol e com a temperatura do globo negro abaixo de 25°C; e 2) tarde: coleta de sangue e mensuração da temperatura retal entre 14:00 e 16:00 h, após os animais serem mantidos no mesmo piquete, porém com exposição ao sol e sem disponibilidade de sombra, por um período de sete horas (7:00-14:00 h) quando a temperatura do globo negro atingiu valores superiores a 45°C.

As características ambientais foram obtidas através de uma base meteorológica de termômetro de globo negro digital (ITEG-500, Incon Eletronica Ltda) alocada no piquete onde foi realizado o experimento. Para avaliar as diferenças nas características ambientais durante os dois tratamentos (manhã e tarde), foi realizado o Teste Tukey ( $P < 0,05$ ) por meio do procedimento GLM do SAS v. 9.2 (SAS Inst. Inc., EUA).

Para obtenção da temperatura retal (°C), um termômetro clínico veterinário (Incoterm, 6200.03, ANIMED) com escala até 44 °C foi introduzido a 3,5 cm de profundidade no reto do animal e mantido por 2 minutos. O estresse térmico foi determinado utilizando como referência o índice de tolerância ao calor, descrito pela fórmula:  $ITC = 10 - (TR2 - TR1)$ , onde TR2 é a temperatura retal após o estresse térmico, e TR1 é a temperatura retal antes do estresse térmico (BACCARI JUNIOR et al., 1986). Esse índice foi adotado com medida de estresse térmico dos animais, uma vez que o animal quando em estresse térmico tende a apresentar aumento de temperatura interna.

Amostras de 500 µL de plasma de cada um dos oito animais mais termotolerantes (amostras coletadas antes e após estresse térmico, totalizando 16 amostras) e dos oito animais menos



termotolerantes (16 amostras) foram utilizadas para a identificação de proteínas por espectrometria de massa de alta resolução, cuja metodologia consistiu em cinco etapas: remoção de albumina, quantificação de proteínas, SDS-PAGE, preparação das amostras para análise proteômica e análise por espectrometria de massas avançada, descritas brevemente a seguir.

A remoção da albumina foi realizada com a resina Hibind Cibacron Blue Agarose Beads (Sigma-Aldrich) empacotada em coluna Spin Screw Cap (Pierce), conforme instruções do fabricante. A quantificação proteica foi realizada em duplicada, pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). A absorbância foi lida em 595 nm no espectrofotômetro SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices) e a massa total de proteínas em cada amostra foi estimada. A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi realizada para avaliação do perfil proteico a partir de 20 µg de cada amostra, ressuspensa em tampão XT 1X (BioRad) com 20 µg de ditioneitol (DTT, GE) para a redução das pontes de dissulfeto, seguida de alquilação com 100 µg de iodoacetamida (Sigma Ultra). A eletroforese foi realizada em géis de poliacrilamida a 40 V por 30 minutos e 70 V por 2 horas no sistema Mini-PROTEAN II Electrophoresis System (BioRad).

A preparação das amostras para a espectrometria de massas avançada consistiu de 3 etapas principais: 1) redução e alquilação das proteínas; 2) digestão enzimática das proteínas com tripsina; e 3) limpeza e dessalinização das amostras. Em resumo, 50 µg de cada amostra foi submetida a redução das pontes de dissulfeto das proteínas pela adição de DTT (1mg DTT/mg proteína), seguida da alquilação pela adição de iodoacetamida (3 mg IA/mg proteína). O volume das amostras foi diluído 5X em solução de 0,1 M de bicarbonato de amônio (pH ≥8,0) obtendo-se um volume final de 500 µL. As amostras foram então incubadas com 1 µg de tripsina (Promega) à 37°C durante a noite. A limpeza e dessalinização das amostras foi realizada com a coluna OASIS HLB Cartridge 1cc (Waters), conforme indicação do fabricante. As amostras foram em seguida secas em speed vac e cerca de 2 µg de cada amostra foram injetadas para análise no espectrômetro de massas Orbitrap Eclipse (ThermoFisher) acoplado a um sistema de cromatografia nanoflow Nano LC-MS/MS (Dionex Ultimate 3000 RLSCnano System, Thermofisher). Os peptídeos foram separados em coluna Nanoease MZ peptide BEH C18 (130A, 1.7µm, 75µmx250mm, Waters) 300 nL/minuto utilizando um gradiente de 4-50% de acetonitrile em 90 minutos. Os dados foram adquiridos no MS1 na faixa de M/Z 375–1500 (120.000 de resolução, AGC target 1 E6 com tempo máximo de injeção de 100 ms). Os íons mais abundantes foram submetidos a MSMS com energia de colisão de 30%, janela de isolamento de precursor de 1.2 m/z, AGC target 1E5 e resolução de 15.000.

