

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITOS DE ESTRESSORES AMBIENTAIS SOBRE
INDICADORES FISIOLÓGICOS, PRODUTIVOS, DE BEM-
ESTAR E SAÚDE DE GLÂNDULA MAMÁRIA EM VACAS
LEITEIRAS GIROLANDO**

Letícia Caldas Mendonça

Médica Veterinária

2023

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITOS DE ESTRESSORES AMBIENTAIS SOBRE
INDICADORES FISIOLÓGICOS, PRODUTIVOS, DE BEM-
ESTAR E SAÚDE DE GLÂNDULA MAMÁRIA EM VACAS
LEITEIRAS GIROLANDO**

Discente: Letícia Caldas Mendonça

Orientador: Prof. Dr. João Alberto Negrão

Coorientadora: Dra. Wanessa Araújo Carvalho

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Zootecnia.

2023

FICHA CATALOGRÁFICA

M539e	<p>Mendonça, Leticia Caldas</p> <p>Efeitos de estressores ambientais sobre indicadores fisiológicos, produtivos, de bem-estar e saúde de glândula mamária em vacas leiteiras Girolando / Leticia Caldas Mendonça. -- Jaboticabal, 2023 123 p.</p>
	<p>Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientador: João Alberto Negrão Coorientadora: Wanessa Araújo Carvalho</p>
	<p>1. Produção animal. 2. Estresse por calor. 3. Lipopolissacarídeos. I. Título.</p>

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

O impacto esperado deste estudo está relacionado ao desenvolvimento de abordagens mais eficientes no manejo diário de vacas leiteiras Girolando. O presente estudo demonstrou que animais desta raça sofrem consequências negativas do estresse por calor. Portanto, o conhecimento alcançado por este trabalho pode levar a mudanças positivas no manejo animal que busquem proporcionar maior conforto térmico para vacas Girolando.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

The expected impact of this study is related to the development of more efficient approaches in the daily management of Girolando dairy cows. This study showed that animals of this breed suffer the negative consequences of heat stress. Therefore, the knowledge of this study can lead to positive changes in animal management that seek to provide greater thermal comfort for Girolando cows.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: EFEITOS DE ESTRESSORES AMBIENTAIS SOBRE INDICADORES FISIOLÓGICOS, PRODUTIVOS, DE BEM-ESTAR E SAÚDE DE GLÂNDULA MAMÁRIA EM VACAS LEITEIRAS GIROLANDO

AUTORA: LETICIA CALDAS MENDONÇA
ORIENTADOR: JOÃO ALBERTO NEGRÃO
COORIENTADORA: WANESSA ARAUJO CARVALHO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Zootecnia, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. JOÃO ALBERTO NEGRÃO (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Básicas / FZEA USP Pirassununga/SP

Prof. Dr. MATEUS JOSÉ RODRIGUES PARANHOS DA COSTA (Participação Virtual)
Departamento de Zootecnia / FCAV UNESP Jaboticabal

Pesquisadora Dr. ALESSANDRO DE SA GUIMARÃES (Participação Virtual)
Empresa Gado de Leite / Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Juruê de Foz/MS

Profa. Dra. MARIA IMACULADA FONSECA (Participação Virtual)
Departamento de Economia, Administração e Educação / FCAV UNESP Jaboticabal

Pesquisador Dr. BRUNO CAMPOS DE CARVALHO (Participação Virtual)
Empresa Gado de Leite / Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Juruê de Foz/MS

Jaboticabal, 27 de abril de 2023



Documento assinado digitalmente
ALFONSO DE SA GUIMARÃES
Data: 2023.04.27 10:45:43
Endereço em https://brasil.gov.br



gov.br
Assinatura digital



gov.br
Assinatura digital

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Letícia Caldas Mendonça, filha de Luiz Gonzaga Assis Mendonça e Mércia Caldas Mendonça, nascida em 18 de maio de 1981, na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais. Em 2001, ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, concluindo o curso ao final de 2005. Em 2006, iniciou o mestrado pela mesma universidade, sob orientação do Prof. Dr. Lívio Ribeiro Molina, defendendo, em 2007, a dissertação “Viabilidade do controle da mastite contagiosa e da utilização do escore de sujidade de úbere e de lesões de esfíncter de tetos no monitoramento do risco de ocorrência da doença”. De 2007 a 2008, atuou como especialista em Qualidade do Leite na empresa Danone S.A., em Poços de Caldas, Minas Gerais. Ingressou como analista do Núcleo de Saúde Animal e Qualidade do Leite na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Gado de Leite – no final de 2008. Iniciou o curso de doutorado em Zootecnia pela Universidade Estadual Paulista – Câmpus Jaboticabal em 2018, sob orientação do Prof. Dr. João Alberto Negrão e coorientação da Dra. Wanessa Araújo Carvalho.

À minha amada filha, Manuela, dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, a Espiritualidade e ao Universo pelas oportunidades ofertadas e bênçãos recebidas. Sei que nunca estou só.

Ao meu pai, Luiz, e minha mãe, Mércia, pelo presente da Vida. Pelo apoio incondicional e por todos os sacrifícios imensuráveis que fizeram para que eu pudesse crescer, me desenvolver e ser uma pessoa feliz.

À minha irmã Raquel, por ser minha parceira nesta e em outras vidas.

Ao Du, por estar ao meu lado e me incentivar a crescer sempre.

À minha família amada, tios e primos. À dindinha Miriam, por ser minha segunda mãe. Paulinho, Ude e toda a família Corrêa Brito pelo apoio e torcida.

À Manu, minha filha, pela paciência nos momentos de ausência e por permitir sentir todo esse amor que me move.

À Embrapa, por me conceder a oportunidade única de fazer o doutorado em tempo integral. Aos colegas e amigos da Gado de Leite, pelo apoio e intensa colaboração durante todo o processo. Luizinho (*in memoriam*), Jonas, Betinho, Verônica, Juarez, Mengo, Izabel, Marcos Freitas, Armando, Alessandro, Guilherme, Bruno, Marta, Marco Antônio Machado, Danielle, Fatinha, Marcos Souto, Cláudia, Carla, Clara, Mirton, Luiz Gustavo Siqueira, Luiz Gustavo Pereira, Thierry, Juarez M., Rita, TCris, Renata.

Mariana e Wanessa, por serem meus guias iluminados na condução do experimento e pós-experimento. Jamais esquecerei!

À MJL, minha família de JF, por me motivarem e torcerem sempre por mim.

À Unesp-Jaboticabal pela oportunidade e ao CNPq, pelo auxílio com a bolsa de pós-graduação.

À Sandra e Giovana, por todo incentivo e colaboração.

Ao Professor João Negrão, por acreditar em mim antes mesmo de me conhecer.

A todos, meu agradecimento imenso. Uma tese produzida à muitas mãos tem um valor muito especial.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - Considerações gerais	1
1. Introdução	1
2. Objetivos e Hipótese	2
3. Revisão	3
3.1 Potenciais impactos do aquecimento global na agropecuária	3
3.2 Termorregulação dos bovinos	5
3.3 O estresse por calor em vacas de leite: definição e parâmetros	7
3.4 Impactos do estresse por calor sobre o metabolismo	10
3.5 Impactos do estresse por calor sobre o bem-estar e comportamento.....	11
3.6 Impactos do estresse por calor sobre produção e composição do leite.....	12
3.7 Impactos do estresse por calor sobre a saúde da glândula mamária	14
4. Referências	18
CAPÍTULO 2 – Efeito do estresse por calor sobre o comportamento ingestivo, produção e qualidade do leite e na expressão gênica em células da glândula mamária de vacas Girolando	31
1. Introdução	33
2. Material e Métodos	35
3. Resultados	44
4. Discussão	54
5. Conclusões	60
6. Referências	60
CAPÍTULO 3 – Efeitos do desafio de lipopolissacarídeo de <i>Escherichia coli</i> na imunidade da glândula mamária de vacas Girolando submetidas a estresse por calor	70
1. Introdução	72
2. Material e Métodos	73
3. Resultados	82
4. Discussão	94
5. Conclusões	99
6. Referências	99

Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais



Comissão de Ética
no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos de desafios ambientais sobre indicadores fisiológicos, comportamento, estresse e resposta imune em vacas leiteiras Girolando sadias e com mastite subclínica", protocolada sob o CEUA nº 5557190520, sob a responsabilidade de **Leticia Caldas Mendonca** e equipe; *Leticia Caldas Mendonca; Wanessa Araujo Carvalho* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Embrapa Gado de Leite (CEUA/EGL) na reunião de 27/07/2020.

We certify that the proposal "Effects of environmental challenges on physiological indicators, behavior, stress and immune response in healthy and subclinical mastitis cows", utilizing 20 Bovines (20 females), protocol number CEUA 5557190520, under the responsibility of **Leticia Caldas Mendonca and team**; *Leticia Caldas Mendonca; Wanessa Araujo Carvalho* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Embrapa Gado de Leite Corporate (CEUA/EGL) in the meeting of 07/27/2020.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de 08/2020 a 09/2020

Área: **Núcleo de Saúde Animal E Qualidade do Leite**

Origem: **Campo Experimental José Henrique Bruschi**

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **28 a 60 meses**

N: **20**

Linhagem: **GIROLANDO**

Peso: **550 a 650 kg**

Local do experimento: O experimento será realizado no Campo Experimental José Henrique Bruschi (CEJHB), pertencente à Embrapa Gado de Leite, localizado no município de Coronel Pacheco/MG. Os animais permanecerão no Complexo Multiusuário de Bioeficiência (CMB), sendo metade (n=10) no free-stall e metade (n=10) na câmara climática, sob condições de temperatura e umidade controladas.

Juiz de Fora, 30 de julho de 2020

Dra. Leticia Sayuri Suzuki
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Embrapa Gado de Leite

Virginia de Souza Columbiano Barbosa
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Embrapa Gado de Leite

Efeitos de estressores ambientais sobre indicadores fisiológicos, produtivos, de bem-estar e saúde de glândula mamária em vacas leiteiras Girolando

RESUMO – O presente trabalho teve como objetivo compreender como o estresse por calor em vacas Girolando afeta indicadores fisiológicos, de bem-estar, produção de leite e a resposta celular frente ao desafio com lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* imposto à glândula mamária destes animais. A tese foi dividida em três capítulos, sendo o primeiro de revisão sobre o tema. O segundo capítulo trata do estudo que avaliou o efeito isolado do estresse por calor em vacas Girolando. Para tanto, doze vacas em lactação foram submetidas a estresse por calor (HS) por oito horas diárias em câmara climática regulada para manter índice de temperatura e umidade de 85, enquanto as outras doze vacas permaneceram em “free-stall” com sistema de resfriamento (CTR). O terceiro capítulo trata do estudo que avaliou a resposta da glândula mamária destas vacas sob estresse por calor quando desafiados ao LPS. Os mesmos 24 animais do primeiro estudo receberam, no dia 10 do experimento, uma dose única de 100 µg de LPS diluídos em 10 mL de solução fisiológica (0,9% NaCl) no quarto mamário posterior esquerdo e o quarto mamário posterior direito recebeu 10 mL de solução salina 0,9% de NaCl, sendo considerado o quarto mamário controle. A duração dos dois estudos, realizados em sequência, foi de 17 dias. Frequência respiratória (FR), temperatura vaginal (TVag), concentração plasmática de cortisol (CORT), tiroxina (T4), triiodotironina (T3), IGF-1 e insulina (INS), produção de leite, cultivo microbiológico do leite, composição do leite, contagem de células somáticas (CCS), contagem diferencial de células, número de passos e coices, frequência de micção, defecação, ruminação, consumo de matéria-seca e expressão gênica em células do leite foram avaliados. No primeiro estudo, a TVag das vacas HS foi significativamente maior do que as vacas CTR ($p < 0,05$), entretanto, FR não se diferenciou. Dosagem de cortisol foi significativamente maior nos dias 5 e 7, outros hormônios não sofreram efeito entre grupos. Produção de leite foi significativamente menor no grupo HS, já componentes do leite, incluindo a CCS não foi diferente ($p > 0,05$). As vacas HS ruminaram menos em sala de ordenha ($p < 0,05$) e consumiram menor volume de matéria seca ($p < 0,05$) ao longo dos dias do experimento. A expressão de genes ligados a proteínas de choque térmico, receptores de insulina, e prolactina e de glicocorticoides foram alteradas. No segundo estudo, a TVag dos animais HS foi superior ($p < 0,05$) a das vacas CTR na média do período em que foram submetidas ao estresse por calor ($39,12^{\circ}\text{C}$ x $38,75^{\circ}\text{C}$), e nas doze horas seguintes à administração de LPS ($39,25^{\circ}\text{C}$ x $39,00^{\circ}\text{C}$). FR não se diferenciou entre grupos ($p > 0,05$). CORT, T4 INS foram significativamente maiores para o grupo HS nas horas 12, 24 e 12 e 24 pós-LPS, respectivamente. Produção de leite não se alterou entre os grupos HS e CTR mas apresentou interação com as horas pós LPS, sendo estatisticamente menor para os dois grupos na hora 24 pós-LPS. Já a CCS também não foi significativamente diferente entre os grupos, mas apresentou elevação significativa em seis horas após o LPS, mantendo-se elevada até 72 horas. A porcentagem de neutrófilos presentes no leite dos quartos mamários tratados com LPS foi significativamente maior do que nos quartos mamários controle nos tempos 6 e 24 horas pós-LPS. A expressão de genes ligados a proteínas de choque térmico, resposta imune e estresse oxidativo foram alteradas. A conclusão geral dos estudos é que as vacas Girolando experienciaram alterações fisiológicas, de comportamento e de produção compatíveis com estresse por calor. Entretanto, este estressor não foi

capaz de afetar a imunidade da glândula mamária destes animais nem quando desafiados a um potente indutor de resposta inflamatória como o LPS.

Palavras-chave: células somáticas do leite; estresse por calor; Girolando; lipopolissacarídeo

Effects of environmental stressors on physiological and productive indicators, welfare, and udder health in Girolando dairy cows

ABSTRACT - The present study aims to understand how heat stress in Girolando cows affects physiological and welfare indicators, milk production, and cellular response before the challenges posed by *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS) on the udder. The thesis is divided into three chapters, the first of which is a review of the subject. The second chapter focuses on the study that evaluated the isolated effect of heat stress in Girolando cows. For this purpose, twelve lactating cows were subjected to heat stress (HS) for eight hours a day in a regulated, climatic chamber to maintain a temperature and humidity index of 85, while the other twelve cows remained in a free stall with a cooling system (CTR). The third chapter focuses on the study that evaluated the udder response of these heat stressed animals after to a LPS challenge. On day 10 of the experiment, the same 24 animals from the first study received a single dose of 100 µg of LPS diluted in 10 mL of saline (0.9% NaCl) in the left mammary quarter, and 10 mL of 0.9% NaCl saline in the right mammary quarter, being the control quarter. The total duration of the two studies, performed in sequence, was 17 days. Respiratory rate (RR), vaginal temperature (TVag), cortisol plasma concentrations (CORT), thyroxine (T4), triiodothyronine (T3), IGF-1, and insulin (INS), milk production, microbiological milk culture, milk composition, somatic cell count (SCC), differential cell count, number of steps and kicks, frequencies of urination, defecation and rumination, dry matter intake, and gene expression in milk cells were evaluated. In the first study, TVag of HS cows was significantly higher than that of CT cows ($p < 0.05$). However, FR did not differ. The cortisol dosage was significantly higher on days 5 and 7, and other hormones had no effect among groups. Milk production was significantly lower in the HS group; milk components including SCC did not differ ($p > 0.05$). HS cows ruminated less in the parlor ($p < 0.05$) and consumed less dry matter ($p < 0.05$) over the days of the experiment. The expression of genes linked to heat shock proteins, insulin, prolactin, and glucocorticoid receptors were altered. In the second study, TVag of HS animals was higher ($p < 0.05$) than that of CT cows in the average period when they were subjected to heat stress, and in the twelve hours following LPS administration. RR did not differ among groups ($p > 0.05$). CORT, T4 INS were significantly higher for the HS group at hours 12, 24 and 12, and 24 post-LPS, respectively. Milk production did not change between HS and CTR groups but showed interaction with hours post-LPS, being statistically lower for both groups at hour 24 post-LPS. SCC was also not significantly different between groups but showed a significant elevation 6 hours post-LPS, remaining elevated until 72 hours. The percentage of neutrophils present in the milk from the LPS-treated breast quarters was significantly higher than in the control breast quarters at 6 and 24 hours post-LPS. Expression of genes linked to heat shock, immune response and oxidative stress proteins were altered. The overall conclusion of the studies is that Girolando cows experienced physiological, behavioral, and production changes consistent with heat stress. However, this stressor was not able to affect the udder immunity of these animals even with the challenges posed by a potent inducer of inflammatory response such as LPS.

Keywords: milk somatic cell, heat stress, Girolando crossbreed, lipopolysaccharide

CAPÍTULO 1 - Considerações gerais

1. Introdução

No ano de 2020, o Brasil produziu 35,44 bilhões de litros de leite, posicionando-se entre os cinco maiores produtores de leite no mundo (Magalhães Junior et al., 2022). O grande potencial brasileiro como produtor de leite bovino se deve, principalmente, à possibilidade de crescimento em termos de produtividade, já que o índice brasileiro (2.192 kg/vaca/ano) (Boletim, 2021) é bastante inferior ao de países como Estados Unidos (10.457 kg/vaca/ano) e Nova Zelândia (4.237 kg/vaca/ano) (Resende et al., 2019). O incremento da produção de leite no Brasil tem ocorrido com base na verticalização da produção, sustentado pelo adensamento animal nas áreas produtivas e elevação da produtividade animal.

Entre as raças mais utilizadas no Brasil está a Girolando, fundamentada no cruzamento de animais Holandês Preto e Branco (*Bos taurus*) e Gir (*Bos indicus*) (Silva et al., 2022), e que foi criada com o objetivo de produzir leite de modo sustentável nas regiões tropicais e subtropicais (Otto et al., 2020), aliando a alta capacidade de produção de leite das vacas da raça europeia à rusticidade da genética Gir (Silva et al., 2019). Em função dessas virtudes associadas, a raça Girolando foi rapidamente adotada em diversas regiões do Brasil e estima-se que 80% do leite produzido no país seja oriundo de vacas Girolando (ABCG, 2014). Por meio de programa de melhoramento genético implantado para esta raça desde os anos 90, visando identificação de indivíduos geneticamente superiores (Osei-Amponsah et al. 2019) e a multiplicação genética de forma orientada, a produção média anual da raça Girolando cresceu em torno de 60% entre os anos 2000 e 2021 (Silva et al., 2022). Neste contexto, percebe-se que o cenário é favorável tanto para o aumento da produção quanto da produtividade de leite no Brasil.

Mas para que esta atividade seja sustentável e competitiva, grandes desafios precisam ser vencidos, principalmente no setor primário. O Brasil é um país caracterizado por altos índices de radiação solar e temperatura, potencialmente agravados pelos efeitos do aquecimento global. O desafio em conciliar aumento de produtividade nos rebanhos deve considerar não apenas investimentos em genética, nutrição, reprodução e sanidade, que são os pilares básicos de um rebanho bem gerido. O bem-estar das vacas, relacionado às novas condições climáticas deve ser considerado como ponto crucial para que o potencial produtivo dos animais seja plenamente alcançado.

Entretanto, poucos são os estudos científicos que avaliam o impacto do estresse por calor sobre a raça Girolando. Não há, na literatura científica, informações sobre possíveis efeitos do estresse por calor sobre a saúde destes animais ou em possíveis mecanismos desencadeados por este estressor sob a resposta imune de vacas Girolando.

2. Objetivos e Hipótese

O objetivo geral do estudo é compreender como o estresse por calor em vacas Girolando afeta indicadores fisiológicos, produtivos, de comportamento e a resposta imune frente ao desafio com lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* imposto à glândula mamária destes animais.

Os objetivos específicos são:

- a) Avaliar o efeito do estresse por calor e do desafio com LPS de *E. coli* em **indicadores fisiológicos** (frequência respiratória, temperatura vaginal, concentração dos hormônios cortisol, T3, T4, IGF-1 e insulina) e no **comportamento animal** (ingestivo e comportamento na ordenha) de vacas Girolando;
- b) Avaliar o efeito do estresse por calor e do desafio com LPS de *E. coli* na **produção e qualidade do leite** de vacas Girolando;

- c) Avaliar o efeito do estresse por calor e do desafio com LPS de *E. coli* na expressão de **genes relacionados à síntese do leite e à resposta imune** em células do leite de vacas Girolando.

A hipótese do presente trabalho é que o estresse por calor impacta parâmetros fisiológicos e o comportamento na ordenha, reduz o consumo de alimentos, a produção, a qualidade do leite e a capacidade de resposta imune da glândula mamária de vacas Girolando.

3. Revisão

3.1 Potenciais impactos do aquecimento global na agropecuária

O mais recente relatório do Painel Intergovernamental para as Mudanças Climáticas (AR6) publicado em fevereiro de 2022 demonstrou que as mudanças climáticas, que incluem eventos extremos mais frequentes e intensos (como secas prolongadas, ondas de calor terrestres e marinhas, ciclones e inundações), vêm causando impactos negativos generalizados e perdas relacionadas à natureza e às pessoas para além da variabilidade climática natural. Tais mudanças alteraram os ecossistemas marinhos, terrestres e de água doce em todo o mundo e os efeitos têm sido sentidos mais cedo que o esperado e são mais generalizados e com consequências mais abrangentes do que o previsto. Alguns esforços de desenvolvimento e adaptação têm reduzido esta vulnerabilidade, mas, não são suficientes. Observa-se, em muitas regiões, que pessoas e sistemas mais vulneráveis são afetados de forma desproporcional (IPCC, 2022).

Os extremos relacionados ao clima têm afetado a produtividade dos setores agrícola, florestal, pecuário e pesqueiro e contribuem para reduzir a disponibilidade e aumentar os preços dos alimentos, ameaçando a segurança alimentar, a nutrição e a subsistência de milhões de pessoas (IPCC, 2022).

A nível mundial, ruminantes (bovinos, búfalos, ovinos e caprinos) produzem em torno de 36.355 megatoneladas de proteína por ano (Mottet et al.,

2017) e fornecem micronutrientes essenciais para o bem-estar humano (Henry et al., 2018). Grande parte das terras ocupadas por ruminantes está em regiões tropicais e subtropicais, sensíveis aos impactos das mudanças climáticas, com mais de 50% do total de carne e 60% do leite produzido nessas zonas (Mottet et al., 2017). Neste contexto, o Brasil é um dos produtores de proteína mais importantes para o mundo. Dados da base FAOSTAT ([FAOSTAT](#)) compilados e analisados por Aragão e Contini (2021) mostram que o país teve, em 2020, o maior rebanho bovino do mundo (14,3% do total), 4º maior rebanho avícola (5,6%), 3º maior rebanho suíno (4,4% do total), e ocupa a 3ª posição mundial em produção total de carnes (bovina, suína e de frango), somando 29 milhões de toneladas. Neste mesmo ano, o Brasil se encontrou no posto de maior exportador de carne bovina para o mundo, com 14,4%, ou seja, 2,2 milhões de toneladas. Com relação ao leite, segundo Magalhães Junior et al. (2022), a produção de 35,445 bilhões de litros em 2020, a maior considerando a série histórica de volume já registrada, posiciona o Brasil como o 3º maior produtor do mundo.

Entretanto, as projeções do aquecimento global são alarmantes para a pecuária de leite nacional. Um estudo de cenários futuros de clima para avaliação de Impactos-Vulnerabilidade-Adaptação de Marengo e Chou et al. (2017) projetam reduções da precipitação na Amazônia de até 19% e na bacia do rio São Francisco de até 35% em 2080, com um aquecimento regional maior de 2°C a partir de meados do século XXI. Também, as projeções mostram aumento de chuva no Sul do Brasil até 2100, com aumento nos períodos secos no Nordeste e Amazônia, e chuvas intensas mais frequentes no Sudeste e Sul do Brasil. O futuro também aponta para climas mais quentes, com aquecimento de até 3°C no Sudeste, Nordeste e Sul e de até 6°C na Amazônia e Centro-Oeste. O aquecimento pode ocorrer em todo o país, com máximo sobre Amazônia e Centro-Oeste brasileiro, podendo se estender ao Sudeste e alcançar até 8°C no final do século XXI.

Os potenciais impactos desta mudança climática para a atividade leiteira são muitos. A quantidade e a qualidade das forragens para bovinos podem ser afetadas pelo aumento de temperatura e variação dos níveis de precipitação (Rojas-Downing et al., 2017), levando a um menor valor nutritivo em função de redução de proteína bruta e da digestibilidade (Henry et al., 2018). O aumento

de temperatura também pode aumentar a ingestão de água por ruminantes, o que em determinadas regiões já afetadas pela escassez hídrica pode ser um agravante (Harle et al., 2007). A ocorrência de doenças nos rebanhos também poderá ser impactada pelo aquecimento global (Rojas-Downing et al., 2017), já que o ambiente dos hospedeiros, dos vetores e a própria epidemiologia das doenças podem sofrer alterações (Thornton et al., 2009). Por fim, o preocupante efeito direto do aquecimento global sobre a saúde e produtividade dos animais, provocado pelo estresse por calor (Henry et al., 2018), que compromete funções metabólicas, digestivas, bem-estar, eficiência reprodutiva, e em casos mais extremos, levar à morte do animal (Das et al., 2016).

Embora países de climas tropical e subtropical tenham conseguido adequar-se à variabilidade climática utilizando raças de bovinos localmente adaptadas, a exemplo da raça Girolando no Brasil, a capacidade de lidar com condições mais quentes exigirá, no futuro, investimentos adicionais em bem-estar animal (Henry et al., 2018). Assim, as mudanças climáticas previstas por diversos órgãos e especialistas podem impactar severamente a produtividade da agricultura e pecuária brasileiras, e conseqüentemente a segurança alimentar de todo o mundo. Agrava esse quadro a estimativa que aponta para uma população não inferior a 9 bilhões de pessoas no mundo até 2050, sendo 6 bilhões vivendo em cidades e apenas 3 bilhões no campo (Nobre e Marengo, 2017). Reduzir os riscos da insegurança alimentar em função das mudanças climáticas, é, portanto, um dos maiores desafios do século 21 (Sejian et al., 2018).

3.2 Termorregulação dos bovinos

Os animais homeotérmicos, dentre eles os ruminantes, têm uma zona neutra do ponto de vista térmico, na qual encontram-se entre a temperatura crítica mínima (TCmin) e máxima (TCmax) (Santos et al., 2017). Nesta zona termoneutra, o gasto de energia para manter a temperatura corporal normal é mínimo, constante e independente da temperatura ambiente (Sammad et al., 2020). Sob essa condição, o animal não precisa ativar mecanismos de dissipação de calor ou de geração de calor endógeno, a taxa metabólica é mínima e toda a energia disponível é alocada para maximizar a performance produtiva (Santos et al., 2021).

A termorregulação é definida como o conjunto de estratégias dos seres vivos para regulação da temperatura corpórea, por meio do equilíbrio entre ganho e perda de calor, e é considerado um mecanismo essencial para a adaptação e manutenção de espécies em diferentes habitats (Souza e Batista, 2012; Huber et al., 2020). Esse processo é regulado pelos sistemas endócrino e nervoso, que enviam mensagens ao centro regulador, hipotálamo, que processa as informações e envia respostas através de fibras eferentes e neurônios de associação até aos órgãos efetores, que produzem os efeitos necessários à regulação da homeostase (Souza e Batista, 2012).

Utilizando-se de tais mecanismos termorregulatórios, as vacas dissipam calor por quatro vias básicas: condução, convecção, radiação (todos eles métodos não evaporativos) e a evaporação (Becker et al., 2020). Estas vias dão embasamento técnico para o desenvolvimento de grande parte das tecnologias de resfriamento artificial em instalações para vacas leiteiras (Herbut et al., 2018).

Nos mecanismos termorregulatórios não evaporativos, o gradiente de temperatura entre o corpo do animal e o meio ambiente determina a direção da transferência de calor (perda ou ganho): quando a temperatura do animal é mais alta do que a do ambiente, o animal perde calor para seu ambiente (Santos et al., 2021). A troca de calor por condução baseia-se no princípio de que o calor flui do mais quente para o mais frio, e, portanto, depende do contato físico entre o animal e objetos mais frios, como por exemplo, a vaca e o chão úmido onde ela se deita. A convecção ocorre quando a camada de ar quente mais próximo à superfície da pele é substituída por ar mais frio, sendo a velocidade do vento (natural ou artificial) bastante influente na perda de calor por essa via (Schutz et al., 2010). E quando a temperatura externa é significativamente mais baixa que a temperatura corporal, o animal pode transferir o calor produzido para o ambiente por radiação, via ondas eletromagnéticas (Becker et al., 2020, Santos et al., 2021). Tais vias de dissipação de calor, também chamadas de vias sensíveis de perda de calor (Souza e Batista, 2012) não demandam gasto de energia (Atrian e Shahryar, 2012; Becker et al., 2020).

Entretanto, à medida em que as temperaturas vão se elevando e a diferença entre temperatura ambiente e corporal vai diminuindo (Santos et al., 2021), as vias não evaporativas tornam-se insuficientes e a perda de calor por evaporação – classificada em cutânea e respiratória - inicia-se, vias estas que

demandam gasto de energia (Becker et al., 2020). Na evaporação, o animal dissipa calor corporal para o meio ambiente por meio do aumento da frequência respiratória e da sudorese (De Rensis e Scaramuzzi, 2003; Schutz et al., 2009; Santos et al., 2021). Para que isso ocorra, a umidade do ar é fator chave, pois quando a umidade relativa do ar é alta, a quantidade de água sob a forma de vapor no ar também é alta, afetando a eficiência na perda de calor por evaporação (Baena et al., 2019).

A evaporação cutânea é a forma mais importante de dissipação de calor no bovino (Sejian et al., 2018; Sammad et al., 2020) e ocorre por meio de reações fisiológicas como vasodilatação periférica e estimulação das glândulas sudoríparas (Godyn et al., 2019). Ela pode variar em função da região anatômica (pescoço, flanco, membros posteriores) e cor da pelagem do animal (Santos et al., 2021), e segundo Maia et al. (2005), corresponde a 85% da perda de calor por evaporação total de uma vaca adulta.

Já a evaporação respiratória ocorre pela ofegação ou aumento da frequência respiratória, resultando em aumento da ventilação do trato respiratório e eliminação do calor latente da vaporização da água, na tentativa de dissipar a energia térmica do corpo (Collier e Gebremedhin, 2015; Santos et al., 2017).

Quando todos esses métodos fisiológicos de dissipação de calor são insuficientes para reduzir a temperatura corporal, a vaca entra em estresse por calor, durante o qual há alterações metabólicas e comportamentais que levam à redução em sua produção de leite (Wheelock et al., 2010), fertilidade (De Rensis e Scaramuzzi, 2003) e bem-estar geral, comprometendo seu potencial produtivo (Becker et al., 2020).

3.3 O estresse por calor em vacas de leite: definição e parâmetros

O estresse pode ser definido como um estímulo ambiental sobre um indivíduo que sobrecarrega seus sistemas de controle. Se os sistemas de controle que regulam a homeostase e as respostas aos perigos não conseguem prevenir uma alteração de estado além dos níveis toleráveis, atinge-se uma situação de importância biológica diferente (Broom e Molento, 2004). Um exemplo dessa situação é o estresse térmico a que animais podem ser

submetidos, e ocorre quando a temperatura do ambiente excede (para mais ou para menos) a zona termoneutra (Rhoads et al., 2009), que é definida pela faixa de temperatura na qual a taxa metabólica do animal se mantém constante (Hill et al., 2012). Segundo Hou et al. (2021), o estresse por calor é uma condição fisiológica na qual a carga total de calor (somada a do ambiente e a da produção endógena) excede a capacidade de dissipação pelo animal.

O estresse por calor que atua sobre o animal provoca aumento da temperatura corporal e evoca respostas fisiológicas (Dikmen & Hansen, 2009). Estas respostas implicam na ativação de sistemas neuronais e neuro-hormonais, e o grau de estimulação destes sistemas determina a intensidade da resposta ao estresse, bem como as consequências que eles trazem para o organismo (Herbut et al., 2018). Os elementos do clima que atuam em tais respostas incluem radiação solar, temperatura ambiente, umidade do ar e velocidade do vento, que influenciam no ganho ou perda de calor entre o animal e o meio ambiente (Tao et al., 2020). O estresse por calor ocorre quando a capacidade de dispersar o calor produzido através do metabolismo normal é comprometido (Dahl et al., 2020).

Uma variedade de índices pode ser utilizada para estimar o grau com que o estresse por calor afeta os animais de produção (Dikmen & Hansen, 2009). O mais comum deles, o índice de temperatura e umidade (ITU), combina a temperatura do bulbo seco (T_{db}) e a temperatura do bulbo úmido (T_{wb}) (Thom, 1959, citado por Dikmen & Hansen, 2009). Com isso, o ITU considera a temperatura do ambiente e a umidade do ar, sendo um índice utilizado tanto para vacas a pasto quanto para vacas confinadas (Herbut et al., 2018). Uma das fórmulas mais conhecidas e utilizadas para o cálculo do ITU é a do NRC (1971): $ITU = (1.8 \times T + 32) - [(0.55 - 0.0055 \times RH) \times (1.8 \times T - 26)]$, onde T é a temperatura em graus celsius e RH é a umidade relativa (%) (Tao et al., 2020). O ITU não considera a radiação solar e a velocidade do vento (Tao et al., 2020), mas ainda assim, tem acurácia e é amplamente utilizado.

O valor do ITU geralmente é o principal determinante para as tomadas de decisões gerenciais relacionadas ao estresse por calor nas propriedades leiteiras (Polsky e Von Keyserlingk, 2017). O limiar deste parâmetro no qual considera-se o estresse por calor em vacas leiteiras vem sendo revisado ao longo dos últimos anos. Estudos anteriores apontavam ITU de 72 como limite a

partir do qual a produção de leite sofreria redução (Armstrong, 1994; Silva et al., 2002). Entretanto, estudos mais recentes mostraram que o limiar inferior de estresse por calor para vacas holandesas seria de 68 (Zimbelman et al., 2009; Carabano et al., 2014; De Rensis et al., 2015). Sinais medianos de estresse por calor ocorrem em ITU entre 68 e 74 e acima de 75, há grave comprometimento da performance produtiva da vaca (De Rensis et al., 2015). Zimbelman et al. (2009) ainda acrescentam que para vacas que produzem mais de 35 kg/dia, o limiar de ITU é de 65. Entretanto, todos estes estudos foram realizados utilizando vacas holandesas como modelo; não havendo o ITU máximo para vacas mestiças estabelecido pela literatura. Ressalta-se que há um único estudo brasileiro que apontou nível crítico para vacas Girolando 3/4 superior a 77 (Azevedo et al., 2005).

