

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Araçatuba

GABRIELA DA SILVA FERREIRA

**ANÁLISE DA ATIVIDADE MITOCONDRIAL E MECANISMOS
DE ADAPTAÇÃO EM BOVINOS SUBMETIDOS AO
ESTRESSE PELO CALOR**

ARAÇATUBA/SP
2019

GABRIELA DA SILVA FERREIRA

**ANÁLISE DA ATIVIDADE MITOCONDRIAL E MECANISMOS
DE ADAPTAÇÃO EM BOVINOS SUBMETIDOS AO
ESTRESSE PELO CALOR**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária “Júlio de Mesquita Filho” UNESP - campus Araçatuba/SP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

Orientador: Prof. Dr. Guilherme de Paula Nogueira.

ARAÇATUBA - SP
2019

F383a Ferreira, Gabriela da Silva
ANÁLISE DA ATIVIDADE MITOCONDRIAL E
MECANISMOS DE ADAPTAÇÃO EM BOVINOS
SUBMETIDOS AO ESTRESSE PELO CALOR / Gabriela
da Silva Ferreira. -- Araçatuba, 2019
64 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
(Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba
Orientador: Guilherme de Paula Nogueira

1. Bovinos. 2. Adaptação fisiológica. 3. Metabolismo. 4.
Mitocôndrias. 5. Temperatura corporal. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

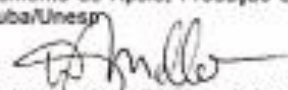
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

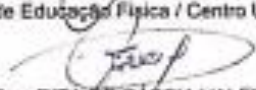
Título: ANÁLISE DA ATIVIDADE MITOCONDRIAL E MECANISMOS DE ADAPTAÇÃO EM BOVINOS
SUBMETIDOS AO ESTRESSE PELO CALOR

AUTORA: GABRIELA DA SILVA FERREIRA
ORIENTADOR: GUILHERME DE PAULA NOGUEIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIA ANIMAL, área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. GUILHERME DE PAULA NOGUEIRA
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp


Prof. Dr. WAGNER GARCEZ DE MELLO
Curso de Educação Física / Centro Universitário Toledo de Araçatuba


Profa. Dra. RITA DE CÁSSIA VALENTE FERREIRA
Curso de Nutrição / Centro Universitário Toledo de Araçatuba


Pós-doutorando MARCO MICANESI
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp


Prof. Dr. RAFAEL SILVA GIPRIANO
Curso de Medicina Veterinária / Centro Universitário Católica Salesiano Auxilium de Araçatuba

Araçatuba, 21 de janeiro de 2019.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Gabriela da Silva Ferreira – nascida em 22 de setembro de 1986 no município de Araçatuba – SP. cursou o ensino fundamental e médio na Escola Estadual Peri Martins, no município de Bataguassu - MS. Ingressou no curso de Nutrição na Universidade Paulista campus de Araçatuba – SP em 2004 e formou-se no ano de 2008. Realizou o curso de Pós-graduação *Lato Sensu* – Especialização em Terapia Nutricional Clínico Hospitalar no período de 03/2009 à 01/2010 na Universidade de Rio Preto – UNIRP – SP e especialização em Nutrição esportiva pelo Centro Universitário Toledo campus de Araçatuba/SP no período de 02/2016 à 12/2017. Atuou em 2009 à 2015 como orientadora de estágio na clínica de saúde da Universidade Paulista campus de Araçatuba/SP. Desde 08/2012 é docente do Centro Universitário Toledo e desde 08/2014 é docente do curso de nutrição da Universidade Paulista campus de São José do Rio Preto/SP. Mestre pelo curso de Pós-graduação em Ciência Animal na FMVA/UNESP, na área de Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal.

Dedico à minha família, com muito amor.

Meus pais que sempre me incentivaram a estudar, me apoiando nas horas mais difíceis e orando, pedindo a Deus para que eu suportasse tudo. Ao meu esposo que nunca mede esforços sob atitudes de compreensão e incentivo. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por toda bênção. Ele sempre me dá forças para continuar e sabedoria para caminhar. Que a minha fé aumente a cada dia.

À minha família e amigos, cada palavra de ânimo foi significativa e me impulsionou para o término desse trabalho.

À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”** campus Araçatuba – FMVA, desde direção, coordenadores, professores, colaboradores, amigos que fiz. Obrigada pela oportunidade e apoio.

Ao **CNPQ** em colaboração com a **Universidad del Sacro Cuore di Placência** na Itália e ao **Laboratório de endocrinologia** da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” campus de Araçatuba/SP.

Ao meu professor orientador **Dr. Guilherme de Paula Nogueira** por todo ensino com paciência, sabedoria, confiança e dedicação notória ao que faz com amor. Nunca aprendi tanto em tão pouco tempo. Obrigada por tudo!

Aos meus queridos amigos **Doralice de Souza Sumida, Danilo G. Sandre e Bruno Fonseca Martins da Costa Andrade** por terem me incentivado a iniciar o doutorado com palavras de ânimo, indicação do caminho a ser seguido e o processo necessário.

Ao **Marcos Maioli, Marco Milanesi e Yuri Tani Utsunomiya** pelo auxílio nas atividades e análises realizadas.

Ao Prof. **Dr. Fernando Garcia e Ludmilla Zavarez** pelo oferecimento das biópsias dos tecidos para realização da atividade mitocondrial.

Às minhas amigas de laboratório que fizeram os dias mais leves, com muitas conversas e apoio mútuo. Obrigada **Ana Flávia, Waneska, Tamilis e Devani**.

Filho, aprenda o que eu lhe ensino e nunca esqueça o que mando você fazer. Escute os sábios e procure entender o que eles ensinam. Sim, peça sabedoria e grite pedindo entendimento. Procure essas coisas, como se procurasse prata ou um tesouro escondido.

Provérbios 2:1-4

FERREIRA, G. S. **Análise da atividade mitocondrial e mecanismos de adaptação em bovinos submetidos ao estresse pelo calor.** 2019. 62f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba/SP, 2019.

RESUMO

Com aumento global da temperatura, compreender como o metabolismo de bovinos se adapta ao estresse térmico, permitirá selecionar animais melhor adaptados ao aumento da temperatura ambiente. Uma das possibilidades é compreender como cada raça responde a esse efeito ambiente. O trabalho objetivou expor ao sol duas raças distintas de bovinos com diferente resistência ao calor e estudar as alterações no metabolismo mitocondrial e comportamental após a exposição ao sol ou não por 60 dias. Foram analisados 23 animais da raça Angus – susceptível ao calor (12 ao sol e 11 sob sombra) e 25 Nelores – tolerantes ao calor (13 ao sol e 12 sob sombra). Após todos os animais passarem por período de adaptação de 60 dias, foram divididos entre os grupos e analisados os parâmetros ambientais (THI, HLI e AHLU), movimentação (por radiotelemetria), concentrações séricas de testosterona e LH por radioimunoensaio, espessura de tecido adiposo subcutâneo por ultrassonografia e atividade enzimática mitocondrial de músculo esquelético do complexo I (NADH oxidoreductase). A atividade mitocondrial foi avaliada em amostras da musculatura do tríceps braquial colhidas por biópsia periodicamente ao longo do experimento. Os parâmetros ambientais caracterizam o desconforto térmico que os animais foram submetidos, principalmente Angus sol com índice de AHLU muito acima de estresse extremo. Os Angus se movimentaram mais que os Nelore durante o período experimental ($p < 0,05$) e os Nelore se movimentaram mais à noite em comparação ao dia ($p < 0,05$). As concentrações de testosterona aumentaram do período de adaptação para o experimento para ambas as raças e tratamentos. Os animais da raça Nelore apresentaram maior depósito de gordura subcutânea que os Angus. A atividade mitocondrial aumentou significativamente do período de adaptação (P0) para o experimento (P1) e não diferiu durante o experimento entre as raça e os tratamentos. Animais endotérmicos mantidos em altas temperaturas respondem com adaptações metabólicas e comportamentais mediante o estresse exposto. Os Nelore se movimentam mais à noite quando a temperatura é mais amena e os Angus durante o dia à procura de conforto térmico. A atividade mitocondrial é aumentada devido a alta demanda de ATP provavelmente em repercussão da necessidade de sinalizar biogênese mitocondrial, reparação celular e níveis aumentados de testosterona.

PALAVRAS-CHAVE: Bovinos. Adaptação fisiológica. Metabolismo. Mitocôndrias. Temperatura corporal.

FERREIRA, G. S. **Analysis of mitochondrial activity and adaptation mechanisms in bovines submitted to heat stress.** 2019. 62f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba/SP, 2019.

ABSTRACT

Cattle farmers are suffering challenges in the animal breeding, consequence of the global increase of the temperature. Understanding how the homeothermic metabolism adapts to the thermal stress, allows the selection of better adapted animals to the of the environmental temperature increase. One of those possibilities is to understand each breed reacts to this ambient effect. The work aimed to expose in the sun two different bovine breeds that have different heat resistance and evaluate the mitochondrial metabolism and behavioral changes during sun exposure. Twenty three Angus - susceptible to heat (12 in the sun and 11 in shadow) and 25 Nelore - heat tolerant (13 in the sun and 12 in shadow) animals were analyzed. After all the animals went through a 60 days adaptation period, the animals were sorted composing the groups and analyzed the environmental parameters, movement (by radiotelemetry) subcutaneous fat thickness and mitochondrial enzymatic activity from squeelectical muscle samples. The activity mitochondria were evaluated by the enzymatic reaction of the compound I (NADH oxidoreductase) in muscular tissue samples that were collected periodically during the experiment. The environmental parameters characterize the thermal discomfort that the animals were subjected to, mainly Angus sun with AHLU index well above extreme stress. The Angus moved more than the Nelore during the experimental period ($p < 0.05$) and the Nelore moved more at night compared to the day ($p < 0.05$). Testosterone concentrations increased from the adaptation period to the experimental for both breeds and treatments. The animals of the Nelore breed presented greater subcutaneous fat deposition than the Angus. Enzymatic mitochondrial activity increased significantly from the adaptation period (P0) to the experiment (P1) and did not differ during the experiment between breed and treatments. Homeothermic animals kept at high temperatures respond with metabolic and behavioral adaptations through exposed stress. The Nelore move more at night when the temperature is milder and the Angus during the day looking for thermal comfort. Mitochondrial activity is increased due to high ATP demand probably in repercussion of the need to signal mitochondrial biogenesis, cell repair and increased levels of testosterone.

KEY WORDS: Bovine. physiological adaptation. Metabolism. Mitochondria. body temperature.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mensuração da espessura da gordura subcutânea em bovinos Nelore por ultrassonografia, Araçatuba/SP – 2019.

Figura 2 – Atividade enzimática mitocondrial do complexo I expresso em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de bovinos Nelore e Angus sob adaptação (P0), sombra e sol (P1). Araçatuba/SP – 2019. Análise em comparação à adaptação e experimento foi realizada mediante o teste t de Student pareado e as análises entre os grupos foi utilizado o ANOVA com teste post-hoc de Tukey, considerado valor $p < 0,05$.

Figura 3 – Concentrações plasmáticas de testosterona (ng/mL) de angus sol, angus sombra, nelore sol e nelore sombra nos D1 (adaptação de 08 a 11 de dez); P1 (experimento de 01 a 03 de fev). Araçatuba/SP- 2019.

Figura 4. Atividade relativa dos animais das raças Angus e Nelore, com sombra ou no sol durante o período experimental. Araçatuba/SP – 2019.

Figura 5. Análise comparativa sobre a atividade relativa dos animais das raças Angus versus Nelore, com sombra ou sol durante o período experimental. Araçatuba/SP – 2019.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variação do THI (índice de Temperatura e Umidade) durante os períodos PRE e EXP, Araçatuba/SP-2019.

Tabela 2. Variação do HLI (Índice de Carga de Calor) durante os 2 períodos: PRE (adaptação) e EXP (durante o experimento), Araçatuba/SP, 2019.

Tabela 3. Percentil de horas acima do limiar superior de HLI (Índice de Carga de calor), considerando raça e tratamento (Angus sol = 87, Angus sombra = 91, Nelore sol = 97 e nelore sombra =104) nos períodos PRE e EXP, Araçatuba/SP, 2019.

Tabela 4. Dados médios do índice AHLU (Unidade de Carga de Calor Acumulado), segundo raça (Nelore e Angus) e tratamento (sombra e sol), durante os períodos PRE e EXP, Araçatuba/SP – 2019.

Tabela 5 – Índice de Temperatura e umidade (THI) nos períodos de P0 e P1. Dados obtidos por meio de estação meteorológica CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo) localizada no Campus de Medicina Veterinária do campus da Universidade Estadual Paulista –UNESP, Araçatuba/SP – 2019.

Tabela 6– Índice de Carga de Calor (HLI) nos períodos de P0 e P1. (Valor mínimo e máximo, mediana e média). Araçatuba/SP-2019.

Tabela 7. Dados médios do índice AHLU (Unidade de Carga de Calor Acumulado), segundo raça (Nelore e Angus) e tratamento (sombra e sol), durante os períodos de P0 e P1. Média±desvio padrão. Araçatuba/SP – 2019.

Tabela 8 – Análise da atividade enzimática mitocondrial do complexo I ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) de bovinos Nelore ou Angus quando na adaptação (P0) e quando na sombra ou no sol (P1). A comparação durante a adaptação realizada pelo teste t de Student pareado considerado $p < 0,05$. (Média±desvio padrão). Araçatuba/SP – 2019.

Tabela 9 – Análise comparativa dos dados da atividade do complexo I mitocondrial entre período, raça e tratamento. A análise dos períodos utilizou-se o teste t de Student pareado e entre os tratamentos o ANOVA com teste post-hoc de Tukey, considerado valor $p < 0,05$. Araçatuba/SP, 2019.

Tabela 10 – Concentração plasmática de testosterona (ng/mL) e LH (ngmL) de Angus sol, Angus sombra, Nelore sol e Nelore sombra nos períodos de primeira coleta (08 a 11 de dez/2015); e última coleta (01 a 03 de fev/2016). (Média±desvio padrão e valor p).

Tabela 11 - Espessura de gordura subcutânea (mm) avaliada nos períodos de adaptação e experimento (Média± desvio padrão e P-valor).

Tabela 12 – Análise da atividade relativa (movimentação) dos animais durante o período de Adaptação (P0) e Experimento (P1). Teste t de Student considerando p valor <0,05. (Média±desvio padrão). Araçatuba/SP – 2019.

Tabela 13 – Comportamento de ruminação nos períodos P0 (adaptação de 08 a 11 de dez); P1 (experimento de 01 a 03 de fev) de Nelore sol, Nelore sombra, Angus sol e Angus sombra. (Média±desvio padrão).

Tabela 14 – Concentrações plasmáticas de Leptina (ng/mL) de Angus sol, Angus sombra, Nelore sol e Nelore sombra, na primeira (08-11/12/15) e última análise (01-03/02/16). Araçatuba/SP- 2019.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 Interferência da temperatura ambiente no metabolismo e concentração hormonal	17
2.2 Atividade mitocondrial	23
2.3 Produção aeróbia de ATP	25
2.4 Atividade mitocondrial e adaptações ao calor.....	28
3 OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo geral	31
3.2 Objetivos específicos.....	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1 Animais e delineamento experimental	32
4.2 Condução do experimento	33
4.2.1 Período de adaptação.....	33
4.2.2 – Período de desafio	34
4.2.3 – Período de recuperação.....	34
4.2.4 – Dados ambientais	34
4.2.5 – Controle dos parâmetros ambientais.....	35
4.2.6 Controle de exposição ao calor.....	37
4.2.7 Seleção e amostragem dos tecidos para análises	37
4.3 Análises.....	37
4.3.1 Atividade mitocondrial	38
4.3.2 Análise do metabolismo endócrino	39
4.3.4 – Análise de espessura de tecido subcutâneo	39
4.3.5 Dados comportamentais	40
4.3.6 Análise estatística	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
5.1 Parâmetros ambientais.....	41
5.2 Parâmetros comportamentais e metabolismo.....	45
5.2.1 - Atividade enzimática mitocondrial de complexo I – NADH oxidoreductase	45
5.2.2 - Acompanhamento das concentrações plasmáticas de testosterona e LH.....	48
5.2.3 Espessura de gordura subcutânea	51
5.2.4 - Movimentação dos animais.....	52
5.2.5 - Ruminação	56
5.2.6 – Concentrações plasmáticas de Leptina.....	56
6 CONCLUSÃO.....	58
REFERÊNCIAS.....	59

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o país situado em uma região de clima quente, pois está quase em sua totalidade na zona tropical, o que faz com que as temperaturas sejam, em sua maioria, altas (VIANA *et al.*, 2013). Segundo a agência americana que estuda os oceanos e a atmosfera (NOAA, 2015) a primeira metade do ano de 2015 registrou a maior temperatura desde o início das medições, há 136 anos. As projeções, entretanto, indicam que o mundo pode aquecer mais de 4°C até 2100, causando eventos climáticos extremos como secas, inundações, ciclones e o aumento do nível do mar (NOAA, 2015).