Os dados brutos foram processados utilizando o algoritmo Comet (v. 2018) e banco de dados do bovino Uniprot (<https://www.uniprot.org/>). Os peptídeos identificados que atingiram o critério máximo de 5% de erro pelo Peptide Prophet foram utilizados para a extração da intensidade para

quantificação pelo algoritmo Xpress. Os peptídeos e suas intensidades foram agrupados para gerar a intensidade da proteína utilizando um script na linguagem R. Proteínas com concentrações acima de 2X em um dos grupos foram consideradas super expressas. Informações sobre funções moleculares, processos biológicos e vias metabólicas em que as proteínas atuam foram obtidas nos bancos de dados Gene Ontology (<http://geneontology.org/>) e KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>). As interações diretas (física) e indiretas (funcional) entre as proteínas diferencialmente expressas em ambos os grupos, foram obtidas por meio do programa String (<https://string-db.org/>).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as variáveis ambientais avaliadas apresentaram diferenças significativas ( $P < 0,0001$ ) entre os tratamentos manhã e tarde (Tabela 1). As diferenças nas características ambientais refletiram diretamente no índice de tolerância ao calor (ITC) dos animais, o qual variou de 7,2 a 9,7 ( $8,5 \pm 0,49$ ). A mediana (8,6) e moda (8,6) desta variável demonstraram que existe variabilidade dentro deste rebanho. Para a análise proteômica, foram considerados termotolerantes e suscetíveis os animais que apresentaram ITC entre 9,7 e 9,0 e entre 7,9 e 7,2, respectivamente.

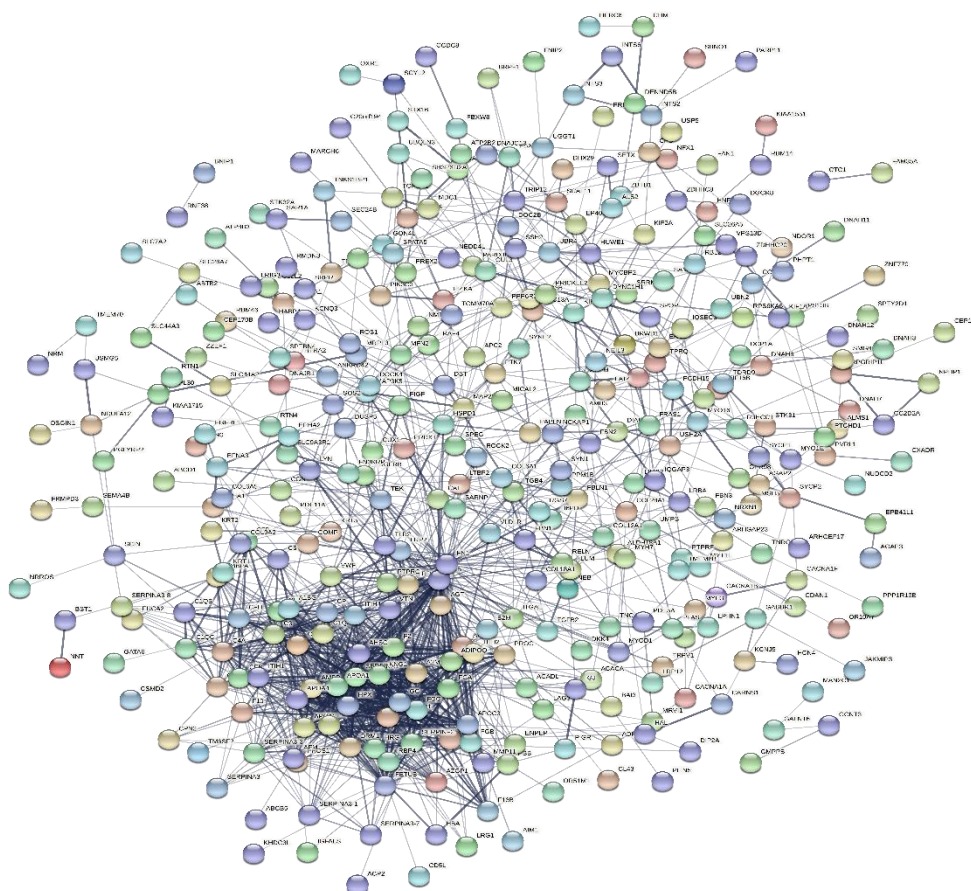
**Tabela 1.** Médias estimadas por quadrados mínimos, seguidas de erro padrão, para as características ambientais obtidas durante os tratamentos manhã e tarde.