O aumento da temperatura corporal é considerado o sinal aparente de que a vaca está em estresse por calor (Tao et al., 2018). Como referência fisiológica, tem-se estabelecido valores de 38,0°C a 39,0°C para bovinos adultos (Dirkens et al., 1993). Robinson (1999) cita faixa de 38,0°C a 39,3°C para animais leiteiros; Collier et al. (2019) estabelece o *setpoint* da temperatura corporal para o gado leiteiro em 38,5°C. Poucos são os trabalhos com vacas de raças zebuínas; Cardoso et al. (2015) estabeleceram temperatura retal entre 38,65 e 39,05°C em vacas mestiças sob condição termoneutra.

A frequência respiratória (FR) é mais um parâmetro utilizado para observação do estresse por calor nos rebanhos. A FR normal em bovinos adultos varia entre 24 e 36 movimentos respiratórios por minuto (mov/min) (Stöber, 1993). Shultz (1984) e Dahl (2018) estabelecem que FR acima de 60 movimentos/minuto como indicativo deste estressor em vacas em lactação. Acima de 120 movimentos/minuto, as vacas experenciam estresse severo (Hahn, 1999). Outro estudo observou que em uma variação de temperatura ambiente entre 24 e 39°C, cada 1°C de aumento na temperatura ambiente pode aumentar em 2,8 a 3,3 movimentos/minuto na FR de vacas em lactação (Gaughan et al., 2000). De acordo com Costa et al. (2018), animais da raça zebu vivendo em ambiente tropical protegido do sol, a FR não excede 27 respirações por minuto. Para animais *Bos indicus*, a média na FR varia entre 33,75 a 41 movimentos/minuto dependendo da raça, temperatura ambiente e hora do dia (Cardoso et al., 2015).

3.4 Impactos do estresse por calor sobre o metabolismo

A ativação da resposta aguda ao estresse é iniciada por receptores térmicos periféricos localizados na derme e epiderme que respondem às mudanças no ambiente (Collier e Gebremedhin, 2015). As vias aferentes do estresse transmitem estas informações via trato espinotalâmico para o sistema nervoso central, incluindo o tálamo e o hipotálamo, onde os *setpoints* são controlados, e para o córtex, para percepção. Estes centros então ativam vias eferentes para efetuar uma resposta para o meio ambiente (Sejian et al., 2018). Os sistemas nervoso autônomo e endócrino promovem respostas cardiovasculares e alterações metabólicas e ativam fatores de transcrição envolvidos na resposta aguda. A ativação simpática da medula adrenal também pode causar a liberação direta de catecolaminas, que modifica o metabolismo celular e a distribuição vascular (Collier e Gebremedhin, 2015; Collier et al., 2017).

Em resposta ao estresse por calor, o eixo hipotálamo-pituitário-adrenal (eixo HPA) é rapidamente ativado, já que atua como um dos principais reguladores endócrinos. Os produtos do eixo HPA que controlam a via do estresse em bovinos são o hormônio liberador de corticotropina (CRH), o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e o cortisol (Sejian et al., 2018). A secreção de glicocorticoides é uma resposta endócrina clássica ao estresse (Kannan et al. 2000), e por essa razão, o nível do hormônio cortisol no sangue é o biomarcador mais proeminente do estresse em vacas leiteiras (Park et al., 2021). O nível basal de cortisol em vacas é baixo, menor que 10 nmol/L (Mormede et al., 2007) e este valor pode alcançar entre 60 e 200 nmol/L frente a um estressor (Boissy et al., 1997).

Uma das principais funções do aumento do cortisol no estresse por calor é a estimulação da gliconeogênese hepática, que envolve a conversão de fontes não carboidratos em glicose. O resultado é o aumento do nível de glicose no sangue e posteriormente, a concentração de insulina no sangue (Sejian et al. 2008). O cortisol também inibe a entrada de glicose nas células, contribuindo para o aumento da glicose e insulina no sangue (Mormede et al., 2007). Insulina é um potente inibidor lipolítico, o que explica a ausência de mobilização de tecido adiposo em vacas sob estresse por calor, processo que poderia viabilizar a

manutenção da produção de leite, a exemplo do que é visto em vacas recém-paridas em balanço energético negativo (Rhoads et al., 2009; Sammad et al., 2020).

A glândula tireoide é conhecida por ter um papel muito importante na termorregulação, metabolismo de energia e proteínas, desempenho e crescimento dos bovinos (Aleena et al., 2016), sendo altamente sensível a variação da temperatura ambiente (Rasooli et al., 2004). Tao et al. (2020) relatam que os hormônios tireoidianos triiodotironina (T3) e tiroxina (T4) podem sofrer redução em função do estresse por calor pois eles atuam na produção de calor metabólico. A redução nas concentrações de T3 e T4 ocorre, provavelmente, pelo efeito direto do estresse por calor sobre o eixo HPA e o eixo da tireoide, visando diminuir a produção de hormônio liberador da tirotrópina e limitar a produção de calor metabólico (Pragna et al., 2018). As menores concentrações de hormônios tireoidianos não são consequência primária de uma menor ingestão de alimentos durante o estresse por calor, mas sim, resultado de processos neuroendócrinos relacionados às interações entre termossensores, hipotálamo, adeno-hipófise e tireoide (Pereira et al., 2008).

3.5 Impactos do estresse por calor sobre o bem-estar e comportamento

Adaptação comportamental é reconhecida como a primeira e a principal resposta adotada pelo animal para redução da temperatura corporal (Sejian et al., 2018). Em termos de estratégias de comportamento, várias são as modificações promovidas pelo animal na tentativa de termorregular.

Bovinos sob estresse por calor aumentam a frequência (Shilja et al., 2016) e o volume de consumo de água - cerca de 1,2 a 2,0 kg por grau Celsius (West, 2003). Segundo Collier et al. (2019), o consumo de água de vacas em lactação pode aumentar em 21% quando o ITU sobe de 57 para 72.

Estes animais tendem a procurar locais de maior sombra (Sejian et al., 2018), reduzir seu tempo em atividade e em movimento (DeRensis e Scaramuzzi, 2003; Schutz et al., 2009) e alimentarem-se nas horas mais frescas do dia (Sammad et al., 2020).

Vacas em estresse por calor podem reduzir em até 30% o tempo que passam deitadas (Schutz et al., 2011; Ratnakaran et al., 2017). Nordlund et al.

(2019) reportaram aproximadamente três horas de redução no tempo deitada em vacas sob estresse por calor alojadas em *free stall*. Esta mudança no comportamento visa tanto estar apto a reorientar-se em diferentes direções de maior sombra (Sejian et al., 2018) como também para expor-se a uma maior área de superfície para redução do calor, redução da perda de água e maior movimentação do ar via convecção (Cook et al., 2007; Allen et al., 2015). Entretanto, o tempo maior na posição em pé pode aumentar o gasto de energia e os requerimentos de manutenção (West, 2003) como reduzir em até 25% o fluxo de sangue para a glândula mamária (Delamaire e Guinard-Flament, 2006), contribuindo para a redução na produção de leite. Grandin (2016), citada por Becker et al. (2020) relata que o menor tempo deitada também afeta o tempo de sono das vacas, uma vez que elas dificilmente dormem em pé; o que pode alterar o sistema endócrino, aumentar o gasto de energia e enfraquecer o sistema imune, impactando negativamente em seu bem-estar.

Mudanças na frequência de micção e defecação também podem ocorrer em vacas sob estresse por calor (Sejian et al., 2018), em razão da desidratação que o animal sofre com os mecanismos de evaporação respiratória e cutânea (Ratnakaran et al., 2017).

3.6 Impactos do estresse por calor sobre produção e composição do leite

Ajustes fisiológicos, endócrinos e bioquímicos necessários à redução da produção de calor corporal levam à redução da produção de leite em vacas de leite submetidas ao estresse por calor (Sammad et al., 2020).

O primeiro deles, acionamento do eixo hipotalâmico-hipofisário, induz à inibição do centro de apetite e à redução do consumo de alimentos (Kamal et al., 2018; Sammad et al., 2020). Esta redução, já relatada em torno de 9,6% em bovinos em estresse por calor comparado à animais na ZTN (Bouraoui et al., 2002), causa imediata redução na disponibilidade de nutrientes para a síntese de leite (West, 2003; Rhoads et al., 2009). Segundo Baumgard e Rhoads (2013), a redução do consumo é responsável por 30 a 50% da redução na produção de leite.

Simultaneamente, há um aumento no metabolismo basal causado pela ativação no sistema termorregulador, por meio da sudorese e ofegação (Godyn

et al., 2019). O estresse por calor de leve a severo pode aumentar a taxa do metabolismo basal (ou manutenção metabólica) em 7 a 25% (NRC, 2001), exacerbando ainda mais o estresse metabólico existente e a redução na produção de leite (Polsky e Von Keyserlingk, 2017).

Vacas em estresse por calor têm seu perfil metabólico alterado sob a perspectiva da partição de nutrientes. Somatotropina bovina e IGF-1 são os dois hormônios mais importantes na promoção da lactação (Rhoads et al, 2010). Em condições normais, a somatotropina bovina direciona os nutrientes em direção à glândula mamária diminuindo a absorção de nutrientes por tecidos extra-mamários e estimula a síntese e secreção hepática de IGF-1 (Sammad et al., 2020). Entretanto, vacas em estresse por calor apresentam valores inferiores de ambos os hormônios (Rhoads et al., 2009), o que pode ser um dos fatores que explicam a redução na produção de leite não relacionada à redução do consumo.

A falha na mobilização de gordura corporal observada em vacas em estresse por calor, possivelmente devido ao aumento da insulina que é um hormônio inibidor da lipólise, também pode afetar a produção de leite de forma complementar à redução na ingestão de alimentos (Rhoads et al., 2009).

A redução na produção de leite também pode ser explicada pelo efeito do calor no aumento da taxa de morte programada de células epiteliais primárias mamárias, conforme demonstrado por Tao et al. (2018).

Portanto, rebanhos leiteiros mostram correlação negativa entre estresse por calor e produção de leite (West, 2003) em qualquer nível de produtividade, mas de maneira mais expressiva naqueles mais produtivos devido à maior demanda de nutrientes e maior taxa metabólica (Zimbelman et al., 2009). O impacto na produtividade é tão significativo que vacas que experenciam estresse por calor durante o período seco têm redução na produção de leite na lactação subsequente. Tao e Dahl (2013) encontraram diferença de 4 a 5 kg/leite/dia em vacas que não receberam resfriamento evaporativo durante o período seco.

Em uma revisão de 2018, Herbut e colaboradores apontam limite de ITU entre 68 e 74 para início da redução da produção de leite, ou segundo Zimbelman et al. (2009), quando ITU mínimo do dia ultrapassa 65 ou quando a média fica acima de 68, considerando variações em função de raça, tipo de sistema, entre outros. Estes mesmos autores encontraram redução linear na produção de leite de 0,13kg/dia para cada unidade de aumento no ITU, no

intervalo entre 60 e 80 desta medida. Pramod et al. (2021) apontaram que para cada aumento no índice de temperatura e umidade (ITU) entre 72 e 84, há redução diária na produção de leite de 2,1%.

Diferentemente da produção de leite, não há um consenso da literatura com relação ao efeito do estresse por calor na composição do leite. Conforme relata a revisão de Becker et al. (2020), os teores de proteína, gordura e lactose do leite de vacas estressadas podem reduzir, aumentar ou não alterar. Alguns estudos apontam que a redução do teor de proteína, por exemplo, pode estar ligada à redução do fluxo sanguíneo para a glândula mamária de vacas estressadas, reduzindo o suprimento de precursores da proteína do leite (Gao et al., 2017) ou afetando a “maquinaria celular” que sintetiza a proteína (Rhoads et al., 2009).

3.7 Impactos do estresse por calor sobre a saúde da glândula mamária

A imunidade inata (não-específica) que atua na glândula mamária contra a invasão de patógenos e estabelecimento da mastite (Sordillo et al., 2002), consiste em células de defesa, conhecidas como células somáticas do leite, e conta com diversos tipos celulares como neutrófilos, macrófagos, linfócitos e as células epiteliais (Sordillo; Shafer-Weaver; Derosa, 1997). O número total e o nível de atividade da população destes leucócitos da glândula mamária possuem um papel fundamental na severidade e duração de infecções intramamárias (Sordillo et al., 2002). As porcentagens de células epiteliais no leite variam muito com os estudos e podem corresponder de 1,6% a 20% do total de células somáticas, a depender da técnica empreendida (Lengi et al., 2022).

Os macrófagos atuam predominantemente em glândula mamária sadia, lactante ou em involução, via fagocitose. Quando os macrófagos reconhecem bactérias, liberam citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina 1 β (IL-1 β), estimulando a migração e atividade bactericida dos neutrófilos (Oviedo-Boyso et al., 2007) e produzindo prostaglandinas e leucotrienos, que aumentam a reação inflamatória local (Bannerman et al., 2004). A capacidade fagocítica de macrófagos pode aumentar na presença de anticorpos de patógenos específicos (Sordillo et al., 1989), por isso, são também

considerados especialistas na apresentação de antígenos para linfócitos T (Sordillo et al., 2002).

Já os neutrófilos correspondem a 90% das células de defesa frente a um processo inflamatório recente, oriundos da corrente sanguínea em resposta a uma variedade de mediadores, como as citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β (Oviedo-Boyso et al., 2007). A ação bactericida dos neutrófilos ocorre por fagocitose das bactérias, em uma ação de explosão respiratória que produz íons superóxido, hidrogênio e peróxido de hidrogênio (Sordillo et al., 1989).

A patogenicidade de infecções por bactérias gram-negativas se deve a diversos fatores de virulência, sendo o mais importante deles o lipopolissacarídeo (LPS), componente da parede celular da *Escherichia coli* (Steele et al., 2019). Resumidamente, o reconhecimento do LPS pelo sistema imune se dá inicialmente por sua conexão à proteína de ligação LPS do hospedeiro (LBP). O complexo LPS-LBP se liga à proteína CD14, localizada na superfície de macrófagos. Esse complexo é reconhecido pelo receptor de membrana TLR-4 e proteína MD2 que se agregam e induzem à resposta inflamatória caracterizada pela liberação de mediadores pró-inflamatórios como TNF- α , IL-1 β e IL-6 (Lu et al., 2008; Borghetti et al., 2009; Alnakip et al., 2014). A liberação destes mediadores ocorre por meio da translocação do fator nuclear B (NF- κ B), que migra do núcleo celular e regula a expressão destas citocinas (Liebers et al., 2008; Wellnitz & Bruckmaier, 2012). As citocinas TNF- α e IL-1 β participam da atividade quimiotática de neutrófilos, induzindo a expressão de moléculas de adesão pelas células endoteliais (Oviedo-Boyso et al., 2007), o que auxilia na migração destes leucócitos circulantes para o sítio da infecção (Borghetti et al., 2009). O recrutamento de neutrófilos para o interior da glândula mamária em infecções por *E. coli* ocorre em seis horas, com pico em 12 horas (Vangroenweghe et al., 2004).

Durante o curso da infecção, estas citocinas pró-inflamatórias podem induzir a reação de fase aguda, como a febre via TNF- α (Wellnitz & Bruckmaier, 2012) e mudanças metabólicas tais quais o catabolismo de proteínas e a gliconeogênese (Borghetti et al., 2009). Podem ocorrer também alterações hormonais, como o efeito direto do IL-1 no eixo hipotalâmico-pituitário, provocando aumento de cortisol e inibindo secreção de prolactina (Besedovsky e del Rey, 2000; Mocchegiani et al., 2006) e efeito inibitório do TNF- α sobre a

concentração plasmática do hormônio do crescimento (GH) (Borghetti et al., 2009). Por essa potente capacidade indutora de resposta inflamatória (Johnzon et al., 2018), a administração de LPS é uma das ferramentas utilizadas como modelo padrão para simulação de desafio imunológico e estudo da mastite bovina (Borghetti et al., 2009).

No caso de bactérias gram-positivas como *Staphylococcus aureus*, o reconhecimento da infecção ocorre via TLR-2, que interage com lipoproteínas, peptidoglicanos e ácido lipoteicoico da parede celular (Wellnitz e Bruckmaier, 2012).

O sistema imune inato é, portanto, o mecanismo primário de defesa da glândula mamária contra estressores do ambiente (Das et al., 2016) e crucial para o controle da proliferação de microrganismos no tecido mamário (Oviedo-Boyso et al., 2007). Uma das consequências possíveis do estresse por calor em vacas em lactação é a supressão deste sistema (Bagath et al., 2019), o que pode aumentar o risco de mastite.

Estudos já demonstraram aumento da contagem de células somáticas em rebanhos leiteiros durante os meses mais quentes do ano (Becker et al., 2020), como Riekerink et al. (2007), que encontraram maior probabilidade de vacas apresentarem valores acima de 200.000 células/mL no mês de agosto (verão). Nars e El-Tarabany (2017) registraram aumento de 36% na CCS do tanque de refrigeração em ITU acima de 70; e Zeinhom et al. (2016) relataram CCS de tanque de 438.000 células/mL versus CCS de 251.000 células/mL quando o ITU sobe de <72 para >78. Gernand et al. (2019) relataram uma relação linear entre a incidência de mastite durante os primeiros 10 dias pós-parto e a média do ITU dos primeiros 5 dias pós-parto, com aumento de 0,02% na incidência de mastite para cada unidade de aumento no ITU. Tais autores explicam parcialmente o aumento de CCS por um possível efeito de diluição em função da redução na produção de leite (Ferreira e DeVries, 2015) e pela maior sobrevivência de patógenos no ambiente, em função das altas temperaturas e umidade do ar (Das et al., 2016). Com relação ao padrão microbiológico dos patógenos que têm seu crescimento favorecido em climas quentes, não há um consenso sobre a predominância de um ou outro grupo de microrganismo. Gao et al. (2017), avaliando 161 rebanhos na China, encontraram maior prevalência de *E. coli* e *Klebsiella* spp. no verão, enquanto *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus*

dysgalactiae predominaram no inverno. Já Lundberg et al. (2016) encontraram, na Suécia, predominância de *S. dysgalactiae* ao final do verão, de *Streptococcus uberis* ao final do inverno e *S. aureus*, em ambos os períodos. Tais resultados sugerem que o aumento da mastite nos períodos quentes do ano está provavelmente mais relacionado a fatores ligados ao animal do que à espécie dos patógenos (Dahl, 2018).

Outra justificativa para o aumento da CCS nos meses mais quentes do ano é a possível depressão do sistema imune como consequência do estresse por calor. Segundo Borghetti et al. (2009), Caroprese et al. (2012) e Bagath et al. (2019), o cortisol, que aumenta em vacas sob estresse por calor (Sejian et al., 2018), pode se ligar a determinados receptores, inibindo a expressão de genes envolvidos na ativação de células T e na produção de citocinas pró-inflamatórias, o que pode impactar severamente a resposta imune da vaca. Os glicocorticoides também são hábeis em inibir a via NF- κ B, que regula expressão de citocinas frente ao reconhecimento do LPS pelo LBP (Borghetti et al., 2009).

Os indicadores de imunidade, tais como produção de citocinas, proliferação de células imunes, migração de linfócitos para o úbere e viabilidade celular podem estar reduzidos devido ao estresse por calor (Steele, 2016). Lacetera e colaboradores (2006) sugerem impactos do estresse por calor na capacidade de migração, fagocitose e eliminação de invasores por parte das células de defesa. A proporção de leucócitos também pode ser alterada em resposta ao aumento do ITU. Muñoz et al. (2014) descobriram que a razão neutrófilos/linfócitos, um marcador de inflamação e infecção, foi significativamente aumentada durante os meses de verão. Células polimorfonucleares do sangue bovino submetidas *in vitro* à temperatura de 41°C tiveram taxa de fagocitose (-37%) e de produção de reativos de oxigênio (ROS) reduzida, comprovando o impacto do estresse por calor na imunidade dos bovinos (Lecchi et al., 2016). Safa e colaboradores (2019) encontraram redução de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1 α e IL-2) e imunoglobulinas no plasma sanguíneo de vacas submetidas ao estresse por calor, o que compromete a resposta imune destes animais, já que TNF- α promove ativação endotelial e recrutamento de leucócitos para o sítio da infecção (Alhussien e Dang, 2019) e IL-1 e IL-2 potencializam a atividade bactericida e fagocítica de neutrófilos (Wellnitz & Bruckmaier, 2012; Alnakip et al., 2014).

A expressão gênica tem sido uma ferramenta de grande auxílio para compreender como as alterações em nível molecular provocam modificações nas células durante diversas condições estressantes (Sejian et al., 2019), incluindo o estresse por calor. Neste contexto, análises de células epiteliais mamárias bovinas expostas a alta temperatura ambiente mostraram redução da expressão de genes envolvidos na estrutura celular, biossíntese e transporte, e aumento da expressão gênica de genes ligados ao reparo de proteínas e degradação (Li et al., 2015, Garner et al., 2020). A temperatura interna da glândula mamária é altamente correlacionada à temperatura corporal geral da vaca (Bitman et al., 1984), portanto, as células da sua glândula mamária são expostas à alta temperatura quando está em estresse por calor (Tao et al., 2018). Estes resultados sugerem respostas celulares coordenadas na tentativa de garantir a sobrevivência das células da glândula mamária quando expostas a altas temperaturas (Li et al., 2015).

A produção de proteínas de choque térmico (HSP) é a resposta celular mais conhecida do estresse por calor (Tao et al., 2018) e ocorre na tentativa de manter a integridade das células e prevenir a apoptose (Hu et al., 2016). Orellana et al. (2017) observaram aumento da expressão gênica de proteínas de choque térmico em biópsias mamárias coletadas de vacas em lactação após ausência de resfriamento evaporativo durante o verão. A expressão dos genes relacionados à apoptose também mostraram aumento após o estresse por calor provocado, sugerindo um aumento programado de morte celular.

Todos os resultados citados baseiam seus estudos em vacas holandesas, sabidamente menos tolerantes ao estresse por calor. Não há disponível na literatura dados relacionados ao impacto do estresse por calor sobre a imunidade de glândula mamária de vacas Girolando, raça responsável por grande parte da produção leiteira brasileira, lacuna esta que o presente estudo tentará preencher.

4. Referências

Aleena J.; Pragna, P.; Archana, P.R.; Sejian, V.; Bagath M.; Krishnan, G.; Manimaran, A.; Beena, V.; Kurien, E.K.; Varma, G.; Bhatta, R. 2016. Significance of metabolic response in livestock for adapting to heat stress challenges. **Asian Journal of Animal Sciences**, v.10, p.224–234.

Alhussien, M.N.; Dang, A.K. 2019. Potential roles of neutrophils in maintaining the health and productivity of dairy cows during various physiological and physiopathological conditions: a review. **Immunology Research**, v.67(1), p.21-38. doi: 10.1007/s12026-019-9064-5. PMID: 30644032.

Allen, J.D.; Hall, L.W.; Collier, R.J.; Smith, J.F. 2015. Effect of core body temperature, time of day, and climate conditions on behavioral patterns of lactating dairy cows experiencing mild to moderate heat stress. **Journal of Dairy Science**, v.98, p. 118–127.

Alnakip, E.M.; Quintela-Baluja, M.; Böhme, K.; et al. 2014. The Immunology of Mammary Gland of Dairy Ruminants between Healthy and Inflammatory Conditions. **Journal of Veterinary Medicine**, doi: 10.1155/2014/659801. PMID: 26464939; PMCID: PMC4590879.

Associação Brasileira de Criadores De Girolando- ABCG (2014). Produção de leite no Brasil e participação da genética Girolando com ênfase em reprodução. Disponível em: Biblioteca-virtual - Associação Brasileira dos Criadores de Girolando. Acesso em: 21 abril de 2020.

Aragão, A.; Contini, E. O agro no Brasil e no mundo: uma síntese do período de 2000 a 2020. Secretaria de Inteligência e Relações Estratégicas (Sire), **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)**. Disponível em: embrapa.br. Acesso em 12/03/2022.

Armstrong, D. V. 1994. Heat stress interaction with shade and cooling. **Journal of Dairy Science**, v.77, p.2044–2050. doi:10.3168/jds. S0022-0302(94)77149-6.

Atrian, P., Shahryar, H. A. 2012. Heat stress in dairy cows (A review). **Journal of Zoology**, London, v.2, p.31–37.

Azevedo, M.; Pires, M.F.A.; Saturnino, H.M.; et al. 2005. Estimativa de Níveis Críticos Superiores do Índice de Temperatura e Umidade para Vacas Leiteiras 1/2, 3/4 e 7/8 Holandês-Zebu em Lactação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.6, p.2000-2008.

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

Bagath, M.; Krishnana, G.; Devaraja, C.; Rashamola, V.P.; Pragnab, P.; Leesc, A.M.; Sejian, V. 2019. The impact of heat stress on the immune system in dairy cattle: A review. **Research in Veterinary Science**, v.126, p.94–102. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.08.011>

Bannerman, D.D. et al. Innate immune response to intramammary infection with *Serratia marcescens* and *Streptococcus uberis*. **Veterinary Research**, v.35, n.6, p.681-700, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1051>

Baumgard, L.H.; Rhoads, R.P. Jr. 2013. Effects of heat stress on postabsorptive metabolism and energetics. **Annual Review Animal Bioscience**, v.1, p.311–337. doi:10.1146/annurev-animal-031412-103644

Becker, C. A.; Collier, R. J.; Stone, A. E. 2020. Invited review: Physiological and behavioral effects of heat stress in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.103, n.8.

Besedovsky, H.O., del Rey, A., 2000. The cytokine–HPA axis feedback circuit. **Z. Rheumatology**, v.59, II26–II30.

Bitman, J., A. Lefcourt, D. L. Wood, and B. Stroud. 1984. Circadian and ultradian temperature rhythms of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.67, p.1014–1023.

Boissy, A.; Le Neindre, P. 1997. Behavioral, cardiac and cortisol responses to brief peer separation and reunion in cattle. **Physiology Behaviour**, v.61, p.693–9.

Boletim Indicadores Leite e Derivados. Boletim eletrônico mensal. Coordenadores, Glaucio R. Carvalho, Luiz Antonio A. de Oliveira, Samuel J. M. Oliveira. Juiz de Fora: **Embrapa Gado de Leite**, Ano 12, nº 121- Outubro/2021 - Edição Especial. Disponível em: https://www.cileite.com.br/ind_leite_derivados_out_2021_2. Acesso em: 16/09/2022.

Borghetti, P.; Saleri, R.; Mocchegiani, E.; Corradi, A.; Martelli, P. 2009. Infection, immunity and the neuroendocrine response. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 130(3-4), p.141-162.

Bouraoui, R.; Lahmar, M.; Majdoub, A.; Djemali, M.; Belyea, R. 2002. The relationship of temperature-humidity index with milk production of dairy cows in a Mediterranean climate. **Animal Research**, v.51, p.479–491. <https://doi.org/10.1051/animres:2002036>

Broom, D.M.; Molento, C.F.M. 2004. Bem-estar animal: conceito e questões relacionadas: Revisão. **Archives of Veterinary Science**, v.9, n.2, p.1-11.

Carabano, M.J.; Bachagha, K.; Ramon, M.; Diaz, C. 2014. Modeling heat stress effect on Holstein cows under hot and dry conditions: selection tools. **Journal of Dairy Science**, v.97, p.7889–790.

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

Caroprese, M.; Albenzio, M.; Bruno, A.; Annichiarico, G.; Marino, R.; Sevi, A. 2012. Effects of shade and flaxseed supplementation on welfare of lactating ewes under high ambient temperatures. **Small Ruminants Research**, p.177–185.

Collier, R.J.; Gebremedhin, K.G. 2015. Thermal biology of domestic animals. **Annual Review of Animal Bioscience**, v.3, p.10.1–10.20. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022114-110659>.

Collier, R.J.; Renquist, B.J.; Xiao, Y. 2017. A 100-Year Review: Stress physiology including heat stress. **Journal of Dairy Science**, v.100, p.10367–10380. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13676>

Collier, R.J.; Baumgard, L.H.; Zimbelman, R.B.; Xiao, Y. 2019. Heat stress: physiology of acclimation and adaptation. **Animal Frontiers**, v.9, p:12e9. DOI: 10.1093/af/vfy031.

Cook, N.B.; Mentink, R.L.; Bennett, T.B.; Burgi, K. 2007. The Effect of Heat Stress and Lameness on Time Budgets of Lactating Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p.1674-1682.

Costa, C.C.M.; Maia, A.S.C.; Nascimento, S.T.; Nascimento, C.C.; Neto, M.C.; Fonsêca, V.F.C. 2018. Thermal balance of Nellore cattle. **International Journal of Biometeorology**, v.62, p.723–731. <https://doi.org/10.1007/s00484-017-1349-6>

Dahl, G.F. 2018. Impact and Mitigation of Heat Stress for Mastitis Control. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v.34, p.473–478. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2018.07.002>

Dahl, G.E.; Tao, S.; Laporta, J. 2020. Heat Stress Impacts Immune Status in Cows Across the Life Cycle. **Frontiers of Veterinary Science**, v.7, p.116. doi: 10.3389/fvets.2020.00116

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

Delamare, E.; Guinard-Flament, J. 2006. Increasing milking intervals decreases the mammary blood flow and mammary uptake of nutrients in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.3439e46. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72381-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72381-5)

De Rensis, F., Scaramuzzi, R. J. 2003. Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow—A review. **Theriogenology**, v. 60, p. 1139–1151. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(03\)00126-2](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(03)00126-2).

De Rensis, F.; Garcia-Ispuerto, I.; Lopez-Gatius, F. 2015. Seasonal heat stress: Clinical implications and hormone treatments for the fertility of dairy cows. **Theriogenology**, v. 84, p. 659–666.

Dikmen, S.; Hansen, P.J. 2009. Is the temperature-humidity index the best indicator of heat stress in lactating dairy cows in a subtropical environment? **Journal of Dairy Science**, v.92, p.109–116. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1370>.

Dirksen, G.; Gründer, H.D.; Stöber, M. 1993. Exame clínico dos bovinos. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 419p.

Ferreira, F.; De Vries, A. 2015. Effects of season and herd milk volume on somatic cell counts of Florida dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v.98, p. 4182–4197.

Gao, S. T.; Guo, J.; Quan, S. Y.; et al. 2017. The effects of heat stress on protein metabolism in lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v.100, p.5040–5049. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11913>

Gaughan, J. B.; Holt, S. M.; Hahn, G. L.; Mader, T. L.; Eigenberg, R. 2000. Respiration rate—Is it a good measure of heat stress in cattle? Asian-Australas. **Journal of Animal Science**, v.13(Suppl. C), p.329–332.

Garner, J.B.; Chamberlain, A.J.; Vander Jagt, C.; et al. 2020. Gene expression of the heat stress response in bovine peripheral white blood cells and milk somatic cells in vivo. **Science Report**, v.10, p. 19181. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75438-2>

Gernand E.; Konig, S.; Kipp, C. 2019. Influence of on-farm measurements for heat stress indicators on dairy cow productivity, female fertility, and health. **Journal of Dairy Science**, v.102, p.:6660-71. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-16011>.

Godyń, D.; Herbut, P.; Angrecka, S. 2019. Measurements of peripheral and deep body temperature in cattle – a review. **Journal of Thermal Biology**, v.79, p.42–49. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.11.011>

Grandin, T. 2016. Evaluation of the welfare of cattle housed in outdoor feedlot pens. **Veterinary Animal Science**, v.1–2, p.23–28. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2016.11.001>

Hahn, G. L., Osburn, D.D. 1969. Feasibility of summer environmental control for dairy cattle based on expected production losses. **Trans. ASAE** 12:448–451. <https://doi.org/10.13031/2013.38862>.

Harle, K.J.; Howden, S.M.; Hunt, L.P.; Dunlop, M. 2007. The potential impact of climate change on the Australian wool industry by 2030. **Agricultural Systems**, v.93, p. 61–89.

Henry, B.K.; Eckard, R.J.; Beauchemin, K.A. 2018. Review: Adaptation of ruminant livestock production systems to climate changes. **Animal**, v.12:S2, p. s445–s456. doi:10.1017/S1751731118001301

Herbut, P.; Angrecka, S.; Walczak, J. 2018. Environmental parameters to assessing of heat stress in dairy cattle-a review. **International Journal of Biometeorology**, v.62, p.2089e97. <https://doi.org/10.1007/s00484-018-1629-9>

Hill, R. W.; Wyse, G. A.; Anderson, M. 2012. Copper-based hemocyanins occur in many arthropods and molluscs. **Animal Physiology**, p. 622–623.

Hou, Y.; Zhang, L.; Dong, R.Y.; Liang, M.Y.; Lu, Y.; Sun, X.Q.; Zhao, X. 2021. Comparing responses of dairy cows to short-term and long-term heat stress in climate-controlled chambers. **Journal of Dairy Science**, v.104(2), p.2346-2356. doi: 10.3168/jds.2020-18946. PMID: 33272576.

Hu, H.; Wang, J.; Gao, H.; Li, S.; Zhang, Y.; Zheng, N. 2016. Heat-induced apoptosis and gene expression in bovine mammary epithelial cells. **Animal Production Science**, v.56, p.918–926. <https://doi.org/10.1071/AN14420>

Huber, E.; Notaro, U.S.; Recce, S.; Rodríguez, F.M.; Ortega, H.H.; Salvetti, N.R.; Rey, F. 2020. Fetal programming in dairy cows: Effect of heat stress on progeny fertility and associations with the hypothalamic-pituitary-adrenal axis functions. **Animal Reproduction Science**, v.216, p.106348. doi: 10.1016/j.anireprosci.2020.106348. PMID: 32414470.

IPCC, 2002. Sixth Assessment Report, Climate Change 2022: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Disponível em: [Climate Change 2022: Impacts, Adaptation and Vulnerability | Climate Change 2022: Impacts, Adaptation and Vulnerability \(ipcc.ch\)](https://www.ipcc.ch/report/ar6/wg2/). Acesso em: 07/03/2022.

Johnzon, C.F.; Dahlberg, J.; Gustafson, A.M.; Waern, I.; Moazzami, A.A.; Östensson, K.; Pejler, G. 2018. The Effect of Lipopolysaccharide-Induced Experimental Bovine Mastitis on Clinical Parameters, Inflammatory Markers, and the Metabolome:A Kinetic Approach. **Frontiers in Immunology**, v.9, p.1487.

Kamal, R.; Dutt, T.; Patel, M.; Dey, A.; Bharti, P.K.; Chandran, P.C. 2018. Heat stress and effect of shade materials on hormonal and behavior response of dairy cattle: a review. **Tropical Animal Health Production**, v.50, p.701–706. <https://doi.org/10.1007/s11250-018-1542-6>

Kannan, G.; Terrill, T.H.; Kouakou, B.; Gazal, O.S.; Gelaye, S.; Amoah, E.A.; Samake, S. 2000. Transportation of goats: effects on physiological stress responses and live weight loss. **Journal of Animal Science**, v.78, p.1450– 1457

Lacetera, N.; Bernabucci, U.; Scalia, D.; Basirico, L.; Morera, P.; Nardone, A. 2006. Heat stress elicits different responses in peripheral blood mononuclear cells from Brown Swiss and Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.4606e12. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72510-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72510-3)

Lecchi, C.; Rota, N.; Vitali, A.; Cecilian, F.; Lacetera, N. 2016. In vitro assessment of the effects of temperature on phagocytosis, reactive oxygen species production and apoptosis in bovine polymorphonuclear cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.182, p.89–94. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.10.007>

Lengi, A.J.; Stewart, J.W.; Makris, M.; Rhoads, M.L.; Corl, B.A. 2022. Heat Stress Increases Mammary Epithelial Cells and Reduces Viable Immune Cells in Milk of Dairy Cows. **Animals**, v.12, p. 2810. <https://doi.org/10.3390/ani12202810>

Li, L.; Sun, Y.; Wu, J.; Li, X.; Luo, M.; Wang, G. 2015. The global effect of heat on gene expression in cultured bovine mammary epithelial cells. **Cell Stress Chaperones**, v.20, p.381–389.

