

GABRYELE ALMEIDA SANTOS

**EFEITO DO GENÓTIPO E DA TEMPERATURA AMBIENTE NA EXPRESSÃO
DOS GENES DO ESTRESSE OXIDATIVO E DO CHOQUE TÉRMICO EM SUÍNOS
EM CRESCIMENTO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Paulo Henrique R. F. Campos

Coorientada: Renata Veroneze

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S237e
2022

Santos, Gabryele Almeida, 1997-

Efeito do genótipo e da temperatura ambiente na expressão dos genes do estresse oxidativo e do choque térmico em suínos em crescimento / Gabryele Almeida Santos. – Viçosa, MG, 2022.
1 dissertação eletrônica (46 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexos.

Orientador: Paulo Henrique Reis Furtado Campos. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Zootecnia, 2022.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.662>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Suínos - Genética. 2. Suínos - Crescimento. 3. Calor - Efeito fisiológico. I. Campos, Paulo Henrique Reis Furtado, 1984-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Zootecnia. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia.
III. Título.

CDD 22. ed. 636.40821

Bibliotecário(a) responsável: Bruna Silva CRB-6/2552

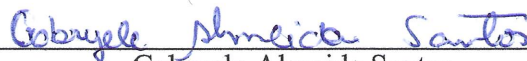
GABRYELE ALMEIDA SANTOS

**EFEITO DA TEMPERATURA AMBIENTE NA EXPRESSÃO DOS GENES DO
ESTRESSE OXIDATIVO E DO CHOQUE TÉRMICO EM SUÍNOS EM
CRESCIMENTO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

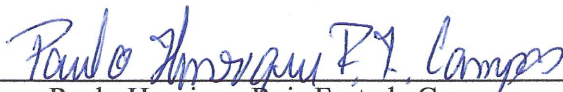
APROVADA: 11 de fevereiro de 2022.

Assentimento:



Gabryele Almeida Santos

Autora



Paulo Henrique Reis Furtado Campos

Orientador

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES).

Agradeço a Deus por cada vitória ao longo desse percurso, sem o senhor eu até poderia ter conseguido, porém não teria o mesmo significado. Obrigada, pois nos tempos de angústia, seu amor e conforto se fizeram presentes.

Aos meus familiares, em especial a minha “mainha”, Suely, por ser meu maior exemplo de amor e humildade para com o próximo, meu pai Geoge, pelo apoio e incentivo sempre dado em decorrer desses anos, aos meus irmãos Guilherme e Gloria por todo amor e torcida.

A Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Zootecnia pela oportunidade de realização do mestrado, o qual era um grande sonho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), pela concessão da bolsa.

Ao meu orientador, professor Paulo Campos, por todos os ensinamentos e oportunidades que me foram oferecidas, por toda paciência, presteza, orientação e execução deste estudo. Agradeço também a Renata Veroneze minha coorientadora, e a aos professores, Gabriel C. Rocha, Marcio Duarte e Alysson Saraiva, pela disponibilidade e atenção durante meu mestrado.

Aos meus colegas e amigos que me auxiliaram na execução desse estudo, Gustavo, Karine, Lorena, Vinicius e Mateus. Aos amigos de jornada, Amanda (a sua mãe juju e pai Jô), Clodoaldo, Maykelly, Marta, Dante, Pedro e Hallef. E a todos colegas que fiz durante esses anos, deixo aqui meu muito obrigada pela acolhida, risadas e apoio de sempre.

Ao grupo de estudos de suínos (GDSUI), aos funcionários da UEPE – Suinocultura, Arlindo, Fernando, Dedeco, Leandro e Valdeir, pela amizade. Agradeço também aos funcionários da Granja de Melhoramento de Suínos (Ricardo, Leo, Edinaldo e Vanildo), meu muito obrigada por sempre estarem dispostos a colaborar.

Aos meus amigos e familiares, que me acompanharam e torciam por mim durante toda minha jornada, Aires, Karla, Marise, Chiara, Bel e Carlos.

A vocês, muito obrigada!

RESUMO

SANTOS, Gabryele Almeida, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2022. **Efeito do genótipo e do ambiente térmico na expressão dos genes do estresse oxidativo e do choque térmico em suínos em crescimento.** Orientador: Paulo Henrique Reis Furtado Campos. Coorientadora: Renata Veroneze.

Além dos efeitos negativos nas respostas de desempenho, a exposição dos animais de produção às altas temperaturas ambientais resulta em aumento do estresse oxidativo, desnaturação e perda da função das proteínas, apoptose e dano celular. Nesse contexto, com o objetivo de identificar se a variação na termotolerância em diferentes genótipos está associada a mecanismos e processos de proteção celular, avaliou-se efeito da alta temperatura ambiente na expressão dos genes do estresse oxidativo e do choque térmico em suínos de linhagem comercial; suínos puros da raça naturalizada brasileira Piau; e suínos cruzados comercial × Piau. Foram utilizadas amostras de *Longissimus dorsi* e do tecido hepático de coletadas em dois experimentos para realização das análises de expressão gênica. No primeiro experimento, suínos da raça Piau foram submetidos a condições ambientais de termoneutralidade (22°C) e alta temperatura ambiental (30°C). No segundo experimento, foram utilizadas as mesmas condições ambientais (termoneutralidade e alta temperatura), contudo foram avaliados animais de linhagem comercial e cruzados comercial × Piau. As médias ajustadas foram comparadas pelo teste de Bonferroni e os efeitos considerados significativos se $P < 0,05$. Em suínos Piau, a temperatura influenciou ($P < 0,05$) na expressão de mRNA dos genes CAT, GPX, HSP90, SOD-1 e SOD-2. No entanto, não foi observada diferença significativa ($P > 0,05$) para expressão do gene HSP70 no tecido hepático. Para essa raça, no músculo *Longissimus dorsi*, a temperatura não influenciou ($P > 0,05$) a expressão dos genes CAT, GPX, HSP70, HSP90, SOD-1. No entanto, a expressão de mRNA do gene SOD-2 aumentou ($P < 0,05$) quando suínos Piau foram submetidos a alta temperatura ambiental. Em termos dos efeitos da temperatura ambiente na expressão hepática em suínos de linhagem comercial e cruzados, não foi observada interação entre os fatores genótipo e temperatura para expressão de mRNA dos genes CAT, GPX, HSP70, HSP90 e SOD-1 ($P > 0,05$). No entanto, houve interação ($P < 0,05$) entre os fatores genótipo e temperatura para expressão de mRNA da SOD-2, animais cruzados apresentaram maiores níveis de expressão de mRNA do gene SOD-2 em comparação a linhagem comercial quando expostos a termoneutralidade. Adicionalmente, suínos cruzados apresentaram aumento na expressão de mRNA do gene CAT quando

comparados aos animais comerciais. Independente do genótipo, quando expostos a 30°C ocorreu maior expressão ($P < 0,05$) de mRNA do gene SOD-1 quando comparados com suínos a 22°C. A exposição a alta temperatura resultou em aumento da expressão dos genes CAT, GPX, HSP90, SOD-1 e SOD-2 no tecido hepático da raça nativa Piau, quando comparado aos animais expostos a temperatura termoneutra, o que evidencia a importância desses genes na adaptação de suínos a altas temperaturas ambientais. O genótipo comercial apresentou maiores níveis de expressão dos genes antioxidantes, CAT e GPX no *longissimus dorsi* quando comparado aos animais cruzados, o que sugere maior necessidade de atividade de enzimas antioxidantes em virtude do maior desempenho produtivo e consequente maior produção de calor metabólico.

Palavras-chave: Estresse por calor. Genética. Piau. Termotolerância.

ABSTRACT

SANTOS, Gabryele Almeida, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2022. **Effect of genotype and thermal environment on the expression of oxidative stress and heat shock genes in growing pigs.** Adviser: Paulo Henrique Reis Furtado Campos. Co-advisor: Renata Veroneze.

In addition to the negative effects on performance responses, the exposure of production animals to high ambient temperatures results in increased oxidative stress, denaturation and loss of protein function, apoptosis and cellular damage. Therefore, in order to identify whether variation in thermotolerance in different genotypes is associated with cellular protection mechanisms and processes, we evaluated the effect of high ambient temperature on the expression of oxidative stress and heat shock genes in commercial pigs; purebred Brazilian naturalized Piau pigs; and commercial × Piau crossbred pigs. *Longissimus dorsi* and liver tissue samples from two experiments were used to perform gene expression analyses. In the first experiment, Piau pigs were subjected to thermoneutral (22°C) and high ambient temperature (30°C) conditions. In the second experiment, the same environmental conditions were used (thermoneutrality and high ambient temperature), however, animals of commercial and commercial × Piau crossbreeds were evaluated. The adjusted means were compared by Bonferroni test and the effects were considered significant if $P < 0.05$. In Piau pigs, temperature influenced ($P < 0.05$) mRNA expression of CAT, GPX, HSP90, SOD-1 and SOD-2 genes. However, no significant effect ($P > 0.05$) was observed for HSP70 gene expression in liver tissue. In the *Longissimus dorsi* muscle, temperature did not influence ($P > 0.05$) the expression of genes CAT, GPX, HSP70, HSP90, SOD-1. However, mRNA expression of SOD-2 gene increased ($P < 0.05$) when Piau pigs were subjected to high ambient temperature. In regard to the effects of ambient temperature on liver expression in commercial and crossbred pigs, no interaction was observed between genotype and ambient temperature for mRNA expression of CAT, GPX, HSP70, HSP90 and SOD-1 genes ($P > 0.05$). However, there was an interaction ($P < 0.05$) between the genotype and ambient temperature for SOD-2 mRNA expression. Crossbred animals had greater levels of SOD-2 gene mRNA expression compared to commercial pigs exposed to thermoneutrality. In addition, crossbred pigs had greater mRNA expression of CAT gene when compared to commercial pigs. Regardless of the genotype, when exposed to 30°C a greater expression ($P < 0.05$) of mRNA of SOD-1 gene was observed when compared to 22°C.

Exposure to high temperature resulted in increased expression of CAT, GPX, HSP90, SOD-1 and SOD-2 genes in the liver tissue of the native breed Piau when compared to animals exposed to thermoneutral temperature, which highlights the importance of these genes for the adaptation of pigs to high environmental temperatures. The commercial genotype showed higher expression levels of the antioxidant genes, CAT and GPX in the *Longissimus dorsi* when compared to crossbred animals, which suggests a greater need for antioxidant enzyme activity due to the higher productive performance and consequent higher metabolic heat production.

Keywords: Heat stress. Genetics. Piau. Thermotolerance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema da atuação do hipotálamo como centro do sistema termorregulador adaptado de Collier et al., (2012)	14
Figura 2 – Gráfico do perfil termorregulador da temperatura corpórea de Mount (1974).	15
Figura 3 – Mecanismo de indução de HSP por estresse adaptado de Wan et al., (2020)	18
Figura 4 – Fatores que induzem a geração de espécies reativas de oxigênio adaptado de Khazaei et al., (2017).....	20
Figura 5 – Relação das ações das enzimas antioxidantes adaptado de Nandi et al., (2019).	22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Desenho dos <i>primers</i>	34
Tabela 2 – Efeito da temperatura ambiente na expressão hepática dos genes do estresse oxidativo e do choque térmico em suínos da raça Piau	35
Tabela 3 – Efeito da temperatura ambiente na expressão dos genes do estresse oxidativo e do choque térmico no músculo <i>Longissimus dorsi</i> da raça Piau	36
Tabela 4 – Efeito da temperatura ambiente na expressão hepática dos genes do estresse oxidativo e do choque térmico em suínos da linhagem comercial e cruzados (comercial x Piau).....	37
Tabela 5 – Efeito da temperatura ambiente na expressão dos genes do estresse oxidativo e do choque térmico no músculo <i>Longissimus dorsi</i> de suínos de linhagem comercial, cruzados (comercial x Piau).....	38