Variável	Manhã $\pm$ EP	Tarde $\pm$ EP	Diferença $\pm$ EP
<b>Bulbo úmido (°C)</b>	20,71 $\pm$ 0,10	36,35 $\pm$ 0,10	15,64 $\pm$ 0,14
<b>Bulbo seco (°C)</b>	20,60 $\pm$ 0,09	35,93 $\pm$ 0,09	15,33 $\pm$ 0,12
<b>Globo negro (°C)</b>	20,70 $\pm$ 0,21	49,15 $\pm$ 0,21	28,45 $\pm$ 0,30
<b>IBUTG externo</b>	20,69 $\pm$ 0,12	38,87 $\pm$ 0,12	18,18 $\pm$ 0,16
<b>IBUTG interno</b>	20,71 $\pm$ 0,13	40,19 $\pm$ 0,13	19,48 $\pm$ 0,18

IBUTG: índice de bulbo úmido e termômetro de globo negro

Foram identificadas 540 proteínas nas 32 amostras avaliadas, das quais 217 foram detectadas apenas nos animais termotolerantes, 51 apenas nos animais susceptíveis e 272 foram detectadas em ambos os grupos. Foram identificadas 472 proteínas diferencialmente expressas nos animais termotolerantes, das quais 233 foram identificadas apenas antes do estresse térmico, 71 apenas após o estresse térmico, 130 e 38 apresentaram expressão aumentada e diminuída, respectivamente, após o estresse térmico. Já nos animais susceptíveis foram detectadas 316 proteínas diferencialmente expressas, das quais 85 foram detectadas apenas antes do estresse térmico, 99 apenas após o estresse térmico, 114 e 18 proteínas apresentaram expressão aumentada e diminuída, respectivamente, após o estresse térmico. As interações físicas e funcionais entre as proteínas diferencialmente expressas em ambos os grupos, estão ilustradas na Figura 1.





**Figura 1.** Interações diretas (físicas) e indiretas (funcionais) validadas entre as proteínas identificadas como diferencialmente expressas antes e após o estresse térmico em ambos os grupos.

Entre os potenciais biomarcadores para o estresse térmico, identificados a partir das proteínas diferencialmente expressas entre os períodos manhã e tarde e detectadas apenas nos animais menos termotolerantes, destacam-se *ABCD1*, *ALS2*, *CACNA1F*, *DNAJB1*, *DNAJC13*, *DYNC1H1*, *MAP3K5*, *MICAL2*, *NDOR1*, *OSGIN1*, *OXR1*, *PLIN5*, *PRDX1*, *SH3PXD2A*, *SOS2*, *TRPV1* e *VNN1*. Já entre os potenciais biomarcadores identificados a partir das proteínas diferencialmente expressas entre os períodos manhã e tarde e detectadas apenas nos animais mais termotolerantes, destacam-se *CAT*, *F2*, *HTRA2* e *RPS6KA6*.

A alteração do perfil proteico após o estresse térmico, avaliada por meio das proteínas diferencialmente expressas, impacta importantes vias metabólicas, funções moleculares e processos biológicos, dentre os quais destacam-se: resposta celular ao calor (GO:0034605) e ao estresse oxidativo (GO:0034599), ligação à proteína de choque térmico (GO:0031072), resposta à hipóxia (GO:0001666 e GO:0071456), resposta inflamatória aguda (GO:0002526) e crônica (GO:0002544), fosforilação oxidativa (GO:0006119, GO:0002082 e bta00190), processo metabólico de superóxido (GO:0006801), remoção de radicais superóxido (GO:0019430), detecção (GO:0070994) e resposta



ao estresse oxidativo (GO:0006979, GO:0008631, GO:1900407, GO:1900408, GO:1902176 e GO:1903204), proteção à UV (GO:0009650), regulação da cascata MAPK ativada por estresse (GO:0032872 e GO:0032874), montagem de grânulos de estresse (GO:0034063), regulação positiva da cascata de sinalização de proteína quinase ativada por estresse (GO:0070304), transporte de oxigênio (GO:0015671), processo metabólico de espécies reativas de oxigênio (GO: 0072593 e GO:2000378), desintoxicação celular oxidante (GO: 0098869), cascatas de complemento e coagulação (bta04610), síntese e secreção de cortisol (bta04927), termogênese (bta04714), além das vias de sinalização PI3K-Akt (bta04151), Rap1 (bta04015), MAPK (bta04010) e PPAR (bta03320).