Liebers, V.; Raulf-Heimsoth, M.; Brüning, T. 2008. Health effects due to endotoxin inhalation (review). **Archives Toxicology**, v.82(4), p.203-10. doi: 10.1007/s00204-008-0290-1. Epub 2008 Mar 6. PMID: 18322674.

Lu, Y.C.; Yeh, W.C.; Ohashi, P.S. 2008. LPS/TLR4 signal transduction pathway. **Cytokine**, v.42(2), p.145-151. doi: 10.1016/j.cyto.2008.01.006. Epub 2008 Mar 4. PMID: 18304834.

Lundberg, Å.; Nyman, A.K.; Aspán, A.; Börjesson, S.; Unnerstad, H.E.; Waller, K.P. 2016. Udder infections with *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*, and *Streptococcus uberis* at calving in dairy herds with suboptimal udder health. **Journal of Dairy Science**, v.99(3), p.2102-2117. doi: 10.3168/jds.2015-9487. PMID: 26805990.

Magalhães Junior, W.C.P.; Hott, M.C.; Andrade, R.G. 2022. Produção de leite por Estados e regiões em 2020. In: **Anuário Leite 2022**, Embrapa Gado de Leite, p.36-37. Disponível em: [ANUÁRIO Leite 2022: pecuária leiteira de precisão. - Portal Embrapa](#). Acesso em: 16/09/2022

Maia, A.S.C.; Da Silva, R.G.; Loureiro, C.M.B. 2005. Sensible and latent heat loss from the body surface of Holstein cows in a tropical environment. **International Journal of Biometeorology**, v.50, p.17–22. <https://doi.org/10.1007/s00484-005-0267-1>

Marengo, J.A.; Chou, S. C. 2017. Cenários Futuros de Clima para Estudos de Impactos-Vulnerabilidade-Adaptação (IVA). In: **Nobre, C.A., Marengo, J.A. (Eds.), Mudanças climáticas em rede: um olhar interdisciplinar: contribuições do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Mudanças Climáticas**, 608p., p. 427–452, Cap13. ISBN 978-85-7917-463-6.

Mocchegiani, E.; Santarelli, L.; Costarelli, L.; Cipriano, C.; Muti, E.; Giacconi, R.; Malavolta, M.; 2006. Plasticity of neuroendocrine–thymus interactions during ontogeny and ageing: role of zinc and arginine. **Ageing Research Reviews**, v.5, p.281–309.

Mormède, P.; Andanson, S.; Aupérin, B.; et al. 2007. Exploration of the hypothalamic–pituitary–adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. **Physiology & Behavior**, v.92, Issue 3, p.317-339, ISSN 0031-9384, <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.12.003>.

Mottet, A.; de Haan, C.; Falcucci, A.; Tempio, G.; Opio, C.; Gerber, P. 2017. Livestock: on our plates or eating at our table? A new analysis of the feed/food debate. **Global Food Security**, v.14, p.1–8.

Muñoz, G., F. Rondelli, L. Maiztegui, S. Gherardi, F. Tolini, J. Amelong, G. Fernández, and A. Coronel. 2014. Effects of heat waves on lactating Argentinian Holstein cows in the Dairy Module. **Ciencias Veterinarias**, (Heredia), v.16, p.113–127.

Nars, M.A.F.; El-Tarabany, M.S. 2017. Impact of three ITU levels on somatic cell count, milk yield and composition of multiparous Holstein cows in a subtropical region. **Journal of Thermal Biology**, v.64, p.73-77. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtherbio.2017.01.004>

Nobre, C.A., Marengo, J.A. Mudanças climáticas em rede: um olhar interdisciplinar: contribuições do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Mudanças Climáticas, 608p., p. 15. ISBN 978-85-7917-463-6.

Nordlund, K.V.; Strassburg, P.; Bennett, T.B.; Oetzel, G.R.; Cook, N.B. 2019. Thermodynamics of standing and lying behavior in lactating dairy cows in freestall and parlor holding pens during conditions of heat stress. **Journal of Dairy Science**, v.102, p.6495e507. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15891>.

NRC. 1971. A Guide to Environmental Research on Animals. **National Academy Science**, Washington, DC.

NRC. 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th rev. ed. **National Academy Science**, Washington, DC.

Orellana, R.R.M.; Marins, T.N.; Weng, X.; Monteiro, A.P.A.; Guo, J.; Bernard, J.K.; et al. 2017. Effects of heat stress, dietary Zn sources and mammary inflammation on plasma heat shock protein concentration and gene expression of mammary gland in lactating dairy cows during summer. **Journal of Dairy Science**, v.100(Suppl. 2), p.84.

Osei-Amponsah R.; Chauhan, S.S.; Leury, B.J.; et al. 2019. Genetic selection for thermotolerance in ruminants. **Animals**, v.9, p.948. <https://doi.org/10.3390/ani9110948>

Otto, P.I.; Guimarães, S.E.F.; Calus, M.P.L.; Vandenplas, J.; Machado, M.A.; Panetto, J.C.C.; da Silva, M.V.G.B. 2020. Single-step genome-wide association studies (GWAS) and post-GWAS analyses to identify genomic regions and candidate genes for milk yield in Brazilian Girolando cattle. **Journal of Dairy Science**, v.103(11), p.10347-10360. doi: 10.3168/jds.2019-17890. Epub 2020 Sep 28. PMID: 32896396.

Oviedo-Boyso, J.; Valdez-Alarcón, J. J.; Cajero-Juárez, M.; Ochoa-Zarzosa, A.; López-Meza, J. E.; Bravo-Patiño, A.; Baizabal-Aguirre, V. M. 2007. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. **Journal of Infection**, v. 54, n. 4, p. 399–409

Park, D.; Gu, B.; Park, Y.J.; Joo, S.S.; Lee, S.S.; Kim, S.H.; Kim, E.T; et al. 2021. Dynamic changes in blood immune cell composition and function in Holstein and Jersey steers in response to heat stress. **Cell Stress and Chaperones**, v. 26, p.705–720. <https://doi.org/10.1007/s12192-021-01216-2>

Pereira, A.M.F; Baccari Jr., F.; Titto, E.A.L.; Almeida, J.A.A. 2008. Effect of thermal stress on physiological parameters, feed intake and plasma thyroid hormones concentration in Alentejana, Mertolenga, Frisian and Limousine cattle breeds. **International Journal of Biometeorology**, v.52, p.199 –208 DOI 10.1007/s00484-007-0111-x

Polsky, L.; Von Keyserlingk, M.A.G. 2017. Invited review: Effects of heat stress on dairy cattle welfare. **Journal of Dairy Science**, v.100, p.8645–8657.

Pragna, P.; Sejian, V.; Soren, N.M.; Bagath, M.; Krishnan, G.; Beena, V.; Devi, P.I.; Bhatta, R. 2018. Summer season induced rhythmic alterations in metabolic activities to adapt to heat stress in three indigenous (Osmanabadi, Malabari and Salem Black) goat breeds. **Biological Rhythm Research**, v.49, p.551–565.

Pramod, S.; Sahib, L.; Bibin, B.B., et al. 2021. Analysis of the effects of thermal stress on milk production in a humid tropical climate using linear and non-linear models. **Tropical Animal Health Production**, v.53, p.66. <https://doi.org/10.1007/s11250-020-02525-x>

Rasooli, A.; Nouri, M.; Khadjeh, G.H.; Rasekh, A. 2004. The influences of seasonal variations on thyroid activity and some biochemical parameters of cattle. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v.5, p. 1383-1391.

Ratnakaran, A.P.; V. Sejian, V.; Sanjo, J.V.; Vaswani, S.; Bagath, M.; Krishnan, G.; Beena, V.; Devi, P.I.; Varma, G.; Bhatta, R. 2017. Behavioral responses to livestock adaptation to heat stress challenges. **Asian Journal of Animal Science**, v.11, p. 1-13.

Resende, J.C.; Leite, J.L.B.; Stock, A.S.; Nardy, V.P.D.R. 2019. Produção e produtividade de leite no mundo. In: **Rentero N (Ed.). Anuário Leite 2019**, Embrapa Gado de Leite e Texto Comunicação Corporativa: São Paulo, p. 46-48.

Rhoads, M. L.; Rhoads, R. P.; Vanbaale, M. J.; Collier, R. J.; Sanders, S. R.; Weber, W. J.; Crooker, B. A.; Baumgard, L. H. 2009. Effects of heat stress and plane of nutrition on lactating Holstein cows: I. Production, metabolism, and aspects of circulating somatotropin. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 5, p. 1986–1997. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030209705132>>.

Rhoads, M.L.; Kim, J.W.; Collier, R.J.; Crooker, B.A.; Boisclair, Y.R.; Baumgard, L.H.; Rhoads, R.P. 2010. Effects of heat stress and nutrition on lactating Holstein cows: II. Aspects of hepatic growth hormone responsiveness. **Journal of Dairy Science**, v.93, p.170–179

Riekerink, O. R. G.; Barkema, H. W.; Stryhn, H. 2007. The effect of season on somatic cell count and the incidence of clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v.90, p.1704–1715.

Robinson, E.N. Termorregulação. In: **CUNNINGHAM, J.G.** 1999. Tratado de fisiologia veterinária. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap.51, p.427-435.

Rojas-Downing, M.M.; Nejadhashemi, A.P.; Harrigan, T.; Woznicki, S.A. 2017. Climate change and livestock: Impacts, adaptation, and mitigation. **Climate Risk Management**, v. 16, p. 145–163.

Safa, S.; Kargar, S.; Moghaddam, G.A.; Ciliberti, M.G.; Caroprese, M. 2019. Heat stress abatement during the postpartum period: effects on whole lactation milk yield, indicators of metabolic status, inflammatory cytokines, and biomarkers of the oxidative stress. **Journal of Animal Science**, v.97, p.122–32. doi: 10.1093/jas/sky408

Sammad, A.; Wang, Y.J; Umer, S.; et al. 2020. Nutritional Physiology and Biochemistry of Dairy Cattle under the Influence of Heat Stress: Consequences and Opportunities. **Animals**, v.10, p.793. doi:10.3390/ani10050793

Santos, S.G.C.G.; Saraiva, E.P.; Filho, E.C.P.; Neto, S.G.; Fonsêca, V.F.C.; Pinheiro, A.C.; Almeida, M.E.V.; Amorim, M.L.C.M. 2017. The use of simple physiological and environmental measures to estimate the latent heat transfer in crossbred Holstein cows. **International Journal of Biometeorology**, v.61, p.217–225. <https://doi.org/10.1007/s00484-016-1204-1>

Santos, M.M.; Souza-Junior, J.B.F.; Dantas, M.K.T.; Costa, L.L.M. 2021. An updated review on cattle thermoregulation: physiological responses, biophysical mechanisms, and heat stress alleviation pathways. **Environmental Science and Pollution Research**, v.28, p.30471–30485.

Schutz, K.E.; Rogers, A.R.; Cox, N.R.; Tucker, C.B. 2009. Dairy cows prefer shade that offers greater protection against solar radiation in summer: shade use, behaviour, and body temperature. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 116, p.28–34.

Schutz, K.E.; Rogers, A.R.; Pulongin, Y.A.; Cox, N.R.; Tucker, C.B. 2010. The amount of shade influences the behaviour and physiology of dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.93, p.125–133. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2416>

Schutz, K. E.; Rogers, A. R.; Cox, N. R.; Webster, J. R.; Tucker, C. B. 2011. Dairy cattle prefer shade over sprinklers: Effects on behavior and physiology. **Journal of Dairy Science**, v.94, p.273–283. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3608>

Sejian V.; Sanyal. S; Das, P.K.; Ghosh, P.R.; Sivakumar, B.; Pandiyan, G.D.V. 2008. Effect of unilateral adrenalectomy on the blood biochemistry of Black Bengal goats (*Capra hircus*). **Turk Journal of Veterinary Animal Science**, v.32(4), p.249–254.

Sejian, V.; Bhatta, R.; Gaughan, J.B.; Dunshea, F.R.; Lacetera, N. 2018. Review: Adaptation of animals to heat stress. **Animal**, v.12:S2, p.431–444

Sejian, V.; Bagath, M.; Krishnan, G.; et al. 2019. Genes for resilience to heat stress in small ruminants: A review. **Small Ruminant Research**, v.173, p.42-53. ISSN 0921-4488. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2019.02.009>

Shilja. S.; Sejian, V.; Bagath, M.; Mech, A.; David, C.G.; Kurien, E.K.; Varma, G.; Bhatta, R. 2016. Adaptive capability as indicated by behavioural and physiological responses, plasma HSP70 level, and PBMC HSP70 mRNA expression in Osmanabadi goats subjected to combined (heat and nutritional) stressors. **International Journal of Biometeorology**, v.60, p.1311–1323

Shultz, T. A. 1984. Weather and shade effects on corral cow activities. **Journal of Dairy Science**, v.67, p.868–873.

Silva, I.J.O.; Pandorth, H.; Acararo JR., E. et al. 2002. Efeitos da climatização do curral de espera na produção de leite de vacas Holandesas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.5, p.2036-2042.

Silva, M.V.G.B.; Panetto, J.C.C.; Martins, M.F.; Machado, M.A. 2019. Girolando: dos cruzamentos aleatórios até a seleção genômica. In: **Rentero N (Ed.). Anuário Leite 2019**, Embrapa Gado de Leite e Texto Comunicação Corporativa: São Paulo, p. 36-38.

Silva, M.V.G.B., Martins, M.F., Ferreira Junior, E.; Panetto, J.C.C., Paiva, L.C.; Machado, M.A.; Faza, D.R.L.R.; Daltro, D.S.; Negri, R.; Kluska, S. Martins, M.F.; Borges, C.A.V. 2022. Programa De Melhoramento Genético Da Raça Girolando / Sumário de Touros / Resultado do Teste de Progênie / Avaliação Genética/Genômics - Junho/2022, **Embrapa Gado de Leite**, Documentos 266.

Sordillo, L. M., Nickerson, S. C.; Akers, R. M. 1989. Pathology of *Staphylococcus aureus* mastitis during lactogenesis: relationship with bovine mammary structure and function. **Journal of Dairy Science**, v.72, p.228. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030289791013>.

Sordillo, L. M.; Shafer-Weaver, K.; Derosa, D. 1997. Immunobiology of the Mammary Gland. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 8, p. 1851–1865. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030297761216>>.

Sordillo, L. M.; Sordillo, L. M.; Streicher, K. L.; Streicher, K. L. 2002. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 7, n. 2, p. 135–46. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12463736>>.

Souza, B. B.; Batista, N. L. 2012. Os efeitos do estresse térmico sobre a fisiologia animal. **Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v.8, n.3, p 06.-10. – ISSN 1808-6845

Steele, M. 2016. Does Heat Stress Affect Immune Function in Dairy Cows? **Veterinary Evidence**, ISSN:2396-9776, v.1, Issue 3. DOI: <http://dx.doi.org/10.18849/ve.v1i3.39>

Steele, N.M.; Swartz, T.H.; Enger, K.M.; Schramm, H.; Cockrum, R.R.; Lacy-Hulbert, S.J.; White, R.R.; Hogan, J.; Petersson-Wolfe, C.S. 2019. The effect of J5 bacterins on clinical, behavioral, and antibody response following an *Escherichia coli* intramammary challenge in dairy cows at peak lactation. **Journal of Dairy Science**, v.102(16), p. 11233–11249.

Stöber, M. Identificação, anamnese, regras básicas da técnica de exame clínico geral. 1993. In: DIRKSEN, G.; GRÜNDER, H.D.; STÖBER, M. **Exame clínico dos bovinos**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap.2, p.44- 80.

Tao, S.; Dahl, G.E. 2013. Invited review: Heat stress impacts during the dry period on dry cows and their calves. **Journal of Dairy Science**, v.96, p.4079–4093.

Tao, S.; Orellana, R. M.; Weng, X.; Marins, T. N.; Dahl, G. E.; Bernard, J. K. 2018. Symposium review: The influences of heat stress on bovine mammary gland function. **Journal of Dairy Science**, p. 5642–5654. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030218300195>>.

Tao, S.; Rivas, R.M. O.; Marins, T. N.; Chen, Y.; Gao, J.; Bernard, J. K. 2020. Impact of heat stress on lactational performance of dairy cows. **Theriogenology**, v.150, p.437-444.

Thom, E. C. 1959. The discomfort index. **Weatherwise**, v. 12, p. 57–59.

Thornton, P.K.; Van de Steeg, J.; Notenbaert, A.; Herrero, M. 2009. The impacts of climate change on livestock and livestock systems in developing countries: a review of what we know and what we need to know. **Agricultural Systems**, v. 101, p.113–127

Vangroenweghe F.; Ducheteau, L.; Burvenich, C. 2004. Moderate inflammatory reaction during experimental *Escherichia coli* mastitis in primiparous cows. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.886e95.

Wellnitz, O.; Bruckmaier, R. M. 2012. The innate immune response of the bovine mammary gland to bacterial infection. **Veterinary Journal**, v. 192, n. 2, p. 148–152. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.09.013>>.

West, J. W. 2003. Effects of heat-stress on production in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 2131–2144. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(03\)73803-x](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(03)73803-x)

Wheelock, J. B.; Rhoads, R. P.; VanBaale, M. J.; Sanders, S. R.; Baumgard, L. H. 2010. Effects of heat stress on energetic metabolism in lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v.93, p. 644–655. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2295>.

Zeinhom, M.M.; Abdel, A.R.L.; Mohammed, A.N.; et al. 2016. Impact of seasonal conditions on quality and pathogens content of milk in Friesian cows. **Asian-Australas Journal of Animal Science**, v.29, p.1207–13.

Zimbelman, R. B., Rhoads, R. P.; Rhoads, M. L.; Duff, G. C.; Baumgard, L. H.; Collier, R. J. 2009. A re-evaluation of the impact of temperature humidity index (ITU) and black globe temperature humidity index (BGHI) on milk production in high producing dairy cows. **Proceedings of the 24th Southwest Nutrition and Management conference**, Tempe, AZ. pp. 158-16.

CAPÍTULO 2 – Efeito do estresse por calor sobre o comportamento ingestivo, produção e qualidade do leite e na expressão gênica em células da glândula mamária de vacas Girolando

RESUMO- O efeito do estresse por calor sobre parâmetros fisiológicos, comportamento ingestivo e comportamento na ordenha, produção e qualidade do leite e na expressão gênica em células da glândula mamária de vacas Girolando, foram avaliados no presente estudo. Para tanto, doze vacas em lactação foram submetidas a estresse por calor (HS) por oito horas diárias em câmara climática regulada para manter índice de temperatura e umidade de 85, enquanto as outras doze vacas permaneceram em “free-stall” com sistema de resfriamento (CTR), durante oito dias. Frequência respiratória (FR), temperatura vaginal (TVag), concentração plasmática de cortisol (CORT), tiroxina (T4), triiodotironina (T3), IGF-1 e insulina (INS), produção de leite, cultivo microbiológico do leite, contagem de células somáticas (CCS), contagem diferencial de células, número de passos e coices, frequência de micção, defecação, ruminação, consumo de matéria-seca e expressão de genes alvo relacionados ao estresse por calor, liberação de cortisol, processo de apoptose, hormônios da síntese do leite e resposta imune foram avaliados. TVag das vacas HS foi significativamente maior do que as vacas CTR ($p \leq 0,05$), entretanto, FR não se diferenciou. Dosagem de cortisol foi significativamente maior nos dias 5 e 7, outros hormônios não sofreram efeito entre grupos. Produção de leite foi significativamente menor no grupo HS, já componentes do leite, incluindo a CCS não foi diferente ($p > 0,05$). As vacas HS ruminaram menos em sala de ordenha e consumiram menor volume de matéria seca ao longo dos dias do experimento ($p \leq 0,05$). O estresse por calor modificou significativamente a expressão dos genes *HSP60*, *HSP90*, *GR*, *INSR* e *PRLRs* em células do leite. As vacas Girolando do presente estudo experienciaram alterações fisiológicas, hormonais e de produção compatíveis com estresse por calor, estressor que também demonstrou impactar localmente genes relacionados à síntese do leite.

Palavras-chave: estresse por calor, fisiologia, Girolando, produção de leite, qualidade do leite, expressão gênica

Effect of heat stress on ingestive behavior, milk production, milk quality and gene expression in udder cells of Girolando cows

ABSTRACT- The present study aims to evaluate the effect of heat stress on physiological parameters, ingestive and milking behavior, milk production, milk quality, and gene expression in udder cells of Girolando cows. For this purpose, twelve lactating cows were subjected to heat stress (HS) for eight hours a day in a regulated, climatic chamber to maintain a temperature and humidity index of 85, while the other twelve cows remained in a free stall with a cooling system (CTR) for eight days. Respiratory rate (RR), vaginal temperature (TVag), cortisol plasma concentrations (CORT), thyroxine (T4), triiodothyronine (T3), IGF-1, and insulin (INS), milk production, microbiological milk culture, somatic cell count (SCC), differential cell count, number of steps and kicks, frequency of urination, defecation, rumination, dry matter consumption, and target gene expression related to heat stress, cortisol release, apoptosis process, milk synthesis hormones, and immune response were evaluated. TVag of HS cows was significantly higher than that of CT cows ($p < 0.05$). However, FR did not differ. The cortisol dosage was significantly higher on days 5 and 7, and other hormones had no effect among groups. Milk production was significantly lower in the HS group, whereas milk components, including CCS, were not different ($p > 0.05$). HS cows ruminated less in the milking parlor and intaked less dry matter over the days of the experiment ($p \leq 0.05$). Heat stress significantly modified the expression of genes HSP60, HSP90, GR, INSR and PRLRs in milk cells.

Keywords: heat stress, Girolando crossbreed, milk production, milk quality, physiology, gene expression

1. Introdução

As mudanças climáticas causadas pelo aquecimento global têm sido amplamente discutidas como um dos maiores desafios para a produção de alimentos e para o bem-estar dos animais de produção (IPCC, 2022). Dentre as alternativas para evitar as adversidades causadas pelo aumento da temperatura ambiente, o cruzamento entre bovinos taurinos e zebuínos tem sido uma estratégia eficiente para aumentar a produtividade e a resiliência ao calor (Franzoni et al., 2018; Henry et al., 2018; Sejian et al., 2018). De maneira geral, a adaptação das raças zebuínas às altas temperaturas é refletida por uma menor taxa de metabolismo basal (Hansen et al., 2004), uma maior eficiência em perder calor aumentando a vasodilatação periférica, a taxa de sudorese e a frequência respiratória (Hansen, 2004; Taye et al. 2017). Diante desse fato, vale salientar que 80% do rebanho leiteiro brasileiro é composto por vacas Girolando de diversas composições genéticas resultantes do cruzamento de animais das raças Holandesa e Gir (ABCG, 2010).

O estresse por calor pode causar mudanças comportamentais e fisiológicas até mesmo em zebuínos considerados termotolerantes (Nardone et al., 2010), já que a habilidade das vacas leiteiras em resistir a esta condição está relacionada ao seu nível de adaptação, que é inversamente relacionado ao consumo de matéria seca, produção de calor metabólico e produção leiteira (Aleena et al., 2016; Sejjan et la., 2018). A correlação negativa entre produção de leite e tolerância ao calor mostra que a seleção genética para altos níveis de produção pode impactar a capacidade termotolerante das vacas leiteiras, o que pode ser agravado em regiões com temperatura ambiente e umidade altas durante todo o ano (Campos et al., 2022). Tendo em vista que a produção média anual da raça Girolando cresceu em torno de 60% entre os anos 2000 e 2021 (Silva et al., 2022), os animais desta raça podem estar enfrentando maior dificuldade em manter sua termotolerância em função do consistente aumento da produtividade (Zimbelman et al., 2009; Cardoso et al., 2015) e aumento de temperatura em regiões tropicais e subtropicais. Como exemplo, Santana e colaboradores (2015) em um estudo de avaliação genética utilizando base de dados brasileira apontaram correlação negativa entre produção de leite e termotolerância em vacas Gir.

Em geral, o impacto negativo do estresse por calor sobre parâmetros fisiológicos, consumo de alimentos, produção de leite e bem-estar animal tem sido bastante estudado ao longo dos últimos anos em vacas taurinas da raça Holandesa (Collier et al., 2017). Como exemplo, foi demonstrado que para cada aumento no índice de temperatura e umidade (ITU) entre 72 e 84, há redução diária na produção de leite de 2,1% (Pramod et al., 2021). Em relação ao comportamento ingestivo das vacas leiteiras, alguns autores têm reportado que o estresse por calor reduz a taxa de ruminação e a ingestão de matéria seca, reduzindo indiretamente a produção de leite (Corazzin et al. 2021; Meneses et al., 2021). Outros autores têm sugerido que o estresse por calor modifica a liberação de hormônios fundamentais para a síntese do leite (Ponchon et al., 2017; Baumgard e Rhoads, 2013; Hooper et al., 2021). Complementarmente, alguns autores têm demonstrado que o estresse por calor muda a expressão de receptores dos genes do hormônio do crescimento (GHR), da prolactina (PRLR), do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF1R) e da insulina (INSR) na glândula mamária, sugerindo uma ação direta do estresse por calor sobre as células mamárias (Ouellet et al., 2021; Hooper et al., 2021).

Por outro lado, o impacto do estresse por calor sobre a saúde de glândula mamária apresenta resultados contraditórios. Enquanto estudos observacionais apontam para aumento da contagem das células somáticas do leite, maior incidência de mastite clínica nos meses de verão e também maior número de amostras de leite positivas para *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (Zeinhom et al., 2016; Nars e El-Tarabany, 2017, Dahl e McFadden, 2022), estudos controlados sugerem que a hipertermia induzida pelo estresse por calor não tem influência direta sobre a contagem de células somáticas do leite e prevalência de mastite (Tao et al., 2018). *In vitro*, o aumento da temperatura a 41°C reduziu a capacidade fagocitária dos neutrófilos e aumentou a taxa de apoptose dos monócitos (Catozzi et al. 2020). Além disso, no verão observa-se maior incidência de doenças metabólicas e respiratórias quando comparado ao inverno (Thompson e Dahl, 2012, Dahl e McFadden, 2022), sugerindo um possível efeito negativo do estresse por calor na eficiência do sistema imune (Park et al., 2021).

Contudo, a maioria destes trabalhos foi realizada em vacas holandesas, sabidamente pouco tolerantes ao aumento da temperatura e umidade do

ambiente. São escassos os estudos que avaliam os efeitos do estresse por calor sobre diversos aspectos fisiológicos, produtivos e imunológicos das vacas Girolando, raça oriunda de cruzamento com a raça Gir, considerada termotolerante (McManus et al., 2014). Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar o impacto do estresse por calor sobre parâmetros fisiológicos, comportamento ingestivo, produção e qualidade do leite e expressão de genes relacionados à síntese do leite, inflamação e apoptose em células da glândula mamária de vacas Girolando. A hipótese deste trabalho é que o estresse por calor reduz a produção de leite, altera a expressão de genes relacionados à síntese de leite e apoptose em células da glândula mamária e aumenta a contagem de células somáticas de vacas Girolando.

2. Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Complexo Multiusuário de Bioeficiência e Sustentabilidade da Pecuária (CMB), da Embrapa Gado de Leite (EGL), localizado no município de Coronel Pacheco-MG, latitude $-21^{\circ} 34' 59.99''$ S, longitude $-43^{\circ} 15' 60.00''$ W. As atividades foram aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Embrapa Gado de Leite (CEUA/EGL) sob o protocolo de número 5557190520, aprovado em 30 de julho de 2020. O experimento ocorreu durante o inverno, entre os meses de agosto e setembro.

2.1 Animais

Foram utilizadas 24 vacas da raça Girolando, grau de sangue $\frac{3}{4}$ Holandês $\frac{1}{4}$ Gir, com médias de 561 ± 74 kg de peso vivo, 111 ± 54 em dias de lactação, $19,4 \pm 4,5$ kg/dia de produção de leite e contagem de células somáticas de 183.000 ± 138.000 células/mL. Os animais foram distribuídos nos tratamentos experimentais de forma homogênea, considerando fase de lactação, produção de leite e CCS.

A ordenha foi realizada duas vezes ao dia, 6h e 15h, mantendo sempre o manejo e sendo realizada pelos mesmos ordenhadores, em equipamento DeLaval® (DeLaval, Tumba, Sweden) do tipo linha baixa, espinha de peixe

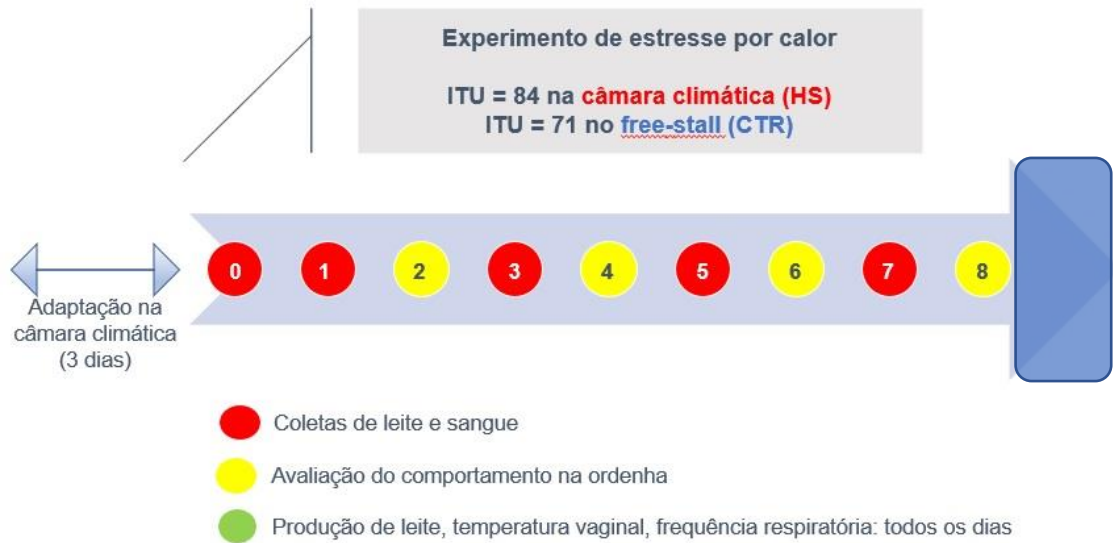
(2x4=8) e sistema de gerenciamento DeLaval DelPro™. O manejo de ordenha contava com teste da caneca para detecção de mastite clínica, pré-dipping, secagem dos tetos com papel toalha e pós-dipping. A sala de ordenha contava com ventiladores que eram acionados em dias mais quentes. A produção de leite e os demais dados relacionados a ordenha foram disponibilizados pelo sistema de controle eletrônico da ordenhadeira.

As vacas receberam a mesma dieta em sistema de mistura total (TMR) dividido em dois tratos diários às 09h e 15h, composto de 85% de silagem de milho e 15% concentrado (42% de farelo de soja, 52,5% de farelo de milho, 4% núcleo mineral e 1,5% de ureia). A dieta foi calculada segundo os requerimentos do NRC (2001) considerando o peso animal, escore corporal e fase de lactação e produção de leite. A quantidade de dieta fornecida foi suficiente para resultar em pelo menos 10% de sobra. Todas receberam uma etiqueta auricular contendo um transponder individual para identificação nos cochos eletrônicos de consumo.

2.2 Desenho experimental

Do total de 24 vacas, 12 vacas foram submetidas a estresse por calor em câmara climática (grupo HS) e as outras 12 vacas foram mantidas em instalação tipo “free stall” equipada com sistema de resfriamento (grupo CTR). O experimento durou doze dias consecutivos, sendo três dias de adaptação das vacas do grupo HS à câmara climática e nove dias em estresse por calor (Figura 1).

Figura 1: Linha do tempo do experimento



As vacas do grupo controle (CTR) foram mantidas no “free stall” durante todo o período experimental, saindo apenas para as duas ordenhas do dia, às 6h e às 15h. Este galpão era equipado com ventiladores alocados em cima das camas e na linha de cochos de alimentação e aspersores, alocados na linha dos cochos e tal sistema era acionado nos dias mais quentes. Já as vacas do grupo em estresse por calor (HS) eram conduzidas pelos ordenhadores para a câmara climática após a ordenha da manhã e lá permaneciam, entre 07h e 15h, diariamente. A câmara climática foi regulada em 35°C de temperatura e 65% de umidade ambiente, com índice de temperatura e umidade (ITU) calculado em 85, considerado estressor grave (Carabano et al., 2014). Após as 15h, as vacas do grupo HS eram levadas para a ordenha, e de lá, encaminhadas para o “free stall”, onde passavam a noite junto com o grupo CTR. Assim, as vacas Girolando em lactação foram submetidas aos tratamentos experimentais: estresse por calor na câmara climática (tratamento HS); e controle no galpão tipo free-stall com sistema de resfriamento (tratamento CTR) entre as 7 e 15 h, por nove dias consecutivos.

2.3 Coleta de dados

Temperatura e umidade dentro da câmara climática e no “free-stall” foram registradas para monitoramento em termômetros e higrômetros digitais (Unity Instruments®) três vezes ao dia (8h, 12h e 15h). Dois equipamentos destes foram instalados no interior da câmara climática e outros dois instalados acima da cama do “free-stall”. Demais dados ambientais foram obtidos na estação meteorológica nas imediações do CMB (INMET). Com os dados de temperatura e umidade, o ITU dos ambientes da câmara climática (grupo HS) e do “free-stall” (grupo CTR) foi calculado de acordo com a fórmula do NRC (1971), onde $ITU = (1.8 \times T + 32) - [(0.55 - 0.0055 \times RH) \times (1.8 \times T - 26)]$, sendo T, a temperatura em graus celsius e RH, a umidade relativa (%). O ITU médio registrado no período de imposição do desafio experimental na câmara climática (7h a 15h) foi de $84 \pm 0,94$ na câmara climática para as vacas submetidas ao tratamento HS e $71 \pm 3,92$ para as vacas submetidas ao tratamento CTR no galpão “free-stall” com sistema de resfriamento. A evolução do ITU médio da câmara climática e no “free-stall” ao longo das 24 horas experimentais são detalhadas na Figura 3. Faixas de ITU utilizadas como referência: ≤ 70 são considerados normais e a vaca leiteira está em conforto térmico; < 70 e ≤ 72 a vaca está em alerta; < 72 e ≤ 78 é faixa crítica para produção de leite; < 78 a ≤ 82 a vaca está em perigo; > 82 a vaca está em emergência (Preez et al. 1990).