Considerando as previsões para consideráveis mudanças climáticas no Brasil e no mundo maiores que as já registradas, é certo que a produtividade animal será afetada. A elevada temperatura ambiental e o aumento da radiação solar direta são os principais responsáveis por causarem desconforto, que leva os animais a adotarem medidas fisiológicas e comportamentais para manter a homeotermia (SOUZA; BATISTA, 2012).

Dessa forma é imprescindível estudar alterações no metabolismo animal para se adaptar ao aumento da temperatura, permitindo estratégias de intervenção, além de conhecer as adaptações fisiológicas de raças distintas para possível seleção do animal melhor adaptado.

Segundo FERREIRA *et al.* (2009), ruminantes submetidos ao estresse térmico pode responder com uma menor ingestão de alimentos e da alteração da concentração de vários hormônios. Além da diminuição na ingestão de alimentos ocorre redução na ruminação, reduzindo a produção de calor, também ocorre diminuição da atividade muscular e desvia a energia que poderia ser utilizada em outros processos metabólicos e produtivos (SOUZA *et al.*, 2010).

Isso pode ser explicado, pois diante de estímulos que provoquem desequilíbrio entre o animal e o ambiente, o organismo recorrerá aos métodos de *retroalimentação* a fim de evitar os transtornos neuroendócrinos causados por possíveis desajustes na homeostasia do animal (SOUZA; BATISTA, 2012).

Quando o animal passa por estresse térmico, os hormônios que atuam no metabolismo do animal são influenciados. Ocorre diminuição da atividade do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide, e redução na concentração de outros hormônios como

o do crescimento, a tiroxina e a triiodotironina (MORAIS et al., 2008). Por outro lado aumenta a concentração do cortisol, responsável por restaurar a homeostase, sendo liberado após exposição a situações estressantes (SOUZA; BATISTA, 2012; RANDALL, 2010).

A comparação entre raças é uma possibilidade importante de se estudar mecanismos de adaptação. Segundo estudo de PEREIRA (2014) que avaliou os efeitos do equilíbrio entre as respostas das vias de perda de calor em diferentes raças, observou que há uma resposta distinta, inferindo numa adaptação diferente ao ambiente semiárido, onde animais da raça portuguesa Mertolenga (*Bos taurus*), obtiveram ótima resposta ao estresse pelo calor, mesmo mantendo uma pequena taxa de sudorese. Sendo necessárias novas pesquisas para melhor compreensão do seu metabolismo.

Dessa forma, espera-se compreender as variações metabólicas das diferentes raças de animais sob condições de estresse pelo calor, com o intuito de identificar variáveis que permitam selecionar o animal mais adaptado, permitindo repercussões positivas na produção e reprodução.

2 REVISÃO DA LITERATURA

As pesquisas com foco na produção e interpretação da adaptação de ruminantes são a cada dia mais necessárias. Compreendendo as alterações metabólicas de animais sob condições de estresse pelo calor, é possível identificar variáveis que permitam selecionar animais mais adaptados, com repercussões positivas na produção e reprodução mesmo com o aumento da temperatura global.

2.1 Interferência da temperatura ambiente no metabolismo e concentração hormonal

Os estudos acerca da associação da temperatura corporal e metabolismo em endotérmicos são pertinentes, cada vez mais é possível constatar que a relação entre a temperatura ambiente e o gasto energético estão relacionados.

À medida que o indivíduo se mantém na zona termoneutra, o organismo não precisa aumentar o gasto energético para manter suas funções vitais (ABESO, 2016; X. CUI et al. 2016). Entretanto à medida que a temperatura do ambiente aumenta, o corpo tende a reduzir o gasto energético, facilitando o depósito de tecido adiposo (MCANINCH and BIANCO, 2014; X. CUI et al. 2016). Isso é explicado pelo eixo hipotálamo-hipófise-tireoide, à medida que a temperatura corporal aumenta, o organismo necessita reduzir a produção de calor, reduzindo assim a produção de tiroxina (T4) e triiodotironina (T3), hormônios responsáveis pela termogênese e ativação do metabolismo corporal (MORAIS, 2008).

E o oposto também é verdadeiro, à medida que o indivíduo fica exposto ao ambiente frio, o organismo necessita produzir hormônios tireoidianos afim de aumentar o gasto energético e produzir calor. Isso é explicado pelo mecanismo de ativação do tecido adiposo marrom, através das UCPs (proteínas desacopladoras), aumentando o gasto energético sem a presença de tremores no indivíduo, conhecido como termogênese sem tremores, ou seja, sem atividade.

E as pesquisas se tornam cada vez mais apropriadas devido ao constante aumento da temperatura global e da interferência desta nos animais de produção. A elevada temperatura ambiental e o aumento da radiação solar direta são os principais responsáveis por causarem desconforto, que leva os animais a adotarem medidas fisiológicas e comportamentais para manter a homeotermia (SOUZA; BATISTA, 2012). Além de considerar que os animais possuem uma máxima expressão de seu potencial genético em ambientes de temperatura favoráveis e

controladas para cada raça, idade e estado fisiológico, essas alterações climáticas podem afetar seu desempenho (MORAIS, 2008; CATTELAM et al., 2013).

A termoneutralidade então pode ser definida como a temperatura ambiente em que não há desconforto térmico, não afetando o gasto de energia além do basal para manter a homeotermia (XIN CUI et al., 2016). Estudos sugerem que animais endotérmicos quando estão na zona de termoneutralidade, gastam menos energia para manter suas funções vitais. Especialmente em países desenvolvidos em que é possível manter a temperatura ambiente confortável, com o uso de ar condicionado, por exemplo, o corpo não precisa diminuir o consumo de alimento para produzir menos calor e manter a temperatura corporal (LICHTENBELT et al. 2014).

Animais endotérmicos caracterizam pela manutenção da temperatura corporal relativamente constante, ajustando o calor produzido no metabolismo com o calor ganho do ambiente. Quando são mantidos em ambiente cuja temperatura está na zona de termoneutralidade a produção de calor é relativamente estável. Por outro lado, em temperaturas superiores, gastar menos energia para reduzir a produção de calor é uma forma de controle (FIALHO; OST; OLIVEIRA, 2001).

Segundo Moraes (2008), quando estudou o metabolismo de vacas em diferentes estações do ano (tempo chuvoso e seco) por dois anos consecutivos, observou-se que os níveis de tiroxina diminuiriam na época chuvosa (época mais quente do ano), demonstrando um mecanismo de controle da temperatura corporal. Corroborando com os achados de Starling et al (2005), em que as concentrações séricas dos hormônios cortisol, T4 e T3, foram afetadas pela temperatura e umidade do ar. Os níveis de cortisol foram aumentados e de tiroxina e triiodotironina reduzidos em ovinos mantidos em estresse térmico em câmara climática sob 45°C por 9 dias e 8 horas por dia, evidenciando que o aumento na temperatura ambiente pode reduzir a taxa metabólica.

Em animais mantidos em alta temperatura, há um maior acúmulo de gordura nos depósitos internos (gordura interna e vísceras) em detrimento a gordura subcutânea. Estas alterações poderiam refletir uma adaptação do animal à temperaturas elevadas, pois facilitaria as trocas de calor com o meio (FIALHO; OST; OLIVEIRA, 2001).

Animais endotérmicos utilizam estratégias fisiológicas, bioquímicas e comportamentais para se adaptarem e controlarem a temperatura corporal quando

expostos a ambientes com alterações da temperatura (SILVA et al., 2016). Quando o corpo é exposto a situações térmicas excedentes de calor ou de frio, que ultrapassam os limites de conforto térmico, essas ações são acionadas para que se mantenha o calor interno estável, evitando alterações funcionais prejudiciais ao organismo (CAMARGO et al, 2011).

Quando o calor produzido pelo metabolismo do animal for maior do que o liberado para o ambiente, ocorrem alterações fisiológicas nos animais para tentar manter sua temperatura corporal constante. Para amenizar ou diminuir os efeitos do estresse, os animais iniciam uma sucessão de mecanismos em resposta ao estímulo estressante, sendo estes regulados por hormônios e coordenados pelos sistemas nervoso, endócrino e mitocondrial (SILVA et al., 2016).

A mitocôndria exerce uma importante função na produção de calor para o organismo, sendo na formação de energia (ATP) um subproduto gerado. Quase todo o calor biológico é produzido pelos processos da síntese e da hidrólise de ATP. Quanto maior o gasto de ATP, mais calor será produzido. Essa formação de calor é devida ao "vazamento" intrínseco de prótons para a matriz da mitocôndria, cujo retorno é acompanhado da liberação de calor ao invés da síntese de ATP, isso é explicado pois a energia proveniente do ciclo de Krebs é processada pela cadeia respiratória, sendo os prótons armazenados transitoriamente na forma de um potencial eletroquímico através da membrana mitocondrial interna, como essa membrana é relativamente impermeável aos prótons, as moléculas de ATP são geradas à medida que estes retornam à matriz mitocondrial, através da enzima ATP-sintase e nesse retorno há liberação de calor (BIANCO, 2000).

Estressores ambientais podem ser considerados como temperatura, instalações, privação alimentar, ambiente social, entre outros. E o estresse pode ser definido como uma reação do organismo a qualquer dessas alterações, numa tentativa de manter a homeostase e, no caso de estresse térmico, realizar a termorregulação (DONIN, 2007). E considerando a situação de estresse por calor, é possível observar o aumento na mobilização de energia (gliconeogênese, lipólise, proteólise) para manter as funções vitais (DONIN, 2007).

Wang et al. (2015), submeteram ratos machos *Sprague-Dawley* em situações de estresse térmico (32°C) e conforto térmico (24°C), em caixas separadas e alimento *ad libitum*, os autores discutem a possibilidade de

desnaturação de enzimas intracelulares e outras proteínas, podendo levar ao dano celular, quando expostos a temperaturas muito elevadas (>42°C).

Corroborando os achados de Dobson e Smithr (2000) que afirma que o estresse induzido pelo calor pode prejudicar o processo reprodutivo em animais domésticos, visto que o aumento das concentrações de cortisol afeta a secreção de Hormônio Luteinizante (LH) e estradiol, sendo consideradas as interações entre o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e hipotálamo-hipófise-ovário.

A interpretação da interação entre os eixos citados e a alteração na reprodução, pode ser explicada pelo fato de que para o sucesso do processo reprodutivo requer maturação folicular, biossíntese de estradiol, indução do pico de LH, ovulação e expressão do comportamento sexual, que devem ocorrer de forma coordenada e ser expressos cada qual no seu momento exato (MACEDO, 2012), e segundo Mazieiro (2012) o estresse resulta na secreção de hormônio cortisol, pela glândula adrenal controlada pelo Hormônio Liberador de Corticotrofina (CRH), e que afeta diretamente a reprodução por inibir a liberação de hormônios gonadotróficos pela adenohipófise e discute ainda que os efeitos negativos provocados pelo estresse podem inibir o pico pré-ovulatório de LH ou inibir a ovulação e até mesmo piorar a qualidade dos embriões produzidos. O estresse agudo, medido pelo nível de cortisol, deprime a secreção de LH pulsátil, o que ocorre devido ao potencial do cortisol em diminuir a resposta da hipófise aos pulsos do Hormônio Liberador de Gonadotrofina (GnRH) (MACEDO, 2012).

Segundo Carroll et al (2013), vacas da raça Angus (sensíveis ao calor) comparadas à raça Romosinuano (resistentes ao calor) apresentam níveis plasmáticos do hormônio cortisol aumentados quando submetidas ao estresse térmico, comparadas ao período em que estavam em conforto. Um estudo avaliando o estresse térmico por calor em bovinos, observou queda na performance da reprodução e lactação, desta forma os autores sugerem selecionar os animais tolerantes ao calor, o que pode aumentar tanto a capacidade reprodutiva quanto a adaptabilidade ao clima quente (DASH et al, 2016).

Segundo DONIN (2007) suínos por apresentarem baixa tolerância ao calor quando expostos à altas temperaturas, têm sua eficiência reprodutiva diminuída pela redução na quantidade e qualidade do sêmen, manifestada por ejaculados com menor motilidade, pelo aumento na porcentagem de

espermatozoides com defeitos morfológicos, pela redução na produção destes e pelo menor volume do ejaculado.

Outro hormônio responsável pela reprodução é a leptina, sendo considerado dois processos de sua ação: a forma direta, quando o hormônio age sobre as gônadas promovendo o aumento na produção de esteroides sexuais, evidenciado pelo aumento no tamanho uterino em vacas, em razão da maior proliferação glandular no epitélio e endométrio; e indireta, por meio da ação sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário, cuja função é informativa sobre o estado nutricional do indivíduo, permitindo que o processo reprodutivo siga em frente quando houver reservas energéticas suficientes para reprodução, caso contrário, este fenômeno é temporariamente bloqueado. Dessa forma, em estados de estresse, tanto alimentar (déficit nutricional, por exemplo), quanto ambiental (temperatura ambiente), os níveis de leptina caem, representado por um mecanismo de defesa metabólica, para estimular a realimentação, a secreção de glicocorticoides, a diminuição na atividade tireoidiana, o gasto de energia, e conseqüentemente de bloquear as funções reprodutivas (CATUNDA, et al., 2014).

Além disso, camundongos com deficiência de leptina (camundongos ob / ob) são intolerantes ao frio e expõem decréscimos na temperatura corpórea e na atividade locomotora em comparação ao controle. No hipotálamo, a leptina ativa os centros que desempenham um papel importante na modulação do sistema nervoso autônomo e da pressão arterial, bem como na regulação da temperatura (DO CARMO et al., 2017).

Para se opor aos desafios do ambiente o animal necessita utilizar estratégias fisiológicas e comportamentais para resistir ao ambiente hostil.

Dentre estas alterações que se observam nos animais sob estresse calórico podem ser citadas a redução do consumo alimentar, reduzindo o incremento calórico do fator térmico do alimento (SILANIKOVE, 2000), aumento no consumo de água (MEYER; STAHL; FLACHOWSKY, 2006), e diminuição da ruminação (PIRES; CAMPOS, 2008), pois o ato de ruminar é uma atividade que produz calor (FERREIRA, 2010).

Devido todas as alterações apresentadas, a exposição de endotérmicos fora da zona de termoneutralidade, no contexto apresentado na presente pesquisa em temperaturas elevadas, implica em modificações comportamentais para

possíveis ajustes fisiológicos mediante ao estresse exposto. E uma das adaptações apresentadas é a redução do consumo alimentar.

Segundo Lana *et al.* (2000) a alteração da temperatura ambiente afeta o consumo alimentar e o ganho de peso, e a associação da umidade relativa do ar deve ser considerada, uma vez que valores mais baixos, como 55%, os efeitos sobre a temperatura corporal não foram significativos.