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA – Análise de Variância

AKT- Proteína Quinase B

B2M-Beta-2-Microglobulina

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CAT- Catalase

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

EROS- Espécies reativas de oxigênio

FAO - Food and Agriculture Organization

GSH: Glutathione

GPX – Glutathione Peroxidase

GAPDH-Gliceraldeído-3-Fosfatodesidrogenase

HSPs- Proteínas do Choque Térmico

HSP70- Proteína do Choque Térmico 70

HSP90- Proteína do Choque Térmico 90

H²O² Peróxido de Hidrogênio

IL-6 -Interleucina – 6

mTORC1-Alvo Mamífero do Complexo 1

mRNA- RNA Mensageiro

RNA: Ácido Ribonucleico

SOD 1- Superóxido dismutase 1

SOD 2- Superóxido dismutase 2

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral alfa

T3-Triiodotironina

T4-Tiroxina

UFV – Universidade Federal de Viçosa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1 Alta temperatura x produção animal.....	12
2.2 Mecanismos da termorregulação.....	13
2.3 Estratégias para atenuar os efeitos da alta temperatura ambiente.....	16
2.4 Expressão das Heat shock proteins em estresse por calor.....	17
2.5 Estresse por calor, geração de ROS e estresse oxidativo.....	19
3.REFERÊNCIAS.....	23
4. Artigo: Efeito do genótipo e do ambiente térmico na expressão dos genes do estresse oxidativo e do choque térmico em suínos em crescimento.....	30
4.1 Introdução.....	30
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
5.2 Animais e delineamento experimental.....	31
5.3 Amostras, extração de RNA e síntese de cDNA.....	32
5.4 Primers e avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real (RT- qPCR).....	33
5.5 Análise estatística.....	34
6. RESULTADOS.....	35
6.1 Efeito do genótipo e da temperatura ambiente na expressão de genes no tecido hepático e no músculo Longissimus dorsi em suínos da raça Piau.....	35
6.2 Efeito do genótipo e da temperatura ambiente na expressão de genes tecido hepatico e no músculo Logissimus dorsi em suínos de linhagem comercial e cruzado (comercial x Piau).....	36
7.DISSCUSSÃO.....	38
7.1 Efeito da temperatura ambiente na expressão dos genes do estresse oxidativo e proteínas do choque térmico em suínos da raça Piau.....	38
7.2 Efeito do genótipo na expressão dos genes do estresse oxidativo e proteínas do choque térmico em suínos de linhagem comercial e cruzados.....	40
9.CONCLUSÃO.....	41
10.REFERÊNCIAS.....	42

1. INTRODUÇÃO

Uma das carnes mais consumidas mundialmente é a carne suína e, a fim de atender à crescente população mundial, a produção de suínos deve aumentar nos próximos anos (Robinson et al., 2011; Fao, 2018). No entanto, condições climáticas desfavoráveis são uma das maiores restrições da maximização dos sistemas de produção, uma vez que, o estresse por calor afeta negativamente o bem-estar animal e a eficiência de produção (Baumgard & Rhoads, 2013). Quando suínos são expostos a altas temperaturas ambientais, mudanças no comportamento, na fisiologia e no metabolismo são ativadas para atenuar os distúrbios associados ao estresse por calor (Renaudeau 2011 et al., Campos et al., 2014; Collier et al., 2019). Com a ativação desses mecanismos, a eficiência de produção é comprometida, pois ocorre a reorganização da utilização de nutrientes, sendo desviada para manutenção da homeotermia e consequentemente, a produtividade é minimizada (Mayorga et al., 2019).

Além disso, há evidências crescentes de que o melhoramento genético reduziu a capacidade dos suínos de lidar com altas temperaturas ambientais, uma vez que resultou no aumento da produção metabólica de calor com a melhoria das características reprodutivas e com maior taxa de deposição de proteína (Merks et al., 2012; Gourdine et al., 2021).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Alta temperatura x produção animal

A implementação e expansão de sistemas de produção intensiva e de alto desempenho em países em desenvolvimento, localizados em regiões de clima tropical e subtropical, aumentou nas últimas décadas, a fim de atender a demanda global por proteína animal (Gollin et al., 2009). Entretanto, as altas temperaturas ambientais são fatores limitantes para eficiência da produção animal nessas regiões (Renaudeau et al., 2012).

Os ajustes fisiológicos e metabólicos resultantes das repostas termoregulatórias para atenuar o estresse por calor, possuem impacto significativo na produtividade do animal (Collier et al., 2019). O aumento da temperatura resulta na diminuição do consumo médio diário de ração a fim de reduzir produção de calor metabólico. Em estudo de meta-análise,

Renaudeau et al. (2011), reportaram que suínos em fase de terminação com peso médio de 90 kg, reduziram 80 g/dia no consumo alimentar para cada grau Celsius de aumento na temperatura ambiente entre 24 a 30°C. A baixa ingestão de energia e nutrientes advindos da ração, explicam a redução na deposição proteica e diminuição na taxa de crescimento de suínos em crescimento e terminação submetidos a condições de estresse por calor (Campos et al., 2017). Oliveira et al. (2019), reportaram redução de 58 g/ dia no consumo diário de ração, de suínos em crescimento submetidos a alta temperatura (29°C a 35°C), em comparação ao grupo submetido a temperatura termoneutra (18°C a 25°C).

Adicionalmente, a exposição a altas temperaturas ambientais foi relatada como prejudicial à produção de suínos e à qualidade da carne desses animais, pois afeta o anabolismo e o catabolismo de proteínas, bem como, a proliferação de células-satélite, as quais desempenham papéis importantes na determinação do crescimento e desenvolvimento muscular (Kamanga-Sollo et al., 2011).

2.2 Mecanismos da termorregulação

Suínos são pertencentes a classe de animais homeotérmicos, esses são capazes de manter a sua temperatura interna dentro de uma estreita faixa de temperatura sob condições ambientais variáveis (Collier et al., 2019). A temperatura interna dos suínos é mantida por meio de ajustes comportamentais, metabólicos e fisiológicos, regulados pelos centros termorreguladores do hipotálamo, que interagem com os vasos sanguíneos, o córtex cerebral, os termorreceptores da medula espinhal e da superfície da pele, e dos órgãos abdominais (Moyorga et al., 2019). Conforme a figura 1, através dos receptores de frio e calor distribuídos por todo o corpo, as informações térmicas são enviadas e ultrapassam as entradas térmicas, presentes na medula espinhal e no sistema nervoso central (Collier et al., 2012). As informações são assimiladas pelo hipotálamo anterior, ao passo que o hipotálamo posterior é responsável pelo estabelecimento das respostas geradas, em prol da manutenção da homeotermia por meio do aumento ou diminuição da dissipação e produção de calor (Braz 2005, Moyorga et al., 2020).

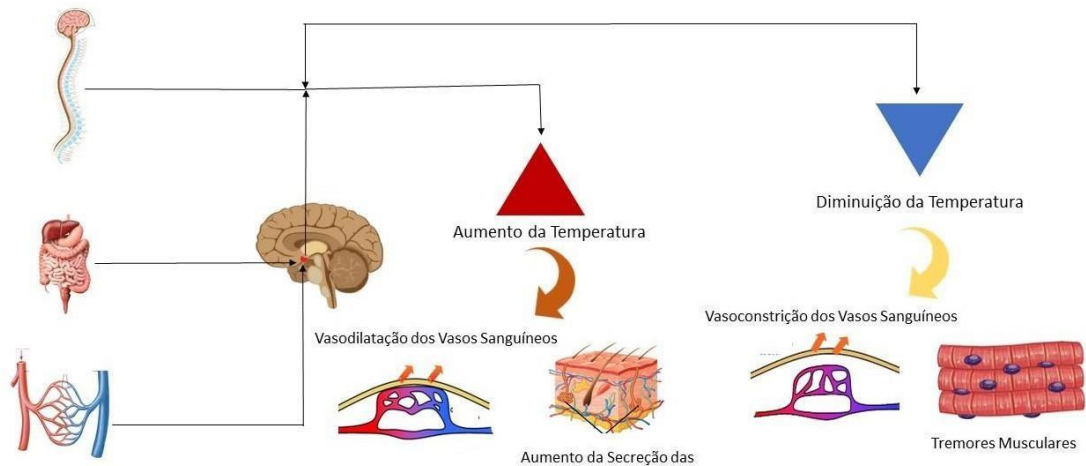


Figura 1 - Esquema da atuação do hipotálamo como centro do sistema termorregulador (Adaptado de Collier et al., 2012).

A termorregulação é o equilíbrio entre a produção e a perda de calor, a fim de manter a temperatura corporal constante. O equilíbrio entre produção de calor, a troca sensível, a perda latente de calor, e posterior aclimatação, de acordo com as alterações na temperatura ambiente, é representado pelo gráfico de Mount (1974), exposto na figura 2. Os pontos A e E do gráfico, representam a temperatura ambiente crítica, são os pontos extremos para manutenção da homeotermia. São nesses pontos, que a energia dos processos produtivos é desviada para manutenção da homeotermia, ao passo que, a hipertermia ou hipotermia podem ser letais (Collier et al., 2012; Renaudeau et al., 2012).

O ponto C no gráfico, representa a Zona de termoneutralidade, a qual é caracterizada como uma faixa intermediária de temperatura, dentro desta faixa a mobilização de recursos nutricionais e fisiológicos é mínimo, uma vez que os mecanismos de ajustes para manter o equilíbrio entre a produção e perda de calor são realizados por processos físicos, e não evaporativos, ocasionando baixo impacto no metabolismo do animal (Renaudeau et al., 2012). A temperatura crítica inferior é caracterizada pelo ponto B', na qual o animal aumenta a sua termogênese através do aumento da produção de calor metabólico com intuito de se termorregular. Porém, quando os animais são expostos a condições ambientais que excedem sua zona de termoneutralidade (25°C para suínos em crescimento), as vias sensíveis são ativadas (ponto A'), a fim de reduzir a carga térmica desses animais através do aumento da dissipação de calor, seja por condução, radiação ou convecção.

À medida que a temperatura ambiente se aproxima da temperatura cutânea do animal, tais ajustes não são suficientes para manter o equilíbrio entre a termólise e a termogênese. Em situações críticas de alta temperatura (ponto C'), os animais utilizam as

vias latentes de perda de calor (ofegação) como alternativa para a manutenção de sua homeotermia, uma vez que, esta não depende do gradiente de temperatura entre animal e ambiente, mas sim da pressão de vapor ambiental. Assim, as altas umidades relativas do ar diminuem as perdas evaporativas, uma vez que aumenta a pressão de vapor de água do ambiente e reduz a sua capacidade de receber mais partículas de água (Collier et al., 2012). Os suínos têm baixa capacidade de perder calor por evaporação cutânea (Ingram, 1965), e a aclimatação (ponto D) desses animais submetidos ao estresse por calor crônico, ou seja, expostos a alta temperatura ambiente por um longo período, ocorre principalmente pela redução na produção do calor metabólico (Nienaber & Hahn, 1982).

A aclimatação, é caracterizada por um perfil bifásico baseado no tempo de exposição a alta temperatura ambiente. Ocorre uma redução gradual das respostas termoregulatórias, em virtude da diminuição do calor metabólico, em parte associada a diminuição do consumo voluntário, ocasionando uma redução na demanda de resfriamento, estes processos ainda incluem a menor ação dos hormônios da tireoide, Triiodotironina (T3) e Tiroxina (T4), e do cortisol (Campos et al., 2014, Teixeira et al., 2021). Com a diminuição da temperatura corporal e da magnitude da ativação dos mecanismos de dissipação de calor, é estabelecido um platô, em que os animais atingem níveis relativamente constantes de desempenho (Renaudeau et al., 2010; Campos et al., 2014; Campos et al., 2017).

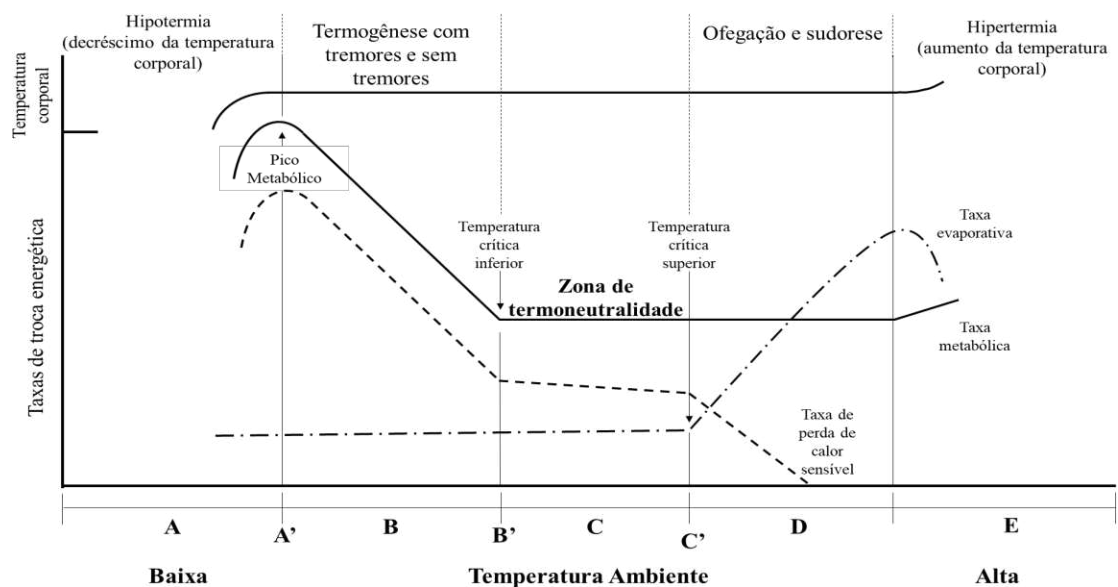


Figura 2 - Gráfico do perfil termorregulador da temperatura corpórea adaptado de Mount (1974).

Estratégias para atenuar os efeitos da alta temperatura ambiente

O desempenho dos suínos submetidos a altas temperaturas ambientais, varia de acordo com a idade, raça e nível produtivo (Renaudeau et al., 2007; Renaudeau et al., 2012). Alterações artificiais do ambiente, mudanças na nutrição e manejo alimentar, e ainda seleção de genótipos com maior resiliência ao estresse por calor, são recursos utilizados para atenuar os efeitos negativos das altas temperaturas sobre o desempenho de suínos (Ross et al., 2015).