A frequência respiratória (FR) e temperatura vaginal (TVag) foram avaliadas como indicadores fisiológicos dos tratamentos impostos, medidas diariamente do dia 0 ao dia 8 do período experimental. A FR foi medida por meio da contabilização do número de movimentos no flanco por 15 segundos, multiplicados por quatro, duas vezes ao dia (9h e 14h). A temperatura vaginal (TVag) foi aferida a cada 60 minutos durante todo o período experimental utilizando dispositivo plástico intravaginal e data loggers (iButton®, Whitewater, USA) (Ribeiro et al., 2019).

Antes das ordenhas experimentais foram realizadas avaliações clínicas diárias do úbere de cada vaca antes da ordenha, por inspeção e palpação para detecção de possíveis alterações inflamatórias: edema, temperatura à palpação quando comparado ao quarto contralateral, dor à palpação e rubor. A produção de leite da ordenha da manhã e da ordenha da tarde e os demais dados

relacionados a ordenha foram obtidos do sistema de gerenciamento eletrônico da ordenhadeira.

O comportamento animal foi avaliado nos dias 2, 4, 6 e 8 durante a ordenha da manhã por um único observador treinado tendo como referências os comportamentos definidos e descritos por Marçal-Pedroza et al. (2020) e Marçal-Pedroza et al. (2021). Durante a ordenha foram observados os seguintes comportamentos: número de passos, número de coices e as ocorrências dos comportamentos de micção, defecação e ruminação. De modo geral, o comportamento número de passos e coices refere-se apenas às patas traseiras e foi registrado em dois momentos da ordenha: na preparação do úbere (desde o primeiro contato do ordenhador com os tetos da vaca) e no momento da colocação do conjunto de teteiras (do primeiro até o último copo ser acoplado). Os comportamentos de micção, defecação e ruminação começaram a ser registrados a partir da preparação do úbere até a completa retirada de todo o conjunto de teteiras, sendo assinalados na planilha uma única vez (sim ou não).

O comportamento ingestivo foi avaliado nas vacas do grupo CTR através do consumo diário de matéria natural diário registrado automaticamente pelos cochos eletrônicos instalados no “free stall”. Já o consumo das vacas na câmara climática (HS) foi realizado manualmente, sendo que os alimentos fornecidos foram pesados antes da entrada e as sobras pesadas após a saída dos animais. O resultado do consumo foi expresso em quilo de matéria seca/dia.

2.4 Coleta e análise de amostras de leite

Dois amostras compostas de leite (referente aos quatro quartos mamários) de cada vaca foram coletadas na ordenha da manhã, nos dias 0, 1, 3, 5 e 7 do experimento. A primeira delas foi coletada antes da ordenha, em frasco estéril de vidro para as seguintes análises: (i) microbiológica, (ii) contagem diferencial de células e (iii) expressão gênica em células do leite. Essas amostras foram coletadas diretamente dos tetos de cada vaca, seguindo rigorosa assepsia conforme descrito em Mendonça et al. (2012) e foram mantidas sob refrigeração até o seu processamento, no mesmo dia da coleta. A segunda amostra foi coletada ao final da ordenha, diretamente do copo medidor acoplado à ordenha, em frasco de 50 mL contendo conservante bronopol® (2-bromo-2-nitropropane-

1-diol) para análise da CCS e composição do leite: teores de gordura, proteína, extrato seco total (EST), extrato seco desengordurado (ESD), ureia e caseína.

2.4.1 Análise composicional, microbiológica e de componentes celulares do leite

As amostras coletadas para composição do leite CCS foram encaminhadas sob refrigeração ao Laboratório da Rede Brasileira de Qualidade do Leite, em Juiz de Fora/MG e foram analisadas em equipamento composto pelos aparelhos Bentley 2000 e Somacount 300 conforme recomendações do IDF (1995) e IDF (1996). Os resultados de composição foram expressos em massa/massa (%) e os de CCS expressos em número de células somáticas x 10³ ml⁻¹.

A análise microbiológica foi realizada no Laboratório de Microbiologia do Leite da EGL de acordo com o “National Mastitis Council” (NMC, 1987) seguindo as adaptações propostas por Brito e Brito (1999). Após inoculação de 0,01mL de cada amostra de leite, as placas de ágar-sangue foram examinadas em 24 e 48 horas de incubação. Após 24 horas, os isolados foram inoculados em placas de ágar BHI por mais 24 horas. Em seguida, foi realizado esfregaço corado pelo método de Gram para verificação da morfologia e coloração do microrganismo. Cocos gram-positivos foram diferenciados pelo teste da catalase nos gêneros *Streptococcus* e *Staphylococcus*. Para as bactérias do gênero *Staphylococcus*, foi empregado o teste da coagulase para diferenciá-las em coagulase-positivo (*S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus*) e coagulase-negativo (*S. chromogenes*, *S. simulans*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*). Teste confirmatório de aglutinação diferenciou *S. aureus* dos outros coagulase-positivo. Para a diferenciação de *Streptococcus* sp. foram realizados os testes de CAMP, esculina, bile-esculina, NaCl e hipurato (NMC, 1987).

Para contagem diferencial de células (CDC) do leite foi realizado esfregaço em lâmina, adaptado de Paape et al. (1965). As lâminas foram confeccionadas em duplicata com 0,01 mL da amostra e após secas e fixadas em fixador Carnoy, foram coradas em pyronin-y-verde de metila (PYMG). Os esfregaços de leite corados foram examinados em microscopia de campo claro, com magnitude de 100X. Os leucócitos foram diferenciados em neutrófilos,

monócitos, linfócitos, basófilos e eosinófilos e ainda foram contabilizadas as células “não identificadas”, que não se enquadraram na classificação dos leucócitos. Foram contadas 200 células e o número de células de cada tipo dos dias 0, 3 e 7 foi somado e a média calculada. Em seguida, foram calculadas as porcentagens para posterior análise estatística.

2.4.2. Expressão gênica em células presentes no leite

Para a análise da expressão gênica, foram utilizadas as amostras de leite coletadas no dia 07 do experimento. A separação das células do leite foi realizada por centrifugação a 1500 x g durante 15 minutos a 4°C de todo o volume do leite obtido, seguida de sucessivas lavagens com solução de PBS estéril. O pellet de células recuperado foi armazenado em ultrafreezer a -80°C. Para extração do RNA total das células mamárias foi empregado o kit de extração de RNA total PureLink RNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). O protocolo iniciou-se com a lise das células na presença de isotiocianato de guanidina e 2-mercaptoetanol, capazes de proteger o RNA de RNases endógenas. Após homogeneização, adicionou-se etanol e a amostra foi processada através de uma coluna contendo membrana de sílica na qual o RNA se liga. O RNA purificado foi então eluído com água livre de RNases e imediatamente prosseguiu-se com a análise da concentração e qualidade de cada amostra obtida. O RNA foi avaliado por densidade óptica em absorbâncias de 260 e 280 nm e a razão de absorção de 260/280 foi de aproximadamente 2,0. A integridade do RNA também foi analisada em gel de agarose desnaturante. O RNA eluído foi submetido à reação de degradação do DNA para evitar qualquer tipo de contaminação na reação de amplificação do fragmento de interesse na amostra em estudo. Para tanto, o DNA foi degradado com 1 U da enzima DNase (Promega) em solução tamponada com 40 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM MgSO₄ e 1 mM CaCl₂ durante 30 minutos a 37°C. Em seguida a DNase foi inativada (2 mM EGTA, pH 8,0) aquecendo o tubo de reação a 65°C durante 10 minutos. O RNA total das amostras foi reverso-transcrito em um volume final de 20 µL empregando-se a enzima GoScript Reverse Transcriptase (Promega). Resumidamente, o protocolo iniciou-se com a incubação do RNA com 0,5 µg de oligonucleotídio oligo-dT (Promega) por 5 minutos a 70°C. Em seguida, foi

adicionado ao tubo de reação tampão 1X, 3,0 mM de MgCl₂, 0,5 mM de dNTP, 40 unidades de inibidor de RNases e 1,0 µL da enzima transcriptase reversa. A reação foi conduzida a 42°C durante 60 minutos, seguindo por 15 minutos a 70°C e resfriamento a 4°C.

O estudo da amplificação dos genes de interesse foi realizado pela técnica de qRT-PCR qualitativo relativo utilizando o sistema SybRGreen (Life Technologies, Carlsbad, CA). O volume total de reação foi de 20 µL composto de 1,0 µL de cDNA (concentração média de 10 ng/µL), 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 10 µL Sybr Green PCR Master Mix (Life Technologies, Carlsbad, CA) que contém todos os componentes necessários para a reação incluindo o fluoróforo Sybr Green I. Todas as reações foram realizadas no termociclador StepOnePlus® Applied Biosystem (Life Technologies, Carlsbad, CA). As etapas da PCR quantitativa foram as seguintes: estágio de desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, e anelamento dos primers e extensão a 60°C por 1 minuto. Cada amostra foi analisada em duplicata, tanto para os genes alvo como para o gene controle endógeno. As sequências dos 28 transcritos estudados estão descritas no Anexo I. Todas as amplificações foram finalizadas com a curva de dissociação ou curva de *melting*, confirmando a especificidade da reação e ausência de formação de dímeros de *primers* ou qualquer outro produto inespecífico. A eficiência da RT-PCR foi realizada para todos os pares de primers e os tamanhos dos fragmentos produzidos foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Foram utilizados três genes de referência endógena (Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase – GAPDH, β-actina e Ubiquitina C - UBC), os quais foram selecionados com base na eficiência e estabilidade de expressão entre os tratamentos estudados. A expressão gênica foi quantificada usando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (2008) comparando a expressão dos genes alvo com a média geométrica dos genes de referência. Para tanto, foi calculado: $\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct \text{ tratamento} - \Delta Ct \text{ controle})$. A equação proposta Schmittgen e Livak (2008) possibilita a comparação das mudanças no perfil de expressão gênica de cada gene de interesse em relação a um calibrador (tratamento controle) e entre diferentes amostras. O número dois na base da fórmula representa que a quantidade de material genético da reação é dobrada a cada novo ciclo e o Ct se refere a ciclo “threshold” que é a quantidade de ciclos

necessários para que a amostra atinja o limiar de detecção na fase exponencial da amplificação.

2.4.3. Análises hormonais

Os parâmetros hormonais foram avaliados no sangue periférico de todas as vacas do experimento. Para tal, as coletas de sangue foram realizadas nos dias 0, 1, 3, 5 e 7 do experimento. Às 9h, foram colhidos 9,0mL de sangue de cada animal pela veia coccígea, em função da facilidade de contenção no brete, seguindo rigorosa assepsia da região onde a agulha foi inserida. O tubo continha heparina para obtenção do plasma e posterior análise de cortisol (CORT), tiroxina (T4), triiodotironina (T3), fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-1) e insulina (INS) e foi mantido sob refrigeração até seu processamento. No laboratório, o tubo foi centrifugado a 1.500g durante 15 minutos para separação do plasma e congelados a -20°C. Os hormônios CORT, T4, T3, IGF-1 e INS foram analisados em duplicata no plasma por análise de imunoenensaio (ELISA), utilizando kit comercial de acordo com as instruções do fabricante (Monobind Inc, Lake Forest, Ca 92630, EUA). Os mesmos foram validados pela demonstração de curvas entre concentrações padrão e plasma diluído em série. Os coeficientes de variação intra e inter-ensaio (CV) foram inferiores a 3,5 e 6,0%, respectivamente, para todos os hormônios.

2.5 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas no Software SPSS® Statistics versão 8.0 (SPSS, 1998). Os dados foram avaliados quanto à normalidade da distribuição, levando em consideração o número de observações, sendo teste Kolmogorov-Smirnov para variáveis com número de observações maior que 50 e o teste Shapiro-Wilk para variáveis com número de observações menor ou igual a 50.

As variáveis com distribuição normal (teor de proteína, ureia, caseína, consumo, CORT, T3, T4, IGF-1, INS e expressão gênica) foram analisadas pela Análise de Variância (ANOVA) utilizando modelos lineares generalizados, considerando os efeitos de tratamento, dia de coleta e sua interação como

efeitos fixos e animal como efeito aleatório. Para avaliar a expressão gênica foi realizada uma análise de variância, utilizando um modelo linear generalizado, considerando o efeito fixo de tratamento e animal como efeito aleatório. Para os efeitos significativos nas variáveis paramétricas, as médias foram comparadas usando o teste de Fisher com significância de $p \leq 0,05$. Os dados destas variáveis foram apresentados nas tabelas e gráficos como média \pm erro-padrão médio.

Já as variáveis com distribuição não normal (TVag, FR, produção de leite, CCS, teor de gordura, lactose, EST, ESD, número de passos, porcentagem de neutrófilos, monócitos, linfócitos, basófilos e eosinófilos) as medianas foram comparadas pelo teste de Mann-Whitney e os dados foram apresentados nas tabelas como medianas \pm erro-padrão médio. Os dados de cultura microbiológica foram avaliados de forma descritiva e apresentados em porcentagem de amostras positivas dentro dos tratamentos HS e CT para os patógenos isolados, sem comparação entre as médias.

Além disso, os resultados de TVag e FR foram categorizados como inferior ou superior ao limiar fisiológico; sendo entre 38,0 e 39,3°C para TVag (Robinson, 1999; West, 2002) e entre 24 e 36 movimentos/min para FR (Stöber, 1993; Ferreira et al., 2006). Para a ocorrência dos comportamentos de micção, defecação e ruminação, os resultados foram categorizados como sim (manifestou o comportamento pelo menos uma vez durante a ordenha) ou não (não manifestou o comportamento). Estas categorias foram analisadas por meio de distribuição de frequência usando o Teste do Qui-quadrado com significância de $p \leq 0,05$ e calculada a razão de risco (OddsRatio). Para essas variáveis, os dados foram apresentados nas tabelas em porcentagem.

3. Resultados

3.1. Parâmetros fisiológicos e hormonais

Os parâmetros fisiológicos e hormonais dos grupos HS e CTR mensurados durante o período experimental encontram-se listados na Tabela 1. Para temperatura vaginal média (TVag), foram considerados os dados registrados das 7h às 15h, período no qual as vacas estavam em estresse por

calor na câmara climática. As médias das concentrações plasmáticas dos hormônios avaliados referem-se as coletas dos dias 0, 1, 3, 5 e 7.

Tabela 1. Temperatura vaginal nas oito horas de estresse por calor na câmara climática e horário correspondente no free-stall (TVag), frequência respiratória média (FR), concentração plasmática de cortisol (CORT), tiroxina (T4), triiodotironina (T3), IGF-1 e insulina (INS) dos grupos HS e CTR durante o período experimental

	Tratamentos			Valor de p		
	HS (n = 12)	CTR (n = 12)	EPM	T ¹	D	TxD
TVag*	39,13a	38,75b	0,11	0,00		
FR (min)*	44	48	0,88	0,93		
CORT (ng/mL)	18,65	15,46	1,83	0,57	0,18	0,03
T4 (ng/mL)	4,67	4,50	0,19	0,90	0,01	0,22
T3 (ng/mL)	1,44	1,41	0,04	0,70	0,01	0,18
IGF-1 (pg/mL)	24,16	23,09	0,80	0,79	0,03	0,20
INS (ng/mL)	0,36	0,35	0,02	0,89	0,82	0,94

* Variável não paramétrica, teste Mann-Witney para comparação entre medianas

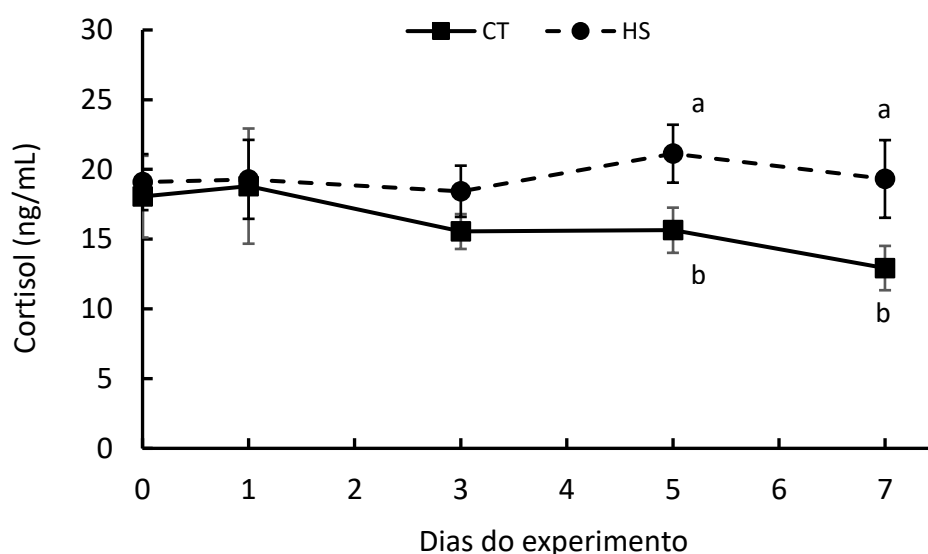
¹ T - efeito de tratamento, D - efeito de dia, TxD - interação tratamento x dia

^{a,b} Medianas na mesma linha seguidas de letras distintas diferem significativamente ($p \leq 0,05$)

EPM: erro padrão da média

Vacas do grupo HS apresentaram temperatura vaginal significativamente maior que vacas do grupo CTR. Não houve efeito significativo de tratamento para FR, T4, T3, IGF1 e INS. Contudo, houve interação significativa entre tratamento e dia para o hormônio cortisol, sendo que o grupo HS apresentou maiores concentrações nos dias 5 e 7 quando comparado ao grupo CTR (Figura 2).

Figura 2. Concentração de cortisol plasmático nos dias 0, 1, 3, 5 e 7 do período experimental nos grupos HS e CT



Na Tabela 2 são apresentadas as porcentagens de vacas dos grupos HS e CT que apresentaram valores superiores ao padrão fisiológico de TVag e FR. Foram considerados como intervalo normal entre 38,0 e 39,3°C para TVag (Robinson, 1999; West, 2002) e entre 24 e 36 movimentos/min para FR (Stöber, 1993; Ferreira et al., 2006). Para tanto, foi considerada a mesma base de dados utilizada para os resultados da Tabela 1 para estes dois parâmetros.

Tabela 2. Porcentagens e números de amostras/total de vacas com valores de temperatura vaginal (TVag) e frequência respiratória (FR) superiores aos valores fisiológicos dos grupos HS e CTR durante o período experimental

Tratamento	Porcentagem de registros com	
	TVag \geq 39,3°C	FR \geq 36
HS % (nº amostras)	35,2a (314/891)	78,2 (169/216)
CTR % (nº amostras)	5,6b (50/891)	73,1 (158/216)

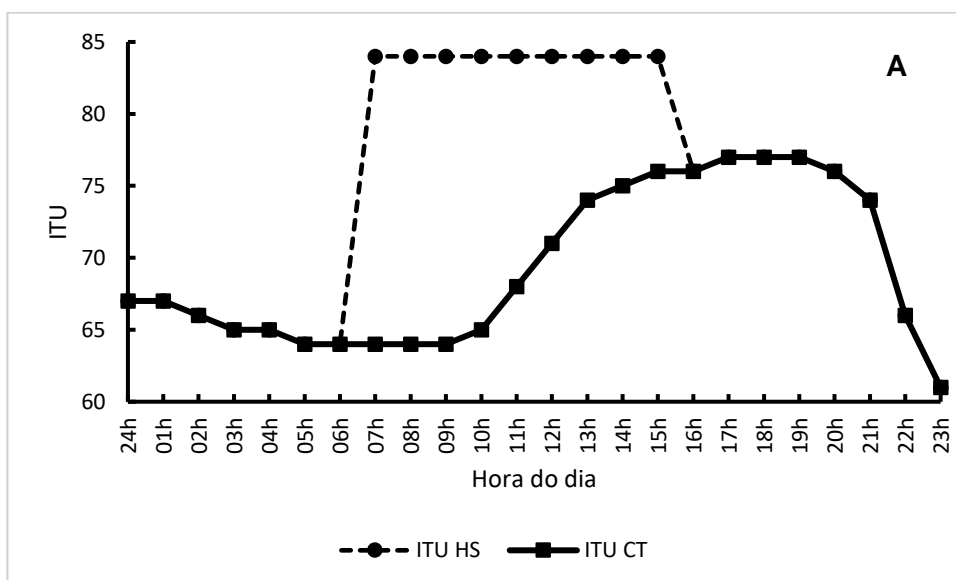
Valores na mesma coluna seguidas de letras minúsculas distintas diferem significativamente pelo teste do qui-quadrado ($p \leq 0,05$)

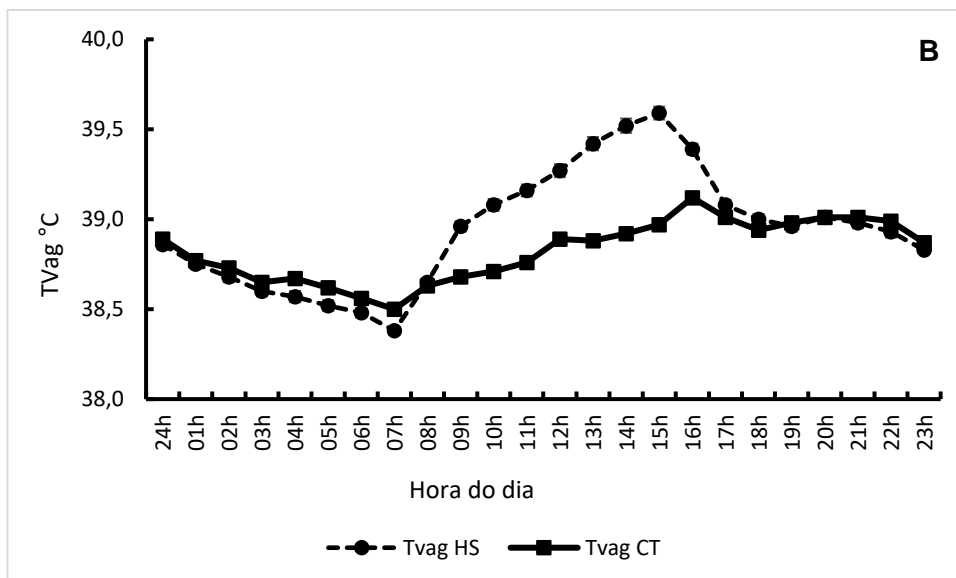
Nesta análise, houve diferença significativa na porcentagem de vacas HS e CT com TVag acima do valor fisiológico (39,3°C). A probabilidade de vacas Girolando submetidas ao estresse por calor apresentarem TVag superior ao

padrão fisiológico foi 29% maior quando comparado as vacas controle, sendo a razão de risco calculada 8 vezes maior (Odds Ratio = 9,15). Já para FR, não houve diferença na porcentagem entre grupos.

A Figura 3 apresenta em (A): a evolução do ITU médio ao longo das horas na câmara climática (ITU HS) e no “free-stall” (ITU CTR) e em (B): evolução da temperatura vaginal média ao longo das horas das vacas HS e CTR. Ambos os gráficos são médias de ITU e TVag ao longo dos nove dias de estresse por calor.

Figura 3: Evolução do ITU médio (A) e evolução da temperatura vaginal média (B) dos grupos HS e CTR ao longo das horas do dia durante o experimento (dias 0 a 8)





É possível observar o aumento da temperatura vaginal média das vacas HS durante a imposição do estresse por calor (entre 7 e 15 horas), quando comparado as vacas controle. Após este período, a temperatura vaginal é semelhante para vacas HS e CTR.

3.2. Produção e qualidade do leite

Os resultados relacionados à produção e qualidade do leite das vacas encontram-se descritos na Tabela 3. Para produção de leite, foi considerada a média diária das vacas do grupo HS e CTR dos dias 0 a 8 do período experimental. Para CCS e composição do leite, foi considerada a média das amostras de leite coletadas nos dias 0, 1, 3, 5 e 7.

Tabela 3. Resultados da produção de leite (kg/dia), composição (teor de gordura, proteína, lactose, EST, ESD, ureia e caseína) e contagem de células somáticas (células/mL) do leite de vacas Girolando submetidas aos tratamentos HS e CTR durante o período experimental

	Tratamentos			Valor de p		
	HS	CTR	EPM	T ¹	D	TxD
	(n =12)	(n =12)				
Leite (kg/d)*	17,3a	18,10b	0,21	0,01		
CCS (células/mL)* ²	87	91	16,23	0,20		
Gordura (%)*	3,78	3,32	0,09	0,22		
Lactose (%)*	4,61	4,58	0,02	0,58		
EST (%)*	12,92	12,43	0,11	0,35		
ESD (%)*	8,96	9,02	0,04	0,80		
Proteína (%)	3,41	3,46	0,03	0,39	0,94	0,79
Ureia (%)	18,07	18,02	0,37	0,94	0,09	0,98
Caseína (%)	3,24	3,32	0,04	0,30	0,01	0,89

* Variável não paramétrica, teste Mann-Witney para comparação entre medianas

¹ T - efeito de tratamento, D - efeito de dia, TxD - interação tratamento x dia

² CCS - contagem de células somáticas, valores x 10³/mL

^{a,b} Medianas na mesma linha seguidas de letras distintas diferem significativamente (p≤0,05)

EST: extrato seco total; ESD: extrato seco desengordurado; EPM: erro padrão da média

A produção leiteira das vacas do grupo HS foi significativamente menor quando comparada as vacas do grupo CTR (17,3 ± 3,36 versus 18,10 ± 3,97 Kg/dia) durante o período experimental. Porém, não houve diferença significativa entre tratamentos em relação a composição e a contagem de células somáticas do leite.

3.3. Comportamento na ordenha e comportamento ingestivo

O comportamento das vacas Girolando durante a ordenha, bem como o consumo médio de matéria seca por vaca/dia (kg) durante o período experimental são apresentados na Tabela 4. As avaliações do comportamento foram realizadas nos dias 2, 4, 6 e 8 do experimento e o consumo de matéria seca foi registrado diariamente, do dia 0 ao 8, sendo calculada a média em kg por animal neste período.

Tabela 4. Resultados da avaliação do número de passos e de coices durante a preparação do úbere, porcentagem da ocorrência dos comportamentos de micção, defecação e ruminação durante a ordenha e consumo total de matéria seca entre grupos HS e CTR durante todo período experimental

Comportamento	HS	CTR	EPM	Valor de p
Passos (n ^o)	2,50	2,00	0,86	0,55
Coices (n ^o) [#]	-	-	-	
Frequência de micção (%)	17	10		0,37
Frequência de defecação (%)	21	17		0,60
Frequência de ruminação (%)	25a	48b		≤0,01
Consumo de matéria seca (Kg/dia)	17,2a	18,1b	0,62	≤0,05

[#] O número de coices foi próximo de zero, não sendo possível analisar estatisticamente este comportamento.

Médias na mesma coluna seguidas de letras minúsculas distintas diferem significativamente ($p \leq 0,05$).

Houve diferença significativa entre as vacas HS e CTR para frequência de ruminação (25 versus 48). A probabilidade de as vacas em estresse por calor ruminarem na sala de ordenha foi 23% menor do que vacas controle, sendo a razão de risco de 1,7 (OR=2,76). Além disso, o consumo diário (kg/MS) dos animais do grupo HS foi significativamente menor quando comparado ao grupo CTR. Não houve diferença entre tratamentos para os demais comportamentos estudados.

3.4. Análise composicional, microbiológica e de componentes celulares do leite

Os resultados da cultura microbiológica do leite de cada vaca estão descritos na Tabela 5. As amostras foram colhidas nos dias 0,1, 3, 5 e 7 do experimento. Apenas duas amostras do total de 144 apresentaram contaminação do material analisado, que ocorre quando mais de três tipos bacterianos crescem na placa de cultivo, fato geralmente relacionado à erro de coleta da amostra.

Tabela 5. Resultados (em porcentagem) da cultura microbiológica do leite de amostras compostas de cada animal durante o período experimental

Tratamentos	Isolado	DO	D1	D3	D5	D7
HS*	Sem crescimento	54,5	66,7	75,0	75,0	75,0
	<i>Staphylococcus</i> sp.	27,3	25,0	8,3	8,3	8,3
	<i>Staphylococcus</i> coagulase positivo	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	<i>Streptococcus</i> sp.	0,0	8,3	8,3	8,3	16,7
	<i>Streptococcus uberis</i>	18,2	0,0	8,3	8,3	0,0
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
CTR*	Sem crescimento	81,8	75,0	66,7	75,0	75,0
	<i>Staphylococcus</i> sp.	9,1	16,7	25,0	16,7	16,7
	<i>Staphylococcus</i> coagulase positivo	9,1	8,3	8,3	8,3	8,3
	<i>Streptococcus</i> sp. e <i>S. uberis</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Nenhuma amostra apresentou, ao longo do experimento, cultura microbiológica positiva para os principais patógenos causadores da mastite, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*. A predominância foi a de ausência de crescimento bacteriano (média de 69,2% para HS e 74,7% para CT), seguido de *Staphylococcus* sp. (média de 15,4% para HS e 16,8% para CT). O grupo HS apresentou média de isolamento de *Streptococcus uberis* em 7% das amostras e o grupo CT apresentou média de isolamento de *Staphylococcus* coagulase positivo (não *S. aureus*) em 8,5% das amostras ao longo dos dias do experimento.

A Tabela 6 apresenta, em porcentagem, os resultados da contagem diferencial de células das vacas Girolando submetidas ao estresse por calor ou tratamento controle, sendo as amostras de leite coletadas nos dias 0, 3 e 7 do experimento. Para cada amostra foi realizado o esfregaço em duplicata, sendo o valor total de cada tipo de célula somado, e a média e a porcentagem calculadas.

Tabela 6. Porcentagem dos diferentes leucócitos encontrados em esfregaço de amostras de leite das vacas Girolando dos grupos HS e CT

Tipo de célula (%)	Tratamentos		Valor de p	
	HS (n =12)	CT (n =12)	EPM	T ¹
Neutrófilos	68	69	2,39	0,87
Linfócitos	6a	3b	0,59	<0,05
Monócitos	1	1	0,31	0,34
Basófilos ²	-	-	-	
Eosinófilos ²	-	-	-	
Não identificado	25	27	2,14	0,45

¹ T - efeito de tratamento

² Número de basófilos e eosinófilos foi próximo de zero, não sendo possível analisar estatisticamente essas células.

^{a,b} Medianas na mesma linha seguidas de letras distintas diferem significativamente ($p \leq 0,05$)

EPM: erro padrão da média

A maior prevalência de células no leite foi de neutrófilos, seguida das células não identificadas. Apenas para linfócitos houve diferença percentual entre os grupos HS e CT (6 versus 3%).

3.5. Expressão gênica em células do leite

A Tabela 7 e a Figura 4 apresentam os resultados relacionados à expressão gênica das células do leite das vacas dos grupos HS e CT. Os genes alvo relacionam-se com respostas ao estresse por calor, liberação de cortisol, processo de apoptose, hormônios da síntese do leite e resposta imune. A descrição completa dos primers, nome, tamanho esperado de amplicon e código no GenBank estão descritos no Anexo I (página 105).

Tabela 7. Expressão gênica mensurada nas células da glândula mamária de vacas Girolando em lactação, submetidas ao estresse por calor (HS) em relação ao tratamento controle (CT)

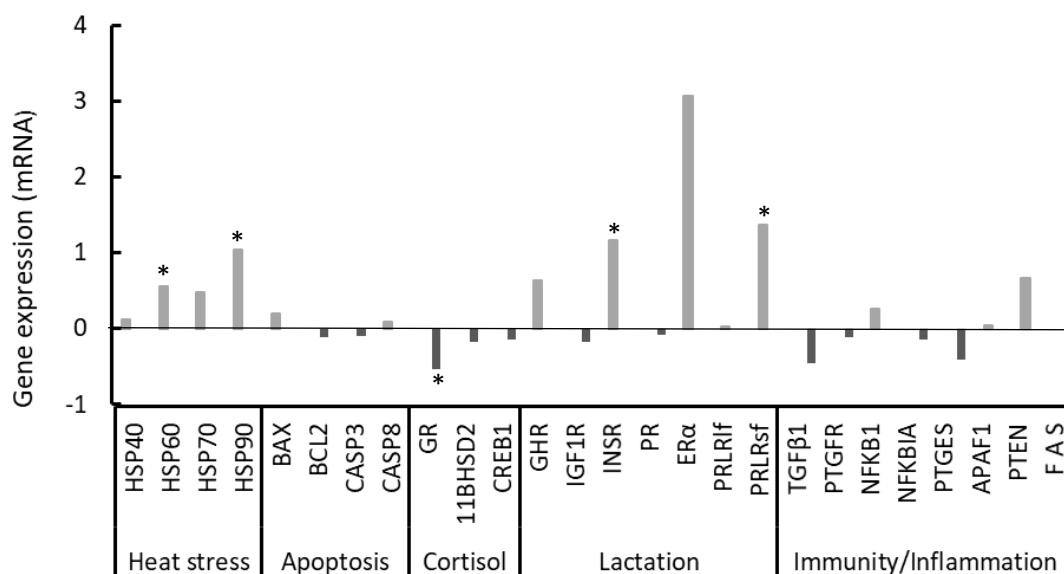
Sigla do Gene	Tratamentos			Valor de p
	HS (n = 12)	CT (n =12)	EPM ²	
<i>HSP40</i>	1,02	1,00	0,22	0,96
<i>HSP60</i>	1,56a	1,00b	0,13	0,01
<i>HSP70</i>	1,47	1,00	0,22	0,34
<i>HSP90</i>	2,03a	0,99b	0,20	0,02
<i>BAX</i>	1,19	0,99	0,12	0,49
<i>BCL2</i>	0,88	1,00	0,07	0,45
<i>CASP3</i>	0,99	1,00	0,03	0,92
<i>CASP8</i>	1,03	1,00	0,32	0,97
<i>GR</i>	0,47b	1,00a	0,08	0,001
<i>MR</i> ¹	-	-	-	-
<i>11BHSD2</i>	0,83	1,00	0,20	0,88
<i>CREB1</i>	0,86	1,00	0,15	0,74
<i>GHR</i>	1,63	1,00	0,57	0,69
<i>IGF1R</i>	0,83	1,00	0,15	0,76
<i>INSR</i>	2,17a	1,00b	0,25	0,01
<i>PR</i>	0,92	1,00	0,25	0,93
<i>ERα</i>	4,06	1,00	1,06	0,21
<i>Erβ</i> ¹	-	-	-	-
<i>PRLRlf</i>	1,03	1	0,20	0,95
<i>PRLRsf</i>	2,37a	1,00b	0,45	0,01
<i>TGFβ1</i>	0,55	1,00	0,25	0,48
<i>PTGFR</i>	0,88	1,00	0,26	0,44
<i>NFKB1</i>	1,29	1,03	0,22	0,53
<i>NFKBIA</i>	0,85	1,00	0,17	0,68
<i>PTGES</i>	0,59	1,00	0,17	0,35
<i>APAF1</i>	1,04	1,00	0,18	0,91
<i>PTEN</i>	1,68	1,01	0,18	0,41
<i>F A S</i>	0,67	1,00	0,20	0,49

¹ Não houve expressão dos genes dos receptores dos mineralocorticoide (MR) e de estrogênio (Er β).