Isso pode ser explicado pelo fato de quando a umidade relativa do ar está elevada (acima de 60%), a taxa de sudorese é afetada, pois a taxa de perda de calor por meio da evaporação é dependente deste índice. Quando o ar está seco, a umidade é quase nula, o que provoca maior evaporação, e com a alta umidade, a pressão de vapor do ar ambiente aproxima-se daquela da pele úmida, prejudicando a troca de calor (CAMARGO; FURLAN, 2011; MCARDLE, 2011).

Vários fatores são responsáveis pelo ajuste no controle da temperatura corporal em condições fora da zona termoneutra, e isso resulta em condições de aumento ou redução da produção de calor, afetando diretamente o consumo alimentar. As fibras adrenérgicas que inervam os neurônios que produzem o Hormônio Liberador de Tireotrofina (TRH), também possuem outros neuropeptídeos que estão diretamente envolvidos com a regulação da ingestão alimentar, do peso corporal e da termogênese, um deles é a CART (fator de transcrição regulado pela cocaína e anfetamina). A CART estimula a síntese e liberação TRH e pode potencializar a ação das catecolaminas, nos neurônios que produzem TRH durante a exposição ao frio, aumentando a ingestão alimentar (NAVES, 2010).

Segundo Uribe-Velásquez *et al.* (1998) durante o estresse térmico observa-se diminuição do consumo de alimento, sugerindo que alguns dos efeitos do estresse estão associados à redução do consumo da matéria seca pelos animais submetidos ao calor.

A resposta produtiva dos animais é em função do consumo, da digestibilidade e do metabolismo dos nutrientes dietéticos. Destes fatores, o consumo é o mais importante, pois 60 a 90% da variação observada na ingestão de energia digestível entre animais e dietas estão relacionadas às diferenças no consumo e somente 10 a 40%, às diferenças na digestibilidade. Variações bruscas na temperatura do ambiente afetam de forma significativa o consumo voluntário dos animais, pois pode desestabilizar a sua homeotermia, que é a capacidade de manter a sua temperatura corporal em níveis constantes, ou seja, manter a “temperatura

ótima” para consumo, digestão, absorção e metabolismo. A produtividade ou mesmo a sobrevivência animal, depende principalmente de sua capacidade em manter a temperatura corporal dentro de certos limites (FERREIRA et al., 2013, OLIVEIRA et al, 2017).

Forbes (1993) concluiu que os ruminantes em geral são capazes de controlar seu consumo energético de maneira semelhante aos animais de estômago simples, desde que a densidade de nutrientes da dieta seja suficientemente alta para que as restrições físicas não interfiram.

O sistema de controle térmico emprega três mecanismos importantes para reduzir o calor do organismo quando a temperatura corporal se torna excessivamente quente: 1) Ocorre a diminuição da produção de calor com inibição dos calafrios e da termogênese química 2) Os vasos sanguíneos cutâneos sofrem intensa dilatação em quase todo o corpo, processo causado pela inibição dos centros no hipotálamo responsáveis pela vasoconstrição. A vasodilatação pode aumentar a transferência de calor para a pele por até 8 vezes. 3) Ocorre acentuada elevação na velocidade de perda de calor através da sudorese e consequente evaporação quando a temperatura corporal total ultrapassa o nível crítico de 37 °C. Um aumento adicional de 1 °C na temperatura corporal provoca sudorese suficiente para remover 10 vezes mais a taxa basal de produção de calor corporal.

2.2 Atividade mitocondrial

As mitocôndrias desempenham reações celulares fundamentais no organismo, incluindo a produção de energia através da cadeia respiratória mitocondrial, a regulação da apoptose, metabolismo do cálcio e a produção de espécies reativas de oxigênio (SPINAZZI et al., 2012). Organela citoplasmática que possui seu próprio DNA e a disfunção no seu funcionamento é um componente importante na associação de diversas doenças, como diabetes melito tipo II, câncer, doença de Alzheimer e envelhecimento, seu estudo torna-se cada vez mais frequente (JORNAYVAZ; SHULMAN, 2010; GRABACKA; GAWIN; PIERZCHALSKA, 2014).

Partindo desse pressuposto, o caminho para o crescimento e divisão de mitocôndrias pré-existentes, pode ser a solução para o envelhecimento saudável e tratamento de muitas patologias, é o tema estudado que pode ser definido como biogênese mitocondrial (JORNAYVAZ; SHULMAN, 2010).

Devido as mitocôndrias serem responsáveis pela geração de energia a partir da oxidação dos substratos energéticos glicose, ácidos graxos e proteínas, com a utilização de oxigênio na reação, o aumento na quantidade e qualidade funcional de mitocôndrias do tecido muscular esquelético, ocorrem simultaneamente com o aumento na capilaridade e funcionalidade de sistemas de transporte desses substratos, inferindo a capacidade de movimentação em sinalizar o processo discutido (PEREIRA, 2015).

Para que a produção de energia seja eficiente, estoques de adenosina trifosfato (ATP) (doador universal de energia às células) – são requeridos constantemente, sendo proporcionalmente necessários segundo a intensidade e duração do esforço (FELÍCIO; CAVALCANTI, 2014).

O músculo esquelético é responsável por duas funções principais: a função mecânica, que garante os movimentos ou tensões e função metabólica, que dentre vários aspectos, garante a renovação do ATP consumido durante o trabalho mecânico. O acoplamento entre o trabalho mecânico e a atividade metabólica é assegurada pela degradação e ressíntese de ATP. A molécula de adenosina trifosfato (ATP) efetua uma propriedade dupla:

1. é o depositário da energia liberada pelas vias metabólicas, o que garante ressíntese de ATP (difosfato de adenosina (ADP) e ion fosfato (Pi), sendo a energia liberada durante a hidrólise do ATP;

2. é um fator que modifica a estrutura de proteínas contráteis, pela constituição de ligações actinmiosina, que resulta na produção de tensão muscular (LACOUR, 2011).

A própria condição de aumento da temperatura corporal pode influenciar o gasto energético. A movimentação realizada em clima quente impõe um incremento da carga metabólica de 5% na captação de oxigênio em comparação ao ambiente termoneuro (MCARDLE, 2011). De acordo com Delfino et al. (2012) embora os bovinos apresentem alta capacidade de manter a homeotermia, em situações de temperaturas elevadas a perda de calor não ocorre de maneira satisfatória, resultando na ação de outros mecanismos de adaptação, como o aumento da ingestão hídrica, consumo alimentar e movimentação.

Vias metabólicas que utilizam o ATP para síntese de energia ao organismo são requeridas para manutenção fisiológica, são elas: sistema do fosfagênio (ATP-CP) que utiliza a creatina como doadora de energia para formação

do ATP (via anaeróbia alática), a glicólise, em que utiliza a glicose como doadora de energia (via anaeróbia láctica) e o metabolismo aeróbio dos carboidratos, ácidos graxos e proteínas, sendo transformados em Acetil-Coa dando início ao Ciclo de Krebs e posteriormente gerando energia por meio da cadeia de transporte de elétrons (fosforilação oxidativa), sendo esta última, realizada na mitocôndria e necessária a presença de oxigênio, o que a torna o sistema mais complexo, com uma produção mais lenta, entretanto de capacidade ilimitada (NELSON; COX, 2014).

O gasto energético e a sinalização na formação do ATP podem ser regulados pela realização da movimentação corporal, por meio de alguns hormônios como adrenalina, glucagon, cortisol e hormônio do crescimento. Além de alguns compostos bioativos e nutrientes que parecem exercer influências positivas nessas etapas, intensificando a função mitocondrial (FELÍCIO; CAVALCANTI, 2014).

A cadeia respiratória se encontra na membrana mitocondrial interna, representada por 4 complexos – o complexo I (NADH ubiquinona oxidoreductase), complexo II (succinato-ubiquinona oxidoreductase), complexo III (ubiquinol citocromo c oxidoreductase) e o complexo IV (citocromo c oxidase), além dos complexos, apresentam dois transportadores de elétrons a ubiquinona e o citocromo c. Estes constituintes bem como o complexo V, ATP sintetase, formam o sistema de fosforilação oxidativa (OXPHOS), que fornece o ATP necessário à célula (FERREIRA; AGUIAR; VILARINHO, 2008).

O complexo I é constituído por um grande número de proteínas (46 subunidades nos mamíferos), com origem genética dupla – nuclear e mitocondrial. Este complexo contribui significativamente para a produção de energia na mitocôndria, catalizando o primeiro passo da cadeia respiratória mitocondrial, no qual ocorre a oxidação de NADH, usando a ubiquinona (Q) como aceitador de elétrons. A transferência de dois elétrons é acompanhada pela translocação de quatro prótons (H^+) da matriz para o espaço intermembranar, criando um gradiente protônico que é utilizado para a síntese de ATP (FERREIRA; AGUIAR; VILARINHO, 2008). A atividade enzimática mitocondrial teve como alvo a análise do complexo I na presente pesquisa.

2.3 Produção aeróbia de ATP

É no interior das mitocôndrias que ocorre o processo de geração de energia (ATP) pela via aeróbia e compreende duas vias, o ciclo de Krebs e a cadeia transportadora de elétrons (NELSON, COX, 2014).

O ciclo de Krebs exerce a ação de término da oxidação dos nutrientes energéticos com posterior transporte de seus hidrogênios (moléculas que possuem elétrons com carga energética potencial) a partir de NAD ou FADH₂ (transportadores de hidrogênios) (HOWLEY; POWERS, 2009).

O oxigênio não participa das reações do ciclo de Krebs, mas é o aceptor final de hidrogênio no fim da cadeia de transporte de elétrons. O processo da produção aeróbica de ATP é denominado fosforilação oxidativa. A produção aeróbica de ATP ocorre em três estágios. 1) geração de uma molécula com dois carbonos, o acetil-CoA. 2) oxidação do Acetil-Coa no ciclo de Krebs. 3) processo de fosforilação oxidativa na cadeia de transporte de elétrons (HOWLEY; POWERS, 2009).

O ciclo de Krebs - A entrada no ciclo de Krebs exige a preparação de uma molécula com dois carbonos, o Acetil-CoA, que pode ser formado pela degradação dos nutrientes energéticos (carboidratos, ácidos graxos ou proteínas). Em seguida, se combina com o oxaloacetato (molécula com 4 carbonos) para formar o citrato (seis carbonos). O que se segue é uma série de reações para regenerar o oxaloacetato e duas moléculas de CO₂ (NELSON; COX, 2014).

A principal função do ciclo é remover hidrogênios e a energia associada a eles. A cada volta do ciclo de Krebs são formadas três moléculas de NADH e uma molécula de FADH. Além da produção da NADH e de FADH, o ciclo de Krebs acarreta a formação direta de um composto rico em energia, a guanosina trifosfato (GTP). GTP é um composto de alta energia que pode transferir seu grupo fosfato terminal para o ADP a fim de formar o ATP. A formação direta da GTP no ciclo de Krebs é denominada fosforilação no substrato e é responsável somente por uma pequena quantidade da conversão da energia total do ciclo de Krebs, uma vez que a maior parte da energia produzida (NADH e FADH) é levada à cadeia de transporte de elétrons para formar o ATP (NELSON; COX, 2014).

A Cadeia de transporte de elétrons: A produção aeróbica de ATP (denominada fosforilação oxidativa) ocorre nas mitocôndrias. A via responsável por esses processos é denominada cadeia de transporte de elétrons (ou cadeia respiratória). A produção aeróbica de ATP ocorre devido um mecanismo que usa a

energia potencial disponível nos transportadores de hidrogênios reduzidos, como a NADH e a FADH, para refosforilar o ADP em ATP. Os transportadores de hidrogênio reduzidos não reagem diretamente com o oxigênio, ao contrário, os elétrons removidos dos átomos de hidrogênio são passados por uma série de transportadores de elétrons conhecidos como citocromos, durante essa passagem é liberada energia suficiente para refosforilar o ADP e formar o ATP em três locais diferentes (HOWLEY; POWERS, 2009).

Os transportadores de hidrogênio que levam os elétrons até a cadeia de transporte de elétrons são originários de várias fontes. As NADH encontram-se fora das mitocôndrias e seus hidrogênios devem ser transportados através da membrana mitocondrial, por meio de mecanismos de “lançadeira” especiais. A maior parte do volume de elétrons que entra na cadeia de transporte de elétrons é oriunda das moléculas de NADH e de FADH formadas em consequência da oxidação do ciclo de Krebs. Pares de elétrons da NADH ou da FADH passam por uma série de compostos que sofrem oxidação e redução, com energia suficiente sendo liberada para sintetizar ATP em três locais ao longo da via. No final da cadeia de transporte de elétrons, o oxigênio aceita os elétrons que são passados e se combina com o hidrogênio para formar água (NELSON; COX, 2014).

O mecanismo que explica a formação aeróbica de ATP é conhecido como hipótese quimiosmótica. À medida que os elétrons são transferidos ao longo da cadeia do citocromo, a energia liberada é utilizada para “bombear” os hidrogênios (prótons; H⁺) liberados da NADH e da FADH do interior das mitocôndrias através da membrana mitocondrial interna. Isso acarreta um acúmulo de H⁺ no espaço entre as membranas mitocondriais interna e externa. O acúmulo de H⁺ é a fonte de energia potencial que pode ser capturada e utilizada para recombinar o Pi com o ADP e formar o ATP (HOWLEY E POWERS, 2009).

A formação de ATP ocorre através da movimentação dos H⁺ (prótons) nos complexos mitocondriais e existem três bombas da matriz mitocondrial para o espaço intermembranoso. A primeira bomba (que utiliza NADH) move quatro H⁺ para o interior do espaço intermembranoso para cada dois elétrons que se movem ao longo da cadeia de transporte de elétrons. A segunda bomba também transporta quatro H⁺ enquanto a terceira move apenas dois H⁺. Como resultado, há uma maior concentração de H⁺ no interior do espaço intermembranoso em comparação com a matriz (NELSON; COX, 2014).

Esse gradiente cria um forte impulso para que esses H^+ se difundam de volta para o interior da matriz. Entretanto, como a membrana mitocondrial interna não é permeável ao H^+ , esses íons somente conseguem atravessar a membrana através de canais de H^+ especializados (denominados cadeias respiratórias). Quando o H^+ cruza a membrana mitocondrial interna através desses canais, o ATP é formado pela adição de fosfato ao ADP (processo denominado fosforilação). Isso ocorre porque o movimento do H^+ através da membrana mitocondrial interna ativa a enzima ATP sintetase, que é responsável pela catalização da reação (HOWLEY; POWERS, 2009).

A presença de oxigênio na via é fundamental, devido a ativação do último citocromo da cadeia. Cada elemento da cadeia de transporte de elétrons sofre uma série de reações de oxidação-redução. Entretanto, quando o último citocromo permanece em estado reduzido, ele é incapaz de aceitar mais elétrons e a cadeia de transporte de elétrons é interrompida. No entanto, quando existe oxigênio presente, o último citocromo da cadeia pode ser oxidado pelo oxigênio. O oxigênio permite que o transporte de elétrons continue atuando como receptor final de elétrons da cadeia de transporte de elétrons. Isso promove a oxidação do último citocromo e permite a continuidade do transporte de elétrons e da fosforilação oxidativa. Na última etapa da cadeia de transporte de elétrons, o oxigênio aceita dois elétrons que foram passados ao longo da cadeia seja da NADH ou da FADH. Essa molécula de oxigênio reduzida liga-se então a dois prótons (H^+) para formar água (HOWLEY; POWERS, 2009).

O complexo I

Ao alcançarem a cadeia respiratória, o NADH transfere seus elétrons para a coenzima Q numa reação catalisada pelo complexo I. A NADH desidrogenase (complexo I) catalisa a transferência de 1 hidreto proveniente do NADH e 1 próton da matriz para a coenzima Q e a transferência de 4 prótons da matriz para o espaço intermembrana. Com a saída dos prótons a matriz fica carregada negativamente e o espaço intermembrana torna-se carregado positivamente. Dessa forma, o complexo I atua bombeando prótons para o espaço intermembrana à custa de energia proveniente da transferência de elétrons sendo, portanto, processos obrigatoriamente acoplados.