Estudos demonstram maior tolerância ao calor em genótipos de baixa performance produtiva (Henken et al., 1991; Nienaber, et al., 1997). Em teoria, animais de linhagens de baixa produtividade, apresentam menor produção de calor como consequência do menor desempenho produtivo e da baixa exigência de manutenção (Baker et al., 1994). Suínos de baixa produção podem apresentar a ativação das respostas termoregulatórias de forma mais tardia e com menor aumento da temperatura corporal quando comparados a outras linhagens não adaptadas (Renaudeau et al., 2007).

Alguns autores (Collier et al., 2008; Gourdine et al., 2019; Galal et al., 2019), reportaram que suínos de raças locais ou naturalizadas, apresentam diferenças nos mecanismos moleculares quando expostos a altas temperaturas. Esses mecanismos visam preservar a função celular, uma vez que, a exposição a altas temperaturas induz uma série de ajustes e danos celulares que incluem inibição da síntese de proteínas, disfunção das proteínas, alterações no metabolismo e diminuição da proliferação celular.

Genótipos modernos, provenientes de raças europeias ou americanas, são predominantes no sistema de criação intensivo no Brasil. Entretanto, essas linhagens não são adaptadas ao clima tropical e subtropical, devido maior potencial produtivo e de deposição de proteína (Renaudeau et al., 2012). Após a introdução dos suínos no Brasil pelos colonizadores portugueses no século XVI, diferentes raças foram cruzadas e selecionadas nas condições Brasileiras dando origem a uma série de raças locais, como Piau, Canastra, Moura, Caruncho, Pereira e Nilo. A história dessas raças contribuiu para o desenvolvimento de características fenotípicas e fisiológicas únicas (Gomes & D'aulísio, 1980), o que torna importante o melhor conhecimento de suas particularidades e sua conservação.

A raça Piau é caracterizada por sua rusticidade, resistência a enfermidades, baixa exigência de manejo, adaptabilidade, e alto teor de gordura subcutânea e intramuscular (Veroneze et al., 2014; Silva et al., 2019). Teixeira et al. (2021),

reportou diminuição magnitude da ativação dos mecanismos de dissipação de calor em suínos da raça Piau com peso médio inicial de 64 kg, submetidos a 30°C.

Estratégias voltadas para a criação de animais com melhor tolerância térmica e resiliência climática são intensamente buscadas atualmente para mitigar os impactos do estresse térmico, especialmente em sistemas de produção pecuária de alto insumo (Gourdine et al., 2019; Usala et al., 2021, Teixeira et al., 2021 Moreira et al., 2021).

2.3 Expressão das Heat shock proteins em estresse por calor

A síntese das proteínas de choque térmico (Heat Shock Proteins, HSP), foi inicialmente verificada após exposição de células de *Drosophila busckii* a estresses térmico e químico (Lunz et al., 2005). Sabe-se que a síntese dessas proteínas ocorre praticamente em todos os seres vivos em resposta a exposição a estresses ambientais ou endógenos. (Khazaei & Aghaz, 2017).

As HSPs pertencem ao grupo das chaperonas moleculares e apresentam importante papel nos processos biológicos essenciais para a manutenção da homeostase da proteína (Wolf et al., 2014). Chaperonas moleculares são definidas como proteínas que se ligam e estabilizam outras proteínas instáveis, facilitando sua montagem correta, entretanto não são componentes da estrutura funcional final (Dubrez et al., 2019). Tais proteínas, proporcionam às células tolerância a altas temperaturas ambientais, e a outras situações de estresse exercendo um papel de proteção e manutenção ao organismo (Wan et al., 2020).

As HSPs são classificadas em grupos gerais com base em seu peso molecular. (Wan et al., 2020) A família de proteínas HSP 70, encontrada em compartimentos subcelulares de células nucleadas, auxilia nas respostas celulares ao estresse. A HSP 90, encontrada tanto no citoplasma quanto no núcleo, é uma das proteínas mais abundantes nas células de mamíferos. A HSP90 não apenas interage e contribui para a montagem do RNA polimerase, mas desenvolve importantes papéis no processo de dobramento de proteínas (Kamanga & Sollo et al., 2011).

Os eventos ocorridos na regulação e indução das HSPs, são ilustrados na figura 3. A expressão de HSP induzida por estresse é conduzida por meio da ativação do fator de transcrição 1 responsivo ao choque térmico (HSF1). Em condições basais, o HSF1 existe como monômero e em um estado reprimido para a ligação do elemento de choque térmico (HSE) e atividade transcricional. Em contraste, sob condições de estresse, incluindo variações bruscas na temperatura ambiental ou estresse fisiológico (por

exemplo, estresse mecânico, choque de osmolaridade, desequilíbrio energético), ocorre acúmulo de proteínas anormais, algumas dessas proteínas irão interagir de forma estável com as diferentes HSPs, estas são liberadas dos complexos inativos (HSF-HSPs) e alteram o equilíbrio entre os complexos, o que torna as HSF disponíveis em forma livre. Por sua vez, a HSF1 forma um trímero, ligando-se a HSE, ocorrendo a segunda fosforilação, pela enzima HSF quinase, promovendo a transcrição de genes alvo, especialmente HSP (Shamovsky & Nudler et al., 2008; Tamura et al., 2019).

Nesse contexto, existem evidências de que HSPs quando sintetizadas em maiores

níveis, seja em resposta ao estresse térmico ou outro tipo de estresse celular, desempenham papel crucial na regulação da taxa e eficiência do crescimento muscular e qualidade da carne (Zhang et al., 2014). Esse efeito é atribuído, principalmente ao seu papel em facilitar o dobramento correto de proteínas recentemente sintetizadas, e de prevenir a agregação irreversível de proteínas parcialmente dobradas e desnaturadas evitando assim, a perda de sua função (Wan et al., 2020) As HSPs também auxiliam na translocação de proteínas para o seu devido compartimento celular e regulam a apoptose das células induzida por estresse por meio das vias de transdução de sinal celular (Lomiwes et al., 2014. Tamura et al., 2019).

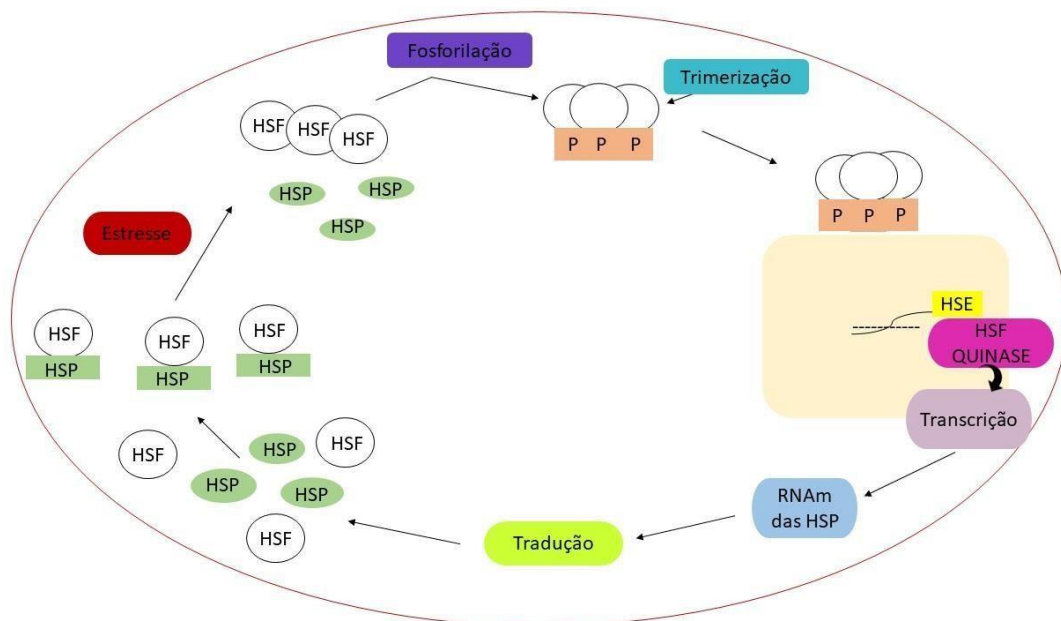


Figura 3 - Mecanismo de indução das HSP por estresse adaptado de Wan et al. (2020). HSF: Fator de choque térmico; HSE: Elemento de choque térmico; HSP: Proteínas do choque térmico.

Além disso, estudos demonstram que as HSPs podem apresentar efeitos sinalizadores nas células musculares, uma vez que em situações de estresse térmico transitório, há uma correlação positiva entre a expressão de HSP 70, aumento na sensibilidade da insulina e ativação da via Akt/mTORC1 no músculo esquelético, além de aumentar a proliferação de células satélites (Gao et al., 2015; Fernandez et al., 2015).

No entanto, a resposta ao estresse por calor, e a expressão de HSPs podem variar consideravelmente entre diferentes grupos genéticos (Carbanõ et al., 2019). Galal et al. (2019) ao investigarem a expressão de mRNA de HSPs relataram que os frangos que tinham o gene do pescoço pelado, apresentaram maiores níveis da HSP70 quando comparados a raças que habitam climas moderados. Resultado consistente com o de Cedraz et al. (2017), que observaram que a expressão de mRNA dos genes *HSP70* e *HSP90* foram altamente expressos nas raças nativas Peloco e Caneluda em estresse térmico, quando comparada a linhagem comercial Cobb.

2.4 Estresse por calor, geração de ROS e estresse oxidativo

O estresse oxidativo é caracterizado pela produção excessiva de EROs e a incapacidade antioxidante disponível nas células (Linguori, et al., 2018). Já é de conhecimento que a exposição a altas temperaturas ambientais podem gerar maior formação de EROS e induzir o estresse oxidativo (Goel et al., 2021). Sob condições fisiológicas normais, a maior parte das EROS se originam das mitocôndrias, como produtos secundários da respiração aeróbica (Hassan et al., 2020). Paradoxalmente, quando os animais são submetidos a altas temperaturas ambientais há a sobrecarga do metabolismo de energia celular mitocondrial e aumento do consumo de oxigênio, os quais estão associados à geração de EROS (figura 4), (Russo et al., 2021).

Os radicais livres são quaisquer espécies independentes, que possuam um ou mais elétrons desemparelhados em sua camada externa (Slimen et al., 2014). Eles são geralmente instáveis e de curta duração, mas, geralmente reativos quimicamente, podendo reagir com qualquer molécula oxidando-a ou causando qualquer outro tipo de modificação química (Linguori, et al., 2018; Nandi et al., 2019). A síntese das EROS, em quantidades moderadas, são cruciais para manutenção da homeostase, uma vez que as EROS participam de uma ampla variedade de funções e manutenção do sistema imunológico (Hassan et al., 2020). Entretanto, quando o nível de EROS excede os mecanismos de defesa, diz-se que uma célula está em um estado de "estresse

oxidativo"(Sharma, et al., 2012).

O aumento descontrolado de EROS pode desencadear reações negativas, levando a disfunções metabólicas, modificação estrutural das proteínas celulares e alteração de suas funções (Chen et al.,2018). As EROS ainda causam quebra da membrana lipídica e/ou aumento da fluidez e permeabilidade da membrana, causando o bloqueio das ações de diversas enzimas, destruição do ácido desoxirribonucléico (DNA) por meio da oxidação da desoxirribose, quebra da fita de DNA, remoção de nucleotídeos, modificação de bases e reticulação da proteína do DNA, e ainda bloqueiam a geração de energia (Chen et al., 2018).

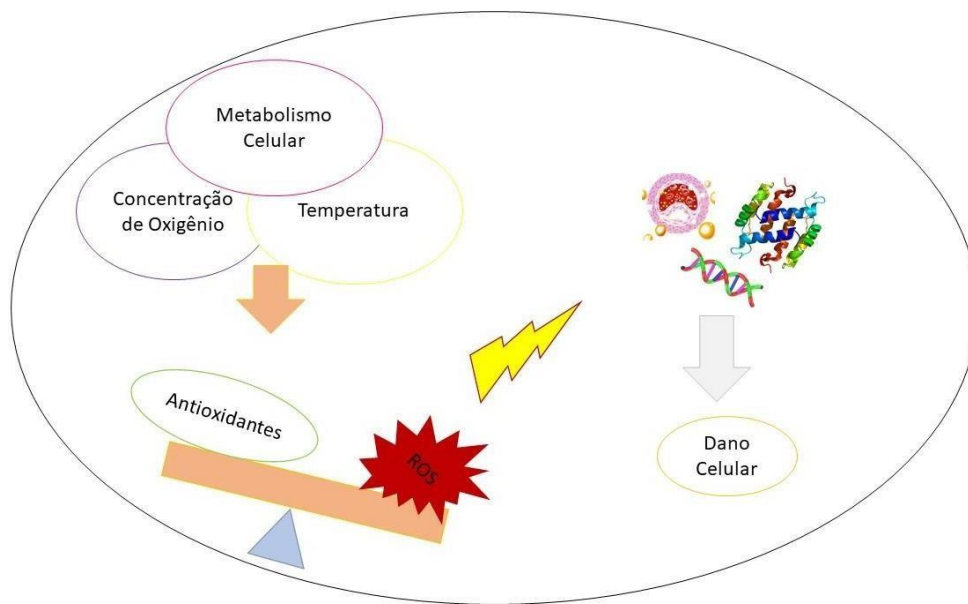


Figura 4 - Fatores que induzem a geração de espécies reativas de oxigênio adaptado de Khazaei et al. (2017).