²EPM = Erro padrão da média

^{a,b} Médias seguidas de letras distintas na mesma linha apresentam efeito significativo ($p \leq 0.05$)

Figura 4. Expressão de genes associados com o estresse térmico, apoptose, produção de cortisol, hormônios da síntese do leite e resposta imune em células isoladas do leite de vacas Girolando submetidas ao estresse térmico por calor (HT) em relação a animais controle (CTR). A expressão gênica (eixo y) foi calculada em função do efeito estimulatório (upregulation) ou inibitório (downregulation) do estresse por calor segundo a fórmula $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct HS - \Delta Ct CTR$



*Diferença significativa ($p \leq 0.05$) entre os tratamentos HT e CT

O estresse por calor aumentou significativamente a expressão dos genes das proteínas de choque térmico (*HSP60* e *HSP90*) e dos receptores de insulina (*INSR*) e de prolactina (*PRLRsF*) das vacas HS quando comparadas às vacas controle. O estresse por calor também diminuiu significativamente a expressão do receptor de glicocorticoide (*GR*) nas vacas HS quando comparado às vacas CTR.

4. Discussão

A temperatura corporal é considerada o melhor indicador do estresse por calor em vacas leiteiras (Tao et al., 2018). No presente estudo, a TVag média das vacas do grupo HS foi significativamente superior quando comparada as

vacas CTR durante a imposição do estresse por calor. Para vacas holandesas, a temperatura corporal acima de 39,3°C é um indicativo de que estão em estresse por calor (Shultz, 1984; Berman et al., 1985; Robinson, 1999; West, 2002). Apesar de não haver um limiar estabelecido para temperatura corporal para vacas Girolando, alguns trabalhos realizados com esta raça descreveram resultados semelhantes ao do presente estudo (Costa et al., 2015; Carvalheira et al. 2021). Comparativamente, vacas Holandesas tem menor eficiência em regular sua temperatura corporal durante exposição ao estresse por calor (Smith et al., 2013) e a resiliência das vacas Girolando a este estressor aparentemente está relacionada a sua maior eficiência em perder calor por meio do aumento da vasodilatação periférica, da taxa de sudorese e da frequência respiratória, mantendo assim sua temperatura corporal dentro da faixa normal de variação (Alfonzo et al., 2016; Santos et al., 2021). Apesar da TVag das vacas HS ter sido influenciada pelo estresse por calor, não houve diferença entre tratamentos para a FR sugerindo que as vacas Girolando perdem calor eficientemente quando desafiadas. Ou seja, animais resilientes postergam o início das respostas relacionadas ao estresse por calor, o que não os impedem de sofrer os efeitos deste estressor (Moran, 2002; Piccione et al., 2003).

Deste modo, quando comparado às vacas CTR, as maiores concentrações de cortisol das vacas HS no 5º e 7º dia experimental refletem a resiliência das vacas Girolando após a imposição do estresse por calor na câmara climática. Pois, o aumento do cortisol durante o estresse promove ajustes fisiológicos positivos para sua adaptação, como mobilizar energia extra para manutenção da homeotermia (Itoh et al., 1998; Mormede et al., 2007; Bomfim et al., 2022). Já para os hormônios T4 e T3, não houve diferença significativa entre as vacas HS e CTR, efeito contrário ao esperado, já que naquelas sob estresse por calor ocorre redução da liberação dos hormônios tireoideanos para limitar a produção de calor metabólico (Aleena et al., 2016, Bagath et al., 2019). Segundo Farooq et al. (2010), a resposta da glândula tireoide ao estresse por calor é bastante lenta, o que pode também justificar a ausência de alteração no grupo HS.

Entretanto, o estresse por calor afetou significativamente a produção de leite das vacas HS, sendo 4,5% menor que as vacas do grupo CTR. Muitos autores já demonstraram que a produção de leite é seriamente afetada pelo

aumento da temperatura ambiente (West, 2003; Rhoads et al., 2009; Wheelock et al., 2010; Polsky e Von Keyserlingk, 2017), mas a grande maioria dos trabalhos foi realizada com animais da raça Holandesa (HPB). Corroborando com os resultados do presente estudo, outros autores também descreveram o efeito negativo do estresse por calor na produção leiteira em vacas de diferentes graus de sangue Girolando (Mellado et al., 2011; Cardoso et al., 2015; Costa et al., 2015; Alfonzo et al., 2016; Franzoni et al., 2018). Segundo Baumgard e Rhoads (2013), a redução do consumo de alimentos é responsável por 30 a 50% da redução na produção de leite. Resultado semelhante foi encontrado no presente estudo, no qual consumo de matéria seca e ruminação foram menores no grupo HS. De fato, o estresse por calor modifica o comportamento ingestivo e reduz significativamente o consumo de matéria seca (Bouraoui et al., 2002; West, 2003; Rhoads et al., 2009; Moretti et al., 2017).

Apesar da concentração de insulina ser similar para as vacas HS e CTR, houve aumento significativo na expressão do gene receptor (*INSR*) nas vacas HS quando comparada as vacas CTR. Neste caso, o aumento da expressão de *INSR* nas células mamárias sugere um aumento da taxa metabólica local. Porém, este aumento de expressão parece não ter relação com a síntese de leite, pois as vacas HS produziram menos leite que as vacas CTR. Normalmente, a insulina é um potente inibidor lipolítico, o que explica em parte a menor mobilização de tecido adiposo em vacas sob estresse por calor (Sejian et al. 2008, Rhoads et al., 2009; Sammad et al., 2020). Deste modo, o aumento da expressão da *INSR* sugere que o estresse por calor também modifica a taxa metabólica das células mamárias, sem promover o aumento de síntese de leite.

No presente estudo, também houve aumento significativo na expressão gênica do *PRLRs* nas células mamárias das vacas HS quando comparado as vacas CTR. Porém, as vacas HS produziram significativamente menos leite que as vacas CTR. Diferentemente nas vacas Holandesas submetidas ao estresse por calor no período seco (Hooper et al., 2020, Ouellet et al. 2021), a menor expressão do *PRLRs* foi associada a uma menor produção de leite na lactação subsequente. Embora as interações entre a PRL e seu receptores modulem a síntese de leite, o efeito do estresse por calor sobre seus receptores nas células mamárias durante a lactação ainda não está definido. Conjuntamente, os efeitos descritos na expressão dos genes *INSR* e *PRLRs* confirmam a hipótese que o

estresse por calor modifica a interação hormônio-receptor nas células mamárias, podendo ser um dos fatores que causam redução na síntese de leite durante o estresse por calor.

Uma outra possibilidade que tem sido estudada para justificar a redução da produção de leite frente ao estresse por calor para além da redução da ingestão de alimentos e da captação de nutrientes para a glândula mamária é o aumento na taxa de apoptose das células epiteliais mamárias, já que o número destas células e sua atividade secretora são fatores chave na regulação da produção de leite (Li et al., 2015; Herve et al., 2016; Lengi et al., 2022). Em uma extensa revisão, Tao et al. (2018) descrevem estudos sobre a expressão de genes de células mamárias epiteliais envolvidos na estrutura celular, biossíntese, transporte, proteínas de degradação e reparação, o que sugeriria uma resposta coordenada para garantir a sobrevivência destas células. Entretanto, no presente estudo, os genes alvo relacionados à apoptose celular (*BAX*, *BCL2*, *CASP3*, *CASP8*, *APAF1* e *FAS*) não se mostraram diferentes nas vacas HS quando comparadas ao grupo CTR. O aumento da expressão do gene receptor da prolactina (*PRLRs*) encontrado nas vacas HS também precisa ser levado em consideração nesta discussão, pois a prolactina estimula a proliferação de células epiteliais mamárias *in vitro* e as protege da apoptose (Accorsi et al., 2002; Herve et al., 2016), o que justificaria a ausência de alterações na expressão dos genes de apoptose avaliados no presente estudo.

O aumento na apoptose celular em resposta ao estresse por calor (Herve et al., 2016) poderia levar também à um aumento na contagem de células somáticas do leite, o que não ocorreu no presente estudo. Assim como não foram observadas alterações importantes no perfil celular quando da análise da contagem diferencial de células. Nesta análise, o número de células categorizadas como “não identificadas”, classificadas por Boutinaud e Jammes (2002) como células epiteliais, não foi diferente entre grupos, o que reforça o resultado de não ter ocorrido efeito do estresse por calor sobre a apoptose das células da glândula mamária de vacas Girolando. Apenas o percentual de linfócitos foi significativamente maior nas vacas HS quando comparado as vacas CTR. Portanto, considerando que os valores de CCS foram baixos e similares entre grupos, as vacas não apresentaram sinais clínicos de mastite e o perfil microbiológico se manteve constante, o maior percentual de linfócitos no leite

das vacas HS pode estar relacionado ao estresse por calor. O aumento de cortisol consequente ao estresse por calor pode promover uma mudança no padrão de resposta imunológica, pela qual há supressão da imunidade celular e promoção da imunidade humoral, e com isso, um efeito inibitório sob as células T Helper 1 (Th1) e um efeito promotor sob as células T Helper 2 (TH2) (Webster et al., 2002; Lacetera et al.; 2005, Bagath et al., 2019). Esta seria uma possibilidade que justificaria o aumento significativo dos linfócitos no grupo HS do presente estudo. Entretanto, como a regulação fisiológica do sistema imune pelos glicocorticoides é apenas uma parte de uma extensa cadeia regulatória que envolve sistema nervoso central, respostas neuroendócrinas e imunes (Webster et al., 2002), outros estudos mais aprofundados serão necessários para confirmar esta relação.

Ainda com relação à CCS, outros estudos já demonstraram aumento da contagem de células somáticas em rebanhos leiteiros durante os meses mais quentes do ano, sendo este aumento parcialmente explicado pela depressão do sistema imune e por um possível efeito de diluição em função da redução na produção de leite (Becker et al., 2020; Ferreira e DeVries, 2015; Li et al., 2021). Como exemplo, Hamdia et al. (2021) encontraram aumento de 5,2% na CCS do leite de vacas holandesas em THI superior a 72. Entretanto, Lengi et al. (2022), também não encontraram diferença na CCS entre vacas submetidas aos tratamentos estresse por calor e controle. Aparentemente, o aumento de CCS observado nos meses mais quentes do ano pode estar relacionado a maior exposição aos patógenos ambientais (Das et al., 2016) já que em estudos controlados dentro de câmaras climáticas este aumento de CCS não ocorre (Lengi et al.; 2022). Reforça esse argumento o fato de que os genes relacionados à resposta imune no presente estudo (*TGFβ1*, *PTGFR*, *NFκB1* e *NFκB1A*) não mostraram diferença entre os grupos HS e CTR.

Os comportamentos avaliados durante a ordenha (frequência de passos, de coices, micção ou defecação na sala de ordenha) não sofreram efeito do estresse por calor. O mesmo ocorreu com os teores dos componentes do leite, que não sofreram efeito significativo do estresse por calor, contrariando outros autores (Rhoads et al., 2009; Bernabucci et al., 2010; Carabano et al., 2016; Hamdia et al., 2021). Apesar disso, os demais resultados do presente estudo, como o aumento da TVag e da concentração de cortisol, redução da taxa de

ruminação e do consumo de MS e menor produção leiteira, demonstram o impacto do elevado ITU sobre o desempenho produtivo das vacas Girolando.

O estresse por calor aumentou significativamente a expressão dos genes *HSP60* e *HSP90* nas células do leite das vacas HS quando comparado as vacas CTR. Alguns estudos avaliando estresse por calor em vacas também encontraram aumento das proteínas de choque térmico (Collier e Benesch, 2020; Garner et al., 2020; Fu et al., 2021, Masroor et al., 2022). O aumento da expressão das HSP's é a mais frequente e imediata resposta celular ao estresse, pois estas proteínas têm como função limitar os danos e dar suporte à recuperação das células (Garner et. al 2020). Em geral, a expressão das *HSPs 60* e *90* pode ser correlacionada à capacidade de adaptação do animal aos desafios ambientais (Aleena et al., 2018; Sejian et al., 2019) e sua termotolerância (Masroor et al., 2022). De fato, estas proteínas protegem as células promovendo sua sobrevivência e melhoram a eficácia do sistema imune, de forma a superar o estressor (Morange, 2006), mantendo a integridade funcional das células, reparando proteínas danificadas (Sejian et al., 2019) e prevenindo a apoptose (Hu et al., 2016). Coerentemente, nas vacas Girolando nenhum dos genes relacionados à apoptose sofreram efeito do calor. Segundo Garner et al. (2020), o aumento da expressão gênica das HPS's em células mamárias é uma evidência de que estas adaptam processos fisiológicos para alcançarem ou aprimorem a sua capacidade termotolerante. Ao mesmo tempo, a redução da expressão do GR no presente estudo, considerado o principal receptor de cortisol em diferentes tecidos (Bomfim et al. 2018, Bomfim et al., 2022), sugere que as vacas HS quando submetidas ao estresse por calor podem reduzir localmente a ação do cortisol e modular os efeitos negativos nas células mamárias. Embora sejam necessários outros estudos, este resultado sugere que a expressão da *HSP60* e *90* e do *GR* podem ser bons indicadores do estresse por calor e estudo da resiliência de vacas zebuínas as mudanças climáticas criadas em ambientes tropicais e subtropicais.

5. Conclusões

As vacas Girolando apresentaram alterações fisiológicas compatíveis com estresse por calor como aumento da temperatura vaginal e da concentração de cortisol, diminuição da ingestão de matéria seca, taxa de ruminação e produção de leite. Além disso, o estresse por calor modificou significativamente a expressão dos genes *HSP60*, *HSP90*, *GR*, *INSR* e *PRLRs* em células do leite, demonstrando um efeito local significativo nas células mamárias sem alterar sua contagem ou a qualidade do leite das vacas Girolando. Entretanto, mais estudos precisam ser realizados a fim de estabelecer os limiares de resiliência de estresse ao calor em vacas zebu puras e cruzadas, o que poderá ajudar no aumento da produtividade em áreas de clima tropical.

6. Referências

Accorsi, P.A.; Pacioni, B.; Pezzi, C.; Forni, M.; Flint, D.J.; Seren, E. 2002. Role of prolactin, growth hormone and insulin-like growth factor 1 in mammary gland involution in the dairy cow. **Journal of Dairy Science**, v.85(3), p.507-13. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(02)74102-7. PMID: 11949853.

Aleena J.; Pragna, P.; Archana, P.R.; Sejian, V.; Bagath M.; Krishnan, G.; Manimaran, A.; Beena, V.; Kurien, E.K.; Varma, G.; Bhatta, R. 2016. Significance of metabolic response in livestock for adapting to heat stress challenges. **Asian Journal of Animal Sciences**, v.10, p.224–234.

Aleena, J., Sejian, V., Bagath, M., Krishnan, G., Beena, V., Bhatta, R., 2018. Resilience of three indigenous goat breeds to heat stress based on phenotypic traits and PBMC HSP70 expression. **International Journal of Biometeorology**, v.62, 1995–2005

Alfonzo, E. P.M.; Silva, M.V.G.B.; Daltro, D.S.; et al. 2016. Relationship between physical attributes and heat stress in dairy cattle from different genetic groups., v.60, p.245–253. DOI 10.1007/s00484-015-1021-y

ABCG- Associação Brasileira De Criadores De Girolando (ABCG). Produção de leite no Brasil e participação da genética Girolando com ênfase em reprodução. 2010. [Biblioteca-virtual - Associação Brasileira dos Criadores de Girolando](#). Acesso em: 27/07/2022.

Bagath, M.; Krishnana, G.; Devaraja, C.; Rashamola, V.P.; Pragnab, P.; Leesc, A.M.; Sejian, V. 2019. The impact of heat stress on the immune system in dairy cattle: A review. **Research in Veterinary Science**, v.126, p.94–102. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.08.011>

Baumgard, L.H.; Rhoads, R.P. Jr. 2013. Effects of heat stress on postabsorptive metabolism and energetics. **Annual Review Animal Bioscience**, v.1, p.311–337. doi:10.1146/annurev-animal-031412-103644

Becker, C. A.; Collier, R. J.; Stone, A. E. 2020. Invited review: Physiological and behavioral effects of heat stress in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.103, n.8.

Berman, A., Folman, Y.; Kaim, M.; et al. 1985. Upper critical temperatures and forced ventilation effects for high-yielding dairy cows in a subtropical climate. **Journal of Dairy Science**, v.68, p. 1488–1495. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(85\)80987-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(85)80987-5)

Bernabucci, U., Lacetera, N.; Baumgard, L.H.; Rhoads, R.P.; Ronchi, B.; Nardone, A. 2010. Metabolic and hormonal acclimation to heat stress in domesticated ruminants. *Animal*, v.4, p.1167-1183.

Bomfim, G. F.; Merighe, G. K. F.; de Oliveira, S. A.; Negrao, J. A. 2018. Effect of acute stressors, adrenocorticotrophic hormone administration, and cortisol release on milk yield, the expression of key genes, proliferation, and apoptosis in goat mammary epithelial cells. **Journal of Dairy Science**, v.101, p.6486–6496. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14123>.

Bomfim, G.F.; Merighe, G. K. F.; de Oliveira, S. A.; Negrao, J. A. 2022. Acute and chronic effects of cortisol on milk yield, the expression of key receptors, and apoptosis of mammary epithelial cells in Saanen goats G. F. **Journal of Dairy Science**, v.105, p. 818–830. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20364>.

Bouraoui, R.; Lahmar, M.; Majdoub, A.; Djemali, M.; Belyea, R. 2002. The relationship of temperature-humidity index with milk production of dairy cows in a Mediterranean climate. **Animal Research**, v.51, p.479–491. <https://doi.org/10.1051/animres:2002036>

Boutinaud, M.; & Jammes, H. 2002. Potential uses of milk epithelial cells: a review. **Reproduction Nutrition Development**, v.42(2), p.133-147.

Brito, M. A. V. P.; Brito, J. R. F. 1999. Diagnóstico microbiológico da mastite. Juiz de Fora, MG: **Embrapa Gado de Leite**. 26 p. (Embrapa Gado de Leite. Circular Técnica, 55).

Campos, I.L.; Chud, T.C.S.; Junior, G.A.O.; Baes, C.F.; Cánovas, Á.; Schenkel, F.S. 2022. Estimation of Genetic Parameters of Heat Tolerance for Production Traits in Canadian Holsteins Cattle. **Animals**, v.12, p.3585. <https://doi.org/10.3390/ani12243585>

Carabano, M.J.; Logar, B.; Bormann, J.; Minet, J.; Vanrobays, M.L.; Diaz, C.; Tychon, B.; Gengler, N.; Hammami, H. 2016. Modeling heat stress under different environmental conditions. **Journal of Dairy Science**, v.99, p.3798–3814.

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

Carvalho, L.R.; Wenceslau, R.R.; Ribeiro, L.S.; et al. 2021. Daily vaginal temperature in Girolando cows from three different genetic composition under natural heat stress. **Translational Animal Science**, v.5, Issue 3. <https://doi.org/10.1093/tas/txab138>

Catozzi, C.; Ávila, G.; Zamarian, V.; Pravettoni, D.; Sala, G.; Cecilian, F.; Lecchi, C. 2021. In-vitro effect of heat stress on bovine monocytes lifespan and polarization. **Immunobiology**, 225(2), 151888.

Collier, R.J.; Renquist, B.J.; Xiao, Y. 2017. A 100-Year Review: Stress physiology including heat stress. **Journal of Dairy Science**, v.100, p.10367–10380. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13676>

Collier, M.P.; Benesch, J.L.P. Small Heat-Shock Proteins and Their Role in Mechanical Stress. 2020. *Cell Stress Chaperones* v.25, p. 601–613.

Corazzin, M.; Romanzin, A.; Foletto, V.; Fabro, C.; Da Borso, F.; Baldini, M.; Piasentier, E.; 2021. Heat stress and feeding behaviour of dairy cows in late lactation. **Italian Journal of Animal Science**, v.20(1), p.600-610.

Costa, A.N.L.; Feitosa, J.V.; Montezuma, P.A.J.; Souza, P.T.; Araújo, A.A. 2015. Rectal temperatures, respiratory rates, production, and reproduction performances of crossbred Girolando cows under heat stress in northeastern Brazil. **International Journal of Biometeorology**, v.59, p. 1647–1653. DOI 10.1007/s00484-015-0971-4

Dahl, G.E.; McFadden, T.B. 2022. Symposium review: Environmental effects on mammary immunity and health. **Journal of Dairy Science**, v.105(10), p.8586-8589. doi: 10.3168/jds.2021-21433. Epub 2022 Aug 31. PMID: 36055830.

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

Farooq, U.; Samad, H.A.; Shehzad, F.; Qayyum, A. 2010. Physiological responses of cattle to heat stress. **World Applied Science**, v.8, p.38-43.

Ferreira, F.; Pires, M.F.A; Martinez, M.L.L; Coelho, S.G.; Carvalho, A.U.; Ferreira, P.M.; Facury Filho, E.J.; Campos, W.E. 2006. Parâmetros fisiológicos de bovinos cruzados submetidos ao estresse calórico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.5, p.732-738.

Ferreira, F.C.; De Vries, A. 2015. Effects of season and herd milk volume on somatic cell counts of Florida dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v.98, p. 4182-4197. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8695>

Franzoni, A. P. S.; Glória, J. R.; Costa, A. L. B. S. A.; Martins, R. A.; Amaral, T. F.; Azevedo, R. A. Campos, E. F.; Coelho S. G. 2018. Metabolic and hormone profiles of Holstein x Gyr cows during pre- and postpartum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.53, p.371–377. doi:10.1590/ S0100-204X2018000300012.

Fu, L.; Zhang, L.; Liu, L.; Yang, H.; Zhou, P.; Song, F.; Dong, G.; Chen, J.; Wang, G.; Dong, X. 2021. Effect of Heat Stress on Bovine Mammary Cellular Metabolites and Gene Transcription Related to Amino Acid Metabolism, Amino Acid Transportation and Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Signaling. **Animals**, v.11, p.3153. <https://doi.org/10.3390/ani11113153>

Garner, J.B.; Chamberlain, A.J.; Vander Jagt, C. *et al.* 2020. Gene expression of the heat stress response in bovine peripheral white blood cells and milk somatic cells in vivo. **Science Report**, v.10, p.19181. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75438-2>

Hahn, G.L.; Gaughan, J.B.; Mader, T.L.; Eigenberg, R.A. 2009. Chapter 5: Thermal indices and their applications for livestock environments. In: De Shazer JA (ed) **Livestock energetics and thermal environment management**. ASABE, St. Joseph, p.113–130.

Hamdia, N.; Darej, C.; Attia, K.; et al. 2021. Modelling THI effects on milk production and lactation curve parameters of Holstein dairy cows. **Journal of Thermal Biology**, v.99, 102917. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2021.102917>

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

Henry, B.K.; Eckard, R.J.; Beauchemin, K.A. 2018. Review: adaptation of ruminant livestock production systems to climate changes. **Animal**, v.12, p.445–456. <https://doi.org/10.1017/S1751731118001301>

Herve, L.; Quesnel, H.; Lollivier, V.; Boutinaud, M. 2016. Regulation of cell number in the mammary gland by controlling the exfoliation process in milk in ruminants. **Journal of Dairy Science**, v.99(1), p. 854-863.

Hooper, H. B.; Silva, P. D. S.; De Oliveira, S. A.; Meringhe, G. K. F.; Lacasse, P.; Negrão, J. A. 2020. Effect of heat stress in late gestation on subsequent lactation performance and mammary cell gene expression of Saanen goats. **Journal of Dairy Science**, v.103(2), p.1982-1992.

Hooper, H. B.; dos Santos Silva, P.; de Oliveira, S. A.; Merighe, G. K. F.; Titto, C. G.; Negrão, J. A. 2021. Long-term heat stress at final gestation: physiological and heat shock responses of Saanen goats. **International Journal of Biometeorology**, v.65(12), p.2123-2135.

Hu, H.; Wang, J.; Gao, H.; Li, S.; Zhang, Y.; Zheng, N. 2016. Heat-induced apoptosis and gene expression in bovine mammary epithelial cells. **Animal Production Science**, v.56, p.918–926. <https://doi.org/10.1071/AN14420>

INMET - Instituto Nacional de Meteorologia, Brasília, DF, Brasil. Disponível em: Disponível em: [INMET :: Tempo](#) . Acesso em: 07/10/22.

IDF - International Dairy Federation. 1995. Milk: enumeration of somatic cells. Bruxelas. 8 p. (IDF. Standard 148 A).

IDF - International Dairy Federation. 1996. Whole milk: determination of milkfat, protein and lactose content: guide for the operation of mid-infra-red instruments. Bruxelas. 12 p. (IDF. Standard 141 B).

IPCC, Intergovernmental Panel on Climate Change 2022. Sixth Assessment Report, Climate Change 2022: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Disponível em: [Climate Change 2022: Impacts, Adaptation and Vulnerability | Climate Change 2022: Impacts, Adaptation and Vulnerability \(ipcc.ch\)](#). Acesso em: 07/03/2022.

Itoh, F.; Obara, Y.; Rose, M. T.; Fuse, H.; Hashimoto, H. 1998. Insulin and glucagon secretion in lactating cows during heat exposure. **Journal of Animal Science**, v.76, p.2182–2189.

Lacetera, N.; Bernabucci, U.; Scalia, D.; Ronchi, B.; Kuzminsky, G.; Nardone, A. 2005. Lymphocyte functions in dairy cows in hot environment. **International Journal of Biometeorology**, v.50(2), p.105-110.

Lengi, A.J.; Stewart, J.W.; Makris, M.; Rhoads, M.L.; Corl, B.A. 2022. Heat Stress Increases Mammary Epithelial Cells and Reduces Viable Immune Cells in Milk of Dairy Cows. **Animals**, v.12, p. 2810. <https://doi.org/10.3390/ani12202810>

Li, L.; Sun, Y.; Wu, J.; Li, X.; Luo, M.; Wang, G. 2015. The global effect of heat on gene expression in cultured bovine mammary epithelial cells. **Cell Stress Chaperones**, v.20, p.381–389.

Li, H.; Zhang, Y.; Li, R.; Wu, Y.; Zhang, D.; Xu, H.; Zhang, Y.; Qi, Z. 2021. Effect of seasonal thermal stress on oxidative status, immune response and stress hormones of lactating dairy cows. **Animal Nutrition**, v. 7, p. 216–223. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2020.07.006>

Marçal-Pedroza, M.G.; Campos, M.M.; Pereira, L.G.R.; Machado, F.S.; Tomich, T.R.; Paranhos Da Costa, M.J.R.; Sant’anna, A.C. 2020. Consistency of temperament traits and their relationships with milk yield in lactating primiparous F1 Holstein - Gyr cows. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 222, 104881.

Marçal-Pedroza, M.G.; Campos, M.M.; Sacramento, J.P.; Pereira, L.G.R.; Machado, F.S.; Tomich, T.R.; Paranhos Da Costa, M.J.R.; Sant'anna, A.C. 2021. Are dairy cows with a more reactive temperament less efficient in energetic metabolism and do they produce more enteric methane? **Animal**, v. 15, Issue 6, 100224.

Masroor, S.; Aalam, M.T.; Khan, O. *et al.* 2022. Effect of acute heat shock on stress gene expression and DNA methylation in zebu (*Bos indicus*) and crossbred (*Bos indicus* × *Bos taurus*) dairy cattle. *International Journal of Biometeorology*, v.66, p.1797–1809. <https://doi.org/10.1007/s00484-022-02320-3>

McManus, C.; Louvandini, H.; Paim, T.P.; Silva, F. C. P.; Bernal, F. E. M. 2014. Factors affecting heat tolerance in crossbred cattle in central Brazil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 15(2), p. 152–158. <https://doi.org/10.1590/1809-6891v15i28726>

Mellado, M.; Coronel, F.; Estrada, A.; Ríos, F.G. 2011. Lactation performance of Holstein and Holstein × Gyr cattle under intensive condition in a subtropical environment. **Tropical and Subtropical Agroecosystem**, v.14, v.927–931.

Mendonça, L.C; Guimaraes, A.S.; Brito, M.A.V.P. 2012. Coleta de amostras leite para diagnóstico microbiológico da mastite. **Comunicado técnico 68**, Embrapa, Juiz de Fora, ISSN 1678-3131, julho, 2012.

Meneses, J. A. M.; de Sá, O. A. A. L.; Coelho, C. F.; Pereira, R. N.; Batista, E. D., Ladeira, M. M.; Gionbelli, M. P. 2021. Effect of heat stress on ingestive, digestive, ruminal and physiological parameters of Nellore cattle feeding low-or high-energy diets. **Livestock Science**, v. 252, p.104676.

Moran, J. 2002. Calf Rearing: A Practical Guide. 2nd ed. Landlinks Press, Collingwood Vic., Australia.

Morange, F., 2006. HSFs in development. *Handbook of Experimental Pharmacology*, v.172, p.153–169.

Moretti, R.; Biffani, S.; Chessa, S.; Bozzi, R. 2017. Heat stress effects on Holstein dairy cows' rumination. **Animal**, v.11(12), p.2320-2325.

Nardone, A.; Ronchi, B.; Lacetera, N.; Ranieri, M.S.; Bernabucci, U. 2010. Effect of climate changes on animal production and sustainability of livestock systems. **Livestock Science**, v.130, p.57–69. doi:10.1016/j.livsci. 2010.02.011

Mormède, P.; Andanson, S.; Aupérin, B.; et al. 2007. Exploration of the hypothalamic–pituitary–adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. **Physiology & Behavior**, v.92, Issue 3, p.317-339, ISSN 0031-9384, <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.12.003>.

Nars, M.A.F.; El-Tarabany, M.S. 2017. Impact of three ITU levels on somatic cell count, milk yield and composition of multiparous Holstein cows in a subtropical region. **Journal of Thermal Biology**, v.64, p.73-77. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtherbio.2017.01.004>

NMC - National Mastitis Council, 1987. Laboratory and Field Handbook on Bovine Mastitis. **National Mastitis Council**, Arlington, 208 p.

NRC - National Research Council. 1971. A Guide to Environmental Research on Animals. **National Academy Science**, Washington, DC.

National Research Council (NRC). 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle, 7.ed. Washington, D.C., p. 381

Ouellet, V.; Negro, J.; Skibieli, A. L.; Lantigua, V. A.; Fabris, T. F.; Marrero, M. G.; Dahl, G. E. 2021. Endocrine signals altered by heat stress impact dairy cow mammary cellular processes at different stages of the dry period. **Animals**, v.11(2), p.563.

Oviedo-Boyso, J.; Valdez-Alarcón, J. J.; Cajero-Juárez, M.; Ochoa-Zarzosa, A.; López-Meza, J. E.; Bravo-Patiño, A.; Baizabal-Aguirre, V. M. 2007. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. **Journal of Infection**, v. 54, n. 4, p. 399–409.

Paape, M. J.; Tucker, H. A.; Hafs, H. D. 1965. Comparison of methods for estimating milk somatic cells. **Journal of Dairy Science**, v.48, p. 191-196. doi: 10.3168/jds.s0022-0302(65)88193-0.

Park, D.; Gu, B.; Park, Y.J.; Joo, S.S.; Lee, S.S.; Kim, S.H.; Kim, E.T; et al. 2021. Dynamic changes in blood immune cell composition and function in Holstein and Jersey steers in response to heat stress. **Cell Stress and Chaperones**, v. 26, p.705–720. <https://doi.org/10.1007/s12192-021-01216-2>

Piccione, G.; Caola, G.; Refinetti, R. 2003. Daily and estrous rhythmicity of body temperature in domestic cattle. **BMC Physiology**, v.3:7. <https://doi.org/10.1186/1472-6793-3-7>.

Polsky, L.; Von Keyserlingk, M.A.G. 2017. Invited review: Effects of heat stress on dairy cattle welfare. **Journal of Dairy Science**, v.100, p.8645–8657.

Ponchon, B.; Zhao, X.; Ollier, S.; Lacasse, P. 2017. Relationship between glucocorticoids and prolactin during mammary gland stimulation in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 1521–1534. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11490>.

Pramod, S.; Sahib, L.; Bibin, B.B., et al. 2021. Analysis of the effects of thermal stress on milk production in a humid tropical climate using linear and non-linear models. **Tropical Animal Health Production**, v.53, p.66. <https://doi.org/10.1007/s11250-020-02525-x>

Preez, J.D.; Giesecke, W.H.; Hattingh, P.J.; Eisenberg, B.E. 1990. Heat stress in dairy cattle under Southern African conditions. II. Identification of areas of potential heat stress during summer by means of observed true and predicted temperature-humidity index values. **Journal of Veterinary Research**, v.57(3), p.183–187.

Rhoads, M. L.; Rhoads, R. P.; Vanbaale, M. J.; Collier, R. J.; Sanders, S. R.; Weber, W. J.; Crooker, B. A.; Baumgard, L. H. 2009. Effects of heat stress and plane of nutrition on lactating Holstein cows: I. Production, metabolism, and aspects of circulating somatotropin. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 5, p. 1986–1997. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030209705132>>.

Rhoads, M.L.; Kim, J.W.; Collier, R.J.; Crooker, B.A.; Boisclair, Y.R.; Baumgard, L.H.; Rhoads, R.P. 2010. Effect of heat stress and nutrition on lactating Holstein cows: II. Aspects of hepatic growth hormone responsiveness. **Journal of Dairy Science**, v.93, p.170–179. doi:10.3168/jds.2009-2469

Ribeiro, L.S.; Brandão, F.Z; Carvalheira, L.R.; Goes, T.J.F.; Torres Filho, R.A.; Quintão, C.C.R.; Pires, M.F.A.; Camargo, L.S.A.; Carvalho, B.B. 2019. Chromium supplementation improves glucose metabolism and vaginal temperature regulation in Girolando cows under heat stress conditions in a climatic chamber. **Tropical Animal Health and Production**, v. 52, p.1661–1668.

Robinson, E.N. Termorregulação. In: **CUNNINGHAM, J.G.** 1999. Tratado de fisiologia veterinária. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap.51, p.427-435.

Sammad, A.; Wang, Y.J; Umer, S.; et al. 2020. Nutritional Physiology and Biochemistry of Dairy Cattle under the Influence of Heat Stress: Consequences and Opportunities. **Animals**, v.10, p.793. doi:10.3390/ani10050793

Santana, M.L.; Pereira, R.J.; Bignardi, A.B.; et al. 2015. Detrimental effect of selection for milk yield on genetic tolerance to heat stress in purebred Zebu cattle: Genetic parameters and trends. **Journal of Animal Science**, v.98, p.9035-43. doi: 10.3168/jds.2015-9817.

Santos, M.M.; Souza-Junior, J.B.F.; Dantas, M.K.T.; Costa, L.L.M. 2021. An updated review on cattle thermoregulation: physiological responses, biophysical mechanisms, and heat stress alleviation pathways. **Environmental Science and Pollution Research**, v.28, p.30471–30485.

Schmittgen, T. D.; e Livak, K., J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(tT) method. *Nat. Protoc.* 3:1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>

Sejian V.; Sanyal. S; Das, P.K.; Ghosh, P.R.; Sivakumar, B.; Pandiyan, G.D.V. 2008. Effect of unilateral adrenalectomy on the blood biochemistry of Black Bengal goats (*Capra hircus*). **Turk Journal of Veterinary Animal Science**, v.32(4), p.249–254.