2.4 Atividade mitocondrial e adaptações ao calor

Uma das formas de endotérmicos produzirem calor metabólico é por meio da geração ou quebra de ATP. A hidrólise está associada ao trabalho biológico e sempre que ocorre sua utilização, ocorre também a perda de energia na forma de calor.

O mecanismo molecular responsável pela produção de calor durante a síntese de ATP tem relação com o funcionamento da mitocôndria, e distintamente os mecanismos de hidrólise de ATP estão relacionados com o trabalho celular que levam ao gasto de ATP (BIANCO, 2000). Nos endotérmicos o calor é produto das funções biológicas mantendo os organismos a uma temperatura próxima dos 37°C. Durante a oxidação, a energia dos alimentos (substratos energéticos) é liberada e depois armazenada por um tempo na forma de ATP. Logo depois, ocorre um processo de transformação de energia resultando do trabalho biológico (transporte de íons, síntese de macromoléculas, contração muscular e outras) sendo neste caso também o calor o principal subproduto da transformação de energia. É no ciclo de Krebs que a energia para formar o ATP é processada. Os carreadores de elétrons liberam energia na cadeia respiratória, e esta energia é armazenada na forma de um potencial eletroquímico de prótons através da membrana interna da mitocôndria.

A membrana interna mitocondrial é impermeável aos prótons, então devido a isto, as moléculas de ATP são geradas à medida que os prótons retornam a matriz da mitocôndria pela enzima ATP sintase (BIANCO, 2000). Entretanto, pode haver um retorno de uma parte deste gradiente de prótons para a matriz, através de uma proteína transmembrana chamada termogenina (presente nas mitocôndrias do tecido adiposo multilocular), ao invés de retornar pela ATP sintase. Então, o retorno é acompanhado da liberação de calor, ao invés da síntese de ATP. O calor se espalha pela corrente sanguínea aquecendo os órgãos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

O calor resultante do metabolismo energético é formado à partir da ativação das proteínas desacopladoras (UCPs), pela dissipação do gradiente de prótons da membrana interna da mitocôndria, desacoplando a fosforilação oxidativa da síntese de ATP, produzindo calor. Os hidrogênios liberados das reações catalisadas pelas desidrogenases e que são carreados pelas flavoproteínas na forma reduzida (NADH⁺ e FADH₂) são bombeados pela cadeia respiratória para o

espaço intermembranas, criando um gradiente de prótons. Devido a esse gradiente, os H⁺ retornam para a matriz passando pela ATP sintase e ressintetizando ATP ou, entretanto, alternativamente, passam pela proteína desacopladora (UCP) que dissipa a energia na forma de calor. São conhecidas 5 classes de UCPs, sendo UCP1, UCP2, UCP3, UCP4 e UCP5, a UCP3 é altamente significativa no músculo esquelético (tecido analisado na presente pesquisa). (DEPIERI *et al.*, 2004).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar a atividade mitocondrial e compreender as adaptações metabólicas em resposta ao aumento da temperatura ambiental entre duas raças bovinas: zebuínos (Nelore) e taurinos (Angus) expostos ou não ao sol.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar a atividade enzimática mitocondrial muscular de bovinos zebuínos (Nelore) e taurinos (Angus) sob condições de exposição pelo calor.

Avaliar alterações no metabolismo endócrino e adaptações comportamentais das duas raças expostas à sombra ou ao sol durante o verão.

Hipótese: A hipótese testada foi que a atividade mitocondrial muscular de animais expostos ao sol, seria reduzida como forma de adaptação ao calor.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais e delineamento experimental

Projeto aprovado pelo comitê de ética da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” mediante o processo FOA nº 2014/01445.

Inicialmente foram selecionados 48 bovinos machos, sendo 25 Nelores (zebuínos, tolerantes ao calor) e 23 Angus (taurinos, susceptíveis ao calor). Os animais foram alimentados em confinamento com água ad libitum, eram machos inteiros e filhos de um mesmo pai para cada raça, visando minimizar a variação genética entre os indivíduos e apresentavam cerca de 15 meses de idade no momento da exposição ao calor.

Todos os animais passaram por um período de adaptação, mantidos sob condições de conforto (ambiente coberto por sombrite - 80% protetor solar) por 8 semanas antes (dia 60) do começo do experimento (dia 0). Doze animais controles para raça Nelore e 11 Angus foram mantidos sob essas condições por todo período do experimento. Nos lotes dos animais mantidos em desconforto (12 Angus e 13 Nelores) o sombrite foi retirado, sendo expostos ao sol por 60 dias.

Os bovinos da raça Angus foram adquiridos com 7 meses de idade no município de Uruguaiana (RS) e chegaram ao recinto experimental da UNESP Araçatuba em 13 de junho de 2015. Os animais da raça Nelore foram adquiridos com 7 meses de idade na cidade de Dourados (MS), e mantidos na fazenda Água Branca em Birigui - SP até os 10 meses de idade, quando foram transferidos para a UNESP em 02 de setembro de 2015.

Os animais foram mantidos no recinto experimental de zootecnia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista – UNESP – Campus de Araçatuba durante todo o período experimental. Todos os animais foram identificados com brincos auriculares e marcação à fogo na parte inferior dos membros pélvicos, de modo a proporcionar identificação inequívoca.

Medidas quimioproláticas foram aplicadas para a prevenção de Anaplasmosse e Babesiose, doenças cujo vetor *Rhipicephalus microplus* apresenta ampla disseminação na região. Portanto, assim que os animais chegaram à Universidade, foram tratados com solução 7% de diminazenodiaceturato (1ml / 60kg)

e oxitetraciclina 25% (1ml/30kg), além de serem vacinados para a Rinotraqueíte Infeciosa Bovina (IBR), Diarréia Viral Bovina (BVDV), Leptospirose e Clostridiose.

Em segundo momento, foi adotado o tratamento quimioprolático com repetições a cada 45 dias, que consistia em solução 7% de diminazenediaceturato (1ml / 60kg), oxitetraciclina 20% (1ml / 30kg), doramectina (1ml / 50kg) e fluazuron 2,5% pouron (1ml/10kg). Em novembro de 2015, todos os animais foram vacinados contra a Febre Aftosa, segundo o calendário nacional de vacinação do Brasil.

4.2 Condução do experimento

4.2.1 Período de adaptação

Desde a chegada ao recinto experimental em junho e setembro de 2015 até 02 de outubro de 2015, os animais foram mantidos em pastagem de *Brachiaria brizantha*, com acesso à sombra e água. Gradualmente foram adaptados para semi-confinamento e dieta à base de polpa cítrica, milho moído, farelo de soja e uréia, além de suplementação mineral, na proporção de 2,5% do peso vivo. Por fim, foram confinados em quatro lotes com acesso à sombra e receberam dieta baseada no bagaço de cana como forragem (Êxito Rural®) com relação de forragem: concentrado 55:45, administrada duas vezes ao dia, e água ad libitum, segundo as recomendações do National Research Council (1996).

No dia 3 de outubro de 2015, os animais foram divididos em 4 grupos homogêneos (2 grupos Nelore e 2 grupos Angus) de 12 ou 13 animais escolhidos aleatoriamente, e confinados em quatro confinamentos de 200 metros quadrados cada, dos quais 100 metros quadrados eram cobertos por sombrite (80% proteção solar).

Os animais Angus (*Bos taurus*) e Nelore (*Bos indicus*), com idade de 12 meses foram naturalmente expostos às mudanças climáticas sazonais (do verão ao inverno) e monitorados para distintos parâmetros fisiológicos (comportamento de ruminância, movimentação, ultrassonografia da carcaça, quantificação dos hormônios testosterona, Hormônio Luteinizante e Leptina).

Todos os animais passaram por um período de adaptação, mantidos sob condições de conforto por 8 semanas antes (dia 60) do começo do experimento (dia 0). Doze animais controles por raça foram mantidos sob essas condições por todo

período do experimento (até o dia 60). Outros 12 animais por raça foram expostos ao sol por 60 dias e depois permaneceram por 30 dias com sombra (recuperação).

4.2.2 – Período de desafio

A fase de desafio teve início em 4 de dezembro de 2015 com a retirada do sombrite de um dos piquetes com animais Nelore e de outro com animais Angus. Dessa forma, dois grupos foram mantidos sem sombra (grupos Nelore-sol e Angus-sol) e dois com sombra disponível (Nelore-sombra e Angus-sombra) até 3 de fevereiro de 2016 (60 dias). Devido às condições críticas de alguns animais, permitiu-se o acesso ao pastejo noturno para todos os lotes durante o período compreendido entre 25 de dezembro de 2015 a 10 de janeiro de 2016.

4.2.3 – Período de recuperação

No dia 4 de fevereiro de 2016 as coberturas foram recolocadas em todos os currais e os animais mantidos com acesso à sombra até o momento do abate em julho de 2016. Esse período não foi analisado na presente pesquisa.

Considerando os períodos (adaptação e experimento), a legenda e suas respectivas datas analisadas são:

- 1) de todo o experimento: Adaptação=PRE (03/10/2015 à 03/12/2015) e Experimento=EXP (04/12/2015 à 03/02/2016);
- 2) dos períodos das coletas de amostras: Adaptação=P0 (24 à 30/11/2015) e Experimento=P1 (28/01 à 03/02/2016).

4.2.4 – Dados ambientais

Os dados ambientais foram recuperados para o período compreendido entre 01 de junho de 2015 e 31 de outubro de 2016 à partir da estação meteorológica da CETESB localizada no Campus de Faculdade de Medicina Veterinária (FMVA) da UNESP – Araçatuba/SP. As variáveis experimentais coletadas foram temperatura ambiente (T em graus centígrados), umidade relativa do ar (H em porcentagem), radiação solar (R em W/m²) e velocidade do vento (W em m/s). Eventuais falhas no registro dos dados foram presumidas utilizando a mediana entre os dados de -10 / + 10 dias do momento da falha.

4.2.5 – Controle dos parâmetros ambientais

A partir de dados ambientais (temperatura, umidade, radiação solar e velocidade do vento) foram obtidos diferentes índices compostos:

1 - O THI (Índice de Temperatura e Umidade), que considera Temperatura e Umidade em um único índice foi calculado como:

$$\text{THI} = (1,8 * \text{temperatura} + 32) - ((0,55 - 0,0055 * \text{umidade}) * (1,8 * \text{temperatura} - 26)).$$

O valor de 72,6 foi considerado de termoneutralidade, 76,4 baixo estresse e 81,5 alto estresse por calor, segundo Valente et al. (2015).

2 - Segundo os índices HLI (Índice de carga de calor) e AHLU (Unidade de Carga Térmica Acumulada) que leva em consideração a acumulação / dissipação progressiva de calor dos animais, foram utilizados utilizando a calculadora online: <https://chlt.katestone.com.au/faq/what-are-the-correct-equations-for-calculating-hlis-and-ahlus/>.

O cálculo do Índice de Carga de Calor (HLI) é calculado mediante a Temperatura (T) em °C, Umidade Relativa (UR) expressa em porcentagem, Velocidade do Vento (WS) em m/s e Temperatura do Globo Negro (BGT) em °C.

A temperatura do Globo Negro (BGT) foi calculada a partir da equação:

$$\text{BGT} = 1,33 \times T - 2,65 \times \sqrt{T} + 3,21 \times \log(\text{SR} + 1) + 3,5.$$

Nota: (log de base 10 e sqrt: função da raiz quadrada, SR – radiação solar).

O índice é calculado: $\text{HLI} = \text{S}(\text{BGT}) * \text{HLI}_{\text{HI}} + (1 - \text{S}(\text{BGT})) * \text{HLI}_{\text{LO}}$.

HLI_{HI} é calculado (quando temperatura é acima de 25°C)

$$\text{HLI}_{\text{HI}} = 1,55 \times \text{BGT} + 0,38 \times \text{RH} - 0,5 \times \text{WS} + \exp(2,4 - \text{WS}) + 8,62.$$

HLI_{LO} (quando temperatura é abaixo de 25°C)

$$\text{HLI}_{\text{LO}} = 1,3 \times \text{BGT} + 0,28 \times \text{RH} - \text{WS} + 10,66. \quad \text{S}(\text{BGT}) = 1 / (1 + \exp(-(\text{BGT} - 25) / 2,25)).$$

Considerando o HLI como índice ambiental, sem discriminação das raças, os valores de HLI podem ser interpretados segundo Ferreira et al. (2017) e Silva et al. (2007) que consideram os valores de 89 como seguros; entre 89 e 92 indicam cuidado; entre 92 e 95, extremo cuidado; e acima de 95, perigo extremo. Entretanto, na presente pesquisa com a utilização da calculadora on line katestone, foi possível

mensurar os limites superiores para cada raça e tratamento e posteriormente utilizado para interpretação e análise de desconforto térmico dos animais.

Valores limiares baixos foram estabelecidos em HLI = 77 para todos os animais. Os limiares superiores foram calculados de acordo com a calculadora on-line Katestone em: <http://chlt.katestone.com.au/toolbox/rap-calculator/> e variaram entre os grupos experimentais segundo os parâmetros: i) genótipo (*Bos indicus* Nelore vs. *B. taurus* Angus); ii) cor da pelagem (branca em Nelore vs. preta em Angus) e iii) sombreamento (3-5m² / cabeça vs. ausência de sombra). Todos os outros parâmetros foram estabelecidos constantes (dias na alimentação = até 80 dias; status do animal = saudável; status do confinamento = 100 mm de pack depth; temperatura da água = 20-30 ° C).

Os limites superiores resultantes de HLI para posterior cálculo de AHLU foram: Angus-sol = 87; Angus-sombra = 91; Nelore-sol = 97 e Nelore-sombra = 104.

3 - O índice AHLU (Unidade de Carga Térmica Acumulada) representa a quantidade de calor acumulado no gado durante um período de tempo e depende do valor do HLI. Valores elevados de HLI resultam em um aumento mais rápido na AHLU. Já valores baixos de HLI resultam em uma diminuição da AHLU (isto é, o resfriamento e a recuperação do gado). Dessa forma certos limites são considerados, o limiar inferior ocorre a um valor de HLI de 77, ou seja, valores de HLI abaixo de 77, o gado resfria e se recupera. O limiar superior depende do tipo e condição do gado, o intervalo de valores HLI entre 77 e o limite superior é chamado de zona termo-neutra.

O cálculo de AHLU foi realizado mediante:

$$\text{AHLU}_{\text{atual}} = \text{AHLU}_{\text{anterior}} + \text{incremento.}$$

Se (HLI <77) então incremento = intervalo * (HLI - 77) / 2.

Se (HLI estiver entre 77 e o limite superior), então incremento = zero.

Se (HLI > limite superior) então incremento = intervalo * (HLI - limite superior).

O intervalo é o tempo entre as medições sucessivas do HLI. Seu valor é 1,0 para um intervalo de uma hora, 0,5 para um intervalo de 30 minutos, 0,25 para um intervalo de 15 minutos e assim por diante.

Os valores de referência para análise do estresse segundo o AHLU são: 0: insignificante, 1-20: baixo risco, 21-50 :risco médio, 51-100: alto risco, acima de 100: risco extremo.

Considerando que os dados ambientais possam ter se modificado ao longo do experimento e que o efeito da exposição ao calor apresenta um efeito acumulativo, foram realizadas análises de todo o período experimental (PRE e EXP) e especificamente nos períodos de P0 (primeira coleta de tecido muscular) e P1 (última coleta de tecido muscular).

4.2.6 Controle de exposição ao calor

Os experimentos com os animais foram realizados no setor de Zootecnia da FMVA-UNESP-Araçatuba. Os animais foram mantidos sob confinamento, expostos às condições ambientais (com avaliação de THI- temperature-humidity-index, mensurado por um “globo negro”) durante o verão. Parte dos animais foi exposta ao sol e parte permaneceu na sombra (Sombrite 80%). Todos os animais possuíram sensores remotos de temperatura no rúmen (DVM System, LCC, www.dvmsystems.com) e de movimentação e ruminação através do sensor SCR (Sistems Heat time, www.scrdairy.com). Estes parâmetros serviram para avaliar o grau de estresse e alteração da homeostase e eventualmente remover do experimento animais que estiveram sob risco de morte.