A fim de evitar danos oxidativos as células, os animais são equipados com um sistema antioxidante natural, o qualé constituído por componentes endógenos e exógenos, quesão capazes de atenuar os efeitos das espécies reativas de oxigênio (EROS) (Nandi et al., 2019). As principais enzimas antioxidantes endógenas que participam do processo de redução do estresse oxidativo são: superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx) e catalase (CAT). A SOD constitui um grupo de metaloenzimas, as quais fazem parte da linha de frente na defesa contra as EROS, a função da SOD é catalisar a dismutação dos radicais livres de ânion superóxido (O_2^-) altamente reativo, em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) de baixa reatividade (Nandi et al., 2019; Goel et al., 2021; Liguori, et al., 2018), A SOD é classificada em três isoformas distintas: superóxido

dismutase de cobre-zinco (, SOD1), Superóxido dismutase de manganês (SOD2) e superóxido dismutase extracelular (SOD 3). A principal diferença entre essas isoformas são as características de suas estruturas proteicas, as localizações cromossômicas, os requisitos de cofator de metal, a distribuição de genes e a compartimentação celular (Nojima et al., 2015)

A catalase funciona na neutralização da produção excessiva de EROS, facilitando a quebra do peróxido de hidrogênio produzido pela SOD em água (H_2O) e oxigênio molecular, juntamente com a GSH (Galasso et al., 2021). A GSH é um tripeptídeo formado por glicina, cisteína e glutamato, é encontrada especialmente no fígado, atua como um agente redutor e como um dos principais antioxidantes celular, mantendo um controle rígido do status redox (Lu 2013; Young et al., 2019). A função antioxidante do GSH é evitar a formação do radical hidroxila, o qual é altamente reativo e prejudicial as células, essa reação é mediada pela ação da GSH peroxidase (GPx), através da redução do peróxido de hidrogênio em água, como ilustrado na figura 5 (Smitch et al., 2020).

Nesse contexto, estudos anteriores demonstraram que a exposição a altas temperaturas ambientais causa um aumento compensatório na atividade de SOD, GSH-Px e CAT no soro, fígado e músculo de frangos de corte (Mak et al., 2010; Xie et al., 2014). Ademais, estudos também sugerem que as diferenças na tolerância ao estresse por calor podem ser parcialmente devido às maiores atividades de enzimas antioxidantes em genótipos tolerantes (Zhao et al., 2014; Hao et al., 2021).

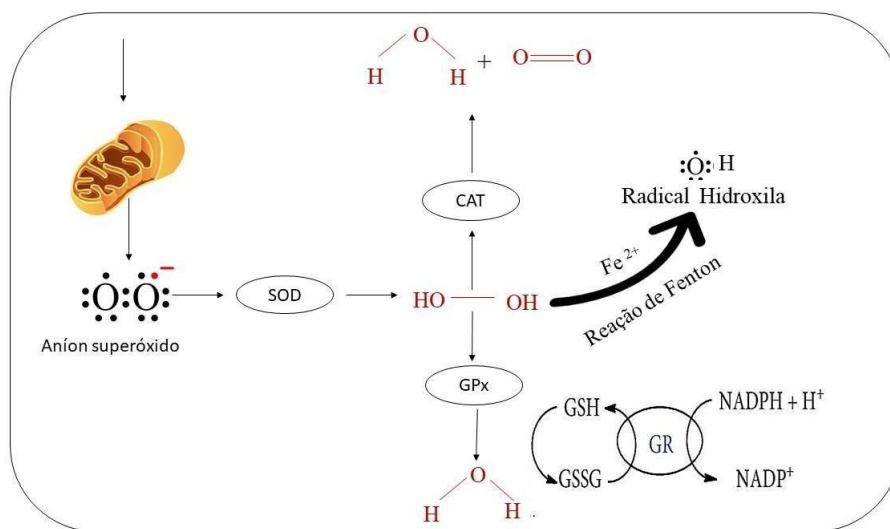


Figura 5 - Relação das ações das enzimas antioxidantes adaptado de Nandi et al.(2019)

3. REFERÊNCIAS

- ALTOBELLI, G. G., VAN NOORDEN, S., BALATO, A., & CIMINI, V. Copper/Zinc Superoxide² Dismutase in Human Skin: Current Knowledge. **Frontiers in medicine**, v.7, p. 183, 2020.
- BAUMGARD, L. H., & RHOADS, R. P.JR. Effects of heat stress on postabsorptive metabolism and energetics. **Annualreview of animal biosciences**, v.1, p.311–337, 2013.
- BETTERIDGE D, J. What is oxidative stress? **Metabolism**, v.49, p. 3–8, 2000.
- BRAZ, José Reinaldo Cerqueira. Fisiologia da Termoregulação. **Revista Neurociências**, v. 13, p. 12-17, 2005.
- BECKHAUSER, T. F., FRANCIS-OLIVEIRA, J., & DE PASQUALE, R. Reactive Oxygen Species: Physiological and Physiopathological Effects on Synaptic Plasticity. **Journal of Experimental Neuroscience**, v.10, n.1, p. 23-48.
- CHANG, H. Y., TAYNG, X. Ptoteases for cell suicide: functions and regulation of Caspases. **Microbiology Molecular Biology Review**, v.64, n.4, p.821-846, 2000.
- COLLIER, R. J., & COLLIER, J. L. (Ed.). Environmental physiology of livestock. Chichester: Wiley-Blackwell, 2012.
- COLLIER, R. J., BAUMGARD, L. H., ZIMBELMAN, R. B., & XIAO, Y. Heat stress: physiology of acclimation and adaptation. **Animal Frontiers**, v.9, n.1, p.12-19, 2019.
- CAMPOS, PAULO HENRIQUE REIS FURTADO *et al.* Thermoregulatory responses during thermal acclimation in pigs divergently selected for residual feed intake. **International journal of biometeorology**, v. 58, n. 7, p. 1545-1557, 2014.
- CAMPOS, P. H. R. F.; LABUSSIÈRE, E.; HERNÁNDEZ-GARCÍA, J.; DUBOIS, S.; RENAUDEAU, D. AND NOBLET, J. Effects of ambient temperature on energy and nitrogen utilization in lipopolysaccharide-challenged growing pigs. **Journal of Animal Science**, v.92, p. 4909–4920, 2014.
- CAMPOS, P. H. F., LE FLOC'H, N., NOBLET, J., RENAUDEAU, D. Physiological responses of growing pigs to high ambient temperature and/or inflammatory challenges. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.46, n.6, p. 2017.
- CULOTTA, V. C., YANG, M., & O'HALLORAN, T. V. Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal. **Biochimica et biophysica acta**, v.1763, n.7, p.747–758, 2006.
- DEISSEROTH, A., & DOUNCE, A. L. Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. **Physiological reviews**, v.50, n.3, p.319–375,

1970.

ELLIS RJ, VAN DER VIES SM. Molecular chaperones. **Annuals Reviews of Biochemistry**, v.60, p. 321-347, 1991.

ENGELMAN, J. A., CHEN, L., TAN, X., CROSBY, K., GUIMARAES, A. R., UPADHYAY, R., CHIRIEAC, L. R. Effective use of PI3K and MEK inhibitors to treat mutant Kras G12D and PIK3CA H1047R murine lung cancers. **Nature medicine**, v. 14, n. 12, p. 1351-1356, 2008.

FERNANDEZ, M. V.S., STOAKES, S.K., ABUAJAMIEH, M., SEIBERT, J.T., JOHSON, J. S., HORST, E.A., RHOADS, R, P., BAUMGARD. L. H. Heat stress increases insulin sensitivity in pigs. **The Physiological Society**, v.3, n.8, 2015.

FIRTH, S. M., & BAXTER, R. C. Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. **Endocrine reviews**, v. 23, n.6, p.824–854.

FLOHE, L., GÜNZLER, W. A., & SCHOCK, H. H. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. **FEBS letters**, v.32, n.1, p.132–134, 1973.

FORMAN, H. J., ZHANG, H., & RINNA, A. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. **Molecular aspects of medicine**, v.30 n. 1, p. 1–12, 2009.

FAO. World Livestock: Transforming the Livestock Sector Through the Sustainable Development Goals. Rome: FAO 2018.

FUKAI, T., & USHIO-FUKAI, M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. **Antioxidants & redox signaling**, v.15, n.6, p.1583–1606, 2011.

OLIVEIRA, A. C. F.; VANELLI, K.; SOTOMAIOR, C. S.; WEBER, S. H.; COSTA, L. B. Impacts on performance of growing-finishing pigs under heat stress conditions: a meta-analysis. **Veterinary research communications**, v.43, n.1, p.37–43, 2019.

GALASSO, M., GAMBINO., ROMANELLI, M.G., DONADELLI, M., SCUPOLI, T. Browsing the oldest antioxidant enzyme:catalase and its multiple regulation in cancer. **Free Radical Biology and Medicine**, v.172, n.20, p.264-272, 2021.

GOMES, Marli de Bem; D'AULÍSIO, Sérgio Henrique Gouveia. Estudo da prolificidade da raça suína Piau. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, v. 37, n. 1, p. 179-208, 1980.

HANSFORD, R. G., HOGUE, B. A., & MILDAZIENE, V. Dependence of H₂O₂ formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. **Journal of bioenergetics and biomembranes**, v.29, n. 1, p. 89–95,1997.

HARDIE, D. GRAHAME. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. **Nature Reviews Molecular cell biology**, v. 8, n. 10, p. 774-785, 2007.

- Hassan, A. H. A., Hozzein, W.N., Mousa, A.S.M. Heat stress as an innovative approach to enhance the antioxidant production in *Pseudoaeromonas* and *Bacillus* isolates. **Scientific Reports**, v.10, 2020.
- HOFFMANN, Irene. Climate change and the characterization, breeding and conservation of animal genetic resources. **Animal genetics**, v. 41, p. 32-46, 2010.
- HENDRICK J,P, HARTL, F. U. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. **Annuals Reviews of Biochemistry**, v. 62, p.349-384, 1993.
- HIRAKAWA, T., YASHIRO, M., DOI, Y., KINOSHITA, H., MORISAKI, T., FUKUOKA, T., HASEGAWA, T., KIMURA, K., AMANO, R., & HIRAKAWA, K. Pancreatic Fibroblasts Stimulate the Motility of Pancreatic Cancer Cells through IGF1/IGF1R Signaling under Hypoxia. **PloS one**, v.11, n.8, 2016.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Lipid peroxidation: a radical chain reaction. In: Free radical in biology and medicine. **New York: Oxford University**, p.189- 276, 1999.
- INOKI, KEN; ZHU, TIANQING; GUAN, KUN-LIANG. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. **Cell**, v. 115, n. 5, p. 577-590, 2003.
- IVANCICH, A., JOUVE, H. M., SARTOR, B., & GAILLARD, J. EPR investigation of compound I in *Proteus mirabilis* and bovine liver catalases: formation of porphyrin and tyrosyl radical intermediates. **Biochemistry**, v.36, n.31, p.9356-9364, 1997.
- KAMANGA-SOLLO, E., PAMPUSCH, M.S., WHITE, M. E. HATHAWAY, M, R., DAYTON, W. R. Effects of heat stress on proliferation, protein turnover, and abundance of heat shock protein messenger ribonucleic acid in cultured porcine muscle satellite cells. **Journal of Animal Science**, v.89, n.11, p. 3473–3480, 2011.
- KHAZAEI, M. & AGHAZ, F. Reactive Oxygen Species Generation and Use of Antioxidants during In Vitro Maturation of Oocytes. **International Journal of Fertility & Sterility**, v.11, n.2, p. 63-70, 2017.
- KAPLOWITZ, N, & OOKHTENS, M. The regulation of hepatic glutathione. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v.25, p. 715–744, 1985.
- KENNEDY, L., SANDHU, J. K., HARPER, M. E., CUPERLOVIC-CULF, M. Role of Glutathione in Cancer: **From Mechanisms to Therapies**. **Biomolecules**, v.10, n.10, p. 1429,2020.
- LOMIWES, D.; FAROUK, M.M.; WIKLUND, E.; YOUNG, O.A. Small heat shock proteins and their role in meat tenderness: a review. **Meat Science**, v.96, p.26-40,
- LUBOS, E., LOSCALZO, J., & HANDY, D. E. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. **Antioxidants & redox**

signaling, v.15, n.7, p. 1957–1997, 2011.