Sejian, V.; Bhatta, R.; Gaughan, J.B.; Dunshea, F.R.; Lacetera, N. 2018. Review: Adaptation of animals to heat stress. **Animal**, v.12:S2, p.431–444

Sejian, V.; Bagath, M.; Krishnan, G.; et al. 2019. Genes for resilience to heat stress in small ruminants: A review. **Small Ruminant Research**, v.173, p.42-53. ISSN 0921-4488. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2019.02.009>

Shultz, T. A. 1984. Weather and shade effects on cow corral activities. **Journal of Dairy Science**, v.67, p.868–873. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(84\)81379-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81379-X).

Silva, M.V.G.B., Martins, M.F., Ferreira Junior, E.; Panetto, J.C.C., Paiva, L.C.; Machado, M.A.; Faza, D.R.L.R.; Daltro, D.S.; Negri, R.; Kluska, S. Martins, M.F.; Borges, C.A.V. 2022. Programa De Melhoramento Genético Da Raça Girolando / Sumário de Touros / Resultado do Teste de Progênie / Avaliação Genética/Genômics - Junho/2022, **Embrapa Gado de Leite**, Documentos 266.

Smith, D.L.; Smith, T.; Rude, B.J.; Ward, S.H. 2013. Short communication: comparison of the effects of heat stress on milk and component yields and somatic cell score in Holstein and Jersey cows. **Journal of Dairy Science**, v.96, p. 3028–3033.

SPSS Statistical Package for the Social Science. 1988. SPSS Inc, Chicago, IL.

Stöber, M. Identificação, anamnese, regras básicas da técnica de exame clínico geral. 1993. In: DIRKSEN, G.; GRÜNDER, H.D.; STÖBER, M. **Exame clínico dos bovinos**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap.2, p.44- 80.

Tao, S.; Orellana, R. M.; Weng, X.; Marins, T. N.; Dahl, G. E.; Bernard, J. K. 2018. Symposium review: The influences of heat stress on bovine mammary gland function. **Journal of Dairy Science**, p. 5642–5654. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030218300195>>.

Taye, M.; Lee, W.; Caetano-Anolles, K.; Dessie, T.; Hanotte, O.; Mwai, O.A.; Kemp. S.; Cho, S.; Oh, S.J.; Lee, H.K.; Kim, H. 2017. Whole genome detection of signature of positive selection in African cattle reveals selection for thermotolerance. **Animal Science Journal**, v.88, p.1889–1901. <https://doi.org/10.1111/asj.12851>

Thompson, I. M.; Dahl, G. E. 2012. Dry-period seasonal effects on the subsequent lactation. **The Professional Animal Scientist**, v.28(6), p. 628-631.

Webster J.I.; Tonelli, L.; Sternberg, E.M. 2002. Neuroendocrine regulation of immunity. *Annual Review of Immunology*, v.20, p.125–163.

West, J.W. Physiological effects of heat stress on production and reproduction. 2002. In: Tri-State Dairy Nutrition Conference, 2002, Fort Wayne. **Proceedings...** Fort Wayne: Eastridge, M.D., p.1-9.

West, J. W. 2003. Effects of heat-stress on production in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 2131–2144. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73803-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73803-X)

Wheelock, J. B.; Rhoads, R. P.; VanBaale, M. J.; Sanders, S. R.; Baumgard, L. H. 2010. Effects of heat stress on energetic metabolism in lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v.93, p. 644–655. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2295>.

Zeinhom, M.M.; Abdel, A.R.L.; Mohammed, A.N.; et al. 2016. Impact of seasonal conditions on quality and pathogens content of milk in Friesian cows. **Asian-Australas Journal of Animal Science**, v.29, p.1207–13.

Zimbelman, R. B., Rhoads, R. P.; Rhoads, M. L.; Duff, G. C.; Baumgard, L. H.; Collier, R. J. 2009. A re-evaluation of the impact of temperature humidity index (ITU) and black globe temperature humidity index (BGHI) on milk production in high producing dairy cows. **Proceedings of the 24th Southwest Nutrition and Management conference**, Tempe, AZ. pp. 158-16.

CAPÍTULO 3 – Efeitos do desafio de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* na imunidade da glândula mamária de vacas Girolando submetidas a estresse por calor

RESUMO - O efeito do estresse por calor sobre a resposta celular da glândula mamária de vacas Girolando, por meio de indução de resposta inflamatória via administração de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS), foi avaliado no presente estudo. Para tanto, doze vacas em lactação foram submetidas a estresse por calor (HS) por oito horas diárias em câmara climática regulada para manter índice de temperatura e umidade de 85, enquanto as outras doze vacas permaneceram em “free-stall” com sistema de resfriamento (CTR). No dia 10 do experimento, todas as vacas receberam dose única de 100 µg de LPS diluídos em 10 mL de solução fisiológica (0,9% NaCl) no quarto mamário posterior esquerdo e o quarto mamário posterior direito recebeu 10 mL de solução salina 0,9% de NaCl, sendo considerado o quarto mamário controle. Frequência respiratória (FR), temperatura vaginal (TVag), concentração plasmática de cortisol (CORT), tiroxina (T4), triiodotironina (T3), IGF-1 e insulina (INS), produção e qualidade do leite, cultivo microbiológico do leite, contagem diferencial de células e expressão de genes alvo relacionados ao estresse por calor, inflamação, resposta imune e estresse oxidativo foram avaliados. A TVag dos animais HS foi superior ($p \leq 0,05$) à das vacas CT na média do período em que foram submetidas ao estresse por calor ($39,12^{\circ}\text{C} \times 38,75^{\circ}\text{C}$) e nas doze horas seguintes à administração de LPS ($39,25^{\circ}\text{C} \times 39,00^{\circ}\text{C}$). FR não se diferenciou entre grupos ($p > 0,05$). CORT, T4 e INS foram significativamente maiores para o grupo HS nas horas 12, 24 e 12 e 24 pós-LPS, respectivamente. Produção de leite não se alterou entre os grupos HS e CTR mas apresentou interação com as horas pós LPS, sendo estatisticamente menor para os dois grupos na hora 24 pós-LPS. Já a CCS não foi significativamente diferente entre os grupos, mas apresentou elevação significativa em seis horas após o LPS, mantendo-se elevada até 72 horas. A porcentagem de neutrófilos presentes no leite dos quartos mamários tratados com LPS foi significativamente maior do que nos quartos mamários controle nos tempos 6 e 24 horas pós-LPS. Sofreram efeito significativo do estresse por calor os genes *TRAIL* e *SOD1* das vacas do grupo HS. Já o efeito do LPS foi observado nos genes *HSP40*, *HSP90*, *NFKB1*, *NFKBIA*, *FAS*, *GPX3*, *NOS2*, *GR*, *IL1 α* , *IL1 β* , *IL-8*, *TRL2*, *TRL4*, *IRF3*, *CD14*, *COX2* e *CXCR2*. O estresse por calor não influenciou negativamente a contagem e o perfil de células somáticas, nem a expressão de genes relacionados a resposta imune celular das vacas Girolando desafiadas pelo processo inflamatório induzido pela administração LPS de *E. coli*.

Palavras-chave: estresse por calor, Girolando, lipopolissacarídeo, células somáticas, expressão gênica

Effect of *Escherichia coli* lipopolysaccharide administration on udder immune response of heat stressed Girolando cows

ABSTRACT - The present study aims to evaluate the effect of heat stress on the udder cell response of Girolando cows, by inducing inflammatory response via administration of *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS). For this purpose, twelve lactating cows were subjected to heat stress (HS) for eight hours a day in a regulated, climatic chamber to maintain a temperature and humidity index of 85, while the other twelve cows remained in a free stall with a cooling system (CTR). On day 10 of the experiment, all cows received a single dose of 100 µg of LPS diluted in 10 mL of saline (0.9% NaCl) in the left hindquarter, and 10 mL of 0.9% NaCl saline in the right hindquarter, which was considered the control quarter. Respiratory rate (RR), vaginal temperature (TVag), cortisol plasma concentrations (CORT), thyroxine (T4), triiodothyronine (T3), IGF-1, and insulin (INS), milk production, milk quality, microbiological milk culture, differential cell count, and target gene expression related to heat stress, inflammation, immune response, and oxidative stress were evaluated. TVag of HS animals was higher ($p < 0.05$) than that of CT cows in the average period when they were subjected to heat stress ($39.12^{\circ}\text{C} \times 38.75^{\circ}\text{C}$), and in the twelve hours following the LPS administration ($39.25^{\circ}\text{C} \times 39.00^{\circ}\text{C}$). FR did not differ among groups ($p > 0.05$). CORT, T4 INS were significantly higher in the HS group at hours 12, 24 and 12, and 24 post-LPS, respectively. Milk production did not change between HS and CTR groups, but showed interaction within hours post-LPS, being statistically lower for both groups at hour 24 post-LPS. SCC was not significantly different among groups, but showed a significant elevation 6 hours post-LPS, and remained elevated up to 72 hours. The percentage of neutrophils present in the milk from the LPS-treated mammary quarters was significantly higher than in the control quarters at 6 and 24 hours post-LPS. The heat stress effect was significant for TRAIL and SOD1 genes in HS cows. The effect of LPS was observed on the following genes: *HSP40*, *HSP90*, *NFKB1*, *NFKBIA*, *FAS*, *GPX3*, *NOS2*, *GR*, *IL1 α* , *IL1 β* , *IL-8*, *TRL2*, *TRL4*, *IRF3*, *CD14*, *COX2*, and *CXCR2*. Heat stress did not demonstrate to negatively influence the somatic cell count and profile, nor the expression of genes related to the cellular immune response of Girolando cows before the challenges posed by *E. coli* lipopolysaccharide.

Keywords: heat stress, *Escherichia coli* lipopolysaccharide, Girolando crossbreed, gene expression

1. Introdução

O estresse por calor provocado pelas mudanças climáticas observadas nos últimos anos pode ter efeitos significativos em diversos processos fisiológicos de animais de produção, incluindo os relacionados ao metabolismo e imunidade, promovendo assim aumento na incidência de doenças (IPCC, 2022; Park et al., 2021). Bovinos expostos ao estresse por calor já foram identificados como mais vulneráveis à ocorrência de afecções respiratórias e mastite (Louie et al., 2018; Vitali et al., 2020). A alteração do perfil celular do sistema imune causada por estes estressor pode potencialmente aumentar a susceptibilidade a infecções patogênicas, explicando o aumento da incidência de determinadas doenças infecciosas (Park et al., 2021). Lacetera e colaboradores (2006) sugerem impactos do estresse por calor na capacidade de migração, fagocitose e eliminação de invasores por parte das células de defesa de vacas leiteiras. O estudo da expressão de genes relacionados à imunidade mostrou redução das citocinas inflamatórias TNF- α , IL-1 α e IL-2 e da expressão da proteína mieloperoxidase de neutrófilos do plasma sanguíneo de vacas da raça Holandesa submetidas a estresse por calor (Safa et al., 2019; Park et al., 2021). Entretanto, os mecanismos pelos quais o estresse por calor reduz a função imune de vacas leiteiras ainda não foi completamente compreendido, principalmente relacionado ao perfil das citocinas afetadas (Safa et al., 2019).

Uma vez que as células imunológicas orquestram as respostas do sistema imune (Park et al., 2021), entender como o estresse por calor modula as alterações nestas células e em suas funções é essencial para elucidar o impacto na resposta celular do organismo animal frente a desafios infecciosos, como por exemplo, a mastite bovina. Apesar do enorme progresso alcançado em sua prevenção e controle nas últimas décadas, a mastite continua sendo a doença de maior impacto econômico nos rebanhos leiteiros (Ruegg, 2017). Estudos prévios de Amaral et al. (2010) e Amaral et al. (2011) identificaram redução da proliferação de linfócitos, da capacidade fagocítica dos neutrófilos e da expressão de citocinas em glândula mamária de vacas holandesas em estresse por calor. Entretanto, são escassos os trabalhos que avaliam o impacto deste estressor sobre a resposta imune da glândula mamária de vacas Girolando, raça

largamente utilizada no Brasil e derivada do cruzamento de Holandês x Gir, sendo este último reconhecido por sua termotolerância (ABCG, 2014; McManus et al., 2014).

Uma das metodologias utilizadas para estudar a mastite *in vivo* ou *in vitro* é a administração de lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli*, considerada modelo padrão para simulação desta doença. Por ser um potente indutor de resposta inflamatória (Borghetti et al., 2009), a LPS é utilizada em ensaios que buscam avaliar, por exemplo, os danos da inflamação provocada por este componente da parede celular de bactérias gram-negativas em células epiteliais mamárias bovinas (Liu et al., 2021). Johnzon et al. (2018), utilizando desta técnica, encontraram aumento expressivo das citocinas IL-6 e TNF- α no leite de vacas desafiadas com o LPS.

Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da indução de resposta inflamatória semelhante à mastite (via infusão intramamária com LPS de *E. coli*) sobre a resposta imune celular da glândula mamária de vacas Girolando submetidas a estresse por calor. A hipótese do presente trabalho é que o estresse por calor reduz a resposta imune e aumenta o processo oxidativo das células mamárias de vacas Girolando frente ao desafio inflamatório causado pela administração de LPS.

2. Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Complexo Multiusuário de Bioeficiência e Sustentabilidade da Pecuária (CMB), da Embrapa Gado de Leite (EGL), localizado no município de Coronel Pacheco-MG, latitude -21° 34' 59.99" S, longitude -43°15' 60.00" W. As atividades foram aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Embrapa Gado de Leite (CEUA/EGL) sob o protocolo de número 5557190520, aprovado em 30 de julho de 2020. O experimento ocorreu durante o inverno, entre os meses de agosto e setembro.

2.1 Animais

Foram utilizadas 24 vacas da raça Girolando, grau de sangue $\frac{3}{4}$ Holandês $\frac{1}{4}$ Gir, com média de peso vivo de 561 ± 74 kg, média de 111 ± 54 em dias de lactação, produção média de leite de $19,4 \pm 4,5$ kg/dia e contagem de células somáticas (CCS) média de 183.000 ± 138.000 células/mL. Os animais foram distribuídos nos tratamentos experimentais de forma homogênea, considerando fase de lactação, produção de leite e CCS.

A ordenha foi realizada duas vezes ao dia, 6h e 15h, mantendo sempre o manejo e sendo realizada pelos mesmos ordenhadores, em equipamento DeLaval® (DeLaval, Tumba, Sweden) do tipo linha baixa, espinha de peixe (2x4=8) e sistema de gerenciamento DeLaval DelPro™. O manejo de ordenha contava com teste da caneca para detecção de mastite clínica, pré-dipping, secagem dos tetos com papel toalha e pós-dipping. A sala de ordenha contava com ventiladores que eram acionados em dias mais quentes e os demais dados relacionados a ordenha foram disponibilizados pelo sistema de controle eletrônico da ordenhadeira.

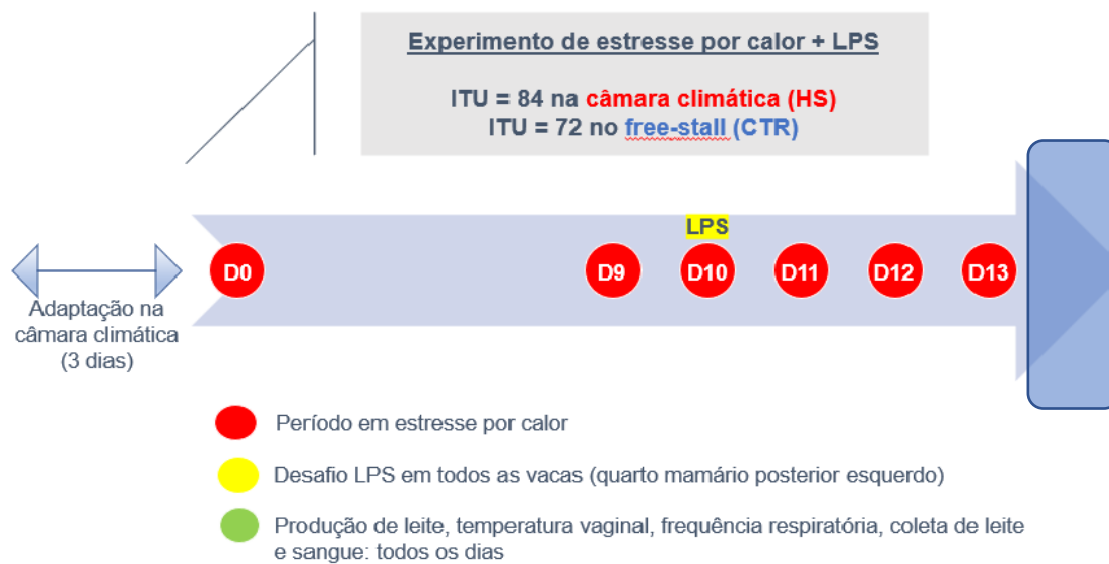
Os animais receberam a mesma dieta em sistema de mistura total (TMR) dividido em dois tratos diários às 09h e 15h, composto de 85% de silagem de milho e 15% concentrado (42% de farelo de soja, 52,5% de farelo de milho, 4% núcleo mineral e 1,5% de ureia). A dieta foi calculada segundo os requerimentos do NRC (2001) considerando o peso animal, escore corporal, fase de lactação e produção de leite. A quantidade de dieta fornecida foi suficiente para resultar em pelo menos 10% de sobra. Os animais receberam uma etiqueta auricular contendo um transponder individual para identificação nos cochos eletrônicos de consumo.

2.2 Desenho experimental

Do total de 24 vacas, 12 vacas foram submetidas a estresse por calor em câmara climática (grupo HS) e as outras 12 vacas foram mantidas em instalação tipo “free stall” equipada com sistema de resfriamento (grupo CTR). O experimento durou 17 dias consecutivos, sendo três dias de adaptação das vacas do grupo HS à câmara climática e 14 dias em estresse por calor (Figura

1). No dia 10 do experimento, o desafio com LPS foi realizado, sendo detalhado a seguir.

Figura 1: Linha do tempo do período experimental



As vacas do grupo controle (CTR) foram mantidas no “free stall” durante todo o período experimental, saindo apenas para as duas ordenhas realizadas às 6h e às 15h. Este galpão era equipado com ventiladores alocados em cima das camas e na linha de cochos de alimentação e aspersores, alocados na linha dos cochos, e eram acionados nos dias mais quentes. Já as vacas do grupo estresse por calor (HS) eram conduzidas pelos ordenhadores para a câmara climática após a ordenha da manhã e lá permaneciam, entre 7h e 15h, diariamente. A câmara climática foi regulada em 35°C de temperatura e 65% de umidade ambiente, com índice de temperatura e umidade (ITU) calculado em 85, considerado estressor grave (Carabano et al., 2014). Após as 15h, as vacas do grupo HS eram levadas para a ordenha, e de lá, encaminhadas para o “free stall”, onde passavam a noite junto com o grupo CTR.

No dia 10 do experimento, logo após a ordenha da manhã, as extremidades dos tetos foram higienizadas com solução de álcool 70% embebida em algodão. No quarto mamário posterior esquerdo de cada animal foi realizado o desafio com lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* (L3024 Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), na dose única de 100 µg de LPS diluídos em 10 mL de solução fisiológica (0,9% NaCl) (Johnzon et al., 2018). O quarto

mamário posterior direito recebeu 10 mL de solução salina 0,9% de NaCl, sendo considerado o quarto mamário controle (placebo) (Vernay et al., 2012; Wellnitz et al., 2011).

2.3 Coleta de dados

Temperatura e umidade dentro da câmara climática e no “free-stall” foram registradas para monitoramento em termômetros e higrômetros digitais (Unity Instruments®) três vezes ao dia (8h, 12h e 15h). Dois equipamentos destes foram instalados no interior da câmara climática e outros dois instalados acima da cama do “free-stall”. Demais dados ambientais foram obtidos na estação meteorológica nas imediações do CMB (INMET). Com os dados de temperatura e umidade, o ITU dos ambientes da câmara climática (grupo HS) e do “free-stall” (grupo CTR) foi calculado de acordo com a fórmula do NRC (1971), onde $ITU = (1.8 \times T + 32) - [(0.55 - 0.0055 \times RH) \times (1.8 \times T - 26)]$, sendo T, a temperatura em graus celsius e RH, a umidade relativa (%). O ITU médio registrado no período de imposição do desafio experimental na câmara climática (7h a 15h) foi de $84 \pm 1,36$ na câmara climática para as vacas submetidas ao tratamento HS e $72 \pm 3,91$ para as vacas submetidas ao tratamento CTR no galpão “free-stall” com sistema de resfriamento. Faixas de ITU utilizadas como referência: ≤ 70 são considerados normais e a vaca leiteira está em conforto térmico; < 70 e ≤ 72 a vaca está em alerta; < 72 e ≤ 78 é faixa crítica para produção de leite; < 78 a ≤ 82 a vaca está em perigo; > 82 a vaca está em emergência (Prezz et al. 1990).

A frequência respiratória (FR) e temperatura vaginal (TVag) foram avaliadas como indicadores fisiológicos dos tratamentos impostos, medidas diariamente dos dias 9 ao dia 13 do período experimental. A FR foi medida por meio da contabilização do número de movimentos no flanco por 15 segundos, multiplicados por quatro, duas vezes ao dia (9h e 14h). A temperatura vaginal (TVag) foi aferida a cada 60 minutos durante todo o período experimental utilizando dispositivo plástico intravaginal e data loggers (iButton®, Whitewater, USA) (Ribeiro et al., 2019).

Antes das ordenhas experimentais foram realizadas avaliações clínicas diárias do úbere de cada animal antes da ordenha, por inspeção e palpação para detecção de possíveis alterações inflamatórias: edema, temperatura à palpação

quando comparado ao quarto contralateral, dor à palpação e rubor. A produção de leite da ordenha da manhã e da ordenha da tarde e os demais dados relacionados a ordenha foram obtidos do sistema de gerenciamento eletrônico da ordenhadeira.

2.4 Coleta e análise de amostras de leite

Duas amostras de leite dos quartos mamários tratados com LPS (LPS) e dos quartos mamários controles (Plac) foram coletadas antes da ordenha, nas horas -24, 0, 6, 24, 48 e 72 horas após o desafio LPS. Essas amostras foram coletadas diretamente dos tetos de cada vaca, seguindo rigorosa assepsia conforme descrito em Mendonça et al. (2012) e foram mantidas sob refrigeração até o seu processamento, no mesmo dia da coleta.

A primeira delas foi coletada em frasco estéril de vidro para as seguintes análises: (i) microbiológica, (ii) contagem diferencial de células e (iii) expressão gênica em células do leite. A segunda amostra de leite foi coletada em frasco de 50 mL contendo conservante bronopol® (2-bromo-2-nitropropane-1-diol) para análise da CCS.

2.4.1 Análise composicional, microbiológica e de componentes celulares do leite

As amostras coletadas para CCS foram encaminhadas sob refrigeração ao Laboratório da Rede Brasileira de Qualidade do Leite, em Juiz de Fora/MG e foram analisadas em equipamento composto pelos aparelhos Bentley 2000 e Somacount 300, conforme recomendações do IDF (1995). Os resultados de CCS foram expressos em número de células somáticas $\times 10^3$ ml.

A análise microbiológica foi realizada no Laboratório de Microbiologia do Leite da EGL em acordo com o “National Mastitis Council” (NMC, 1987) seguindo as adaptações propostas por Brito e Brito (1999). Após inoculação de 0,01mL de cada amostra de leite, as placas de ágar-sangue foram examinadas em 24 e 48 horas de incubação. Após 24 horas, os isolados foram inoculados em placas de ágar BHI por mais 24 horas. Em seguida, foi realizado esfregaço corado pelo método de Gram para verificação da morfologia e coloração do microrganismo.

Cocos gram-positivos são diferenciados pelo teste da catalase nos gêneros *Streptococcus* e *Staphylococcus*. Para as bactérias do gênero *Staphylococcus*, foi empregado o teste da coagulase para diferenciá-las em coagulase-positivo (*S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus*) e coagulase-negativo (*S. chromogenes*, *S. simulans*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*). Teste confirmatório de aglutinação diferenciou *S. aureus* dos outros coagulase-positivo. Para a diferenciação de *Streptococcus* sp. foram realizados os testes de CAMP, esculina, bile-esculina, NaCl e hipurato (NMC, 1987).

Para contagem diferencial de células (CDC) do leite foi realizado esfregaço em lâmina, adaptado de Paape et al. (1965), no mesmo dia da coleta. As lâminas foram confeccionadas em duplicata com 0,01 mL da amostra e após secas e fixadas em fixador Carnoy, foram coradas em pyronin-y-verde de metila (PYMG). Os esfregaços de leite corados foram examinados em microscopia de campo claro, com magnitude de 100X. Os leucócitos foram diferenciados em neutrófilos, monócitos, linfócitos, basófilos e eosinófilos e ainda foram contabilizadas as células “não identificadas”, que não se enquadraram na classificação dos leucócitos. Foram contadas 200 células e o número de células de cada tipo das horas 0, 6 e 24h após desafio do LPS foi somado e a média calculada. Em seguida, foram calculadas as porcentagens para posterior análise estatística.

2.4.2. Expressão gênica em células do leite

Para a análise da expressão gênica, foram utilizadas as amostras de leite coletadas seis horas após o desafio com LPS, dos quartos mamários tratado (LPS) e placebo (Plac). A separação das células do leite foi realizada por centrifugação a 1500 x g durante 15 minutos a 4°C de todo o volume do leite obtido, seguida de sucessivas lavagens com solução de PBS estéril. O pellet de células recuperado foi armazenado em ultrafreezer a -80°C. Para extração do RNA total das células mamárias foi empregado o kit de extração de RNA total PureLink RNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). O protocolo iniciou-se com a lise das células na presença de isotiocianato de guanidina e 2-mercaptoetanol, capazes de proteger o RNA de RNases endógenas. Após homogeneização, adicionou-se etanol e a amostra foi processada através de uma coluna contendo

membrana de sílica na qual o RNA se liga. O RNA purificado foi então eluído com água livre de RNases e imediatamente prosseguiu-se com a análise da concentração e qualidade de cada amostra obtida. O RNA foi avaliado por densidade óptica em absorbâncias de 260 e 280 nm e a razão de absorção de 260/280 foi de aproximadamente 2,0. A integridade do RNA também foi analisada em gel de agarose desnaturante. O RNA eluído foi submetido à reação de degradação do DNA para evitar qualquer tipo de contaminação na reação de amplificação do fragmento de interesse na amostra em estudo. Para tanto, o DNA foi degradado com 1 U da enzima DNase (Promega) em solução tamponada com 40 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM MgSO₄ e 1 mM CaCl₂ durante 30 minutos a 37°C. Em seguida a DNase foi inativada (2 mM EGTA, pH 8,0) aquecendo o tubo de reação a 65°C durante 10 minutos. O RNA total das amostras foi reverso-transcrito em um volume final de 20 µL empregando-se a enzima GoScript Reverse Transcriptase (Promega). Resumidamente, o protocolo iniciou-se com a incubação do RNA com 0,5 µg de oligonucleotídeo oligo-dT (Promega) por 5 minutos a 70°C. Em seguida, foi adicionado ao tubo de reação tampão 1X, 3,0 mM de MgCl₂, 0,5 mM de dNTP, 40 unidades de inibidor de RNases e 1,0 µL da enzima transcriptase reversa. A reação foi conduzida a 42°C durante 60 minutos, seguindo por 15 minutos a 70°C e resfriamento a 4°C.

O estudo da amplificação dos genes de interesse foi realizado pela técnica de qRT-PCR qualitativo relativo utilizando o sistema SybRGreen (Life Technologies, Carlsbad, CA). O volume total de reação foi de 20 µL e foi composto de 1,0 µL de cDNA (concentração média de 10 ng/µL), 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 10 µL Sybr Green PCR Master Mix (Life Technologies, Carlsbad, CA) que contém todos os componentes necessários para a reação incluindo o fluoróforo Sybr Green I. Todas as reações foram realizadas no termociclador StepOnePlus® Applied Biosystem (Life Technologies, Carlsbad, CA). As etapas da PCR quantitativa foram as seguintes: estágio de desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, e anelamento dos primers e extensão a 60°C por 1 minuto. Cada amostra foi analisada em duplicata, tanto para o gene alvo como para o gene controle endógeno. As sequências dos 28 transcritos estudados estão descritas no Anexo I. Todas as amplificações foram finalizadas

com a curva de dissociação ou curva de *melting*, confirmando a especificidade da reação e ausência de formação de dímeros de *primers* ou qualquer outro produto inespecífico. A eficiência da RT-PCR foi realizada para todos os pares de primers e os tamanhos dos fragmentos produzidos foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Foram utilizados três genes de referência endógena (Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase – GAPDH, Beta actina e Ubiquitina C - UBC), os quais foram selecionados com base na eficiência e estabilidade de expressão entre os tratamentos estudados. A expressão gênica foi quantificada usando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (2008) comparando a expressão dos genes alvo com a média geométrica dos genes de referência. Para tanto, foi calculado: $\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct \text{ tratamento} - \Delta Ct \text{ controle})$. A equação proposta Schmittgen e Livak (2008) possibilita a comparação das mudanças no perfil de expressão gênica de cada gene de interesse em relação a um calibrador (tratamento controle) e entre diferentes amostras. O número dois na base da fórmula representa que a quantidade de material genético da reação é dobrada a cada novo ciclo e o Ct se refere a ciclo “threshold” que é a quantidade de ciclos necessários para que a amostra atinja o limiar de detecção na fase exponencial da amplificação.

2.4.3. Análises hormonais

Os parâmetros hormonais foram avaliados no sangue periférico de todos os animais experimentais. Para tal, as coletas de sangue foram realizadas nos tempos -24, 0, 4, 6, 10, 24, 48 e 72 horas após desafio do LPS. Foram colhidos 9,0mL de sangue de cada animal pela veia coccígea, em função da facilidade de contenção do animal no brete, seguindo rigorosa assepsia da região onde a agulha foi inserida. O tubo continha heparina para obtenção do plasma e posterior análise de cortisol (CORT), tiroxina (T4), triiodotironina (T3), fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-1) e insulina (INS) e foi mantido sob refrigeração até seu processamento. No laboratório, o tubo foi centrifugado a 1.500g durante 15 minutos para separação do plasma e congelados a -20°C. Os hormônios CORT, T4, T3, IGF-1 e INS foram analisados em duplicata no plasma por análise de imunoenensaio (ELISA), utilizando kit comercial de acordo com as instruções do fabricante (Monobind Inc, Lake Forest, Ca 92630, EUA). Os

mesmos foram validados pela demonstração de curvas paralelismo entre concentrações padrão e plasma diluído em série. Em plasma, os coeficientes de variação intra e inter-ensaio (CV) foram inferiores a 3,5 e 6,0%, respectivamente, para todos os hormônios.

2.4 Análises estatísticas

Os tratamentos considerados no estudo foram: estresse por calor (grupo HS) e o controle (CTR), administração de LPS (LPS) ou placebo (Plac).

As análises estatísticas foram realizadas no Software SPSS® Statistics versão 8.0 (SPSS, 1998). Os dados foram avaliados quanto à normalidade da distribuição, levando em consideração o número de observações, sendo teste Kolmogorov-Smirnov para variáveis com número de observações maior que 50 e o teste Shapiro-Wilk para variáveis com número de observações menor ou igual a 50.

As variáveis com distribuição normal (produção de leite, CORT, T3, T4, IGF-1, INS e expressão gênica) foram analisadas pela Análise de Variância (ANOVA) utilizando modelos lineares generalizados considerando os efeitos de tratamento, hora de coleta e sua interação como efeitos fixos e animal como efeito aleatório. Para avaliar a expressão gênica foi realizada uma análise de variância, utilizando um modelo linear generalizado, considerando o efeito fixo de tratamento e animal como efeito aleatório. Para os efeitos significativos das variáveis paramétricas, as médias foram comparadas usando o teste de Fisher com significância de $p \leq 0,05$. Os dados destas variáveis foram apresentados nas tabelas e gráficos como média \pm erro-padrão médio.

Já para as variáveis com distribuição não normal (TVag, TVag12hrs pós LPS, FR, CCS, composição, porcentagem de neutrófilos, monócitos, linfócitos, basófilos e eosinófilos) as medianas foram comparadas pelo teste de Mann-Whitney e os dados foram apresentados nas tabelas como medianas \pm erro-padrão médio. Os dados de cultura microbiológica foram avaliados de forma descritiva e apresentados em porcentagem de amostras positivas dentro dos tratamentos HS e CTR para os patógenos isolados, sem comparação entre as médias.

3. Resultados

3.1. Variáveis fisiológicas e hormonais

Na tabela 1 são comparadas as médias de temperatura vaginal e frequência respiratória dos grupos HS e CTR antes (dias 0 a 9), durante (dia 10) a após a administração da LPS (dias 11, 12 e 13). Para o cálculo destas médias foram considerados os dados registrados das 7h às 15h (que corresponde ao período que as vacas foram submetidas aos tratamentos: estresse por calor ou controle).