Diversos estudos têm reportado que o estresse térmico afeta negativamente as funções do sistema imune. O sistema complemento é um grande efetor da resposta imune pois se trata da principal linha de defesa contra infecções, além de desencadear diversos mecanismos imunoregulatórios, desempenhando papéis fundamentais nas imunidades inata e adaptativa. Animais deficientes em componentes do complemento exibem maior suscetibilidade a infecções, respostas de células T e B prejudicadas, atividade fagocítica reduzida e dificuldade na eliminação de patógenos (MIN et al., 2016). Os resultados deste estudo indicam que o estresse térmico diminui a abundância de componentes do sistema complemento do plasma sanguíneo, corroborando com a estreita relação descrita entre o estresse térmico e a ativação do sistema imune.

O cortisol influencia diretamente o metabolismo e a resposta comportamental de animais sob estresse térmico favorecendo a glicogenólise, lipólise e proteólise para fornecer a energia necessária para restaurar a homeostase (MADHUSOODAN et al., 2019). Estudos com bovinos observaram níveis elevados de cortisol plasmático quando os animais estão em ambientes com temperaturas elevadas (KIM et al., 2019; PIRES et al., 2019). Níveis de cortisona alterados devido à influência do estresse térmico também são descritos na literatura, o que proporciona a sobrevivência do animal e prejudica suas funções produtivas e reprodutivas (KHODAEI-MOTLAGH et al., 2011; SAMMAD et al., 2019). O rápido aumento da expressão das proteínas de choque térmico (heat shock proteins) em resposta ao calor também é amplamente descrito na literatura (MISHRA et al., 2021).

A via de sinalização PI3K-Akt é ativada por diversos tipos de estímulos celulares, o qual regula funções celulares fundamentais como transcrição, tradução, proliferação, crescimento e sobrevivência. Estudos têm reportado que essa via desempenha importante papel na prevenção da apoptose induzida pelo estresse térmico (GAO et al., 2013). Já a via de sinalização Rap1 está intimamente associada à regulação do balanço energético, incluindo a homeostase de glicose e o metabolismo lipídico, desempenhando um papel importante na regulação da homeostase energética em condições de estresse térmico (KANEKO et al., 2016).



Proteínas MAPKs representam uma família de serina/treonina quinases que atuam em vias de sinalização que participam de uma diversidade de processos biológicos essenciais. As múltiplas vias de sinalização MAPK permitem respostas coordenadas e integradas a diversos estímulos como, por exemplo, hormônios, fatores de crescimento, citocinas e estresses ambientais. As vias MAPK, uma vez ativadas, exercem grandes efeitos na fisiologia celular, pois orquestram o recrutamento de transcrição gênica, biossíntese de proteínas, controle do ciclo celular, apoptose e diferenciação celular. A maioria das vias MAPK, juntamente com a via NF- $\kappa$ B, são recrutadas por estresse e estímulos inflamatórios para que ocorra a ativação do sistema imune e proteção contra o estresse oxidativo, mecanismos indispensáveis para a manutenção da homeostase do organismo (KYRIAKIS; AVRUCH, 2012).

#### 4. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados são robustos e sugerem que as proteínas diferencialmente expressas identificadas no plasma sanguíneo podem ser utilizadas para categorizar os animais com base na termotolerância de maneira rápida, uma vez que esses potenciais biomarcadores apresentaram alta sensibilidade e especificidade para distinguir animais termotolerantes de susceptíveis. A identificação desses potenciais biomarcadores e a elucidação das suas funções moleculares e vias metabólicas que atuam contribuem para a compreensão dos mecanismos envolvidos na resposta ao estresse térmico em bovinos de corte. Recomenda-se a validação dos resultados obtidos por meio da utilização de um número maior de animais e da inclusão de diferentes raças.