LIN H, BUYSE J, DECUYPERE E. Acute heat stress induces oxidative stress in broiler chickens. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, v.144, p. 11–17, 2006.

LIGUORI, I., RUSSO, G., CURCIO, F., BULLI, G., ARAN, L., DELLA-MORTE, D., GARGIULO, G., TESTA, G., CACCIATORE, F., BONADUCE, D., & ABETE. Oxidative stress, aging, and diseases. **Clinical interventions in aging**, v.13, p.757–772, 2018.

LUNZ, W.; NATALI, A. J. Exercício e Proteínas de Estresse (Hsp 72) no Músculo Cardíaco. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v.13, n.2, p. 7-15, 2005.

LU, SHELLY C. Glutathione synthesis. **Biochimica et biophysica**, v. 1830, n.5, p.3143-3153, 2013.

LIOCHEV, S. I., & FRIDOVICH, I. The effects of superoxide dismutase on H₂O₂ formation. **Free radical biology & medicine**, v.42, n.10, p.1465–1469, 2007.

MAYORGA E. J.; RENAUDEAU DAVID; RAMIREZ B. C.; JASON W. ROSS; BAUMGARD L. H. Heat stress adaptations in pigs. **Animal Frontiers**, v. 9, n. 1, p. 54– 61, 2019.

MILLER A. F. Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights. **FEBS letters**, v.586, n.5, p.585–595, 2012.

MIAO, L., & ST CLAIR, D. K. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. **Free radical biology & medicine**, v.47, n, 4, p. 344–356, 2009

MEISTER, A., & ANDERSON, M.E. Glutathione. **Annual review of biochemistry**, v.52, p. 711–760, 1983.

MERKS, J. W., MATHUR, P. K., & KNOL, E. F. New phenotypes for new breeding goals in pigs. **Animal: an international journal of animal bioscience**, v.6, n.4,p. 535–543, 2012.

MARKLUND S. L. Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. **The Biochemical journal**, v.222, n.3, p. 649–655, 1984.

NATIONAL CENTERS FOR ENVIRONMENTAL INFORMATION Acesso em: setembro de 2020. Disponível em: <<https://www.ncdc.noaa.gov/sotc/global/201813>>.

NOBLE, E.J., MILNE, K. J., MELLING, C. W. Heat shock proteins and exercise: A primer. **Physiol. Nutr.Metab**, v.33, p. 1050-1065, 2008.

NANDI, A., YAN, L. J., JANA, C. K., & DAS, N. Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases. **Oxidative medicine and cellular longevity**, 2019.

NOJIMA, Y., ITO, K., ONO, H., NAKAZATO, T., BONO, H., YOKOYAMA, T., SATO, R., SUETSUGU, Y., NAKAMURA, Y., YAMAMOTO, K., SATOH, J., TABUNOKI, H., &

- FUGO, H. Superoxide dismutases, SOD1 and SOD2, play a distinct role in the fat body during pupation in silkworm *Bombyx mori*. **PloS one**, v.10, n.2, 2015.
- NICHOLLS, P.; FITA, Ignacio; LOEWEN, Peter C. Enzymology and structure of catalases. **Advances In Inorganic Chemistry**, p.51-106, 2000.
- OOKHTENS, M., & KAPLOWITZ, N. Role of the liver in interorgan homeostasis of glutathione and cyst(e)ine. **Seminars in liver disease**, v.18, n. 4, p.313–329, 1998.
- PRIETO, A. M.; BIARNÉS, X.; VIDOSSICH, P.; ROVIRA, C. The Molecular Mechanism of the Catalase Reaction. **Journal Of the American Chemical Society**, v.131, n.33, p. 11751-11761, 2009.
- RENAUDEAU, D.; ANAIS, C.; TEL, L. & GOURDINE, J. L. Effect of temperature on thermal acclimation in growing pigs estimated using a nonlinear function. **Journal of Animal Science**, v. 88, p. 3715–3724, 2010.
- RENAUDEAU, D.; FRANCES, G.; DUBOIS, S.; GILBERT, H. AND NOBLET, J. Effect of thermal heat stress on energy utilization in two lines of pigs divergently selected for residual feed intake. **Journal of Animal Science**, v.91, p.1162–1175, 2013.
- RENAUDEAU, D.; GOURDINE, J. L. AND ST-PIERRE, N. R. A meta-analysis of the effects of high ambient temperature on growth performance of growing-finishing pigs. **Journal of Animal Science**, v. 89, p. 2220–2230, 2011.
- RENAUDEAU, D.; HUC, E. AND NOBLET, J. Acclimation to high ambient temperature in Large White and Caribbean Creole growing pigs. **Journal of Animal Science**, v.85, p.779–790, 2007.
- RENAUDEAU, D.; COLLIN, A.; YAHAV, S.; BASILIO, V.; GOURDINE, J.L.; & COLLIER, J. Adaptation to hot climate and strategies to alleviate heat stress in livestock production. **Animal**, v. 6, n. 5, p. 707-728, 2012.
- ROSS, J. W. et al. Physiological consequences of heat stress in pigs. **Animal Production Science**, v.55, p .1381-1390, 2015.
- ROBINSON TP., THORNTON PK., FRANCESCHINI G., KRUSKA. Global Livestock Production Systems. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) and International Livestock Research Institute (ILRI). 2011.
- SHAMOVSKY, I. NUDLER, E. New insights into the mechanism of heat shock response activation. **Cell Mol. Life Sci**, v.65, p. 855– 861, 2008.
- SATRAPA, R. A., CASTILHO, A. S., RAZZA, E. M., PEGORER, M. F., PUELKER, R., & BARROS, C. M. Differential expression of members of the IGF system in OPU-derived oocytes from Nelore (*Bos indicus*) and Holstein (*Bos taurus*) cows. **Animal reproduction**

science, v. 138, n. 4, p. 155–158, 2013.

SEELNBINDER, K. M., ZHAO, L. D., HANIGAN, M. D., HULVER, M. W., MCMILLAN, R.P., BAUMGARD, L.H., SELSBY, J.T., ROSS, J. W., GABLER, N. K., RHOADS, R.P. Effects os heat stress drimg porcine reproductive and respiratoty syndrome vírus infection on metacolic responses in growing pigs. **Journal of Animal Science**, v. 96, n.4, p. 1375-1387, 2018.

SIROTKIN, ALEXANDER & BAUER, MIROSLAV. Heat shock proteins in porcine ovary: Synthesis, accumulation and regulation by stress and hormones. **Cell stress & chaperones**, v.16, p. 379-87, 2010.

SILVA, A.A., GONÇALVES, R.C. Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandesanimais. **Ciência Rural**, v.40, n.4, p.994-1002,2010.

SHAW, R. J., BARDEESY, N., MANNING, B. D., LOPEZ, L., KOSMATKA, M., DEPINHO, R. A., & CANTLEY, L. C. The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling. **Cancer cell**, v. 6, n.1, p. 91-99, 2004.

SHAW, R.J. LKB1 and AMP- activated protein Kinase Control of mTOR signalling and growth. **Acta physiologica**, v. 196, n.1, p. 65-80, 2009.

SENGUPTA, SHOMIT; PETERSON, TIMOTHY R.; SABATINI, DAVID M. Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. **Molecular cell**, v. 40, n.2, p. 310-322, 2010.

SHARMA, P., JHA, A. B., DUBEY, R.S., PESSARAKLI, M. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. **Journal of Botany**,2013.

SLIMEN, I. B.; NAJAR, T.; GHRAM, A.; DABBEBI, H.; BEN MRAD, M.; ABDREBBAH, M. Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage. A review. **International journal of hyperthermia**, v.30, n.7, p.513–523, 2014.

TEIXEIRA, A.R.; VERONEZE, R.; MOREIRA, V. E.; CAMPOS, L.D.; RAIMUNDI, S. C. J.; CAMPOS, P. H. R F. Effects of heat stress on performance and thermoregulatory responses of Piau purebred growing pigs. **Journal of Thermal Biology**, v. 99,2021.

VON OSSOWSKI, I., HAUSNER, G., & LOEWEN, P. C. Molecular evolutionary analysis based on the amino acid sequence of catalase. **Journal of molecular evolution**, v.37, n.1, p.71 76,1993.

XIN, HAIRUI & ZHANG, XIAOJUN & SUN, DENGSHENG & ZHANG, CHUANG & HAO, YUE & GU, XIANHONG. Chronic heat stress increases insulin-like growth factor-1(IGF-1) but does not affect IGF-binding proteins in growing pigs. **Journal of Thermal**

Biology, v.77, 2018.

WANG R, R., PAN X, J., PENG Z, Q. Effects of heat exposure on muscle oxidation and protein functionalities of pectoralis majors in broilers. **Poult Science**, v. 88, p. 1078–1084, 2009.

WAN, Q., SONG, D., LI, H. Stress proteins: the biological functions in virus infection, present and challenges for target-based antiviral drug development. **Nature**, v.5, v.125 2020.

WEYDERT, C. J., & CULLEN, J. J. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. **Nature protocols**, v.5, n.1, p. 51–66.

YUAN, T. L.; CANTLEY, L. C. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. **Oncogene**, v. 27, n. 41, p. 5497-5510, 2008.

YOUNUS, H. Therapeutic potentials of superoxide dismutase. **International journal of health sciences**, v.12, n.3, p. 88–93, 2018.

ZHANG, L., SUN, C., YE, X. Characterization of four heat shock protein genes from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and demonstration of the inducible transcriptional activity of the Hsp70 promoter. **Fish Physiol Biochem**, v. 40, p.221–233, 2014.

ZHAO Y., FLOWERS, B., SARAIVA, A., YEUM K, J., KIM S, W. Effect of social ranks and gestation housing systems on oxidative stress status, reproductive performance, and immune status of sows. **Journal of Animal Science**, v.91, 2014

ARTIGO: EFEITO DO GENÓTIPO E DO AMBIENTE TÉRMICO NA EXPRESSÃO DOS GENES DO ESTRESSE OXIDATIVO E DO CHOQUE TÉRMICO EM SUÍNOS EM CRESCIMENTO

4. INTRODUÇÃO

O aumento da temperatura global em uma taxa sem precedentes e a ocorrência das ondas de calor em todo o mundo (Noaa, 2018), tem se tornado uma das maiores preocupações para a produção animal. Estudos prévios reportam redução do consumo voluntário (Renaudeau et al., 2011; Oliveira et al., 2019; Teixeira et al., 2021) e menor atividade dos hormônios tireoidianos (Campos et al., 2014; Teixeira et al., 2021) em suínos submetidos a alta temperatura ambiente como estratégia para diminuir a termogênese. Ademais, estudos sugerem que a exposição a alta temperatura resulta em estresse oxidativo (Lu et al., 2017, Janni et al., 2020), estado de desequilíbrio entre os radicais oxidantes (livres) e a degradação insuficiente desses radicais por sistemas antioxidantes. Adicionalmente, o estresse por calor causa desnaturação, danos no dobramento e perda de função de proteínas, além de induzir apoptose e perda de função celular (Hassan et al., 2020; Tamura et al., 2019).

Dentre os genótipos naturalizados de suínos, a raça Piau é considerada a mais importante (Sollero et al., 2006; Bulos et al., 2016). Esses animais passaram por um processo de adaptação às condições ambientais tropicais, e adquiriram características únicas como rusticidade, resistência a doenças e grande deposição de toucinho (Veroneze et al., 2014; Silva et al., 2019). As raças naturalizadas, em comparação com as linhagens comerciais podem ter uma maior resistência a altas temperaturas ambientes, parcialmente por apresentarem menor produção de calor em consequência do menor desempenho produtivo e da baixa exigência de manutenção (Renaudeau et al., 2007; Teixeira et al., 2021).

Em estudo realizado por Teixeira et al. (2021), no qual foi avaliado o desempenho e respostas termorregulatórias de suínos da raça local brasileira Piau, suínos submetidos ao estresse por calor apresentaram redução no consumo voluntário de ração e no ganho de peso diário. Moreira et al. (2021), ao avaliarem o efeito da temperatura ambiente em características de carcaça de suínos comercial e cruzados (comercial × Piau), reportaram que a alta temperatura resultou em redução na deposição de tecido magro em animais comerciais, enquanto não houve efeito da temperatura nesta

característica de animais cruzados (comercial× Piau), sugerindo maior termotolerância para esse grupo.

Variações genéticas entre raças em resposta ao estresse por calor tem sido relatada em várias espécies, entretanto, pouco foi publicado sobre as diferenças na tolerância ao calor entre raças de suínos tropicais e subtropicais associadas a mecanismos de proteção celular (Gourdine et al., 2021). Nesse contexto, objetivou-se avaliar o efeito da alta temperatura ambiente na expressão dos genes do estresse oxidativo e do choque térmico em suínos de linhagem comercial, da raça nativa brasileira Piau e em animais cruzados (comercial × Piau).

5. MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais envolvendo a manipulação dos animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção (CEUAP) da Universidade Federal de Viçosa (protocolo nº 27/2018).