Tabela 1. Temperatura vaginal (TVag) e frequência respiratória (FR) antes, durante e após o desafio LPS das vacas Girolando submetidas aos tratamentos HS e CTR

Variáveis fisiológicas	Tratamentos		EPM	T ¹
	HS	CTR		
Média das 7 às 15h	(n =12)	(n =12)		
TVag (°C)* dias 1 a 9	39,12a	38,75b	0,02	
TVag (°C)* dia 10	39,25a	39,00b	0,02	0,01
TVag (°C)* dias 11 a 13	39,07a	38,43b	0,01	
FR (mov./min)* dias 0 a 9	51	53	0,60	
FR (mov./min)* dia 10	52	52	1,14	0,68
FR (mov./min)* dia 11 a 13	53	52	0,88	

* Variável não paramétrica, teste Mann-Witney para comparação entre medianas

¹ T - efeito de tratamento

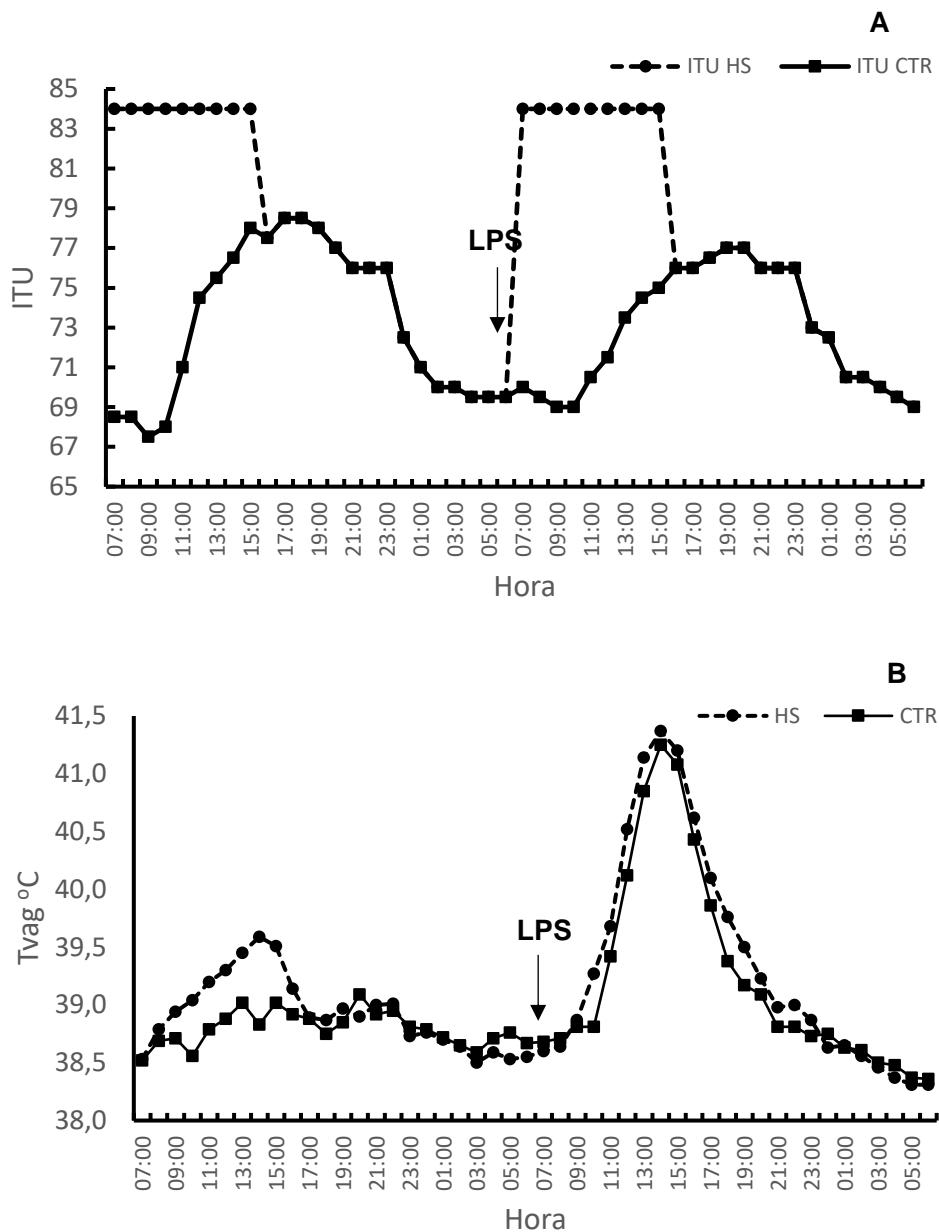
^{a,b} Medianas na mesma linha seguidas de letras distintas diferem significativamente ($p \leq 0,05$)

EPM: erro padrão da média

Os animais do grupo HS apresentaram temperatura vaginal significativamente maior que vacas do grupo CTR antes, durante e após a administração da LPS. Não houve efeito significativo do estresse por calor (HS ou CTR) e da administração de LPS sobre a FR.

Na Figura 2, é possível observar a evolução do índice de temperatura e umidade (ITU, Fig. A) e da temperatura vaginal (TVag, Fig. B) média dos animais submetidos aos tratamentos HS e CTR, 24 horas antes e após a administração da LPS.

Figura 2. Evolução do ITU médio (A) e evolução da temperatura vaginal (B) dos grupos HS e CTR nas doze horas antes e após a administração do LPS



Na Tabela 2, apresentam-se as médias das concentrações de CORT, T4, T3, IGF1 e INS das horas -24, 0, 4, 6, 10, 24, 48 e 72 horas após desafio do LPS.

Tabela 2. Resultados da concentração plasmáticas de cortisol (CORT), tiroxina (T4), triiodotironina (T3), IGF-1 e insulina das vacas Girolando submetidas aos tratamentos HS e CTR, desafiadas com LPS

Variáveis	Tratamentos		EPM	T ¹	Valor de p	
	HS (n =12)	CTR (n =12)			H	TxH
CORT (ng/mL)	54,71	49,26	6,42	0,65	0,01	0,01
T4 (ng/mL)	5,09	5,11	0,22	0,95	0,01	0,02
T3 (ng/mL)	1,68	1,75	0,05	0,66	0,01	0,37
IGF-1 (pg/mL)	26,07	25,35	1,06	0,71	0,73	0,90
INS (ng/mL)	1,13	0,76	0,12	0,23	0,01	0,04

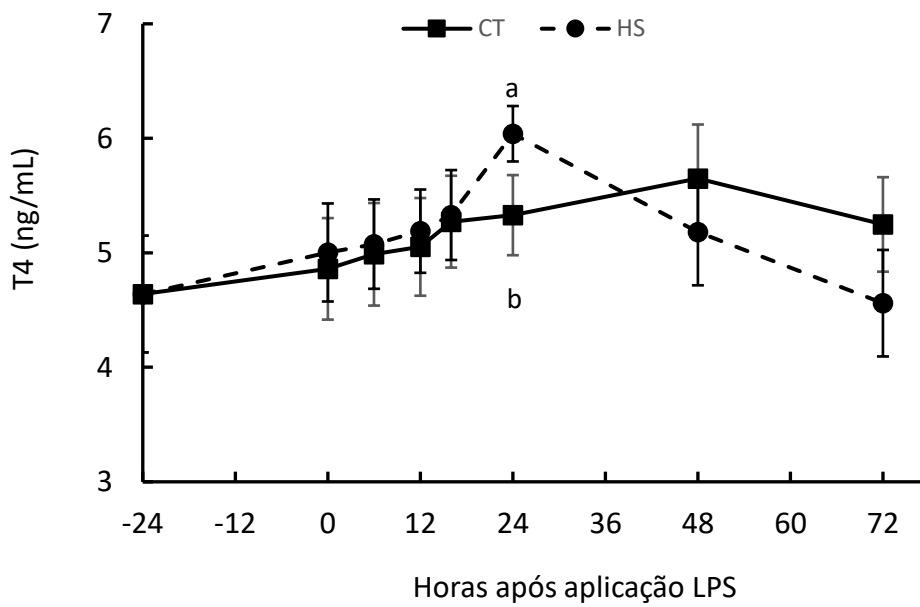
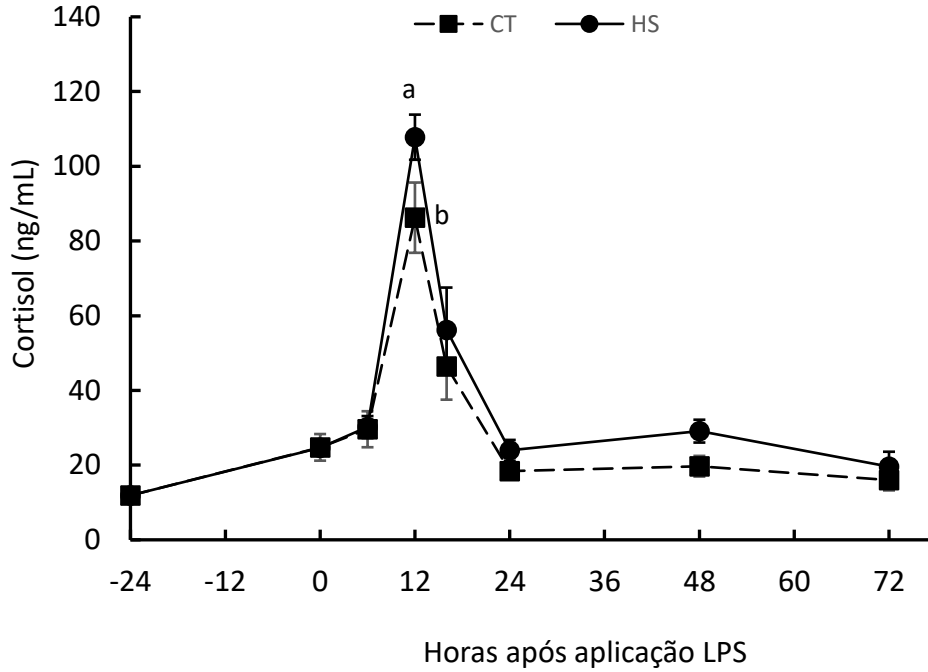
¹ T - efeito de tratamento, H - efeito de hora, TxH - interação tratamento x hora

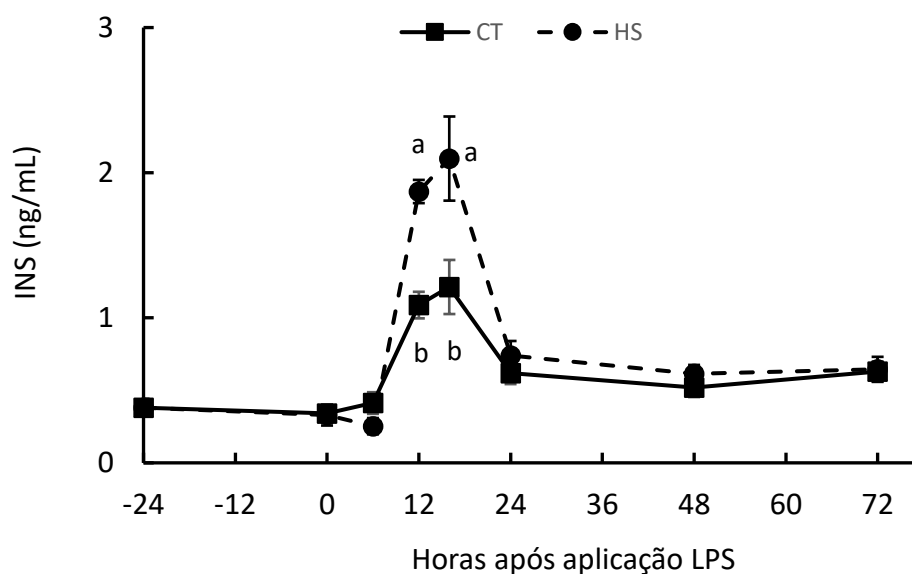
^{a,b} Médias na mesma linha seguidas de letras distintas diferem significativamente ($p \leq 0,05$)

EPM: erro padrão da média

Apesar das médias entre os grupos HS e CTR não se diferenciarem para nenhum dos hormônios, houve interação significativa entre estresse por calor e administração do LPS (interação tratamento x hora). O grupo HS apresentou maiores concentrações de CORT (12h pós LPS), T4 (24h pós LPS) e INS (12 e 24h pós LPS) quando comparado ao grupo CTR (Figura 3).

Figura 3. Concentração de cortisol, tiroxina e insulina plasmática antes e após a administração de LPS dos grupos HS e CTR





A média da produção de leite das vacas dos grupos sob estresse por calor e controle são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Média de produção de leite (kg/dia) de vacas Girolando submetidas aos tratamentos HS e CTR

	Tratamentos		EPM	T ¹	Valor de p	
	HS (n =12)	CTR (n =12)			H	TxD
Produção de leite (kg/dia)	15,01	15,65	0,30	0,24	0,01	0,91

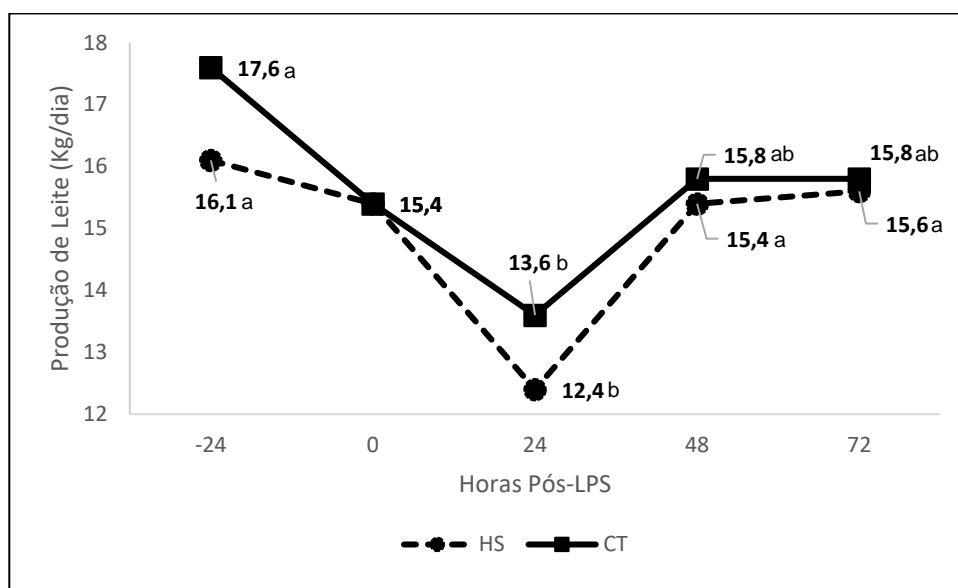
¹ T - efeito de tratamento, H - efeito de hora, TxD - interação tratamento x hora

^{a,b} Médias na mesma linha seguidas de letras distintas diferem significativamente ($p \leq 0,05$)

EPM: erro padrão da média

Não houve efeito do estresse por calor sobre a produção de leite dos animais no período avaliado ($p > 0,05$). Contudo, o efeito das horas foi significativo, como mostra a Figura 4.

Figura 4. Produção de leite (kg/dia) ao longo das horas de desafio LPS dos grupos HS e CTR



Neste caso, a produção de leite das vacas reduziu significativamente ($p \leq 0,05$) nas 24 horas após a administração do LPS e voltou ao patamar anterior ao desafio 48 horas depois.

Os resultados relacionados à contagem de células somáticas dos quartos mamários submetidos a LPS (LPS) ou placebo (Plac) encontram-se descritos nas Tabela 4 e 5, respectivamente, e consideram as coletas realizadas -24 a 72 horas após o desafio LPS.

Tabela 4. Resultado da contagem de células somáticas ($\times 1.000$ células/mL) dos quartos mamários tratados (LPS) ao longo das horas pós administração de LPS nas vacas Girolando dos grupos HS e CTR

Hora	HS (LPS)		CTR (LPS)	
	Mediana	EPM	Mediana	EPM
-24	28a	57,14	22a	73,13
0	60a	485,93	52a	46,76
6	8932b	2900,36	9999b	1497,11
24	9999b	1220,51	9999b	438,15
48	8974b	2566,36	7487b	2676,56
72	2862b	2402,13	1969b	3402,40

*Letras minúsculas diferentes entre linhas diferem estatisticamente pelo teste de Mann-Witney ($p \leq 0,05$)
EPM: erro padrão da média

Antes do desafio, a CCS dos quartos mamários LPS era inferior a 100.000 células/mL tanto para o grupo HS quanto para o CTR, sem diferença significativa entre eles (comparação entre colunas). Entretanto, a CCS aumentou significativamente ($p \leq 0,05$) em ambos os grupos, seis horas após a administração do LPS e continuou alta 24, 48 e 72 horas depois (comparação entre linhas). Não houve diferença na CCS, ao longo do tempo, entre os animais estressados e controle ($p > 0,05$). Portanto, o efeito observado de aumento da CCS ocorreu em função da administração do LPS, sem influência do estresse por calor.

Tabela 5. Contagem de células somáticas ($\times 1.000$ células/mL) dos quartos mamários controle (**Plac**) ao longo das horas após administração de placebo nas vacas Girolando dos grupos HS e CTR

Hora	HS (Plac)		CTR (Plac)	
	Mediana	EPM	Mediana	EPM
-24	26a	82,16	38a	18,58
0	41a	150,27	44a	15,47
6	135b	2955,2	408b	194,22
24	242b	698,53	141b	84,84
48	259b	760,51	261b	812,25
72	102b	3796,57	282b	865,61

*Letras minúsculas diferentes entre linhas diferem estatisticamente pelo teste de Mann-Witney ($p \leq 0,05$)
EPM: erro padrão da média

Para os quartos mamários controle (Plac), também não houve diferença significativa na CCS entre os grupos HS e CTR após administração do placebo (comparação entre colunas), ou seja, o estresse por calor não afetou a CCS. Interessante notar que houve aumento significativo da CCS nestes quartos mamários controle nas horas seguintes ao desafio com LPS realizado nos quartos mamários adjacentes (comparação entre linhas).

Os resultados da cultura microbiológica do leite dos quartos mamários tratados com LPS (LPS) ou Placebo (Plac) estão descritos na Tabela 6 e consideraram as amostras coletadas nas horas -24 a 72 horas após administração do LPS.

Tabela 6. Resultados (em porcentagem) da cultura microbiológica do leite dos quartos mamários LPS e Plac após administração do LPS

Tratamento		Isolado (%)	24h	0 h	12 h	24h	48h	72h
HS - LPS	Sem crescimento		83,3	91,7	100,0	100,0	91,7	83,3
	<i>Staphylococcus</i> sp.		8,3	0,0	0,0	0,0	0,0	16,7
	<i>Staphylococcus</i> coagulase positivo/ <i>Streptococcus</i> sp./ <i>S. uberis</i>		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>		8,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	<i>Trueperella pyogenes</i>		0,0	8,3	0,0	0,0	8,3	0,0
CTR - LPS	Sem crescimento		83,3	83,3	100,0	91,7	83,3	75,0
	<i>Staphylococcus</i> sp.		8,3	8,3	0,0	0,0	8,3	16,7
	<i>Staphylococcus</i> coagulase positivo <i>Streptococcus</i> sp./ <i>S.uberis</i> / <i>S.dysgalactiae</i>		8,3	8,3	0,0	8,3	8,3	8,3
			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
HS – Plac	Sem crescimento		75,0	75,0	66,7	75,0	66,7	75,0
	<i>Staphylococcus</i> sp.		8,3	16,7	25,0	25,0	25,0	16,7
	<i>Staphylococcus</i> coagulase positivo		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	<i>Streptococcus</i> sp.		0,0	8,3	0,0	0,0	8,3	0,0
	<i>Streptococcus uberis</i>		8,3	0,0	8,3	0,0	0,0	8,3
		8,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
CTR – Plac	Sem crescimento		75,0	83,3	91,7	91,7	83,3	75,0
	<i>Staphylococcus</i> sp.		25,0	16,7	8,3	8,3	16,7	25,0
	<i>Staphylococcus</i> coagulase positivo/ <i>Streptococcus</i> sp./ <i>uberis</i> / <i>S.dysgalactiae</i>		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

HS = grupo heat stress; CTR = grupo controle LPS= quarto mamário tratado Plac=quarto mamário controle

A maior parte das amostras não apresentou crescimento bacteriano, indicando ausência de mastite subclínica nestes quartos mamários. Além disso, não houve isolamento dos principais microrganismos para ocorrência da mastite bovina, *S. aureus* e *S.agalactiae*. Deste modo, a contagem de bactérias se manteve praticamente a mesma após a administração do LPS.

As Tabelas 7 e 8 apresentam os resultados da contagem diferencial de células (porcentagem) dos quartos mamários tratados com LPS (LPS) e dos quartos mamários que receberam placebo (Plac) das vacas Girolando HS e CTR, respectivamente. Os resultados consideram as amostras coletadas nas horas 0, 6 e 24 horas pós LPS.

Tabela 7. Frequência (em porcentagem) dos diferentes leucócitos encontrados em esfregaço de amostras de leite dos quartos mamários inoculados com LPS e os quartos mamários Placebo das vacas Girolando do **grupo HS** nas horas 0, 6 e 24 após o desafio com LPS

HS	0		6		24	
	LPS	Plac	LPS	Plac	LPS	Plac
Neutrófilos	60,25	57,73	97,12a	75,50b	100a	68,17b
Linfócitos	2,72	4,75	0a	1,98b	0a	3,78b
Monócitos	1,17	0,47	0a	2,34b	0a	2,64b
Basófilos ¹	-	-	-	-	-	-
Eosinófilos ¹	-	-	-	-	-	-
Não identificadas	36,34	32,63	1,44a	21,68b	0a	26,98b

* Variável não paramétrica, teste Mann-Witney para comparação entre medianas

¹Número de basófilos e eosinófilos foi próximo de zero, não sendo possível analisar estatisticamente essas células

^{a,b}Medianas na mesma linha seguidas de letras distintas diferem significativamente ($p \leq 0,05$)

A porcentagem de neutrófilos dos quartos mamários LPS aumentou significativamente nas horas 6 e 24 pós LPS quando comparado ao Plac ($p \leq 0,05$). Inversamente, a porcentagem de linfócitos, monócitos e células não identificadas foram significativamente maiores no quarto mamário Plac quando comparado ao LPS ($p \leq 0,05$).

Tabela 8. Frequência (em porcentagem) dos diferentes leucócitos encontrados em esfregaço de amostras de leite dos quartos mamários inoculados com LPS e os quartos mamários Placebo das vacas Girolando do **grupo CTR** nas horas 0, 6 e 24 após o desafio LPS

CTR	0		6		24	
	LPS	Plac	LPS	Plac	LPS	Plac
Neutrófilos	61,25	59,75	100a	69,38b	100a	65,25a
Linfócitos	4,78a	0b	0	0	0a	1,6b
Monócitos	0	0	0a	2,86b	0a	0,96b
Basófilos ¹	-	-	-	-	-	-
Eosinófilos ¹	-	-	-	-	-	-
Não identificadas	33,91	38,53	0a	24,27b	0a	28,72b

* Variável não paramétrica, teste Mann-Witney para comparação entre medianas

¹Número de basófilos e eosinófilos foi próximo de zero, não sendo possível analisar estatisticamente essas células.

^{a,b}Medianas na mesma linha seguidas de letras distintas diferem significativamente ($p \leq 0,05$)

A mesma distribuição do perfil celular ocorreu para as vacas do grupo CTR, sendo a porcentagem de neutrófilos significativamente superior no quarto mamário LPS e a porcentagem de linfócitos, monócitos e células não identificadas significativamente maiores nos quartos mamário Plac nas horas 6 e 24 pós aplicação do LPS.

Quando as porcentagens de cada tipo celular dos quartos mamários LPS do grupo HS foram comparadas com as do grupo CTR, não houve diferença significativa entre nenhuma delas ($p > 0,05$), o que, portanto, indica não ter havido efeito do estresse por calor na distribuição celular da glândula mamária das vacas. O mesmo ocorreu quando a porcentagem dos tipos celulares dos quartos mamários Plac dos dois grupos foram comparados ($p > 0,05$).

Na tabela 9 e Figura 5 apresentam-se os resultados de expressão gênica das células do leite dos quartos mamários LPS e Plac das vacas dos grupos HS e CTR. Os genes alvo relacionam-se com respostas ao estresse por calor, inflamação, resposta imune e estresse oxidativo. A descrição completa dos primers, nome, tamanho esperado de amplicon e código no GenBank estão descritos no Anexo II (página 108).

Tabela 9. Expressão gênica mensurada nas células da glândula mamária de vacas Girolandas em lactação, submetidas ao estresse por calor (HS) em relação ao tratamento controle (CTR) e desafiadas pela administração de LPS ou Placebo

Gene	HS ¹		CTR		EPM ²	Valor de p		
	LPS	Placebo	LPS	Placebo		T*	D [#]	TxD ⁺
<i>HSP40</i>	4,28	0,32	2,81	1,00	2,19	0,81	0,03	0,39
<i>HSP60</i>	1,10	0,44	2,53	1,00	0,75	0,24	0,18	0,87
<i>HSP70</i>	4,69	2,24	3,63	1,00	2,09	0,66	0,9	0,24
<i>HSP90</i>	9,19	0,43	8,25	1,00	2,99	0,95	0,01	0,81
<i>GR</i>	1,75	3,69	2,94	1,00	0,05	0,12	0,001	0,99
<i>IL1α</i>	11,61	1,63	20,34	1,00	8,02	0,37	0,01	0,5
<i>IL1β</i>	38,67	2,08	41,07	1,00	12,30	0,89	0,001	0,92
<i>IL2</i>	11,27	3,58	4,01	1,00	11,14	0,28	0,92	0,44
<i>IL6</i>	8,65	3,54	3,08	1,00	3,88	0,19	0,24	0,37
<i>IL8</i>	32,72	0,74	35,73	1,00	10,61	0,58	0,01	0,58
<i>TNFα</i>	5,55	2,06	6,12	1,00	3,82	0,97	0,10	0,69
<i>TGFβ3</i>	3,73	1,63	1,06	1,00	0,69	0,63	0,25	0,11
<i>GPx1</i>	2,19	0,56	2,21	1,00	0,50	0,64	0,03	0,88
<i>GPx3</i>	16,84	0,43	17,78	1,00	2,31	0,30	0,21	0,29
<i>SOD1</i>	0,32	0,33	0,65	1,00	0,33	0,01	0,24	0,27
<i>iNOS</i>	32,97	1,29	16,14	1,00	11,58	0,43	0,10	0,62
<i>NOS2</i>	50,06	2,09	26,49	1,00	2,89	0,63	0,01	0,11
<i>COX2</i>	18,81	1,54	21,69	1,00	3,76	0,41	0,01	0,7
<i>CXCR2</i>	19,12	0,67	22,99	1,00	4,66	0,49	0,001	0,81
<i>TRAIL</i>	8,41	0,43	10,12	1,00	3,51	0,01	0,38	0,55
<i>TLR2</i>	25,68	0,94	56,04	1,00	10,12	0,32	0,01	0,32
<i>TLR4</i>	19,61	0,53	21,83	1,00	7,49	0,43	0,01	0,55
<i>NFKB1</i>	25,77	0,68	19,61	1,00	4,13	0,61	0,001	0,36
<i>NFKBIA</i>	24,69	0,82	16,65	1,00	6,33	0,44	0,01	0,42
<i>IRF3</i>	4,15	0,27	4,95	1,00	1,66	0,54	0,001	0,92
<i>F A S</i>	16,66	0,38	9,36	1,00	2,90	0,42	0,01	0,53
<i>FASL</i>	1,29	0,04	2,86	1,00	0,78	0,53	0,64	0,34
<i>CD4</i>	1,63	1,20	15,39	1,00	3,67	0,13	0,09	0,41
<i>CD14</i>	10,30	0,50	13,10	1,00	2,11	0,51	0,001	0,63

¹ Tratamentos: estresse por calor (HS), controle (CTR), lipossacarídeo (LPS), placebo (Plac)

² Erro padrão médio (EPM);

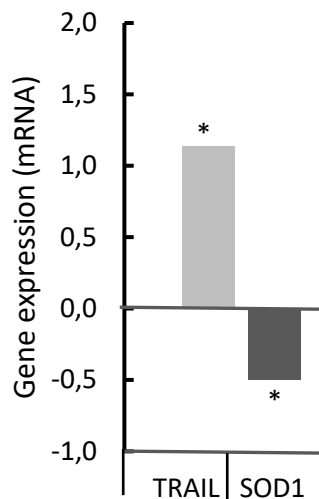
*Valor de significância (p) para o efeito “estresse por calor”

Valor de significância (p) para o efeito “desafio LPS”

+ Valor de significância (p) para a interação entre o efeito do estresse por calor e desafio LPS

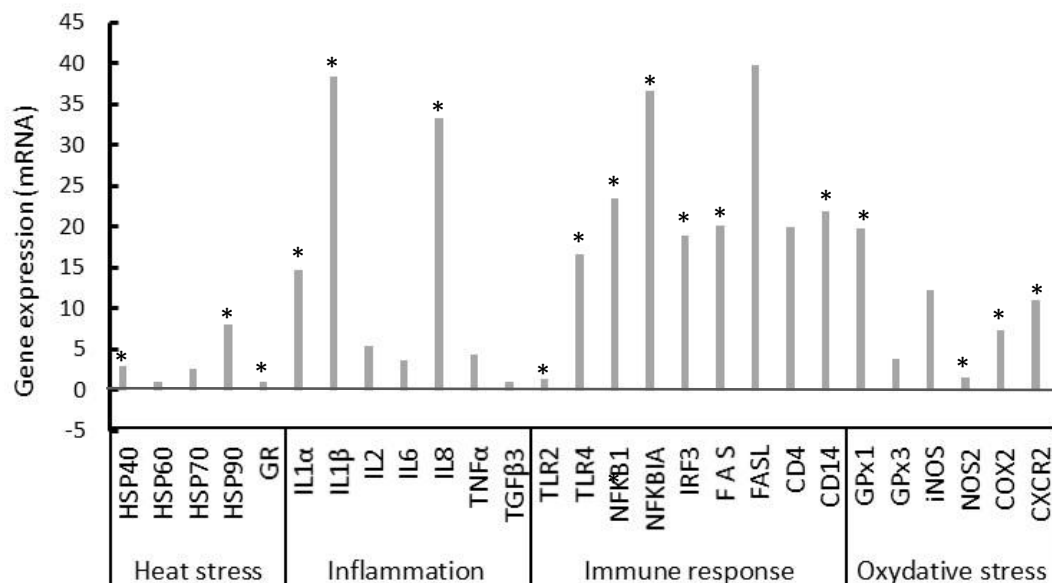
Figura 5. Expressão de genes associados com respostas ao estresse por calor, inflamação, resposta imune e estresse oxidativo mensurada nas células do leite de vacas Girolando em lactação. A expressão Gênica (eixo y) foi calculada em função do efeito estimulatório (upregulation) ou inibitório (downregulation) do estresse por calor (Fig. A, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct HS - \Delta Ct CTR$) ou desafio LPS (Fig. B, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct LPS - \Delta Ct Placebo$)

Fig. A: Estresse por calor



* Houve efeito significativo do estresse por calor ($p \leq 0,05$)

Fig. B: Administração de LPS



*Houve efeito significativo da administração de LPS ($p \leq 0,05$)

Sofreram efeito significativo do estresse por calor os genes *TRAIL* e *SOD1*. As vacas do grupo HS apresentaram aumento da expressão de *TRAIL* e redução da expressão de *SOD1*, quando comparadas as vacas do grupo CTR ($p \leq 0,05$).

Já o efeito do LPS foi observado nos genes *HSP40*, *HSP90*, *NFKB1*, *NFKBIA*, *FAS*, *GPX3*, *NOS2*, *GR*, *IL1 α* , *IL1 β* , *IL-8*, *TRL2*, *TRL4*, *IRF3*, *CD14*, *COX2* e *CXCR2*. Neste caso, todos esses genes apresentaram expressão significativamente maior nos quartos mamários LPS quando comparados aos quartos mamários submetidos ao tratamento placebo (Plac) ($p \leq 0,05$), independente se pertencentes aos grupos HS ou CTR. Não houve interação estresse por calor e LPS na expressão gênica.

4. Discussão

Este experimento *in vivo* é o primeiro que investiga a expressão gênica de genes relacionados à resposta imunológica da glândula mamária de vacas Girolando sob estresse por calor desafiadas com LPS. Os animais experenciaram alterações fisiológicas, hormonais, na produção de leite, no perfil e no número de células de defesa do leite e também, alteração na expressão de genes alvo relacionados à resposta inflamatória, resposta imune e estresse oxidativo em células do leite.

No presente estudo, os genes *CD14*, *TRL-4*, *NFKB1* e *NFKB1A* tiveram suas expressões aumentadas nos quartos mamários LPS quando comparado aos quartos mamários controle, o que demonstra que a via de resposta ao LPS foi plenamente ativada. O processo de reconhecimento do LPS pelo sistema imune, inicia-se com a conexão do LPS à proteína de ligação LPS do hospedeiro (LBP). O complexo LPS-LBP se liga à proteína CD14, localizada na superfície de macrófagos. Esse complexo é reconhecido pelo receptor de membrana TRL-4 e proteína MD2 que se agregam e induzem à resposta inflamatória caracterizada pela liberação de mediadores pró-inflamatórios (Lu et al., 2008; Borghetti et al., 2009; Alnakip et al., 2014). A liberação destes mediadores ocorre por meio da translocação do fator nuclear B (NF- κ), que migra do núcleo celular

e regula a expressão das citocinas (Liebers et al., 2008; Wellnitz & Bruckmaier, 2012). Entretanto, o estresse por calor não impactou na expressão destes genes responsáveis pela ativação da via de resposta imune contra o LPS, já que não houve diferença entre os quartos LPS dos grupos HS e CTR. Outro gene relacionado à via de ativação contra o LPS é o gene *IRF-3*, que depois de ativado leva à produção da citocina interferon gama (Watts, 2008). Da mesma forma que os outros genes relacionados à via LPS, a expressão de *IRF-3* mostrou-se aumentada nos quartos mamários LPS, sem efeito do estresse por calor.

A temperatura vaginal média durante todo o período experimental e a registrada após a administração do LPS foi significativamente maior nas vacas HS quando comparado as vacas CTR. O aumento da temperatura corporal é considerado o sinal aparente de que a vaca está em estresse por calor (Tao et al., 2018). De fato, o aumento observado reflete o impacto do estresse por calor sofrido na câmara climática sob a resposta fisiológica destes animais. Entretanto, uma das consequências da administração de LPS é a ocorrência da febre, pelo seu potente efeito inflamatório, o que também explica o maior aumento da TVag após a LPS. Confirmando o efeito pirogênico destas citocinas, os genes relacionados à $IL1-\beta$ e a enzima relacionada às prostaglandinas (*COX-2*) tiveram suas expressões aumentadas nos quartos mamários LPS no presente estudo, o que sugere que o aumento da temperatura vaginal das vacas HS está relacionada também à administração do LPS e não somente ao estresse por calor sofrido. De fato, as citocinas pró-inflamatórias pirogênicas $TNF-\alpha$, $IL1-\beta$ e $IL-6$ liberadas na reação de fase aguda em resposta ao LPS, além das prostaglandinas (Conti et al., 2004; Plessers et al., 2015), já foram relatadas como importantes no desenvolvimento da febre.

A citocina $IL-1$ possui efeito direto no eixo hipotalâmico-pituitário, provocando aumento de cortisol (Besedovsky e del Rey, 2000), resultado que foi observado no presente estudo nas vacas HS após o desafio com LPS, alcançando valores acima de 50 ng/mL. O aumento do cortisol pode ser consequência tanto da resposta inflamatória ao LPS quanto do estresse por calor sofrido por estes animais. A secreção de glicocorticoides é uma resposta endócrina clássica ao estresse e visa promover ajustes fisiológicos para adaptação dos animais, como a mobilização de energia para enfrentamento do desafio (Kannan et al. 2000; Bomfim et al., 2022). As vacas HS também

apresentaram aumento de insulina após o LPS; segundo Mormede et al. (2007) o cortisol inibe a entrada de glicose nas células, contribuindo para o aumento da insulina no sangue. O hormônio T4 também se mostrou aumentado nas vacas HS, resultado que difere de estudos com animais submetidos apenas ao estresse por calor, nos quais ocorre redução dos hormônios tireoidianos como forma de limitar a produção de calor metabólico (Pragna et al., 2018). Novos estudos são necessários para aprofundar as causas deste aumento de T4 em vacas em estresse por calor desafiadas com LPS.