#### 5. AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela bolsa PIBIC concedida ao aluno HGR (#120621/2021-5). Os autores gostariam de agradecer a FAPESP pelo financiamento do projeto de pesquisa (#2018/19216-7), bolsa JP concedida à NBS (#2019/10438-0) e bolsas TT3 (#2019/17251-2 e #2020/03699-9).

#### 6. REFERÊNCIAS

ABC CARACU - Associação Brasileira dos Criadores de Caracu. Disponível em: <<http://www.abccaracu.com.br>> Acesso em: 26 junho 2022.

BACCARI JUNIOR, F.; POLASTRE, R.; FRÉ, C. A.; ASSIS, P. S. Um novo índice de tolerância ao calor para bubalinos: correlação com o ganho de peso. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE DE ZOOTECNIA, 23, 1986, Campo Grande, MS. **Anais...** Campo Grande: SBZ, 1986. p. 316.

BAENA, M. M.; COSTA, A. C.; VIEIRA, G. R.; ROCHA, R. F. B.; RIBEIRO, A. R. B.; IBELLI, A. M. G.; MEIRELLES, S. L. C. Heat tolerance responses in a *Bos taurus* cattle herd raised in a Brazilian climate. **Journal of Thermal Biology**, v. 81, p. 162-169, 2019.



BINSIYA, T. K.; SEJIAN, V.; BAGATH, M.; KRISHNAN, G.; HYDER, I.; MANIMARAN, A.; LEES, A. M.; GAUGHAN, J. B.; BHATTA, R. Significance of hypothalamic-pituitary-adrenal axis to adapt to climate change in livestock. **International Research Journal of Agricultural and Food Sciences**, v. 2, p. 1-20, 2017.

BOVA, T. L.; CHIAVACCINI, L.; CLINE, G. F.; HART, C. G.; MATHENY, K.; MUTH, A. M.; VOELZ, B. E.; KESLER, D.; MEMILI, E. Environmental stressors influencing hormones and systems physiology in cattle. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 12, 58, 2014.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BROWN-BRANDL, T. M. Understanding heat stress in beef cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 47, 2018.

CARROLL, J. A.; FORSBERG, N. E. Influence of Stress and Nutrition on Cattle Immunity. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 23, p. 105–149, 2007.

ELENKOV, I. J.; CHROUSOS, G. P. Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 966, p. 290–303, 2002.

GAO, Z.; LIU, F.; YIN, P.; WAN, C.; HE, S.; LIU, X.; ZHAO, H.; LIU, T.; XU, J.; GUO, S. Inhibition of heat-induced apoptosis in rat small intestine and IEC-6 cells through the AKT signaling pathway. **BMC Veterinary Research**, v. 9, 241, 2013.

HERBUT, P.; ANGREGKA, S.; WALCZAK, J. Environmental parameters to assessing of heat stress in dairy cattle – a review. **International Journal of Biometeorology**, v. 62, p. 2089-2097, 2018.

KANEKO, K.; XU, P.; CORDONIER, E. L.; CHEN, S. S.; NG, A.; XU, Y.; MOROZOV, A.; FUKUDA, M. Neuronal Rap1 regulates energy balance, glucose homeostasis, and leptin actions. **Cell Reports**, v. 16, p. 3003–3015, 2016.

KIM, W. S.; LEE, J. S.; JEON, S. W.; PENG, D. Q.; KIM, Y. S.; BAE, M. H.; JO, Y. H.; LEE, H. G. Correlation between blood, physiological and behavioral parameters in beef calves under heat stress. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 31, p. 919-925, 2018.

KHODAEI-MOTLAGH, M.; SHAHNEH, A. Z.; MASOUMI, R.; DERENSIS, F. Alternations in reproductive hormones during heat stress in dairy cattle. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 5552-5558, 2011.

KYRIAKIS, J. M.; AVRUCH, J. Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. **Physiological Reviews**, v. 92, p. 689-737, 2012.

LIMA, M. L. P.; BONILHA NETO, L. M.; FIGUEIREDO, L. A.; RAZOOK, A. G. Os bovinos da raça Caracu. **Zootecnia**, v. 30, p.1-12, 1992.

MADHUSOODAN, A. P.; SEJIAN, V.; RASHAMOL, V. P.; SAVITHA, S. T.; BAGATH, M.; KRISHNAN, G.; BHATTA, R. Resilient capacity of cattle to environmental challenges – An updated review. **Journal of Animal Behaviour and Biometeorology**, v. 7, p. 104-118, 2019.