4.2.7 Seleção e amostragem dos tecidos para análises

Os fragmentos de músculo foram colhidos por biópsia realizada com lâminas de bisturi após bloqueio anestésico local na pele e congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer sob -80°C , com vantagem (em relação à eutanásia) de preservar a vida do bovino e permitir avaliar as modificações fisiológicas em adaptação ao calor. As amostras de tecidos foram coletadas por Médicos Veterinários após procedimento de sedação, tranquilização e anestesia local, seguido de ponto na pele após o procedimento de biópsia, seguindo as recomendações do protocolo do Comitê de Ética no Uso de Animais.

As amostras analisadas para atividade mitocondrial foram dos períodos P0 (adaptação) e P1 (experimento).

4.3 Análises

4.3.1 Atividade mitocondrial

As análises de atividade mitocondrial de complexo I foram mensuradas a partir das amostras coletadas de músculo esquelético do tríceps braquial, coletadas por meio de biópsia, e foram analisados segundo SPINAZZI et al. (2012).

Foram selecionadas 78 amostras para análise do complexo I mitocondrial, do período P0 e posteriormente comparados ao P1. A seleção das amostras dos animais no período de adaptação foi caracterizada por 8 animais no grupo Nelore sombra e 9 Nelore sol, 10 Angus sombra e 9 Angus sol. Posteriormente as análises das amostras no período P4 foram selecionados 11 Nelore sombra, 10 Angus sombra, 10 Nelore sol e 11 Angus sol.

As amostras coletadas, em torno de 1 a 2g, foram armazenadas em freezer a -80°C . A preparação do homogenato iniciou-se com a retirada dos tecidos adiposo e conectivo visível e mantidos em tampão de homogeneização e mantidos em gelo, para inativar as enzimas proteolíticas.

O músculo foi homogeneizado utilizando um triturador limpo de vidro, tubo Potter Elvehjem e mantido sob agitação com auxílio de um pistilo fixo e rotação lenta e controlada de cima para baixo, por 3 sessões de 10 segundos e intervalo de 1 minuto, conservado em gelo. Foi imprescindível a adequada higienização dos materiais utilizados, a fim de evitar contaminação.

As amostras foram centrifugadas à 800RPM por 5 minutos à 4°C e posteriormente utilizado o sobrenadante para análises posteriores.

A quantificação da proteína foi realizada pelo método de Biureto, que baseia-se na determinação da concentração de ligações peptídicas através da medida da absorbância do complexo cobre-nitrogênio, que absorve o comprimento de onda de 540nm, sendo a absorbância proporcional à concentração de proteína na solução analisada e comparada à solução padrão de BSA (albumina sérica bovina) à 1% (SILTANEN; KEKKI, 1960).

Após esse procedimento o tecido foi utilizado para análise da atividade do complexo mitocondrial. As análises do complexo I (NADH oxidoreductase) foram realizadas da seguinte forma:

Em uma microplaca contendo 96 poços foi:

Adicionado 280 μL de tampão de ensaio (TRIS 20mM, pH:7,4);

3 μL de Antimicina A;

Proporção de 0,06mg de proteína da amostra após quantificação proteica do homogenato;

3 µL de ferricianeto de potássio;

Em uma amostra foi adicionado 10 µL de rotenona para comprovação do bloqueio da reação demonstrando a especificidade do teste.

Após incubação de 5 minutos à 37°C, foi adicionado 2 µL de NADH para início da reação.

A placa foi transferida para leitura da absorbância e lida a 450nm por 8 vezes com uma leitura por minuto.

A análise da atividade do complexo I realizada mediante a média da queda da absorbância entre os pontos e aplicada na seguinte equação para quantificação da atividade enzimática:

$$\text{Atividade enzimática (nmol/min}^{-1}\text{/mg}^{-1}) = \frac{(\text{Delta da Abs/min} \times 300)}{[(\text{coeficiente de extinção do substrato ou reagente do complexo analisado} \times \text{volume da amostra usado em mL}) \times (\text{concentração de Ptn da amostra em mg/mL})]}$$

Nota: o coeficiente de extinção do substrato do complexo I (ferricianeto de potássio) é de 0,002022mM⁻¹cm.

Os resultados da atividade enzimática mitocondrial foram transformados de nmol/min/mg para µmol/min/mg.

4.3.2 Análise do metabolismo endócrino

Para compreensão do metabolismo endócrino foram analisadas as quantificações hormonais de testosterona, Hormônio Luteinizante (LH) e Leptina. Após a coleta das amostras sanguíneas, a partir da jugular, foram transferidas em tubos de 10 ml contendo EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) (10%). O plasma foi separado por centrifugação refrigerada e armazenado a -20°C.

As dosagens foram realizadas por meio de radioimunoensaio e o sistema adotado foi o de competição com amplificação de sinal utilizando a interação biotina-estreptavidina peroxidase.

4.3.4 – Análise de espessura de tecido subcutâneo

A gordura subcutânea foi medida pelo equipamento GE LOGIC-100 de ultra-som com transdutor de 5MHz. Enquanto os animais foram contidos para pesagem, imagens ultra-sonográficas da espessura da gordura subcutânea foram coletadas posicionando o transdutor transversalmente no músculo Longissimus dorsi, no espaço entre a 12^a e a 13^a costelas identificadas pela palpação (Figura 1). O óleo vegetal foi usado como interface entre a pele e o transdutor.

Figura 1. Mensuração da espessura da gordura subcutânea em bovinos Nelore por ultrassonografia, Araçatuba/SP – 2019.



4.3.5 Dados comportamentais

Os parâmetros de movimentação (atividade relativa) e ruminação foram mensurados por radiotelemetria por meio do sensor SCR (Systems Heat time, www.scrdairy.com) e comparado segundo raça e tratamento submetido (sol ou sombra).

4.3.6 Análise estatística

Os parâmetros ambientais, atividade relativa dos animais (movimentação), ruminação, testosterona e LH foram analisados segundo o teste t de student, utilizando o programa GraphPad Prism versão 6.

A análise da atividade mitocondrial em comparação à adaptação e experimento foi realizada mediante o teste t pareado e as análises entre os grupos foi utilizado o ANOVA com teste post-hoc de Tukey com o auxílio do programa R.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Parâmetros ambientais

Análise de todo o experimento (PRE) e (EXP)

Os dados ambientais confirmaram que os animais foram submetidos à condição de desconforto térmico. Na tabela 1 são apresentados os valores do Índice de Temperatura e Umidade (THI) durante os períodos PRE e EXP.

Tabela 1 - Variação do THI (índice de Temperatura e Umidade) durante os períodos PRE e EXP, Araçatuba/SP-2019.

	PRE	EXP
Min.	63	67
Mediana	76	77
Média	77	77
Máx.	86	85

Legenda: PRE (03/10/2015 à 03/12/2015) e EXP (04/12/2015 à 03/02/2016). O índice foi calculado segundo os dados ambientais de temperatura e umidade, obtidos da estação meteorológica CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo) localizada no Campus de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista –UNESP, Araçatuba/SP.

Segundo Valente et al. (2015) valores acima de 76,4 caracterizam baixo estresse e acima de 81,5 alto estresse para bovinos, sendo assim todos os animais foram submetidos à desconforto durante o período PRE e EXP, com valores médios de 77 e máximos de 86 e 85, respectivamente.

Os resultados de mediana e máximo para o índice HLI (Índice de carga de calor), que foi utilizado para posterior cálculo do índice AHLU) foram maiores ($p < 0,05$) durante o período do experimento (EXP) comparados aos períodos de adaptação (PRE; Tabela 2.).

Tabela 2. Variação do HLI (Índice de Carga de Calor) durante os 2 períodos: PRE (adaptação) e EXP (durante o experimento), Araçatuba/SP, 2019.

	PRE	EXP
Min.	51.44	53.24
Mediana*	79.76	83.40
Média	79.18	81.63
Máx.*	98.25	104.57

Legenda: * $p < 0,05$. PRE (03/10/2015 à 03/12/2015) e EXP (04/12/2015 à 03/02/2016). O índice foi calculado por meio dos dados de temperatura do Globo Negro (°C), umidade relativa do ar (%) e

Velocidade do Vento (m/s), obtidos por meio de estação meteorológica CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo) localizada no Campus de Medicina Veterinária do campus da Universidade Estadual Paulista –UNESP, Araçatuba/SP.

No período PRE o HLI máximo foi de 98,25 e durante o EXP 104,57, segundo os valores referenciais para HLI (FERREIRA et al.,2017; SILVA et al., 2007), que consideram acima de 95 como perigo extremo para bovinos, os valores máximos de HLI a que os animais foram expostos retratam desconforto térmico.

Na tabela 3 são apresentados os valores percentuais de horas acima do limiar máximo de HLI durante cada período, considerando que a sensibilidade ao HLI varia entre raças e tratamento.

Tabela 3. Percentil de horas acima do limiar superior de HLI (Índice de Carga de calor), considerando raça e tratamento por dia nos períodos PRE e EXP, Araçatuba/SP, 2019.

	PRE			EXP		
	N	A	NSom	Nsol	Asom	Asol
Min.	0	0	0	0	0	38
1º Quartil	0	9	0	0	29	46
Mediana	0	33	0	0	38	50
Média	0	25	0	3	35	49
3º Quartil	0	38	0	4	42	54
Máx.	0	46	4	29	54	63

PRE (03/10/2015 à 03/12/2015) e EXP (04/12/2015 à 03/02/2016); (N = Nelore; A = Angus). (Angus sol = 87, Angus sombra = 91, Nelore sol = 97 e nelore sombra =104)O índice foi calculado por meio dos dados de temperatura do Globo Negro (°C), Humidade relativa do ar (%) e Velocidade do Vento (m/s), obtidos por meio de estação meteorológica CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo) localizada no Campus de Medicina Veterinária do campus da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Araçatuba/SP. Limiares máximos de HLI segundo raça e tratamento foram calculados segundo a calculadora on-line Katestone em: <http://chlt.katestone.com.au/toolbox/rap-calculator/>

Os animais da raça Angus apresentaram maior percentual de horas acima do limiar de HLI em comparação com os Nelore tanto PRE quanto EXP. No período PRE os Nelores não foram submetidos à desconforto, com 0% acima do limiar máximo do índice e durante o experimento o valor máximo para os Nelores sol foi de 29% de horas acima do limiar máximo. Durante a adaptação os animais da raça Angus foram expostos à 46% de horas acima do limiar máximo do índice. O percentual de horas aumentou do período de Adaptação (PRE) para o período Experimental (EXP) tanto nos Angus expostos ao sol (63%) quanto nos Angus com sombra (54%).

Considerando o HLI durante o período experimental (EXP), foi possível observar que os Nelores sombra não foram expostos à condição de desconforto térmico quando comparados com período PRE. Os Nelores expostos ao sol sofreram maior desconforto térmico comparando o período PRE com o período EXP, e comparados com os Nelores que ficaram na sombra.

Tabela 4. Dados médios do índice AHLU (Unidade de Carga de Calor Acumulado), segundo raça (Nelore e Angus) e tratamento (sombra e sol), durante os períodos PRE e EXP, Araçatuba/SP – 2019.

	PRE	EXP
Nelore sombra	0	0,0031±0,04
Nelore sol	0	0,34±1,54
Angus sombra	11,64±15,79	55,81±62,57
Angus sol	11,64±15,79	2003,04±1133,6

Legenda: PRE (03/10/2015 à 03/12/2015) e EXP (04/12/2015 à 03/02/2016). O índice AHLU foi calculado segundo a equação - $AHLU_{atual} = AHLU_{anterior} + \text{incremento}$. Sendo o incremento calculado por meio do índice HLI (Índice de Carga de Calor), considerando o índice mínimo de 77 para todos os animais e os valores superiores por raça e tratamento: Angus sol=87, Angus sombra=91, Nelore sol=97 e Nelore sombra=104. Incremento = HLI entre 77 e o limite superior: incremento = zero; $HLI < 77$: incremento = $\text{intervalo} * (HLI - 77) / 2$. $HLI >$ limite superior: incremento = $\text{intervalo} * (HLI - \text{limite superior})$. PRE (Adaptação); EXP (durante o experimento). Cálculo de HLI por meio dos dados de temperatura do Globo Negro (°C), Humidade relativa do ar (%) e Velocidade do Vento (m/s), obtidos por meio de estação meteorológica CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo) localizada no Campus de Medicina Veterinária do campus da Universidade Estadual Paulista –UNESP, Araçatuba/SP e utilizada calculadora Katestone disponível em: <https://chlt.katestone.com.au/faq/what-are-the-correct-equations-for-calculating-hlis-and-ahlus/>.

Considerando a média da Unidade de Calor Acumulada (AHLU) constatou-se que Nelore não foi exposto à desconforto térmico em período algum. Durante o período EXP os animais da raça Angus receberam maior carga de calor acumulada, principalmente os expostos ao sol. No período PRE os animais não foram expostos a desconforto entretanto, no período EXP os Angus sombra tiveram estresse moderado (55,81±62,57) e os Angus sol sofreram risco extremo (2003,04±1133,6), Tabela 4.

Análise dos parâmetros ambientais próximo ao período de biópsias - adaptação (P0) e experimento (P1):

Foi feita uma análise dos parâmetros ambientais no período restrito em que foi realizada a biópsia de tecido muscular para posterior avaliação da atividade

enzimática mitocondrial. Foi realizada a média dos dias que compreenderam os períodos P0 (24 à 30/11/2015) e P1 (28/01 à 03/02/2016).

O índice THI continuou identificando desconforto térmico, no P1 ficou acima de 75, maior ($p < 0,05$) que o índice no período P0 (Tabela 5). É importante salientar que a variação desse índice é ambiental e não difere entre raça ou tratamento.

Tabela 5 – Índice de Temperatura e umidade (THI) nos períodos de P0 e P1, Araçatuba/SP – 2019.

	P0	P1
Mínimo	67,28	72,14
Mediana	74,54	77,37
Média*	73,01	75,75
Máximo	84,76	85,08

Legenda: Dados obtidos por meio de estação meteorológica CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo) localizada no Campus de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista –UNESP. * $< 0,05$.

O índice de carga de calor também identifica que os animais estavam em desconforto térmico tanto no P0 (91) quanto no P1 (94), que entra na classificação de extremo cuidado (Tabela 6).

Tabela 6– Índice de Carga de Calor (HLI) nos períodos de P0 e P1. (Valor mínimo e máximo, mediana e média). Araçatuba/SP-2019.

	P0	P1
Mínimo	82,48	83,02
Mediana	92,91	98,62
Média	91,26	94,06
Máximo	107,89	107,80

O índice é calculado por meio dos dados de temperatura do Globo Negro ($^{\circ}\text{C}$), umidade relativa do ar (%) e Velocidade do Vento (m/s), obtidos por meio de estação meteorológica CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo) localizada no Campus de Medicina Veterinária do campus da Universidade Estadual Paulista –UNESP, Araçatuba/SP.

O índice que indica o acúmulo de calor nos animais retrata que no período P0 os mesmos não estavam em desconforto térmico com médias de valor 0 para Nelore e 12,84 para Angus, tanto sombra e sol para ambas as raças. Entretanto, durante o experimento (P1) a raça Angus acumulou muito calor, com valor médio de $3526,54 \pm 151,73$, indicando estresse extremo segundo a referência do índice (> 100) (Tabela 7).

Tabela 7. Dados médios do índice AHLU (Unidade de Carga de Calor Acumulado), segundo raça (Nelore e Angus) e tratamento (sombra e sol), durante os períodos de P0 e P1. Média±desvio padrão. Araçatuba/SP – 2019.