5.1 Animais e delineamento experimental

Para realização das análises de expressão gênica, foram utilizadas amostras de tecido hepático e *Longissimus dorsi* de suínos em crescimento de da raça pura Piau, genótipo comercial, e genótipo cruzado (comercial × Piau) submetidos a condições de termoneutralidade (22°C) e alta temperatura ambiente (30°C). As amostras dos animais da raça pura Piau foram provenientes do estudo de Teixeira et al. (2021). Por sua vez, as amostras dos animais de genótipo comercial e cruzados (comercial × Piau), foram provenientes do estudo de Moreira et al. (2021).

Embora as amostras utilizadas pertençam a dois experimentos distintos, os animais foram submetidos às mesmas condições de alojamento, manejo e nutrição, e os experimentos realizados pela mesma equipe de trabalho. Os estudos foram realizados na Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão em Melhoramento de Suínos da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Para cada genótipo (comercial, Piau, e cruzado comercial × Piau) foram formados dois grupos de animais submetidos a uma das condições ambientais: termoneutralidade (22°C) ou alta temperatura ambiente (30°C). De acordo com a condição ambiental, os animais foram alojados em salas climatizadas em gaiolas individuais suspensas (0,80 × 1,60 metros), com piso de plástico, divisórias de aço, dotadas de comedouro semiautomático e bebedouro tipo chupeta. O controle da temperatura ambiente, em cada sala climatizada, foi realizado por sistema automatizado

de climatização composto por aquecedores elétricos, lâmpadas de infravermelho e sistema de resfriamento tipo *chiller*. A temperatura ambiente e a umidade relativa das salas foram monitoradas e registradas por meio de datalogger (Klima Logger, Thermo-Hygro-Station).

Os animais permaneceram nas salas climatizadas durante 21 dias divididos em período de adaptação de sete dias e subsequente período experimental de 14 dias. O período de adaptação (dias -7 a -1) permitiu aos animais se adaptarem às condições experimentais. Durante o período de adaptação a temperatura das salas foi mantida a 24°C. Posteriormente, a temperatura de cada sala foi ajustada para 22°C ou 30°C. Durante todo o período experimental os animais receberam água e ração *ad libitum*.

Ao final do período experimental, os animais foram submetidos a jejum alimentar de 12 horas e, em seguida, insensibilizados, abatidos e amostras de tecido hepático e músculo foram coletadas, congeladas e armazenadas em nitrogênio líquido a -80°C para posterior extração de RNA. Todos os instrumentos utilizados para coleta de amostras foram esterilizados e limpos com RNase Exteminator (Protech Technology Enterprise Co., Ltd.).

5.2 Amostras, extração de RNA e síntese do cDNA

Para análise, foram utilizadas amostras de 8 suínos comerciais submetidos a 22°C e 6 suínos comerciais submetidos a 30°C; 9 suínos Piau submetidos a 22°C e 9 suínos Piau submetidos a 30°C; 9 suínos cruzados (comercial × Piau) submetidos a 22°C e 6 suínos cruzados (comercial × Piau) submetidos a 30°C. A extração do RNA foi realizada a partir de 60 mg de amostras de fígado e *Longissimus dorsi* (previamente pulverizadas em nitrogênio), de cada animal, por meio do Trizol® (Invitrogen™) de acordo com as instruções do fabricante. O precipitado final foi reidratado com 20-30 µL de água UltraPure® DNase/RNase-Free. A concentração do RNA foi estimada por espectrofotometria (NanoVue Plus™, GE Healthcare, Munique, Alemanha), nas razões A260/A280 entre 1.8 e 2.0 como controle de pureza. A integridade do RNA extraído foi verificada com o gel de agarose 1%. Na sequência, as amostras foram reversamente transcritas em DNA complementar (cDNA) utilizando o Kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Thermo Fisher), segundo recomendação do fabricante. As amostras de cDNA foram armazenadas a -20 °C até o uso na reação de PCR quantitativo em tempo real.

5.3 Primers e avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real (RT-qPCR)

Os primers (Tabela 1) para amplificação dos fragmentos dos genes alvo (heat shock protein 70 (HSP 70), heat shock protein 90 (HSP 90), superóxido dismutase (SOD-1), superóxido dismutase (SOD-2), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) e dos endógenos (B2M e GAPDH) foram desenhados por meio do programa PrimerQuest (Integrated DNA Technologies Inc, Coralville, IA) a partir das sequências de nucleotídeos obtidas do banco de dados do GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Como controle endógeno, a fim de minimizar as possíveis variações quanto a quantidade de mRNA inicial e a eficiência de transcrição reversa, foram utilizados os genes beta-2-microglobulina (B2M) e gliceraldeído-3-fosfatodesidrogenase (GAPDH). A escolha do gene endógeno foi baseada na eficiência de amplificação dos genes candidatos a partir do cálculo da eficiência para cada par de primer (nas concentrações de 100, 200 e 400 mM) por meio da fórmula $E = 10^{(-1/\text{inclinação da reta}) - 1}$, em que E é a eficiência da reação (Pfaffl et al., 2004) que, para os endógenos testados, variou de 0,94 a 1,22. Além disso, também foi usado como parâmetro o perfil das curvas de amplificação e de dissociação e a estabilidade de amplificação destes genes entre os tratamentos. Os genes endógenos não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos, sendo, então os genes GAPDH e B2M escolhidos para as análises de músculo e fígado respectivamente.

As reações em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) foram realizadas em duplicata utilizando o termociclador ABI Prism 7300 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems - Foster City, CA, EUA), a partir do método de quantificação relativa, utilizando como detecção o sistema SYBR® Green (Applied Biosystems - Foster City, CA, EUA) e o kit GoTaq® qPCR Master Mix (Promega corporation, Madison, EUA). As reações de PCR foram submetidas ao protocolo de ciclos conforme o programa: 95°C por 3 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Os valores de “threshold cycle” (Ct) obtidos foram posteriormente normalizados a partir do método de delta-ct (ΔCt) com base nos valores de Ct obtidos para os genes de controle endógeno (GAPDH e B2M). O cálculo dos níveis relativos de expressão gênica foi desenvolvido de acordo com o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, descrito por Livak e Schmittgen (2001).

Tabela 1 – Sequência de primers utilizados para análise da expressão gênica

Genes	Sequência
<i>HSP70</i>	F:GCCCTGAATCCGCAGAATA R:TCCCCACGGTAGGAAACG
<i>HSP90</i>	F:GCCCTGAGAGACAACTCGAC R:AAGCCAGAAGACAGCAGAGC
<i>SOD-1</i>	F:ATCAAGAGAGGCACGTTGGA R:TCTGCCCAAGTCATCTGGTT
<i>SOD-2</i>	F-GATGCCTTTCTAGTCCTATTC R-TCAGTTCACCTGCTACATT
<i>CAT</i>	F:GCTTTAGTGCTCCCGAACAG R:AGATGACCCGCAATGTTCTC
<i>GHSPX</i>	F:CAAGAATGGGGAGATCCTGA R:GATAAACTTGGGGTCCGGTCA
<i>GAPDH</i>	F:CAAAGTGGACATTGTCGCCATCA R:AGCTTCCCATTCTCAGCCTTGACT
<i>B2M</i>	F:CCACCCAAGATCTCCATCAC R:CGTCCAGTCGTCGTTGAA

¹HSP70: Proteína do choque térmico 70; HSP90: Proteína do choque térmico 90; SOD-1: Superóxido dismutase 1; SOD-2: Superóxido dismutase 2; CAT: Catalase; GHS PX: Glutathiona peroxidase; GAPDH: Gliceraldeído 3- fosfato desidrogenase; B2M: beta-2-microglobulina.

5.4. Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o procedimento GLM do SAS. A estatística foi realizada separadamente para cada um dos experimentos conduzidos, ou seja, uma análise foi conduzida utilizando somente informações da raça Piau e uma segunda análise foi realizada utilizando dados da linhagem comercial e cruzados. Para os animais da raça Piau, a temperatura ambiente (22 e 30°C) foi considerada o efeito fixo. Para os animais comerciais e cruzados, foram considerados efeitos fixos do genótipo (comercial, e cruzado comercial × Piau), temperatura ambiente (22 e 30°C) e a interação entre genótipo e temperatura ambiente. As médias ajustadas foram comparadas pelo teste de Bonferroni e os efeitos considerados significativos se $P < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 Efeito da temperatura ambiente na expressão de genes no tecido hepático e no músculo Longissimus dorsi em suínos da raça Piau

Na tabela 2 são apresentados os resultados da análise de variância para a expressão de genes no tecido hepático para a raça Piau. A temperatura influenciou ($P < 0,05$) na expressão de mRNA dos genes CAT, GPX, HSP90, SOD-1 e SOD-2. No entanto, não foi observada diferença significativa ($P > 0,05$) para expressão do gene HSP70.

Tabela 2 - Expressão hepática dos genes do estresse oxidativo e do choque térmico em suínos da raça Piau.

Genes ²	Piau		RMSE	<i>P</i> -Valor ¹
	22°C	30°C		Temp
CAT	0,32	0,76	0,31	0,011
GPX	0,20	0,48	0,19	0,010
HSP70	0,60	0,61	0,41	0,449
HSP90	0,24	0,46	0,20	0,038
SOD-1	0,31	0,83	0,46	0,035
SOD-2	0,25	0,53	0,24	0,031

¹Dados analisados utilizando o procedimento GLM do SAS considerando o efeito da temperatura ambiente. As médias ajustadas foram comparadas pelo teste de Bonferroni e os efeitos considerados significativos se $P < 0,05$.

²CAT: Catalase; GPX: Glutathione peroxidase; HSP70: Proteína do choque térmico 70; HSP90: Proteína do choque térmico 90; SOD-1: Superóxido dismutase 1 e SOD-2: Superóxido dismutase 2.

Na tabela 3 são apresentados os resultados da análise de variância para a expressão de genes no músculo *Longissimus dorsi* da raça Piau. A temperatura não influenciou ($P > 0,05$) a expressão dos genes, CAT, GPX, HSP70, HSP90, SOD-1. No entanto, a expressão de mRNA do gene SOD-2 foi elevada ($P < 0,05$), quando os animais Piau foram submetidos a alta temperatura.

Tabela 3 - Expressão dos genes do estresse oxidativo e do choque térmico em suínos da raça Piau no músculo *Longissimus dorsi*.

Genes ²	Piau		RMSE	<i>P</i> -Valor ¹
	22°C	30°C		Temp
CAT	1,04	1,03	0,54	0,966
GPX	0,79	1,15	0,45	0,120
HSP70	0,85	0,96	0,58	0,725
HSP90	1,19	1,38	0,54	0,500
SOD-1	1,16	1,39	0,58	0,428
SOD-2	2,66	3,00	1,75	0,031

¹Dados analisados utilizando o procedimento GLM do SAS considerando o efeito da temperatura ambiente. As médias ajustadas foram comparadas pelo teste de Bonferroni e os efeitos considerados significativos se $P < 0,05$.

²CAT: Catalase; GPX: Glutathione peroxidase; HSP70: Proteína do choque térmico 70; HSP90: Proteína do choque térmico 90; SOD-1: Superóxido dismutase 1 e SOD-2: Superóxido dismutase 2.

5.2 Efeito da temperatura ambiente na expressão de genes no tecido hepático e no músculo *Longissimus dorsi* em suínos de linhagem comercial e cruzados.

Na avaliação de amostras de tecido hepático de animais comercial e cruzado (Tabela 4), podemos observar que não houve interação entre os fatores genótipo e temperatura para expressão dos genes CAT, GPX, HSP70, HSP90, SOD-1 ($P > 0,05$). No entanto, houve interação ($P < 0,05$) entre os fatores genótipo e temperatura para expressão de mRNA da SOD-2, animais comerciais apresentaram maiores níveis de expressão de mRNA da SOD-2 quando comparados a animais comerciais em temperatura termoneutra (22°C). Além disso animais cruzados apresentaram aumento na expressão de mRNA da enzima CAT (0,71 vs 0,92 $P < 0,05$) quando comparados aos animais comerciais. Suínos expostos a 30°C apresentaram maior expressão ($P < 0,05$) de mRNA do gene SOD-1 quando comparados com suínos a 22°C.

Tabela 4 - Efeito da temperatura ambiente na expressão dos genes do estresse oxidativo e do choque térmico no tecido hepático de suínos de linhagem comercial e cruzados (comercial × Piau).

Genes 3	Comercial		Cruzados ¹		RMS E	P-Valor ²		
	22°C	30°C	22°C	30°C		Gen	Temp	G X T
CAT	0,73	0,69	0,89	0,95	0,25	0,050	0,860	0,600
GPX	0,71	0,83	0,70	0,54	0,34	0,385	0,786	0,290
HSP70	0,6	0,57	0,82	0,38	0,45	0,806	0,170	0,265
HSP90	0,75	0,92	0,58	0,79	0,34	0,264	0,170	0,872
SOD-1	0,77	1,08	0,72	0,91	0,28	0,378	0,037	0,612
SOD-2	1,05 ^b	2,11 ^a b	2,84 ^a	2,06 ^{ab}	0,92	<0,00 1	0,908	0,019

¹Progênie demachos puros daraça Piau × matrizes de genótipo comercial.