MAIBAM, U.; HOODAA, O.K.; SHARMAB, P.S.; UPADHYAYA, R.C.; MOHANTY, A.K. Differential level of oxidative stress markers in skin tissue of zebu and crossbreed cattle during heat stress. **Livestock Science**, v. 207, p. 45–50, 2018.

MCDOWELL, R. Ej; HOOVEN, N. W.; CAMOENS, J. K. Effect of climate on performance of Holsteins in first lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 59, p. 965-971, 1976.



McMANUS, C.; RIBEIRO, R.; SEIXAS, L.; MELO, C. A raça Caracu. INCT: Informação Genético- Sanitária da Pecuária Brasileira. 2010. Disponível em: <[http://inctpecuaria.com.br/images/informacoes-tecnicas/serie\\_tecnica\\_raca\\_caracu.pdf](http://inctpecuaria.com.br/images/informacoes-tecnicas/serie_tecnica_raca_caracu.pdf)> Acesso em: 10 de julho de 2022.

MENEZES, G. R. O.; ROSA, A. N. F.; PEREIRA, G. M. Cruzamentos aplicados à pecuária de corte. **Informe Agropecuário**, v. 37, p. 97-107, 2016.

MIN, L.; CHENG, J.; ZHAO, S.; TIAN, H.; ZHANG, Y.; LI, S.; YANG, H.; ZHENG, N.; WANG, J. Plasma-based proteomics reveals immune response, complement and coagulation cascades pathway shifts in heat-stressed lactating dairy cows. **Journal of Proteomics**, v. 146, p. 99-108, 2016.

MISHRA, S. R. Thermoregulatory responses in riverine buffaloes against heat stress: An updated review. **Journal of Thermal Biology**, v. 96, 102844, 2021.

PIRES, B. V.; STAFUZZA, N. B.; LIMA, S. B. G. P. N. P.; NEGRÃO, J. A.; PAZ, C. C. P. Differential expression of heat shock protein genes associated with heat stress in Nelore and Caracu beef cattle. **Livestock Science**, v. 230, 103839, 2019.

PRAGNA, P.; SEJIAN, V.; SOREN, N.M.; BAGATH, M.; KRISHNAN, G.; BEENA, V.; DEVI, P.I.; BHATTA, R. Summer season induced rhythmic alterations in metabolic activities to adapt to heat stress in three indigenous (Osmanabadi, Malabari and Salem Black) goat breeds. **Biological Rhythm Research**, v. 49, p. 551-565, 2017.

REIS, S. F.; FAUSTO, D. A.; MEDEIROS, S. R.; PAULINO, P. V. R.; VALADARES FILHO, S. C.; TORRES JUNIOR, R. A. A. Feed efficiency and meat quality of crossbred beef heifers classified according to residual feed intake. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 16, p. 632-642, 2015.

SAMMAD, A.; UMER, S.; SHI, R.; ZHU, H.; ZHAO, X.; WANG, Y. Dairy cow reproduction under the influence of heat stress. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 104, p. 978-986, 2019.

SANIN, Y. L.; CABRERA, A. M. Z.; MORALES, A. M. T. Adaptative responses to thermal stress in mammals. **Revista de Medicina Veterinaria**, v. 31, p. 121-135, 2016.

SEJIAN, V.; BHATTA, R.; GAUGHAN, J.B.; DUNSHEA, F.R.; LACETERA, N. Review: Adaptation of animals to heat stress. **Animal**, v. 12, p. s431-s444, 2018.

SHEIKH, A.A.; AGGARWAL, A.; INDU, B.; AARIF, O. Norganic zinc supplementation modulates heat shock and immune response in heat stressed peripheral blood mononuclear cells of periparturient dairy cows. **Theriogenology**, v. 95, p. 75-82, 2017.

STUBSJOEN, S. M.; BOHLIN, J.; DAHL, E.; KNAPPE-POINDECKER, M.; FJELDAAS, T.; LEPSCHY, M.; PALME, R.; LANGBEIN, J.; ROPSTAD, E. Assesment of chronic stress in sheep (part 1): The use of cortisol and cortisone in hair as non-invasive biological markers. **Small Ruminant Research**, v. 132, p. 25-31, 2015.