Outra importante citocina pró-inflamatória é a IL-8, que se liga aos receptores de quimiocina (CXCR2) na superfície dos neutrófilos, causando sua ativação (Bannerman et al., 2004, Zarrin et al., 2014, Alhussien & Dang, 2018). Os genes *IL-8* e *CXCR2* tiveram sua expressão aumentada nos quartos mamários LPS. Aliado a estes resultados, houve aumento significativo da CCS e da contagem de neutrófilos no leite dos quartos mamários nas 6, 24 e 48 horas após a administração do LPS, que comprovam a capacidade de resposta imunológica dos animais frente ao desafio LPS, via liberação de citocinas pró-inflamatórias e recrutamento de células de defesa, principalmente os neutrófilos. Os altos valores de CCS encontrados no leite dos quartos mamários LPS refletem a rápida e excelente resposta inflamatória do sistema imune da glândula mamária das vacas Girolando tolerantes ao estresse por calor frente ao agente agressor (Zarrin et al., 2014). Segundo Sordillo et al. (1989), os neutrófilos correspondem a cerca de 90% das células de defesa frente a um processo inflamatório recente e o pico de migração de neutrófilos para o leite leva de 8 a 12 horas à medida em que a liberação de citocinas atinge o máximo (Shuster et al., 1996), o que também foi observado no presente estudo. O funcionamento adequado do sistema de neutrófilos é crítico para a prevenção local da infecção no tecido mamário (Burton e Erskine, 2003). Os resultados do presente estudo indicam que as vacas Girolando em estresse por calor não tiveram sua capacidade de resposta imune comprometida pelos efeitos nocivos das altas temperaturas. Wellnitz et al. (2011), Vernay et al. (2012); Zarrin et al. (2014) e Johnzon et al. (2018) também observaram aumento de CCS 24 horas após infusão de LPS, mas nenhum dos trabalhos desafiou simultaneamente os animais ao estresse por calor, tornando inéditos os resultados do presente estudo.

Interessante pontuar que os valores de CCS dos quartos mamários submetidos ao placebo dos grupos HS e CTR foram significativamente maiores já nas seis primeiras horas após a aplicação do placebo e não reduziram ao patamar inicial 72 horas após a administração de LPS. Considerando que o placebo (solução fisiológica) não causa nenhuma reação inflamatória por si só e que o isolamento de microrganismos se manteve praticamente o mesmo, é possível considerar que houve uma influência indireta do LPS administrado no quarto mamário adjacente. Paixão et al. (2017) já relataram que mesmo anatomicamente separados, quartos mamários infectados podem promover aumento de CCS em quartos mamários adjacentes, resultado observado no presente estudo. Esta é uma informação relevante a ser considerada pelos programas de controle e prevenção de mastite das propriedades leiteiras, já que não somente o quarto mamário com mastite clínica pode impactar na CCS geral do rebanho.

A produção de proteínas de choque térmico (HSP) é a resposta celular mais conhecida do estresse por calor (Tao et al., 2018), mas sua expressão também está correlacionada a mudanças no sistema imunológico uma vez que estas são importantes ativadores do sistema imune inato por meio da liberação de citocinas (Wallin et al., 2002). No presente estudo, a expressão das HSP's 40 e 90 se mostraram aumentadas nos quartos mamários LPS tanto no grupo HS quanto no grupo CTR, resultado que sugere outra função das HSP's para além da expressão aumentada frente ao estresse por calor. Segundo Multhoff (2006), uma variedade de estímulos estressores, como infecções bacterianas e virais, podem iniciar a síntese de HSP's, o que também foi observado no presente estudo.

Tradicionalmente, a glutathione peroxidase-1 (*GPX1*) e a enzima superóxido desmutase (*SOD1*) são os principais sistemas de defesa antioxidante das células e têm sua atividade diminuída frente a estressores como o calor (Bai et al., 2021). No presente estudo, a combinação dos dois estressores, LPS e estresse por calor, agiu de forma independente sob estes genes relacionados ao estresse oxidativo das células. Enquanto *SOD1* teve sua expressão reduzida em função do calor, *GPX1* não foi alterado por este estressor. Ainda, *GPX1* atuou como esperado, aumentando sua expressão frente ao agressor LPS, de forma a proteger as células dos possíveis danos causados pelo processo inflamatório,

pois age na redução das espécies reativas de oxigênio (Lubos et al., 2011). A expressão aumentada nos quartos mamários LPS do gene *NOS2*, relacionado à oxido nítrico sintetase, demonstra a importância de genes relacionados a defesa antioxidante. A maior expressão de *NOS2* no presente estudo é resultado da resposta inflamatória localizada resultante de uma infecção ou dano tecidual (Cerqueira e Yoshida, 2002). Entretanto, níveis elevados de oxido nítrico também já foram negativamente relacionados a danos de estresse oxidativo em glândula mamária, resultando em excesso de metabólitos (Yin et al., 2011; Shi et al., 2016).

Este excesso de metabólitos causados pelo estresse oxidativo pode resultar em apoptose das células, processo natural de “turnover” celular que busca garantir a homeostase do sistema imune (Kennedy e DeLeo, 2009; Shi et al., 2016). No presente estudo, os genes *TRAIL* e *FAS*, relacionados a apoptose (Kennedy e DeLeo, 2009) foram influenciados significativamente pelos tratamentos. Ambos tiveram sua expressão aumentada, sendo *TRAIL* pelo estresse por calor e *FAS*, pela administração de LPS.

O estresse por calor não impactou a produção do leite dos animais do grupo HS de forma diferente ao grupo CTR nos dias subsequentes à administração de LPS. Ambos os grupos tiveram queda significativa na produção 24 horas após a aplicação do LPS, retornando ao patamar inicial 48 horas após o desafio. Esta redução da produção de leite pode ser creditada ao intenso processo inflamatório provocado pela ação do LPS, que é considerado o principal fator de virulência de *E. coli*; provoca dor, inchaço e edema no úbere e pode, em casos gravíssimos, causar choque endotóxico (Steele et al., 2019; Zaatout, 2022).

De modo geral, no presente estudo o estresse por calor não influenciou negativamente a contagem e o perfil de células somáticas, nem a expressão de genes relacionados a resposta imune celular das vacas Girolando desafiadas pelo processo inflamatório induzido pela administração LPS de *E. coli* na glândula mamária.

5. Conclusões

Embora o estresse por calor tenha aumentado significativamente a TVag e a expressão dos genes TRAIL (relacionado a apoptose) e diminuído a expressão do gene SOD1 (enzima antioxidante), a hipótese do presente estudo não foi confirmada, pois as vacas Girolando em estresse por calor mostraram resiliência quando desafiadas ao LPS de *E. coli*.

6. Referências

Alhussien, M.N., Dang, A.K. 2018. Milk somatic cells, factors influencing their release, future prospects, and practical utility in dairy animals: An overview. **Veterinary World**, v.11(5), p. 562-577

Alnakip, E.M.; Quintela-Baluja, M.; Böhme, K.; et al. 2014. The Immunology of Mammary Gland of Dairy Ruminants between Healthy and Inflammatory Conditions. **Journal of Veterinary Medicine**, doi: 10.1155/2014/659801. PMID: 26464939; PMCID: PMC4590879.

Amaral, B. C.; Connor, E.E.; Tao, S.; Hayen, M.J.; Bubolz, J.W.; Dahl, G.E. 2010. Heat stress abatement during the dry period influences prolactin signaling in lymphocytes. **Domestic Animal Endocrinology**, v.38, p.38–45.

Amaral, B. C.; Connor, E.E.; Tao, S.; Hayen, M.J.; Bubolz, J.W.; Dahl, G.E. 2011. Heat stress abatement during the dry period influences metabolic gene expression and improves immune status in the transition period of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.94, p.86–96.

Associação Brasileira de Criadores De Girolando- ABCG (2014). Produção de leite no Brasil e participação da genética Girolando com ênfase em reprodução. Disponível em: [Biblioteca-virtual - Associação Brasileira dos Criadores de Girolando](#). Acesso em: 21 abril de 2020.

Bai, H.; Li, T.; Yu, Y.; Zhou, N.; Kou, H.; Guo, Y.; Yang, L.; Yan, P. 2021. Cytoprotective Effects of Taurine on Heat-Induced Bovine Mammary Epithelial Cells In Vitro. **Cells**, v.10, p. 258. <https://doi.org/10.3390/cells10020258>

Bannerman, D.D. et al. Innate immune response to intramammary infection with *Serratia marcescens* and *Streptococcus uberis*. **Veterinary Research**, v.35, n.6, p.681-700, 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1051>

Besedovsky, H.O., del Rey, A., 2000. The cytokine–HPA axis feedback circuit. **Z. Rheumatology**, v.59, II26–II30.

Bomfim, G.F.; Merighe, G. K. F.; de Oliveira, S. A.; Negrao, J. A. 2022. Acute and chronic effects of cortisol on milk yield, the expression of key receptors, and apoptosis of mammary epithelial cells in Saanen goats G. F. **Journal of Dairy Science**, v.105, p. 818–830. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20364>.

Borghetti, P.; Saleri, R.; Mocchegiani, E.; Corradi, A.; Martelli, P. 2009. Infection, immunity and the neuroendocrine response. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 130(3-4), p.141-162.

Brito, M. A. V. P.; Brito, J. R. F. 1999. Diagnóstico microbiológico da mastite. Juiz de Fora, MG: **Embrapa Gado de Leite**. 26 p. (Embrapa Gado de Leite. Circular Técnica, 55).

Burton, J.L; Erskine, R.J. 2003. Immunity and mastites: Some new ideas for an old disease. **Veterinary Clinical Food Animal**, v. 19, p. 1–45.

Carabano, M.J.; Bachagha, K.; Ramon, M.; Diaz, C. 2014. Modeling heat stress effect on Holstein cows under hot and dry conditions: selection tools. **Journal of Dairy Science**, v.97, p.7889–790.

Cerqueira, N. F.; Yoshida, W. B. 2002. Óxido nítrico: revisão. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.17 p.417–423. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502002000600011>

Conti, B.; Tabarean, I.; Andrei, C.; Bartfai, T. 2004. Cytokines and fever. **Frontier of Bioscience**, v.9, 1433–1449.

International Dairy Federation. 1995. Milk: enumeration of somatic cells. Bruxelas. 8 p. (IDF. Standard 148 A).

IPCC, 2002. Sixth Assessment Report, Climate Change 2022: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Disponível em: [Climate Change 2022: Impacts, Adaptation and Vulnerability | Climate Change 2022: Impacts, Adaptation and Vulnerability \(ipcc.ch\)](https://www.ipcc.ch/report/ar6/wg2/). Acesso em: 07/03/2022.

Kannan, G.; Terrill, T.H.; Kouakou, B.; Gazal, O.S.; Gelaye, S.; Amoah, E.A.; Samake, S. 2000. Transportation of goats: effects on physiological stress responses and live weight loss. **Journal of Animal Science**, v.78, p.1450– 1457

Kennedy, A. D.; DeLeo, F. R. 2009. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. **Immunologic research**, v.43, p.25-61.

Johnzon, C.F; Dahlberg, J.; Gustafson, A.M.; Waern, I.; Moazzami, A.A.; Östensson, K.; Pejler, G. 2018. The Effect of Lipopolysaccharide-Induced Experimental Bovine Mastitis on Clinical Parameters, Inflammatory Markers, and the Metabolome:A Kinetic Approach. **Frontiers in Immunology**, v.9, p.1487.

Lacetera, N.; Bernabucci, U.; Scalia, D.; Basiricò, L.; Morera, P.; Nardone, A. 2006. Heat stress elicits different responses in peripheral blood mononuclear cells from Brown Swiss and Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v.89(12), p.4606-4612.

Liebers, V.; Raulf-Heimsoth, M.; Brüning, T. 2008. Health effects due to endotoxin inhalation (review). **Archieve Toxicology**, v.82(4), p.203-10. doi: 10.1007/s00204-008-0290-1. Epub 2008 Mar 6. PMID: 18322674.

Liu, M.; Zhang, C.; Xu, X.; Zhao, X.; Han, Z.; Liu, D.; Bo, R.; Li, J.; Liu, Z. 2021. Ferulic acid inhibits LPS-induced apoptosis in bovine mammary epithelial cells by regulating the NF- κ B and Nrf2 signalling pathways to restore mitochondrial dynamics and ROS generation. **Veterinary Research**, v.52(1), p.104. doi: 10.1186/s13567-021-00973-3. PMID: 34256834; PMCID: PMC8278735.

Louie, A.P.; Rowe, J.D.; Love, W.J.; Lehenbauer, T.W.; Aly, S.S. 2018. Effect of the environment on the risk of respiratory disease in preweaning dairy calves during summer months. **Journal of Dairy Science**, v.101, p.10230–10247. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13716>

Lu, Y.C.; Yeh, W.C.; Ohashi, P.S. 2008. LPS/TLR4 signal transduction pathway. **Cytokine**, v.42(2), p.145-151. doi: 10.1016/j.cyto.2008.01.006. Epub 2008 Mar 4. PMID: 18304834.

Lubos, E.; Loscalzo, J.; Handy, D.E. 2011. Glutathione Peroxidase-1 in Health and Disease: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. **Antioxidants & Redox Signaling**, p.1957-1997. <http://doi.org/10.1089/ars.2010.3586>

McManus, C. M; Louvandini, H.; Paim, T. P.; Silva, F. C. P.; Bernal, F. E. M. 2014. Factors affecting heat tolerance in crossbred cattle in central Brazil. **Ciência Animal Brasileira**, v.15(2), p.152–158. <https://doi.org/10.1590/1809-6891v15i28726>

Mendonça, L.C; Guimaraes, A.S.; Brito, M.A.V.P. 2012. Coleta de amostras leite para diagnóstico microbiológico da mastite. **Comunicado técnico 68**, Embrapa, Juiz de Fora, ISSN 1678-3131, julho, 2012.

Mormède, P.; Andanson, S.; Aupérin, B.; et al. 2007. Exploration of the hypothalamic–pituitary–adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. **Physiology & Behavior**, v.92, Issue 3, p.317-339, ISSN 0031-9384, <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.12.003>.

Multhoff, G. 2006. Heat Shock Proteins in Immunity. In: Starke, K., Gaestel, M. Molecular Chaperones in Health and Disease. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v.172. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/3-540-29717-0_12

National Mastitis Council (NMC), 1987. Laboratory and Field Handbook on Bovine Mastitis. **National Mastitis Council**, Arlington, 208 p.

National Research Council (NRC). 1971. A Guide to Environmental Research on Animals. **National Academy Science**, Washington, DC.

National Research Council (NRC). 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle, 7.ed. Washington, D.C., p. 381

[Paape](#), M. J.; [Tucker](#), H. A.; [Hafs](#), H. D. 1965. Comparison of methods for estimating milk somatic cells. **Journal of Dairy Science**, v.48, p. 191-196. doi: 10.3168/jds.s0022-0302(65)88193-0.

Paixão, M.G.; Abreu, L.R.; Richert, R.; Ruegg, P.L. 2017. Milk composition and health status from mammary gland quarters adjacent to glands affected with naturally occurring clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v.100, p.7522–7533. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12547>

Park, D.; Gu, B.; Park, Y.J.; Joo, S.S.; Lee, S.S.; Kim, S.H.; Kim, E.T; et al. 2021. Dynamic changes in blood immune cell composition and function in Holstein and Jersey steers in response to heat stress. **Cell Stress and Chaperones**, v. 26, p.705–720. <https://doi.org/10.1007/s12192-021-01216-2>

Plessers, E.; Wyns, H.; Watteyn, A.; Pardon, B.; De Backer, P.; Croubels, S. 2015. Characterization of an intravenous lipopolysaccharide inflammation model in calves with respect to the acute-phase response. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.163(1-2), p.46-56. doi: 10.1016/j.vetimm.2014.11.005. Epub 2014 Nov 14. PMID: 25534079.

Pragna, P.; Sejian, V.; Soren, N.M.; Bagath, M.; Krishnan, G.; Beena, V.; Devi, P.I.; Bhatta, R. 2018. Summer season induced rhythmic alterations in metabolic activities to adapt to heat stress in three indigenous (Osmanabadi, Malabari and Salem Black) goat breeds. **Biological Rhythm Research**, v.49, p.551–565.

Preez, J.D.; Giesecke, W.H.; Hattingh, P.J.; Eisenberg, B.E. 1990. Heat stress in dairy cattle under Southern African conditions. II. Identification of areas of potential heat stress during summer by means of observed true and predicted temperature-humidity index values. **Journal of Veterinary Research**, v.57(3), p.183–187.

Ribeiro, L.S.; Brandão, F.Z; Carvalheira, L.R.; Goes, T.J.F.; Torres Filho, R.A.; Quintão, C.C.R.; Pires, M.F.A.; Camargo, L.S.A.; Carvalho, B.B. 2019. Chromium supplementation improves glucose metabolism and vaginal temperature regulation in Girolando cows under heat stress conditions in a climatic chamber. **Tropical Animal Health and Production**, v. 52, p.1661–1668.

Ruegg, P. L. 2017. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. **Journal of Dairy Science**, v.100, p.10381–10397. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13023>.

Safa, S.; Kargar, S.; Moghaddam, G.A.; Ciliberti, M.G.; Caroprese, M. 2019. Heat stress abatement during the postpartum period: effects on whole lactation milk yield, indicators of metabolic status, inflammatory cytokines, and biomarkers of the oxidative stress. **Journal of Animal Science**, v.97, p.122–32. doi: 10.1093/jas/sky408

Schmittgen, T. D.; Livak, K. J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(t) method. *Nat. Protoc.* 3:1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>

Shi, H.; Guo, Y.; Liu, Y.; Shi, B.; Guo, X.; Jin, L.; Yan, S. 2016. The *in vitro* effect of lipopolysaccharide on proliferation, inflammatory factors and antioxidant enzyme activity in bovine mammary epithelial cells. ***Animal Nutrition***, v.2(2), p.99-104. doi: 10.1016/j.aninu.2016.03.005. Epub 2016 Mar 24. PMID: 29767022; PMCID: PMC5941019.

Shuster, D.E.; Lee, E-K.; Kehrli, M.E. Jr. 1996. Bacterial growth, inflammatory cytokine production, and neutrophil recruitment during coliform mastitis in cows within ten days after calving, compared with cows at midlactation. ***American Journal of Veterinary Research***, v. 57, p.1569–1575.

Sordillo, L. M., Nickerson, S. C.; Akers, R. M. 1989. Pathology of *Staphylococcus aureus* mastitis during lactogenesis: relationship with bovine mammary structure and function. ***Journal of Dairy Science***, v.72, p.228. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030289791013>.

SPSS Statistical Package for the Social Science. 1988. SPSS Inc, Chicago, IL.

Steele, N.M.; Swartz, T.H.; Enger, K.M.; Schramm, H.; Cockrum, R.R.; Lacy-Hulbert, S.J.; White, R.R.; Hogan, J.; Petersson-Wolfe, C.S. 2019. The effect of J5 bacterins on clinical, behavioral, and antibody response following an *Escherichia coli* intramammary challenge in dairy cows at peak lactation. ***Journal of Dairy Science***, v.102 (16), p.11233–11249.

Tao, S.; Orellana, R. M.; Weng, X.; Marins, T. N.; Dahl, G. E.; Bernard, J. K. 2018. Symposium review: The influences of heat stress on bovine mammary gland function. ***Journal of Dairy Science***, p. 5642–5654. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030218300195>.

Vernay, M. C. M. B.; Wellnitz, O.; Kreipe, L.; Van Dorland, H. A.; Bruckmaier, R. M. 2012. Local and systemic response to intramammary lipopolysaccharide challenge during long-term manipulated plasma glucose and insulin concentrations in dairy cows. ***Journal of Dairy Science***, v.95, p 2540–2549.

Vitali, A.; Felici, A.; Lees, A.M.; Giacinti, G.; Maresca, C.; Bernabucci, U.; Gaughan, J.B.; Nardone, A.; Lacetera, N. 2020. Heat load increases the risk of clinical mastitis in dairy cattle. ***Journal of Dairy Science***, v.103, p.8378– 8387. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17748>

Wallin, R. P. et al. 2002. Heat-shock proteins as activators of the innate immune system. ***Trends Immunology***, v.23(3), p. 130–135.

Watts C. 2008. Location, location, location: identifying the neighborhoods of LPS signaling. ***Nature Immunology***, v.9(4), p. 343-5. doi: 10.1038/ni0408-343. PMID: 18349810.

Wellnitz, O.; Arnold, E.T.; Bruckmaier, R.M. 2011. Lipopolysaccharide and lipoteichoic acid induce different immune responses in the bovine mammary gland. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 5405–5412.

Wellnitz, O.; Bruckmaier, R. M. 2012. The innate immune response of the bovine mammary gland to bacterial infection. **Veterinary Journal**, v. 192, n. 2, p. 148–152. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.09.013>>.

Yin, B.S.; Li, J.J.; Hu, X.S.; et al. 2011. Study on relationship between free radical oxidative damage and cow mastitis. **Prog Vet Med**, v.32, p.52e3

Zarrin, M.; Wellnitz, O.; Van Dorland, H.A.; Bruckmaier, R.M. 2014. Induced hyperketonemia affects the mammary immune response during lipopolysaccharide challenge in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p.330–339. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-7222>

Zaatout N. 2022. An overview on mastitis-associated *Escherichia coli*: Pathogenicity, host immunity and the use of alternative therapies. **Microbiology Research**, v.256, p.126960. doi: 10.1016/j.micres.2021.126960. Epub 2021 Dec 30. PMID: 35021119.

Anexo I. Informações sobre as características dos primers utilizados para avaliar o efeito do estresse por calor sobre a expressão gênica das células do leite

Gene	Sigla	Sequência dos Primers (5' à 3')	Código no GenBank	Fragmento (pb)
<i>Actin beta</i>	ACTB	5'-GATCTGGCACCACACCTTCT-3' 5'-CCAGAGGCATACAGGGACAG-3'	NM_173979	186
<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	GAPDH	5'-GGTGATGCTGGTGCTGAG-3' 5'-TGACAACTTTGAGGGTGTG-3'	AJ431207	181
<i>Ubiquitin C</i>	UBC	5'-ATGCAGATCTTTGTGAAGAC-3' 5'-CTTCTGGATGTTGTAGTC-3'	NM_001206307	189
<i>Bos taurus 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 mRNA</i>	11 β HSD2	5'-CGAGCACTTGAATGGGCAGTT-3' 5'-CCTGGGTAATAGCGGCGGAGT-3'	AF074706	123
<i>Apoptotic peptidase activating factor 1</i>	APAF1	5'-ACCTTGTTGGCGACTG-3' 5'-TTCTACTGAAATCGGAGC-3'	NM_001191507	96
<i>BCL2 associated X, apoptosis regulator</i>	BAX	5'-ATGGGCTGGACATTGGACTT-3' 5'-ACTGTCTGCCATGTGGGTGT-3'	NM_173894	110
<i>BCL2 apoptosis regulator</i>	BCL-2	5'-GATGACCGAGTATCTGAACCG-3' 5'-GACAGCCAGGAGAAATCAAACA-3'	NM_001166486	120
<i>Caspase 3</i>	CASP 3	5'-GACCATAGCAAAGGAGCA-3' 5'-CACTGTCTGTCTCAATACCAC-3'	NM_001286089	208
<i>Caspase 8</i>	CASP 8	5'-GTGGAGATGGAGAAGAGGA-3' 5'-CTGGAAGCGATTGTGACA-3'	NM_001045970	193
<i>cAMP responsive element binding protein 1</i>	CREB1	5'-CACTCAGCCAGGCACTACCA-3' 5'-GGAAGACGCCATAACAACCC-3'	NM_174285	171
<i>Capra hircus estrogen receptor 1 (ESR1), mRNA</i>	ER α	5'-CAGGAGGAAGAGCTGTCAGG-3' 5'-ATCATCTCTCTGGCGCTTGT-3'	XM_005684972	124
<i>Capra hircus estrogen receptor 2 (ESR2), mRNA</i>	ER β	5'-GCCTCCATGATGATGTCCTTGA-3' 5'-GAGCCGCACTTGGTCGTA-3'	NM_001285688	117
<i>Capra hircus progesterone receptor (PGR), mRNA</i>	PR	5'-TGCAGGACATGACAACAGCA-3' 5'-TTCCGAAAACCTGGCAGTG-3'	XM_005689375	123
<i>Fas cell surface death receptor</i>	F A S	5'-CAGATGTTGACTTGGGTAA-3' 5'-TGCGGAGCAGTTGGAC-3'	U34794	165

<i>Growth hormone receptor</i>	GHR	5'-CGTCTCTGCTGGTGAAAACA-3' 5'-AACGGGTGGATCTGGTTGTA-3'	NM_00128564 8	148
<i>Capra hircus insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR), partial mRNA</i>	IGF-1R	5'-TGGAGTGCTGTATGCCTCTGT-3' 5'-GGTCTCGGGCTCATCCTT-3'	XM_00569495 1	178
<i>Insulin receptor</i>	INSR	5'-CCTGGTGTCACCTTTCCTTCT-3' 5'-TTAGGTTCTGGTTGTCCAAGGCGT-3'	XM_00568239 8	101
<i>Capra hircus nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (glucocorticoid receptor) (NR3C1), transcript variant X4, mRNA</i>	GR	5'-CCATTTCTGTTACGGTGTG-3' 5'-CTGAACCGACAGGAATTGGT-3'	XM_00568308 7	132
<i>Capra hircus nuclear receptor subfamily 3 group C member 2 (NR3C2), transcript variant X3, mRNA</i>	MR	5'-GGGTCTATCTGTAGCCCTGGAA-3' 5'-TGTCTGGACTGGGAACCAT-3'	XM_00569119 6	100
<i>Bos taurus DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member B1 (DNAJB1), mRNA</i>	HSP40	5'-AGCCAGGATCAGCCTTC-3' 5'-AACACAACGGGTATGGT-3'	NM_00103376 3	84
<i>Bos taurus heat shock protein family D (Hsp60) member 1 (HSPD1), transcript variant 2, mRNA; nuclear gene for mitochondrial product</i>	HSP60	5'-ACTGGCTCCTCATCTCACTC-3' 5'-TGTTCAATAATCACTGTCCTTCC-3'	NM_00116660 9	147
<i>Capra hircus heat shock protein 70.1 (HSP70.1), mRNA</i>	HSP70	5'-GACGACGGCATCTTCAAG-3' 5'-GTTCTGGCTGATGTCCTTC-3'	NM_00128570 3	132

<i>Bos taurus</i> heat shock protein 90 alpha family class A member 1 (HSP90AA1), mRNA	HSP90	5'- GCATTCTCAGTTCATTGGCTATCC -3' 5'- GTCCTTCTTCTCTTCCTCCTCTTC- 3'	NM_00101267 0	190
<i>Bos taurus</i> nuclear factor kappa B subunit 1 (NFKB1), mRNA	NFKB1	5'-CAGCCTGGTGGGAAAACACT-3' 5'-CAGGCATCTGTCATTTCGTGC-3'	NM_00107640 9	150
<i>Bos taurus</i> NFKB inhibitor alpha (NFKBIA), mRNA	NFKBIA	5'- GAGACTCGTTCCTGCACTTAGC-3' 5'-CCAGAAGTGCCTCAGCGATT-3'	NM_00104586 8	174
<i>Bos taurus</i> prolactin receptor short form mRNA, complete cds	PRLRsf	5'-GAACCTCAGGCCCATCCCT-3' 5'-TCCGGATTCTCCAGCTTCTC-3'	AF027403	65
<i>Capra hircus</i> prolactin receptor (PRLR), mRNA	PRLRlf	5'-GCCCCAACTCCTGCTACTTT-3' 5'-GAGGCTCTGGTTCAACTATGT- 3'	NM_00128566 9	144
<i>Phosphatase and tensin homolog</i>	PTEN	5'-GCTGGAAAGGGACGAACTGG- 3' 5'-ACACATAGCGCCTCTGACTGG- 3'	NM_00131989 8	151
<i>Prostaglandin E synthase</i>	PTGES	5'-AAATGTACGTGGTGGCCGTC-3' 5'-CGTTCCACATCTGGGTCGTT-3'	NM_174443	124
<i>Prostaglandin F receptor</i>	PTGFR	5'-AGCCTTGCCATTGCTATCC-3' 5'-TAGTTCATTGATGAGGTGCC- 3'	NM_181025	127
<i>Bos taurus</i> transforming growth factor beta 1 (TGFB1), mRNA	TGFβ1	5'- TGGAGCTGTACCAGAAATATAGCA 3' 5'-GCCACTGCCGCACAACTC-3'	NM_00116606 8	120

Anexo II. Informações sobre as características dos primers utilizados para avaliar o efeito do estresse por calor e do desafio LPS sobre a expressão gênica das células do leite

Gene	Sigla	Primers iniciadores 5' à 3')	Código no GenBank	Fragmen to (pares de base)
<i>Actin beta</i>	ACTB	5'-GATCTGGCACCACACCTTCT-3' 5'-CCAGAGGCATACAGGGACAG-	NM_173979	186
<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	GAPDH	5'-GGTGATGCTGGTGCTGAG-3' 5'-TGACAATCTTGAGGGTGTG-3'	AJ431207	181
<i>Ubiquitin C</i>	UBC	5'-ATGCAGATCTTTGTGAAGAC-3' 5'-CTTCTGGATGTTGTAGTC-3'	NM_0012063 07	189
<i>Bos taurus prostaglandin G/H synthase-2 (PGHS-2) mRNA, complete cds</i>	COX-2	5'-TCCTGAAACCCACTCCCAACA- 5'-TGGGCAGTCATCAGGCACAG-	AF031698	242
<i>Bos taurus C-X-C motif chemokine receptor 2 (CXCR2), mRNA</i>	CXCR2	5'-CAACACTGACCTGCCCTCTA-3' 5'-CCAGGTTGAGCAGGTAGACA-	NM_0011012 85	197
<i>CD4 molecule</i>	CD4	5'-TGATGAAAGTGACTAAGTCCC 5'-TTCGGCTGATTTGAGCCCTT-3'	NM_0011032 25	121
<i>CD14 molecule</i>	CD14	5'-CACCTAGACCTGTCTGACAA- 5'-GAGATCAAGCACGCTGAGC-3'	NM_174008	319
<i>Fas cell surface death receptor</i>	F A S	5'-CAGATGTTGACTTGGGTAA-3' 5'-TGCGGAGCAGTTGGAC-3'	U34794	165
<i>Bos taurus Fas ligand (FASLG), mRNA</i>	FasL	5'-AAGAGGAGGGACCACAACACA 5'-GCTGGTGGACTCTCTGAGTTC	NM_0010988 59	141
<i>Capra hircus nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (glucocorticoid receptor) (NR3C1), transcript variant X4, mRNA</i>	GR	5'-CCATTTCTGTTACGGTGTG-3' 5'-CTGAACCGACAGGAATTGGT-	XM_0056830 87	132
<i>Glutathione peroxidase 1</i>	GPX1	5'-GCAAGGTGCTGCTCATTGAG-3' 5'-CGCTGCAGGTCATTCATCTG-3'	NM_174076	82

<i>Glutathione peroxidase 3</i>	GPX3	5'-CTAGCCACCCTCAAGTATGTT 5'-TCACATCGCCTTTCTCAAACAC	XM_0056831 83	76
<i>Bos taurus DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member B1 (DNAJB1), mRNA</i>	HSP40	5'-AGCCAGGATCAGCCTTC-3' 5'-AACACAACGGGTATGGT-3'	NM_0010337 63	84
<i>Bos taurus heat shock protein family D (Hsp60) member 1 (HSPD1), transcript variant 2, mRNA; nuclear gene for mitochondrial product</i>	HSP60	5'-ACTGGCTCCTCATCTCACTC-3' 5'-TGTTCAATAATCACTGTCCTTC	NM_0011666 09	147
<i>Capra hircus heat shock protein 70.1 (HSP70.1), mRNA</i>	HSP70	5'-GACGACGGCATCTTCAAG-3' 5'-GTTCTGGCTGATGTCCTTC-3'	NM_0012857 03	132
<i>Bos taurus heat shock protein 90 alpha family class A member 1 (HSP90AA1), mRNA</i>	HSP90	5'-GCATTCTCAGTTCATTGGCTAT 5'-GTCTTCTTCTCTTCTCCTCT	NM_0010126 70	190
<i>Bos taurus interleukin 1 alpha (IL1A), mRNA</i>	IL-1 α	5'-TCTGGAGGAGGCAGTGAAAT-3' 5'-AGACCCATGCTTTTCCCAGA-3'	NM_174092	208
<i>Bos taurus interleukin 1 beta (IL1B), mRNA</i>	IL-1 β	5'-TCCACCTCCTCTCACAGGAAA-3' 5'-TACCCAAGGCCACAGGAA-3'	NM_174093	99
<i>Interleukin 2</i>	IL-2	5'-AGAACCTCAAGCTCTCCAGGA 5'-TGGGGTTCAGGTTTTTGCTTG	M12791.1	150
<i>Interleukin 6</i>	IL-6	5'-TGCTGGTCTTCTGGAGTATC-3' 5'-GTGGCTGGAGTGGTTATTAG-3'	NM_173923	153
<i>Interleukin 8</i>	IL-8	5'-TGTGAAGCTGCAGTTCTGTCA 5'-TTTCACAGTGTGGCCCACTCT	AF232704	130
<i>Bos taurus inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA, complete cds</i>	iNOS	5'-CTTGTTCTCGAGGTGCCCAT-3' 5'-GTCCCGGACTCCAATTCTG-3'	DQ676956	174

<i>Interferon regulatory factor 3</i>	IRF3	5'-GCATCCCTTGGAAGCACG-3' 5'-CCTCCGCTAAACGCAACAC-3'	NM_0010298 45	180
<i>Bos taurus nuclear factor kappa B subunit 1 (NFkB1), mRNA</i>	NFkB1	5'-CAGCCTGGTGGGAAAACACT-3' 5'-CAGGCATCTGTCATTCGTGC-3'	NM_0010764 09	150
<i>Bos taurus NFkB inhibitor alpha (NFKBIA), mRNA</i>	NFkBIA	5'-GAGACTCGTTCCTGCACTTAGC-3' 5'-CCAGAAGTGCCTCAGCGATT-3'	NM_0010458 68	174
<i>Nitric oxide synthase 2</i>	NOS2	5'-GAGTGACTTTCCAAGACACGC-3' 5'-TGAAGGAGCCGTAATACTGGT-3'	NM_0010767 99	186
<i>Superoxide dismutase 1</i>	SOD1	5'-TGTTGCCATCGTGGATATTGT-3' 5'-CCCAAGTCATCTGGTTTTTCAT-3'	NM_174615	102
<i>Bos taurus transforming growth factor beta 3 (TGFB3), mRNA</i>	TGFβ3	5'-TCTGGGGCGACTTAAGAAGA-3' 5'-CACACAGCAGTTCTCCTCCA-3'	NM_0011011 83	157
<i>Toll like receptor 2</i>	TLR2	5'-CCATGTCTGGAGAGGGTGTT-3' 5'-GGGGACACAAAACAGCACTT-3'	NM_174197	140
<i>Toll like receptor 4</i>	TLR4	5'-GACCCTTGCGTACAGGTTGT-3' 5'-GGTCCAGCATCTTGGTTGAT-3'	NM_174198	103
<i>Bos taurus tumor necrosis factor alpha (TNFa) mRNA, complete cds</i>	TNF-α	5'-TCTTCTCAAGCCTCAAGTAACA-3' 5'-CCATGAGGGCATTGGCATAAC-3'	EU276079	103
<i>TNF superfamily member 10</i>	TNFSF10/TRAIL	5'-CAATCCCTGCTGGGAACTAA-3' 5'-CCTGGAAGTGGCAACGTACT-3'	NM_0013199 01	195