	P0	P1
Nelore sombra	0	0
Nelore sol	0	0,01±0,35
Angus sombra	12,84±14,11	23,71±14,83
Angus sol	12,84±14,11	3526,54±151,73

Legenda: O índice AHLU foi calculado segundo a equação - $AHLU_{atual} = AHLU_{anterior} + \text{incremento}$. Sendo o incremento calculado por meio do índice HLI (Índice de Carga de Calor), considerando o índice mínimo de 77 para todos os animais e os valores superiores por raça e tratamento: Angus sol=87, Angus sombra=91, Nelore sol=97 e Nelore sombra=104. Incremento = HLI entre 77 e o limite superior: incremento = zero; $HLI < 77$: incremento = $\text{intervalo} * (HLI - 77) / 2$. $HLI > \text{limite superior}$: incremento = $\text{intervalo} * (HLI - \text{limite superior})$. PRE (Adaptação); EXP (durante o experimento). Cálculo de HLI por meio dos dados de temperatura do Globo Negro (°C), Humidade relativa do ar (%) e Velocidade do Vento (m/s), obtidos por meio de estação meteorológica CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo) localizada no Campus de Medicina Veterinária do campus da Universidade Estadual Paulista –UNESP, Araçatuba/SP e utilizada calculadora Katestone disponível em: <https://chlt.katestone.com.au/faq/what-are-the-correct-equations-for-calculating-hlis-and-ahlus/>.

5.2 Parâmetros comportamentais e metabolismo

5.2.1 - Atividade enzimática mitocondrial de complexo I – NADH oxidoreductase

A especificidade da atividade do complexo I que é estimada pela porcentagem média de inibição pela rotenona ficou em 80%, considerada satisfatória segundo Spinazzi (2012).

Todos os grupos apresentaram um aumento ($p < 0,05$) na atividade enzimática mitocondrial, entre o período de adaptação e o período experimental (tabela 8 e figura 2). Entretanto, não houve diferença entre as raças e os tratamentos durante o período experimental, Tabela 14.

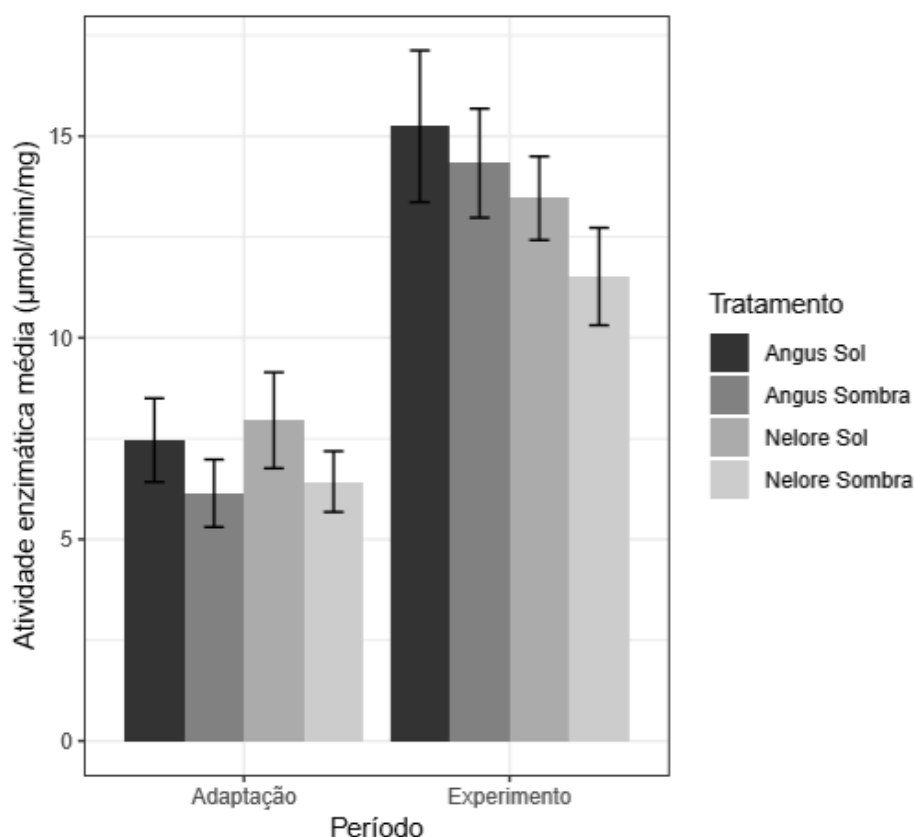
Tabela 8 – Análise da atividade enzimática mitocondrial do complexo I ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) de bovinos Nelore ou Angus quando na adaptação (P0) e quando na sombra ou no sol (P1). A comparação durante a adaptação realizada pelo teste t de Student pareado considerado $p < 0,05$. (Média±desvio padrão). Araçatuba/SP – 2019.

	P0 (sol)	P0 (sombra)	P1 (Sol)	P1 (Sombra)
Nelore	8,20±3,24	6,43±2,13	13,46±3,28	10,73±4,46
Angus	7,69±6,87	6,14±2,64	15,25±6,23	14,33±4,27
Raça	Comparação P0 x P1			P-valor
Angus	Sombra			0,0002*
Angus	Sol			0,0303*
Nelore	Sol			0,0301*
Nelore	Sombra			0,0142*

Após o período de adaptação o aumento da atividade mitocondrial ocorreu em ambas as raças e tratamentos. Nos Nelores sol a atividade enzimática mitocondrial aumentou 64% entre o P0 e P1; nos Nelores sombra aumentou 67%; nos animais do grupo Angus sol a atividade enzimática mitocondrial aumentou 98% entre os períodos; Nos Angus sombra aumentou 133%.

Os animais da raça Angus apresentaram maior aumento entre o período de adaptação e experimento em comparação aos Nelores, isso pode ser especulado pelo fato dos animais Angus estarem menos adaptados ao calor, pois aparentemente os Nelores não aumentaram muito a atividade enzimática mitocondrial. Além disso, considerando os índices ambientais, Angus apresentaram maior desconforto térmico que os Nelores, independentemente dos tratamentos sombra ou sol.

Figura 2 – Atividade enzimática mitocondrial do complexo I expresso em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de bovinos Nelore e Angus sob adaptação (P0), sombra e sol (P1). Araçatuba/SP – 2019.



Análise em comparação à adaptação e experimento foi realizada mediante o teste t de Student pareado e as análises entre os grupos foi utilizado o ANOVA com teste post-hoc de Tukey, considerado valor $p < 0,05$.

No período de adaptação não foi observada efeito de raça ou tratamento sobre a atividade mitocondrial, assim como no período experimental, tabela 9.

Tabela 9 – Análise comparativa dos dados da atividade do complexo I mitocondrial entre período, raça e tratamento. A análise dos períodos utilizou-se o teste t de Student pareado e entre os tratamentos o ANOVA com teste post-hoc de Tukey, considerado valor $p < 0,05$. Araçatuba/SP, 2019.

Comparação	Período	P-valor
Angus Sombra – Angus Sol	Adaptação	0.7554510
Nelore Sol – Angus Sol	Adaptação	0.9845584
Nelore Sombra – Angus Sol	Adaptação	0.8828117
Nelore Sol – Angus Sombra	Adaptação	0.5310173
Nelore Sombra – Angus Sombra	Adaptação	0.9962594
Nelore Sombra – Nelore Sol	Adaptação	0.6999889
Angus Sombra – Angus Sol	Experimento	0.9681549
Nelore Sol – Angus Sol	Experimento	0.8108326
Nelore Sombra – Angus Sol	Experimento	0.2649425
Nelore Sol – Angus Sombra	Experimento	0.9741731
Nelore Sombra – Angus Sombra	Experimento	0.5274336
Nelore Sombra – Nelore Sol	Experimento	0.7814821

Nota: as análises realizadas foram dos períodos de adaptação (P0) e experimento (P1).

A hipótese que a atividade mitocondrial seria reduzida durante a exposição ao calor como forma de adaptação metabólica, para reduzir a produção de calor, não foi comprovada. Houve um aumento da atividade mitocondrial muscular do período de adaptação (P0) até o final do período Experimental (P1) em ambas as raças e tratamentos, Tabela 8. É possível que no período experimental tenha havido aumento na demanda energética dos animais.

Para defender o organismo contra o estresse térmico, mecanismos de proteção celular, como restauração e ressíntese de proteínas danificadas, são induzidos e considerados processos associados com alta demanda de ATP, e adaptações mitocondriais induzidas por estresse de calor podem contribuir para a demanda energética (WENZ, 2013).

As adaptações mitocondriais no músculo esquelético, que incluem biogênese mitocondrial, aumento da oxidação mitocondrial e atividade enzimática podem ser expressas por vários mecanismos de estresse, pois a manutenção da produção de ATP mitocondrial é necessária para apoiar a função celular e tecidual não apenas sob condições normais, mas também em resposta ao estresse celular

(TAMURA, 2014). A sinalização celular responsável pela biogênese mitocondrial envolve a ativação da PGC1-alfa (peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha), definido como um regulador co-transcricional, que ativa diferentes fatores de transcrição e replicação do mtDNA (DNA mitocondrial). Por sua vez, um dos ativadores do PGC1-alfa é a SIRT1 ((sirtuin (silent mating type information regulation 2 homologue) 1) (JORNAYVAZ; SHULMAN, 2010).

Corroborando os nossos achados, segundo Tamura e Hatta (2017) o estresse térmico aumenta o conteúdo mitocondrial e o conteúdo protéico das enzimas de forforilação oxidativa mitocondriais bem como a atividade enzimática. A exposição ao calor aumenta a atividade de PGC1-alfa, SIRT1, AMPK que resultam em biogênese mitocondrial (CHIEN-TING e BROOKS, 2012).

O estresse calórico pode ser definido como o estímulo exercido pelos componentes do ambiente térmico sobre um organismo, causando nele uma reação fisiológica proporcional à intensidade aplicada e à capacidade do organismo em compensar os desvios causados (DELFINO et al., 2012).

5.2.2 - Acompanhamento das concentrações plasmáticas de testosterona e LH

As concentrações plasmáticas de testosterona foram analisadas somente durante o período experimental. Foi possível observar que os animais da raça Angus apresentaram concentração maior comparado aos Nelore, independente do período.

Animais do grupo Angus sol apresentaram maiores ($p= 0,0193$) concentrações de testosterona que os Nelores sol, o mesmo foi observado quando os Angus sombra foram comparados com os Nelores sombra ($p=0,0112$). As concentrações médias podem ser observadas na Tabela 10.

Analisando as concentrações da primeira e última coleta de plasma a concentração de testosterona aumentou em todos os grupos em função do tempo (Figura 3). As médias, desvio padrão e análise segundo o teste t de Student são expressos na tabela 10.

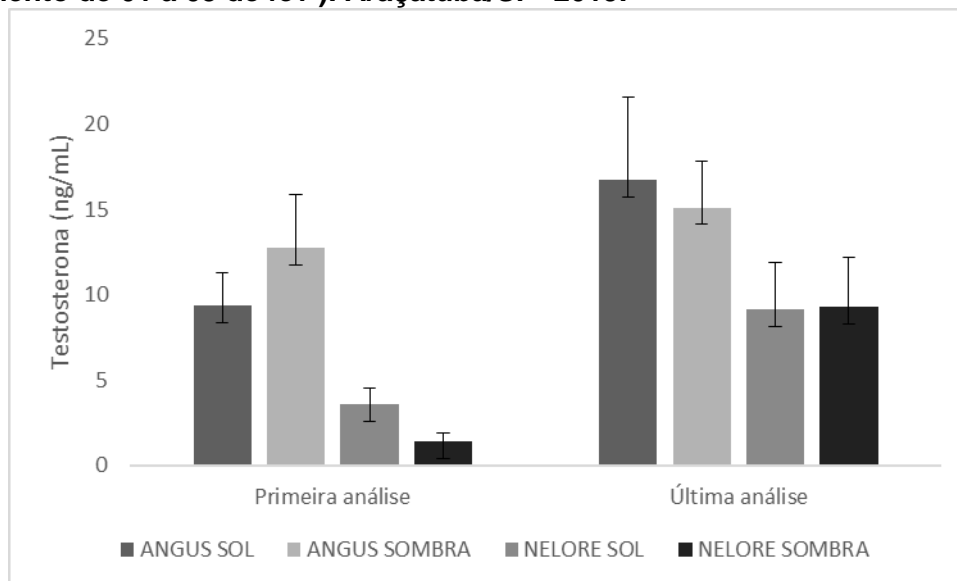
Tabela 10 – Concentração plasmática de testosterona (ng/mL) e LH (ng/mL) de Angus sol, Angus sombra, Nelore sol e Nelore sombra nos períodos de primeira coleta (08 a 11 de dez/2015); e última coleta (01 a 03 de fev/2016). (Média±desvio padrão e valor p).

Testosterona (ng/mL)			
	1ª Análise	Última análise	P-valor
Nelore sol	3,5±3,2	9,1±9,03	0,1799
Nelore sombra	1,4±1,7	9,2±9,75	0,0193*
Angus sol	9,3±6,36	16,7±16,78	0,097
Angus sombra	12,7±9,90	15,1±8,58	0,4216
Nelore sombra x Angus sombra			0,0112
Nelore sol x Angus sol			0,0193
LH (ng/mL)			
	1ª Análise	Última análise	P-valor
Nelore sol	0,37±0,14	0,55±0,47	0,2405
Nelore sombra	0,29±0,09	0,47±0,15	0,0071*
Angus sol	0,50±0,28	0,45±0,18	0,7273
Angus sombra	0,67±0,59	0,41±0,08	0,1614
Nelore sombra x Angus sombra			0,5920
Nelore sol x Angus sol			0,3487

As concentrações de testosterona foram significativamente maiores para os animais da raça Angus tanto sol quanto sombra em comparação aos Nelores, respectivamente. Entretanto, quando analisados os aumentos percentuais de D1 à P1, os Nelores apresentaram maior expressão, com aumento de 160% para Nelore sol, 557% para Nelore sombra, 79% para Angus sol e 18% para Angus sombra.

Quando analisadas as concentrações médias de LH é possível observar que as concentrações aumentaram para os Nelores e reduziram para os Angus, Tabela 12. Isso pode ser justificado pelo fato dos animais da raça Angus estarem em maior desconforto térmico que os Nelores e os níveis de testosterona aumentarem para os Angus devido ao maior perímetro escrotal dos animais (devido a precocidade da raça) em comparação aos Nelores ($p < 0,001$).

Figura 3 – Concentrações plasmáticas de testosterona (ng/mL) de Angus sol, Angus sombra, Nelore sol e Nelore sombra nos D1 (adaptação de 08 a 11 de dez); P1 (experimento de 01 a 03 de fev). Araçatuba/SP- 2019.



As maiores concentrações de testosterona nos Angus provavelmente é consequência da precocidade sexual da raça, animais da raça Nelore são mais tardios (BIANCHINI, 2008). O estresse por calor não afetou as concentrações hormonais de testosterona, provavelmente em função de um processo de adaptação (CHACUR et al., 2010).

A concentração de testosterona aumenta durante a puberdade, pode variar com a estação do ano e entre animais em função da raça ou espécie (DIAS et al., 2014).

A concentração sérica de testosterona aumentou em função do tempo entre o P0 e o P1, também podendo repercutir na miogênese dos animais. A literatura sobre o efeito dos níveis de testosterona na biogênese mitocondrial e gasto energético tem de aprofundado (TSAI; SAPOLSKY, 1996; USUI et al, 2014; VASCONSUELO; MILANESI; BOLAND, 2013; FINK; MATSUMOTO; TAMURA, 2019).

Segundo Usui et al. (2014) a testosterona ativou a biogênese mitocondrial incluindo a expressão de PGC1 α . Os autores indicam que o aumento mitocondrial induzido pela testosterona resulta em biogênese no músculo esquelético sendo responsável pelo aumento do gasto de energia, corroborando nossos achados.

5.2.3 Espessura de gordura subcutânea

A espessura de gordura subcutânea foi analisada em 2 momentos: P0 (adaptação - 28/11/15) e P1 (experimento - 04/02/16); como apresentado na Tabela 11.