²Dados analisados utilizando o procedimento GLM do SAS considerando os efeitos fixos do genótipo, temperatura ambiente e a interação genótipo e temperatura ambiente. As médias ajustadas foram comparadas pelo teste de Bonferroni e os efeitos considerados significativos se $P < 0,05$.

³CAT: Catalase; GPX: Glutathione peroxidase; HSP70: Proteína do choque térmico 70;

HSP90: Proteína do choque térmico 90; SOD-1: Superóxido dismutase 1 e SOD-2: Superóxido dismutase 2.

Não houve interação entre os fatores genótipo e temperatura para expressão de mRNA dos genes CAT, GPX, HSP70, HSP90, SOD-1 e SOD-2 ($P > 0,05$) no músculo *Longissimus dorsi* de suínos. Suínos de genótipo comercial apresentaram maior expressão de mRNA do gene CAT (0,64, vs. 0,34; $P < 0,05$) e GPX (0,68 vs. 0,54 $P < 0,05$) quando comparados a suínos de genótipo cruzado. Suínos expostos a 30°C apresentaram maior expressão ($P < 0,05$) de mRNA do gene SOD-1 quando comparados com suínos a 22°C.

Tabela 5 - Efeito da temperatura ambiente na expressão dos genes do estresse oxidativo e do choque térmico no músculo *Longissimus dorsi* de suínos de linhagem comercial e cruzados (comercial × Piau).

Genes ³	Comercial		Cruzados 1		RMSE	P-Valor ²		
	22°C	30°C	22°C	30°C		Gen	Temp	G X T
CAT	0,51	0,78	0,33	0,36	0,21	0,002	0,120	0,161
GPX	0,66	0,71	0,41	0,27	0,35	0,025	0,700	0,526
HSP70	0,65	0,71	0,31	0,49	0,42	0,120	0,720	0,501
HSP90	0,26	0,37	0,26	0,21	0,16	0,268	0,744	0,264
SOD-1	0,65	0,86	0,37	0,70	0,36	0,160	0,072	0,707
SOD-2	0,74	0,80	0,55	0,43	0,50	0,162	0,650	0,870

¹Progênie demachos puros dараça Piau × matrizes de genótipo comercial.

²Dados analisados utilizando o procedimento GLM do SAS considerando os efeitos fixos do genótipo, temperatura ambiente e a interação genótipo e temperatura ambiente. As médias ajustadas foram comparadas pelo teste de Bonferroni e os efeitos considerados significativos se $P < 0,05$.

³CAT: Catalase; GPX: Glutathione peroxidase; HSP70: Proteína do choque térmico 70; HSP90: Proteína do choque térmico 90; SOD-1: Superóxido dismutase 1 e SOD-2: Superóxido dismutase 2.

7. DISCUSSÃO

7.1 Efeito da temperatura ambiente na expressão dos genes do estresse oxidativo e proteínas do choque térmico em animais da raça Piau

Com a vinda dos portugueses ao Brasil, diversas raças suínas se desenvolveram a partir de cruzamentos com raças trazidas pelos colonizadores (Lima et al., 2018). Ao longo dos últimos séculos essas raças evoluíram em ambiente tropical, o que pode resultar em características específicas de adaptação (Araújo et al., 2020). Dentre as raças denominadas “crioula, local, nativa ou naturalizada” a raça Piau é uma das mais bem caracterizadas (Veroneze et al., 2014; Araújo et al., 2020).

A raça Piau é resultado do cruzamento entre raças chinesas e europeias, introduzidas pelos colonizadores portugueses no século XVI. Os suínos Piau tem como principais características morfológicas a pelagem branca-creme com manchas pretas-amarronzadas, orelhas intermediárias entre ibéricas e asiáticas e perfil nasal retilíneo ou subcôncavo (Sarcinelli et al., 2007). Possuem alta rusticidade e aptidão para deposição de gordura, além de apresentarem menor potencial produtivo quando comparados a

raças comerciais, o que pode explicar parcialmente a adaptação ao estresse por calor desses animais (Veroneze et al., 2014; Silva et al., 2019). Até o presente momento, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares que atuam como defesa contra altas temperaturas em raças nativas. Um desses mecanismos de defesa é a ativação de genes que codificam para as proteínas do choque térmico (Carbonõ et al., 2019). As HSPs são componentes primário da resposta ao estresse celular, e o aumento da expressão de genes que codificam essas proteínas têm sido observados em resposta ao estresse térmico (Hu et al., 2016, Cedraz et al., 2017; Carbonõ et al., 2019).

As HSPs são classificadas em várias famílias de acordo com seus pesos moleculares,

entre estas a HSP70 é a família mais abundante e extensamente estudada, uma vez que é caracterizada como um indicador bioquímico crucial para condições de estresse por calor (Yang et al., 2013; Liu et al., 2018). Os membros pertencentes à família de proteínas HSP 90 são encontradas tanto no citoplasma quanto no núcleo e são uma das proteínas mais abundantes nas células de mamíferos. A HSP90 promove o dobramento de proteínas sintetizadas denovo ou incorretamente dobradas (Hoter et al., 2018).

No presente estudo, não foi observada diferença significativa na expressão de mRNA da HSPs 70 no fígado. Entretanto, os níveis de mRNA do gene HSP90 foi elevado, este resultado é consistente com os relatos de Parkunan et al. (2015) que reportaram aumento da expressão de mRNA da HSP90 em suínos nativos Ghungroo quando expostos a alta temperatura ambiente. Reforçando nossos achados, Cedraz et al. (2017) investigaram a expressão de HSPs em frangos de raças nativas, Caneluda e Peloco submetidas a estresse por calor (39,5°C), e reportaram aumento de mRNA na expressão do gene HSP90 nos frangos da raça Caneluda. Esses resultados podem ser explicados pela presença de mecanismos de defesa, caracterizado por uma indução controlada transcricionalmente da síntese de proteínas do choque térmico após exposição prolongada das células a altas temperaturas (González & Manso et al., 2004; Galal et al., 2019). Além disso, sendo o fígado um órgão essencial, há maior necessidade de regeneração e proteção desse tecido (Xie et al., 2014). A ação das HSPs permite que as células lidem com o aumento da carga de proteínas mal dobradas, além de estimular os mecanismos imunes inatos, promovendo a expressão do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina – 6 (IL-6), dentre outros componentes biologicamente importantes da regeneração hepática (Silver & Noble, 2012; Wolf et al., 2014).

No músculo, a expressão de mRNA dos genes das HSPs 70 e 90 não foi

influenciada pela temperatura, o que pode estar associado a menores processos de proteção celular nesse tecido (Xie et al., 2014). Estes resultados são semelhantes com achados de estudos anteriores, os quais reportaram que o músculo é menos responsivo aos desafios de calor em relação à ativação da expressão gênica das HSPs (Yu et al., 2008; Wang et al., 2013).

Suínos Piau expostos a 30°C apresentaram maior expressão de mRNA no fígado dos genes CAT, GPX, SOD-1 e SOD-2 e do gene SOD-2 no *Longissimus dorsi* quando comparados aos animais expostos a 22°C. Resultado corroborado por Pardo et al. (2021) que reportaram aumento da SOD no *Longísimos dorsi* de suínos da raça nativa Ibérica expostos a alta temperatura. A SOD atua como uma primeira linha de defesa catalisando a conversão de superóxido em peróxido de hidrogênio e funciona em conjunto com CAT e GPX para convertê-lo em água e oxigênio molecular (Hao et al., 2021), mitigando os efeitos do estresse oxidativo, uma vez que as células quando expostas a desafios ambientais, produzem ROS como resultado do metabolismo acelerado associado a condições de estresse (Goel et al., 2021). Teixeira et al. (2021) observaram aumento significativo na frequência respiratória, e na temperatura retal em suínos Piau expostos a temperatura de 30° C, com a ativação das repostas termoregulatórias há o maior consumo de energia e maior sobrecarga das mitocôndrias, e como resultado, maior produção de ROS (Russo et al., 2021). A ativação da resposta termoregulatória pode ter elevado a necessidade da maior expressão de mRNA desses genes de enzimas antioxidantes (Goel et al., 2021). Resultados semelhantes foram obtidos por Yang et al., (2010) ao exporem frangos de corte a 35°C, observaram aumento do gasto energético 2 vezes acima dos níveis normais.

Além disso, o aumento na expressão desses genes no tecido hepático pode ser explicado pelo fato de que os lipídeos são mais sensíveis a oxidação do que as proteínas, assim, naturalmente, há maior presença de enzimas antioxidantes no fígado a fim de proteger danos nas membranas, vazamento de eletrólitos e morte celular (Yasuda et al., 1998; Wander & Du 2000). Estudos anteriores mostraram maior ativação de mecanismos de proteção no fígado, coração e rim, quando comparado ao músculo *Longissimus dorsi* (Sun et al., 2007; Yu et al., 2009; Xie et al., 2014; Montesinos-Cruz et al., 2019), reforçando nossos achados.

7.2 Efeito da temperatura ambiente na expressão dos genes do estresse oxidativo e proteínas do choque térmico em animais de linhagem comercial e cruzado

O ponto de partida dos estudos genéticos para seleção de animais mais termotolerantes a altas temperaturas ambientais é definir fenótipos associados a resistência ou suscetibilidade ao estresse por calor (Gourdine et al., 2021). Nesse contexto, estudos como o de Moreira et al. (2021) foi realizado sob a hipótese de que o cruzamento de raças suínas locais não melhoradas geneticamente, com genótipos comerciais melhoraria a termotolerância da progênie suína. No entanto, seria de grande interesse caracterizar as respostas moleculares, como por exemplo, a expressão dos genes das HSPs e enzimas antioxidante, em estresse por calor em potenciais genótipos tolerantes a altas temperaturas a fim de avaliar a relevância desses genes para a tolerância ao calor (Cabaranõ et al., 2019).

Nesse contexto, no nosso estudo observamos que, a temperatura ambiente não afetou a expressão de mRNA das HSPs 70 e 90 em nenhum dos tecidos avaliados (hepático e *Longissimus dorsi*) nos animais comerciais e cruzados. Esse resultado pode estar associado à prolongada exposição dos animais a 30°C e consequente adaptação dos animais às altas temperaturas (Sidiiqui et al., 2020). A adaptação é marcada pela redução gradual das respostas termorregulatórias, em virtude da diminuição do calor metabólico, parcialmente associada à diminuição do consumo voluntário, menor ação dos hormônios da tireoide (triiodotironina, T3; tiroxina, T4) e cortisol (Campos et al., 2014, Teixeira et al., 2021).

Animais comerciais apresentaram maior expressão de mRNA dos genes CAT e GPX no *Longissimus dorsi* quando comparados aos animais cruzados, o que pode estar associado a maior necessidade de eliminação de espécies reativas de oxigênio e atividade de enzimas antioxidante (Liu et al., 2018). O aumento na temperatura retal em suínos de linhagem comerciais expostos a alta temperatura ambiente foi relatado constantemente em estudos anteriores (Renaudeau et al., 2007; Campos et al., 2014; Moreira et al., 2021) evidenciando a suscetibilidade desses animais a condições de estresse por calor. Renaudeau et al. (2007), em experimento que comparava suínos em crescimentos das raças Crioula e Large White, observaram que, quando expostos à condição de estresse por calor (31°C), suínos nativos da raça Crioula apresentavam ativação das respostas termorregulatórias mais tardias com menor aumento da temperatura corporal quando

comparados à suínos puros da raça Large White. Esse resultado pode ser em virtude do maior desempenho produtivo e consequente maior produção de calor metabólico de animais comerciais quando comparados com nativos que possuem menor taxa metabólica e desempenho produtivo (Moreira et al., 2021).

Adicionalmente quando submetidos ao estresse por calor, a expressão de mRNA do gene SOD-1 aumentou independente do genótipo, o que sugere que o estresse por calor causou aumento no estresse oxidativo devido ao gasto energético, e sobrecarga mitocondrial como já citado, o que foi contrabalançado por um aumento compensatório da superóxido dismutase (Hao et al., 2021). Reforçando nossos achados, Cui et al. (2017), reportaram aumento nos níveis de mRNA da SOD-1 em suínos submetidos a estresse por calor crônico, uma vez que a SOD atua como primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo, convertendo o superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), considerado menos tóxico para células (Hao et al., 2021).

Animais cruzados apresentaram maiores níveis de mRNA de SOD-2 no fígado a 22 °C, quando comparados aos animais comerciais, demonstrando talvez um maior mecanismo de proteção antioxidante. No entanto, esses resultados ainda não estão muito claros.

8. CONCLUSÃO

A exposição a alta temperatura resultou em aumento da expressão dos genes CAT, GPX, HSP90, SOD-1 e SOD-2 no tecido hepático da raça nativa Piau, quando comparado aos animais expostos a temperatura termoneutra, o que evidencia a importância desses genes para adaptação de suínos a altas temperaturas ambientais. No *Longissimus dorsi* do genótipo comercial, a expressão de mRNA dos genes CAT e GPX foram maiores em comparação aos animais cruzados (Piau x Comercial), o que sugere maior necessidade de atividade de enzimas antioxidante, que pode ser em virtude do maior desempenho produtivo e consequente maior produção de calor metabólico. Já o genótipo cruzado apresentou maiores níveis de SOD-2 expostos a temperatura termoneutra, quando comparados a animais comerciais, o que talvez evidencie uma maior proteção antioxidante nesses animais.

9. REFERÊNCIAS

- BAUMGARD, L. H., & RHOADS, R. P.JR. Effects of heat stress on postabsorptive metabolism and energetics. **Annual review of animal biosciences**, v.1, p.311–337, 2013.
- BERNABUCCI, U., LACETERA, N., BAUMGARD, L. H., RHOADS, R. P., RONCHI, B., NARDONE, A. Metabolic and hormonal acclimation to heat stress in domesticated ruminants. **Animal: an international journal of animal bioscience**, v. 4, n.7, p. 1167–1183,2010.
- BELHADJ SLIMEN, I., NAJAR, T., GHRAM, A., & ABDRRABBA, M. Heat stress effects on livestock: molecular, cellular and metabolic aspects, a review. **Journal of animalphysiology and animal nutrition**, v.100, n.3, p. 401-412, 2016.
- BECKER BA, KNIGHT CD, BUONOMO FC, JESSE GW, HEDRICK HB, & BAILE CA. Effect of a hot environment on performance, carcass characteristics, and blood hormones and metabolites of pigs treated with porcine somatotropin. **Journal of Animal Science**, v. 70, n.9, p.2732-2740, 1992.
- BULOS, L.H.S. et al. Antibody response between pigs of Piau and a commercial breed naturally infected with Porcine circovirus 2. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária eZootecnia**, v. 68, n.05, p. 1145-1151,2016.
- CUI, Y., HAO, Li, J., GAO, Y., GU, X. Proteomic changes of the porcine skeletal muscle inresponse to chronic heat stress. **Science of Food and Agriculture**, v.98, n.9, 2017.
- CARABAÑO, M. J., RAMÓN, M., MENÉNDEZ-BUXADERA, A., MOLINA, A., DÍAZ, C. Selecting for heat tolerance. **Animal frontiers: the review magazine of animal agriculture**, v.9, n.1, p.62–68, 2019.
- CAMPOS, PAULO HENRIQUE REIS FURTADO *et al.* Thermoregulatory responses during thermal acclimation in pigs divergently selected for residual feed intake. **International journal of Biometeorology**, v. 58, n. 7, p. 1545-1557, 2014.
- CAMPOS, P. H. R. F.; LABUSSIÈRE, E.;HERNÁNDEZ-GARCÍA, J.;DUBOIS, S.;RENAUDEAU, D. AND NOBLET, J. Effects of ambient temperature on energy and nitrogen utilization in lipopolysaccharide-challenged growing pigs. **Journal of Animal Science**, v.92, p. 4909–4920, 2014.

CAMPOS, P. H. F., LE FLOCH, N., NOBLET, J., RENAUDEAU, D. Physiological responses of growing pigs to high ambient temperature and/or inflammatory challenges.

Revista Brasileira de Zootecnia, v.46, n.6, p. 2017

CEDRAZ, H., GROMBONI, J. G. G., GARCIA, A. A. P., JUNIOR, FARIAS. FILHO R.V., SOUZA T.M, OLIVEIRA, E. R. D., OLIVEIRA, E. B., NASCIMENTO, C. S.,

WENCESLAU, A.A. Heat stress induces expression of HSP genes in genetically divergent chickens. **Plos One**, v.12, n.10, 2017.

CERVANTES, M., M., COTA, N. ARCE., G. CASTILLO., AVELAR, E. Effect of heat stress on performance and expression of selected amino acid and glucose transporters, HSP90, leptin and ghrelin in growing pigs. **Journal Thermal Biology**, v.59, p.69-76, 2016.

COLLIER, R. J., & COLLIER, J. L. (Ed.). Environmental physiology of livestock. Chichester: Wiley-Blackwell, 2012.

CULOTTA, V. C., YANG, M., & O'HALLORAN, T. V. Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal. **Biochimica et biophysica acta**, v.1763, n.7, p.747-758, 2006.

GALAL, A., LAMIAA, M. HABIBA, M. R., AYOUB, A. Expression levels of HSP70 and CPT-1 in three local breeds of chickens reared under normal or heat stress conditions after the introduction of the naked neck gene. **Journal of Thermal Biology**, v.80, p. 113-118, 2019.

GOURDINE, J.L., RIQUET, J., ROSÉ, R., POULLET, N., GIORGI, M., BILLON, Y., RENAUDEAU, D., GILBERT, H. Genotype by environment interactions for performance and thermoregulation responses in growing pigs. **Journal of Animal Science**, v.97, n.9, p.3699-3713, 2019.

HARDIE, D. GRAHAME. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 10, p.774-785, 2007. HAO, Y., XING, M., GU, X. Research Progress on Oxidative

Stress and Its Nutritional Regulation Strategies in Pigs. **Animals**, v.11, n.5, 2021.

HOTER, A., EL-SABBAN, M. E., NAIM, H. Y. The HSP90 Family: Structure, Regulation, Function, and Implications in Health and Disease. v.19, n.9, 2018.

JANNI, M., GULLÌ, M., MAESTRI, E., MARMIROLI, M., VALLIYODAN, B., NGUYEN,

H. T., & MARMIROLI, N. Molecular and genetic bases of heat stress responses in crop plants and breeding for increased resilience and productivity. **Journal of**

Experimental Botany, v.71, n.13, p. 3780–3802, 2020.

KELLER, M., & SIMM, S. Consortium, S.-I. The coupling of transcriptome and proteome adaptation during development and heat stress response of tomato pollen. **BMC Genomics**, v.19, n.1, p. 447, 2018.

LIGUORI, I., RUSSO, G., CURCIO, F., BULLI, G., ARAN, L., DELLA-MORTE, D., GARGIULO, G., TESTA, G., CACCIATORE, F., BONADUCE, D., & ABETE. Oxidative stress, aging, and diseases. **Clinical interventions in aging**, v.13, p.757–772, 2018.

LIU, Z. M., ZHU, X. L., LU, J., CAI, W.J, YE, Y. P, LV, Y. P. Effect of high temperature stress on heat shock protein expression and antioxidant enzyme activity of two morphs of the mud crab *Scylla paramamosain*. **Molecular & Integrative Physiology**, v.223, p. 10-17, 2018. LU, Q., WEN, J., & ZHANG, H. Effect of chronic heat exposure on genetic fat position and meat quality in two types of chicken. **Poultry science**, v.86, n.6, p.1059-1064, 2017.

MOREIRA, V. E., VERONEZE, R., TEIXEIRA, A., CAMPOS, L. D., LINO, L., SANTOS,

G. A., SILVA, B., CAMPOS, P. H. F. Effects of Ambient Temperature on the Performance and Thermoregulatory Responses of Commercial and Crossbred (Brazilian Piau Purebred Sires × Commercial Dams) Growing-Finishing Pigs. **Animals**, v.11, n.11. 2021. MONTILLA, S. I. R., JOHNSON T. P., PEARCE S. C., GARDAN-SALMON D., GABLER

N. K., ROSS J. W. Heat stress causes oxidative stress but not inflammatory signaling in porcine skeletal muscle. **Temperature**, v.1, p.42–50, 2014.

MONTESINOS-CRUZ, V., COTA, M., BUENABAD, M., CERVANTES, E. MORALES.

Effect of Heat Stress on the Expression of HSP70, UCP3 and CYP450 Genes in Liver; *Longissimus Dorsi* and *Semitendinosus* Muscle of Growing Pigs. **American Journal of Animal and Veterinary Sciences**, v.14, n. 4, p.221-230, 2019.

NATIONAL CENTERS FOR ENVIRONMENTAL INFORMATION Acesso em: setembro de 2020. Disponível em: <<https://www.ncdc.noaa.gov/sotc/global/201813>>.

NOBLE, E.J., MILNE, K. J., MELLING, C. W. Heat shock proteins and exercise: A primer. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v.33, p. 1050-1065, 2008.

NANDI, A., YAN, L. J., JANA, C. K., & DAS, N. Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases. **Oxidative medicine and cellular longevity**, 2019. RENAUDEAU, D.; ANAIS, C.; TEL, L. & GOURDINE, J. L. Effect of

temperature on thermal acclimation in growing pigs estimated using a nonlinear function.

Journal of Animal Science, v. 88, p. 3715–3724, 2010.

RENAUDEAU, D.; FRANCES, G.; DUBOIS, S.; GILBERT, H. AND NOBLET, J. Effect of

thermal heat stress on energy utilization in two lines of pigs divergently selected for residual feed intake. **Journal of Animal Science**, v.91, p.1162–1175, 2013.

RENAUDEAU, D.; GOURDINE, J.L. AND ST-PIERRE, N. R. A meta-analysis of the effects of high ambient temperature on growth performance of growing-finishing pigs. **Journal of Animal Science**, v. 89, p. 2220–2230, 2011.

RENAUDEAU, D.; HUC, E. AND NOBLET, J. Acclimation to high ambient temperature in Large White and Caribbean Creole growing pigs. **Journal of Animal Science**, v.85, p.779–790, 2007.

RENAUDEAU, D.; COLLIN, A.; YAHAV, S.; BASILIO, V.; GOURDINE, J.L.; & COLLIER, J. Adaptation to hot climate and strategies to alleviate heat stress in livestock production. **Animal**, v. 6, n. 5, p. 707-728, 2012.

QIU, X. B., Y. M. SHAO, S. MIAO, L. WANG. The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.63, p.2560–2570, 2006.

SLIMEN, I. B.; NAJAR, T.; GHRAM, A.; DABBEBI, H.; BEN MRAD, M.; ABDRAHMAN, A.

M. Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage. A review. **International journal of hyperthermia**, v.30, n.7, p.513–523, 2014.

SILVER, J. T., & NOBLE, E. G. Regulation of survival gene hsp70. **Cell Stress and Chaperones**, v. 17, n.1, 1-9, 2012.

SANZ FERNANDEZ, M. V., STOAKES, S. K., ABUAJAMIEH, M., SEIBERT, J. T., JOHNSON, J. S., HORST, E. A., RHOADS, R. P., & BAUMGARD, L. H. Heat stress increases insulin sensitivity in pigs. **Physiological reports**, v.3, n.8, 2015.

OLIVEIRA, A. C. F.; VANELLI, K.; SOTOMAIOR, C. S.; WEBER, S. H.; COSTA, L. B. Impacts on performance of growing-finishing pigs under heat stress conditions: a meta-analysis. **Veterinary research communications**, v.43, n.1, p.37–43, 2019.

TEIXEIRA, A.R.; VERONEZE, R.; MOREIRA, V. E.; CAMPOS, L.D.; RAIMUNDI, S. C. J.; CAMPOS, P. H. R. F. Effects of heat stress on performance and thermoregulatory responses of Piau purebred growing pigs. **Journal of Thermal Biology**, v. 99, 2021.

- VERONEZE R., LOPES P.S., GUIMARÃES S.E.F., GUIMARÃES J.D., COSTA E.V., FARIA V.R., COSTA K.A. Using pedigree analysis to monitor the local Piau pig breed conservation program. **Archivos de Zootecnia**, v.63, p.:45–54, 2014.
- VOLODINA, O., GANESAN, S., PEARCE, S. C., GABLER, N. K., BAUMGARD, L. H., RHOADS, R. P., SELSBY, J. T. Short-term heat stress alters redox balance in porcine skeletal muscle. **Physiological reports**, v.5, n.8. 2017.
- WANDER, R. C., & DU S.-H. Oxidation of plasma proteins is not increased after supplementation with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. *American Journal Clinical Nutrition*, v.72, p. 731–737.
- YANG, P., HAO, Y., FENG J., LIN, H., FENG, Y., WU, X., YANG, X., GU, X. Genotype by environment interactions for performance and thermoregulation responses in growing pigs. **Journal of Animal Sciences**, v.27, n.12, p.1763-1772, 2014.
- YOUNG, J. T.F., GAYLEY, J., HEIKKILA, J., Simultaneous exposure of *Xenopus* A6 kidney epithelial cells to concurrent mild sodium arsenite and heat stress results in enhanced hsp30 and hsp70 gene expression and the acquisition of -thermotolerance. *Molecular & Integrative Physiology*, v, p.417-427, 2009.
- XIN, H., ZHANG, X., SUN, D.M, ZHANG, C., HAO, Y., GU, X. Chronic heat stress increases insulin-like growth factor-1(IGF-1) but does not affect IGF-binding proteins in growing pigs. **Journal of Thermal Biology**, v.77, p.122-130, 2018.
- YASUDA, S., WATANABE S., KOBAYASHI T., OKUYAMA H. Effects of dietary unsaturated fatty acid and chronic carbon tetrachloride treatment on the accumulation of oxidation products, alpha-tocopherol and liver injury in mice. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v.21, p.1050–1056, 1998.