Tabela 11 - Espessura de gordura subcutânea (mm) avaliada por ultrassonografia nos períodos de adaptação e experimento (Média± desvio padrão e P-valor)

Grupo	P0	P1
Angus_sol	2,17±0,72	3±0,45
Angus_sombra	2,36±0,92	2,5±0,97
Nelore_sol	3,15±1,21	3,77±0,93
Nelore_sombra	3,5±1,09	4,58±1,16
		P-valor
<i>Nelore sol x Angus sol</i>		0,0199*
<i>Nelore sombra x Angus sombra</i>		0,0002*
<i>Angus sol x Angus sombra</i>		0,1402
<i>Nelore sol x Nelore sombra</i>		0,0645

A espessura do depósito de gordura no subcutâneo foi influenciada pela raça, mas não pelo tratamento. Ao final do experimento os Nelore sol apresentaram maior espessura do tecido adiposo subcutâneo que os Angus sol ($p=0,0199$), assim como os Nelore sombra com maior depósito que os Angus sombra (0,0002).

A exposição ou não ao sol não afetou o depósito de gordura no subcutâneo, quando os Angus sol foram comparados com os Angus sombra ou quando os Nelore sol foram comparados com os Nelore sombra não houve diferença.

Mas é provável que os Angus tenham maior deposição de gordura intramuscular, uma vez que a concentração de leptina foi maior nos Angus ($p = 0,011$) do que nos Nelore, mas a concentração de leptina não diferiu entre os tratamentos ($p = 0,35$). Tabela 14 retrata média e desvio padrão. Isso pode ser especulado uma vez que a raça apresenta maior característica de marmorização que Nelore.

Dessa forma, pode-se inferir que apesar da raça Angus ser considerada sensível ao calor, o processo de adaptação à altas temperaturas esteja em processo. Em animais mantidos em alta temperatura, há um maior acúmulo de

gordura nos depósitos internos (gordura interna e vísceras) em detrimento a gordura subcutânea. Estas alterações são o reflexo da adaptação do animal à temperaturas elevadas, pois facilitam as trocas de calor com o meio, através da evaporação (FIALHO; OST; OLIVEIRA, 2001).

5.2.4 - Movimentação dos animais

Assim como os parâmetros ambientais, a movimentação também foi analisada em dois momentos (durante todo o período e especificamente durante os períodos de análise da atividade mitocondrial – P0 (de 24 à 30/nov) e P1 (de 28/jan à 03/fev), uma vez que possa ter sofrido mudanças e alterando a interpretação dos resultados.

Movimentação dos animais durante todo o período

Independente do tratamento a que os animais foram submetidos, pode-se observar que houve diminuição na movimentação nos dias 35 e 56 em ambas as raças. Figura 4 (A, B e C) e 5 (A, B e C), essas reduções na movimentação foram consequência da alteração do manejo dos animais (contenção para coleta de amostras).

Na comparação entre os tratamentos (sol e sombra) para cada raça, durante o período experimental houve diferença, porém essas foram pontuais (Figura 4 B e C). Quando foi comparado o efeito das raças dentro de cada tratamento (Angus sol com Nelore sol; Angus sombra com Nelore sombra), foi possível observar que os Angus se movimentaram mais que os Nelore (Figura 5 A e B). Essa diferença no comportamento entre as raças fica mais evidente quando se compara os Angus sol com os Nelore sol (Figura 5A), onde é possível observar a ocorrência de intervalos prolongados em que houve diferença entre as raças (do dia 9 ao 19; 23 a 31; e do dia 40 ao 52).

Figura 4. Atividade relativa dos animais das raças Angus e Nelore, com sombra ou no sol durante o período experimental. Araçatuba/SP – 2019. * $p < 0,05$

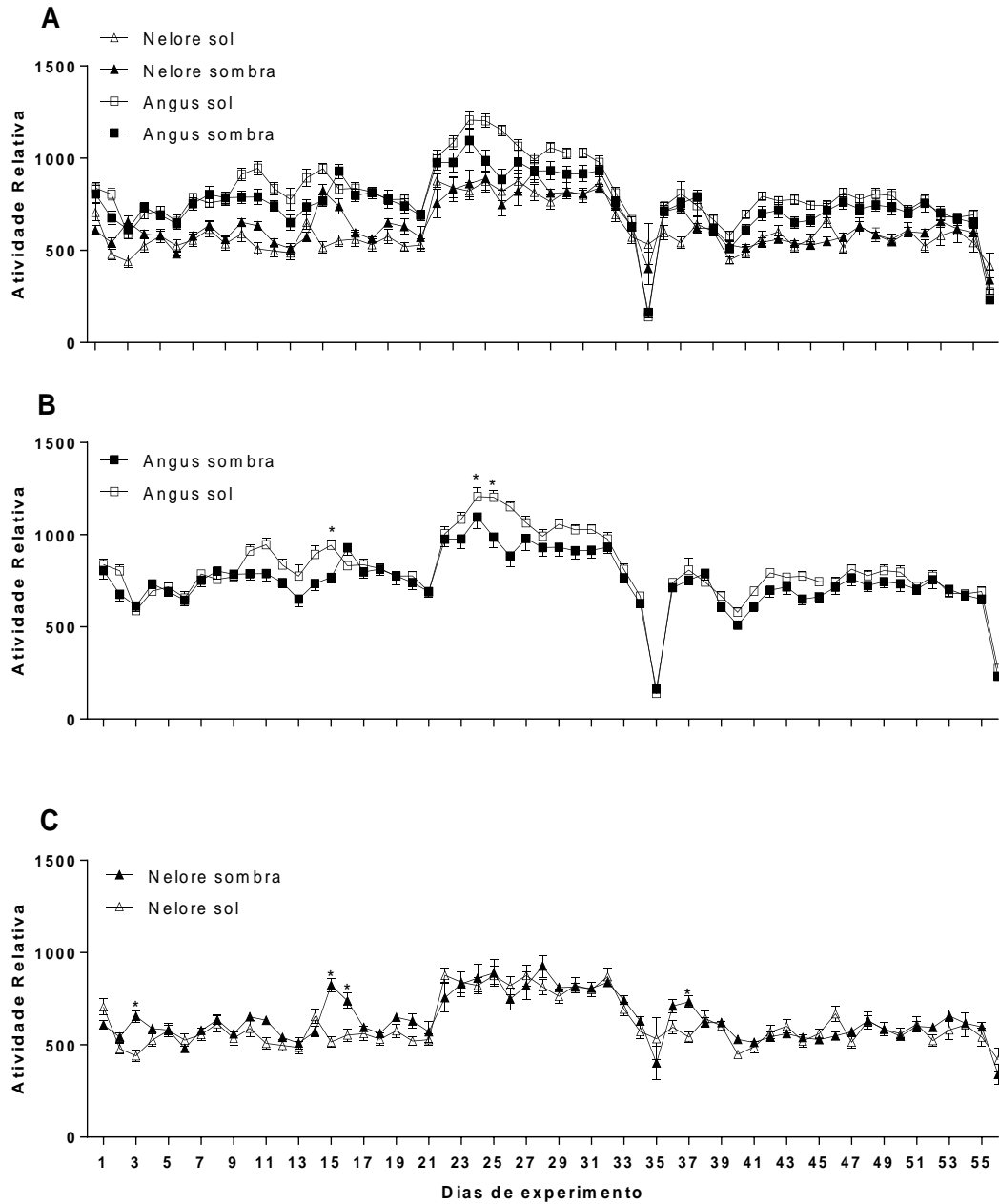
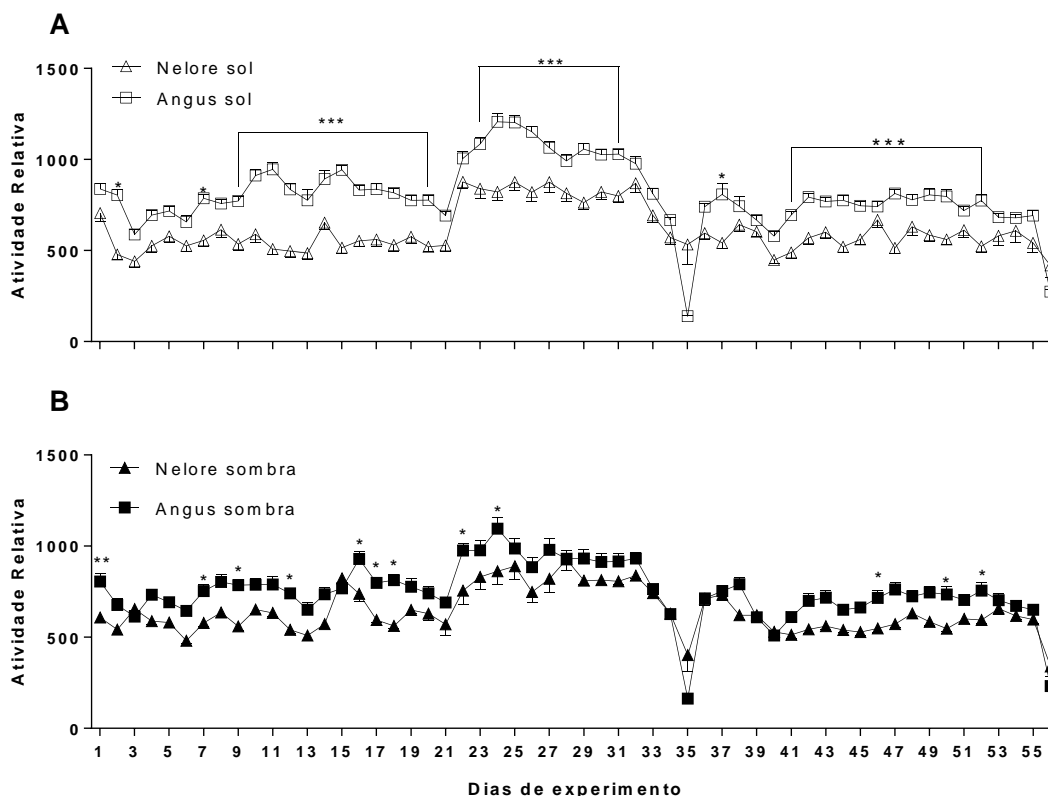


Figura 5. Análise comparativa sobre a atividade relativa dos animais das raças Angus versus Nelore, com sombra ou sol durante o período experimental. Araçatuba/SP – 2019. *p<0,05



Movimentação dos animais durante o período de adaptação (P0) e o período do experimento (P1)

Corroborando com os dados de todo o período, os animais da raça Angus se movimentaram mais que os Nelore. No período diurno durante o experimento os Angus sombra apresentaram uma média de movimentação de 1331 ± 205 enquanto que para os Nelore foi de 1103 ± 41 ($p=0,0011$). Os Angus sol se movimentaram 1342 ± 167 (movimentos relativos) enquanto que os Nelore sol 1123 ± 116 ($p=0,0008$). Os Angus sombra também se movimentaram mais que Nelore sombra no período noturno, 437 ± 61 e 386 ± 18 , respectivamente ($p=0,0117$). No período noturno os animais expostos ao sol apresentam a mesma intensidade de movimentação ($p=0,1122$; Tabela 12).

Comparando o período de adaptação com o período de tratamento, constatou-se que os Nelore aumentaram a atividade relativa no período noturno, tanto os animais do grupo sombra ($p=0,0021$) quanto sol ($p=0,0057$). Isso pode ser explicado pelo fato da raça já estar adaptada ao ambiente quente e preferindo o

período noturno para procurar alimento devido a temperatura mais amena, produzindo menos calor durante o dia.

Tabela 12 – Análise da atividade relativa (movimentação) dos animais durante o período de Adaptação (P0) e Experimento (P1). Araçatuba/SP – 2019.

	Dia			Noite		
	Adaptação	Experimento	p valor	Adaptação	Experimento	p valor
Angus sombra	1516±230	1331±205	0,0257*	517±107	436±60	0,0147*
Angus sol	1419±175	1341±167	0,1149	470±76	439±49	0,1171
Nelore sombra	1180±105	1103±41	0,0169*	351±29	385±18	0,0021*
Nelore sol	1152±194	1122±115	0,5409	367±63	409±40	0,0057*
Comparação do experimento	Angus sombra x Nelore sombra		0,0011*	Angus sombra x Nelore sombra		0,0117
	Angus sol x Nelore sol		0,0008*	Angus sol x Nelore sol		0,1122
Comparação da adaptação	Angus sombra x Angus sol		0,2671	Angus sombra x Angus sol		0,2383
	Nelore sombra x Nelore sol		0,6625	Nelore sombra x Nelore sol		0,4335

Teste t de Student considerando p valor <0,05. (Média+desvio padrão). P0 (24 à 30/nov/2015) P1 (28/jan à 03/fev/2016).

Pode-se inferir que em comparação às duas raças durante o experimento, os Angus se movimentaram mais possivelmente devido ao desconforto térmico, à procura de sombra. Essa resposta foi proposta por Façanha (2015) e Glaser (2008), que avaliou *Bos taurus* e *Bos indicus*, testando tratamentos sombra/sol, e observou que animais da raça Angus procuraram mais sombra nos horários mais quentes do dia quando comparados aos da raça Nelore. Os Angus buscam a sombra como defesa aos agentes estressantes do ambiente como a radiação solar e altas temperaturas.

Bovinos da raça Angus são sensíveis ao calor (SCHARF B, 2010) e como todo endotérmico, uma vez exposto ao ambiente com desconforto térmico, respondem com alterações comportamentais como postura, movimentação, ingestão alimentar, para modificar o processo biológico diminuindo a produção e aumentando a perda de calor (termólise), (KAMAL, et al., 2019; POLSKY; VON KEYSERLINGK, 2017).

Quando comparadas as raças o aumento da movimentação como comportamento de adaptação foi relevante para o ajuste do metabolismo para os animais da raça Angus (FELÍCIO; CAVALCANTI, 2014). Como a raça é sensível ao calor, a procura por diminuir o ganho pela radiação ou aumentar a termólise (perda

de calor) foi intensa, esse comportamento foi observado por Pereira et al. (2017) que taurinos se movimentaram mais procurando a sombra.

Os animais da raça Nelore, por serem mais adaptados à temperatura elevada, se movimentaram menos durante o dia, à procura de sombra, mas aumentaram a atividade no período noturno. Os animais se ajustam ao ambiente em que se encontram e fazem escolhas considerando suas necessidades e adaptam o comportamento e metabolismo resultando em respostas que os beneficiam (GLASER, 2008).

5.2.5 - Ruminação

Foi possível observar que os Nelore reduziram a ruminação entre o período de adaptação (P0) e último período de experimento (P1) enquanto que os Angus praticamente mantiveram o mesmo comportamento ao longo do experimento. É provável que os Nelore ruminem menos, como um mecanismo de adaptação produzindo menos calor pela fermentação. A análise descritiva dos dados com média e desvio padrão é apresentado na Tabela 13.

Tabela 13 – Comportamento de ruminação (minuto/dia) nos períodos P0 (adaptação de 08 a 11 de dez); P1 (experimento de 01 a 03 de fev) de Nelore sol, Nelore sombra, Angus sol e Angus sombra. (Média±desvio padrão).

	P0	P1
Nelore sol	179,11±66,19	130,09±67,85
Nelore sombra	182,59±65,41	100,72±54,31
Angus sol	103,72±79,70	104,14±81,23
Angus sombra	94,61±79,17	88,85±87,94

5.2.6 – Concentrações plasmáticas de Leptina

As concentrações plasmáticas de leptina foram maiores para os animais da raça Angus, particularmente os mantidos em sombra, na primeira análise representado pela concentração de 5,91±5,48ng/mL e última análise 4,26±2,97ng/mL, Tabela 14.

A análise em função das raças demonstra diferença significativa com p valor 0,011, mas sem diferença entre os tratamentos.

Tabela 14 – Concentrações plasmáticas de Leptina (ng/mL) de Angus sol, Angus sombra, Nelore sol e Nelore sombra, na primeira (08-11/12/15) e última análise (01-03/02/16). Araçatuba/SP- 2019.

Grupo	Primeira análise	Última análise
Angus sol	3,93±1,89	3,17±1,83
Angus sombra	5,91±5,48	4,26±2,97
Nelore sol	2,76±0,88	2,1±0,66
Nelore sombra	2,92±1,59	2,28±0,7

As maiores concentrações do hormônio nos Angus, provavelmente é em função da característica de marmorização da raça, com deposição de gordura nas fibras intramusculares, não sendo afetada pelos tratamentos.

6 CONCLUSÃO

Refutamos a hipótese inicial de que um mecanismo de adaptação do bovino ao estresse térmico seria a diminuição da atividade enzimática mitocondrial do complexo I.

Bovinos mantidos em desconforto térmico respondem com adaptações metabólicas e comportamentais, os Nelores se movimentaram mais à noite pois a temperatura é mais amena e Angus durante o dia à procura de sombra. A atividade mitocondrial foi aumentada devido a alta demanda de ATP provavelmente em repercussão da necessidade de realizar reparação celular, biogênese mitocondrial e níveis aumentados de testosterona.

REFERÊNCIAS

Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica Diretrizes brasileiras de obesidade 2016 / **ABESO** - Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. – 4.ed. - São Paulo, SP

BIANCO, A. Hormônios Tireóideos, UCPs e Termogênese. **Arq Bras Endocrinol Metab** vol 44 nº 4 Agosto 2000.

CAMARGO, M. C.; FURLAN, M. M. D. P. Resposta fisiológica do corpo às temperaturas elevadas: exercício, extremos de temperatura e doenças térmicas **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 4, n. 2, p. 278-288, maio/ago - ISSN 1983-1870, 2011.

CARROLL, J. A. et al. Heat-tolerant versus heat-sensitive Bos taurus cattle: influence of air temperature and breed on the acute phase response to a provocative immune challenge Domestic Animal **Endocrinology** 45 163–169, 2013.

CATTELAM, J et al. Termal stress in cattle **RCPV** 108 (587-588) 96-102, 2013.

CATUNDA et al. O papel da leptina na reprodução dos ruminantes. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.38, n.1, p.3-9, jan./mar. 2014.

CHACUR, M. G. M. et al. Influência de um nutracêutico no sêmen, testosterona, cortisol, eritrograma e peso corpóreo em touros jovens Bos taurus indicus. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 2, p. 439-450, abr./jun., 2010.

CHIEN-TING L.; BROOKS, G. A. Mild heat stress induces mitochondrial biogenesis in C2C12 myotubes. **J Appl Physiol** 112: 354 –361, 2012.

DASH, S.; CHAKRAVARTY, A. K.; SINGH, A.; UPADHYAY, A.; SINGH, M.; YOUSUF, S. Effect of heat stress on reproductive performances of dairy cattle and buffaloes: A review, **Veterinary World**, 9(3): 235-244, 2016.

DELFINO L., SOUZA B., SILVA W., ROSANGELA. M. Influência bioclimatológica sobre os parâmetros hematológicos de bovinos leiteiros. **ACSA – Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v.8, n.1, p.23-27, jan-mar. 2012.

DEPIERI et al. UCP-3: Regulação da Expressão Gênica no Músculo Esquelético e Possível Relação Com o Controle do Peso Corporal. **Arq Bras Endocrinol Metab** vol 48 nº 3 Junho 2004.

DIAS, J. C. et al. Níveis periféricos de testosterona total em touros guzerá. **Cienc. anim. bras.**, Goiânia, v.15, n.1, p. 64-73, jan./mar. 2014.

DO CARMO et al. Changes in ambient temperature elicit divergent control of metabolic and cardiovascular actions by leptin. **The FASEB Journal article** fj.201601224R. Published online February 22, 2017

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

DONIN et al. Estresse térmico e suas conseqüências sobre a eficiência reprodutiva de machos suínos **Rev Bras Reprod Anim**, Belo Horizonte, v.31, n.4, p.456-461, out./dez. 2007

EMBRAPA

<https://www.embrapa.br/documents/10180/21470602/EvolucaoQualidadePecuaria.pdf/64e8985a-5c7c-b83e-ba2d-168ffaa762ad> , 2017 (ACESSO EM 03 JAN, 2019).

FAÇANHA et al. Desempenho e respostas adaptativas de novilhos angus x nelore em clima tropical. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 28, n. 2, p. 172 – 178, abr. – jun., 2015.

FELÍCIO, D.; CAVALCANTI, A. Ativadores da lipólise e função mitocondrial no esporte. **Revista Brasileira de Nutrição Funcional** - ano 14, nº59, 2014.

FERREIRA et al. Fatores que afetam o consumo alimentar de bovinos. **Arquivos de Pesquisa Animal**, v.2, n.1, p.9 - 19, 2013.

FERREIRA et al. Parâmetros clínicos, hematológicos, bioquímicos e hormonais de bovinos submetidos ao estresse calórico **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.61, n.4, p.769-776, 2009.

FERREIRA, I. C. et al. Conforto térmico em bovinos leiteiros a pasto. Planaltina, DF : **Embrapa Cerrados**, 2017.

FERREIRA, L. C. B. Respostas fisiológicas e comportamentais de bovinos submetidos a diferentes ofertas de sombra [dissertação] / Luiz Carlos Britto Ferreira ; orientador, Luiz Carlos Pinheiro Machado Filho. - Florianópolis, SC, 2010. 89 p.: il., grafs., tabs. **Dissertação (mestrado)** - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós- Graduação em Agroecossistemas.

FERREIRA, M.; AGUIAR, T.; VILARINHO, L. Cadeia Respiratória Mitocondrial Aspectos Clínicos, Bioquímicos, Enzimáticos e Moleculares Associados ao Défice do Complexo I. ISSN 0871-3413 - **ArquiMed**, Vol. 22, Nº 2/3, 2008.

FIALHO, E. T.; OST, P. R.; OLIVEIRA, V. Interações ambiente e nutrição - estratégias nutricionais para ambientes quentes e seus efeitos sobre o desempenho e características de carcaça de suínos. 2 a Conferência Internacional Virtual sobre Qualidade de Carne Suína 5 de Novembro a 6 de Dezembro de 2001 — Concórdia, SC, Brasil. Disponível em: http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/anais01cv2_fialho_pt.pdf (acesso em 16/11/2016)

FINK, J.; MATSUMOTO, M.; TAMURA, Y. Potential application of testosterone replacement therapy as treatment for obesity and type 2 diabetes in men. **Steroids**. Volume 138, October Pages 161-166, 2019.

GLASER F.D. **Aspectos comportamentais de bovinos das raças Angus, Caracu e Nelore a pasto frente à disponibilidade de recursos de sombra e água para imersão**. 2007. Tese de Doutorado – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo: São Paulo, 2007.

GRABACKA, M. M.; GAWIN, M.; PIERZCHALSKA, M. Phytochemical Modulators of Mitochondria: The Search for Chemopreventive Agents and Supportive Therapeutics. **Pharmaceuticals**, 7, 913-942, 2014.

HOWLEY, E. T.; POWERS, S. K. Fisiologia do Exercício - Teoria e Aplicação ao Condicionamento e ao Desempenho. Manole 6ed, 2009.

JORNAYVAZ, F. R.; SHULMA, G. I. Regulation of mitochondrial biogenesis. **Essays Biochem.** 47: . doi:10.1042/bse0470069, 2010.

KAMAL, *et al.* Heat stress and effect of shade materials on hormonal and behavior response of dairy cattle: a review. **Tropical Animal Health and Production** (2019) 50:701–706 <https://doi.org/10.1007/s11250-018-1542-6>.

LACOUR J.R. Activité musculaire et dépense d'énergie. **Revue des Maladies Respiratoires** (2011) 28, 1278—1292.

LANA, G. R. Q. et al Efeito da Temperatura Ambiente e da Restrição Alimentar sobre o Desempenho e a Composição da Carcaça de Frangos de Corte. **Rev. bras. zootec.**, 29(4):1117-1123, 2000.

LICHTENBELT, W. B.; KINGMA, A.; VAN DER LANS; L. SCHELLEN. Cold exposure—an approach to increasing energy expenditure in humans. *Trends Endocrinol. Metab.* 25:165– 167, 2014.

MACEDO et al. Efeito do estresse na eficiência reprodutiva de fêmeas bovinas. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.36, n.1, p.10-17, jan./mar. 2012.

MAZIEIRO, R. R. D. et al. Avaliação das concentrações plasmáticas de cortisol e progesterona em vacas nelore (*Bos taurus indicus*) submetidas a manejo diário ou manejo semanal. **Vet. e Zootec.** set.; 19(3): 366-372, 2012.

MCANINCH AND BIANCO Thyroid hormone signaling in energy homeostasis and energy metabolismo. **Ann N Y Acad Sci.** April. 2014.

MCARDLE, W. D.; FRANK, I. K.; KATCH, V. L. Nutrição para o esporte e o exercício. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

MEYER, U.; STAHL, W.; FLACHOWSKY, G. Invertigations on the water intake of growing bulls. **Livertock Production Science**, 103, 186-191, (2006).

MORAIS, D. A. E. F.; MAIA, A. S. C.; SILVA, R. G.; VASCONCELOS, A. M.; LIMA, P. O.; GUILHERMINO, M. M. Variação anual de hormônios tireoidianos e características termorreguladoras de vacas leiteiras em ambiente quente. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.3, p.538-545, 2008.

NASCIMENTO, C. C. N.; NASCIMENTO, M. R. B. M.; SILVA, N. A. M. Ocorrência de ondas de calor no triângulo mineiro e alto paranaíba e seu efeito na produção leiteira e consumo alimentar em bovinos. **Biosci. J.**, Uberlandia, v. 30, n. 5, p. 1488-1495, Sept./Oct. 2014.

National Research Council. Nutrient requirements of beef cattle. 7th ed. Washington, D.C.: **National Academic Press**, 1996. 242 p

NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica de Lehninger. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 1298p. 2014.

NOAA. Disponível em: <https://www.ncdc.noaa.gov/temp-and-precip/global-maps/201506#global-maps-select>. (Acesso em 31/10/2015)

OLIVEIRA, B. C. et al. Mecanismos reguladores de consumo em bovinos de corte. ISSN: 1983-9006 Vol. 14, Nº 04, jul./ago. de 2017.

PEREIRA J.R. et al. Efeitos do clima sobre a adaptação e fisiologia de bovinos de corte Bos taurus x Bos indicus. **Rev. Electrón. vet.** ISSN 1695-7504. Volumen 18 Nº 11 -2017.

PEREIRA, A. M. et al. Evaporative heat loss in Bos taurus: do different cattle breeds cope with heat stress in the same way? **J Therm Biol.** 2014 Oct;45:87-95. doi: 10.1016/j.jtherbio.2014.08.004. Epub Aug 23, 2014.

PEREIRA, B. Biogênese mitocondrial e exercício físico: hipótese do acoplamento elétrico-transcripcional. **Rev Bras Educ Fís Esporte**, (São Paulo) Out-Dez; 29(4):687-703, 2015.

PIRES, M. F. A.; CAMPOS, A. T. Conforto animal para maior produção de leite. Viçosa-MG, **CPT**, 254, 2008.

POLSKY L.; MARINA A. G.; KEYSERLINGK V. Invited review: Effects of heat stress on dairy cattle welfare. **J. Dairy Sci.** 100:8645–8657 <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12651>.

POPOV D.V. Adaptation of Skeletal Muscles to Contractile Activity of Varying Duration and Intensity: The Role of PGC1 α . **Biochemistry (Moscow)**, vol.83, n.6, p. 613-628, 2019.

RANDALL, M. The Physiology of Stress: Cortisol and the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis. **DUJS Online - The Dartmouth Undergraduate Journal of Science.** Fall 2010.

SCHARF B. et al. Evaluation of physiological and blood serum differences in heat-tolerant (Romosinuano) and heat-susceptible (Angus) *Bos taurus* cattle during controlled heat challenge. *Journal of Animal Science*, v.88, Issue 7, p.2321–2336, 2010, <https://doi.org/10.2527/jas.2009-2551>.

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

SILTANEN P. & KEKKI M. Determination of Protein by the Biuret Reaction Using Cupric Hydroxide Suspension Reagent. ISSN: 0036-5513. *Scandinav. J. Clin. & Investigation*, v.12, p228-234, 1960.

SILVA et al. Evaluation of thermal stress indexes for dairy cows in tropical regions. *R. Bras. Zootec.*, v.36, n.4, p.1192-1198, 2007.

SILVA, M. R. et al, Estresse térmico e sua influência na fisiologia hormonal de pequenos ruminantes. *J Anim Behav Biometeorol* v.4, n.2, p.50-54, 2016.

SOUZA, B. B. e BATISTA N. L. Os efeitos do estresse térmico sobre a fisiologia animal. *ACSA – Agropecuária Científica no Semi-Árido*, v.8, n.3, p 06.-10, jul-set, 2012.

SOUZA, B. B.; LOPES, J. J.; ROBERTO, J. V. B.; SILVA, A. M. A.; SILVA, E. M. N.; SILVA, G. A. Efeito do ambiente sobre as respostas fisiológicas de Caprinos saanen e mestiços ½saanen + ½boer no semiárido Paraibano. *Agropecuária Científica no Semiárido*. Vol. 06, n. 02, p. 47 - 51, 2010.

SPINAZZI, M. et al. Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells. *Nature Protocols* vol.7 no.6, 2012.

STARLING et al. Variação Estacional dos Hormônios Tireoideanos e do Cortisol em Ovinos em Ambiente Tropical. *R. Bras. Zootec.*, v.34, n.6, p.2064-2073, 2005.

TAMURA, Y. Postexercise whole body heat stress additively enhances endurance training-induced mitochondrial adaptations in mouse skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 307: R931–R943, 2014.

TAMURA, Y.; Hatta H. Heat stress induces mitochondrial adaptations in skeletal muscle. *J Phys Fitness Sports Med*, 6 (3): 151-158 DOI: 10.7600/jpfsm.6.151, 2017
TSAI, L. W.; SAPOLSKY, R. M. Rapid Stimulatory Effects of Testosterone Upon Myotubule Metabolism and Sugar Transport, as Assessed by Silicon Microphysiometry. *AGGRESSIVE BEHAVIOR* Volume 22, pages 357-364, 1996.

URIBE-VELÁSQUEZ et al. Concentrações Plasmáticas de Cortisol, Hormônios Tiroídeanos, Metabólitos Lipídicos e Temperatura Corporal de Cabras Alpinas Submetidas ao Estresse Térmico. *R. Bras. Zootec.*, v.27, n.6, p.1123-1130, 1998.

USUI T. et al. Elevated mitochondrial biogenesis in skeletal muscle is associated with testosterone-induced body weight loss in male mice. *FEBS Letters* 588 1935–194, 2014.

VALENTE, E. E. L. et al. Intake, physiological parameters and behavior of Angus and Nellore bulls subjected to heat stress. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 36, n. 6, suplemento 2, p. 4565-4574, 2015.

VASCONSUELO, A.; MILANESI, L.; BOLAND, R. Actions of 17β -estradiol and testosterone in the mitochondria and their implications in aging **Ageing Research Reviews**. Volume 12, Issue 4, September Pages 907-917, 2013.

VIANA, M. P. et al. Efeitos do estresse térmico sobre a fisiologia, produção e reprodução de caprinos **VACSA – Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v.9, n.3, p 01-06, jul – set , 2013.

WANG, L. et al Effect of acute heat stress on adrenocorticotrophic hormone, cortisol, interleukin-2, interleukin-12 and apoptosis gene expression in rats. **BIOMEDICAL REPORTS**, 2015.

X. CUI et al. Thermoneutrality decreases thermogenic program and promotes adiposity in high-fat diet-fed mice. **Physiol Rep**, 4 (10), 2016, e12799, doi: 10.14814/phy2.12799

WENZ T. Regulation of mitochondrial biogenesis and PGC1- α under cellular stress. **Mitochondrion** 13 134-142, 2013.