

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MARTA LILIANE DE VASCONCELOS

**Efeito de diferentes estressores na produção de leite de cabras Saanen e suas
relações com estresse oxidativo na glândula mamária**

Pirassununga

2021

MARTA LILIANE DE VASCONCELOS

Efeito de diferentes estressores na produção de leite de cabras Saanen e suas relações com estresse oxidativo na glândula mamária

Versão corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dr. João Alberto Negrão

Pirassununga

2021

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

V331e Vasconcelos, Marta Liliâne de
Efeito de diferentes estressores na produção de
leite de cabras Saanen e suas relações com estresse
oxidativo na glândula mamária / Marta Liliâne de
Vasconcelos ; orientador João Alberto Negrão. --
Pirassununga, 2021.
99 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação
em Zootecnia) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. antioxidantes. 2. caprinocultura. 3.
estresse. 4. produção de leite. I. Negrão, João
Alberto , orient. II. Título.

MARTA LILIANE DE VASCONCELOS

Efeito de diferentes estressores na produção de leite de cabras Saanen e suas relações com estresse oxidativo na glândula mamária

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Data da Aprovação: ___/___/___

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Presidente da Banca Examinadora

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Marcos Antônio Correia de Vasconcelos e Aulíria Luiz de Vasconcelos. Aos meus queridos pais, dedico todo o esforço realizado ao longo
dessa jornada

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente Deus, por me conceder a realização dos meus sonhos, pois sem a sua ajuda nada seria possível.

Agradeço principalmente ao Prof. Dr. João Alberto Negrão, que me aceitou como parte do grupo e por sua dedicação e ensinamentos em todo o tempo de orientação.

Agradeço as técnicas do laboratório, Giovana Krempel Fonseca Merighe e Sandra Aparecida Oliveira pelo suporte e colaboração na execução do experimento.

Aos colegas pós-graduandos e os estagiários que ajudaram na execução do projeto. A execução deste trabalho ocorreu com ajuda e colaboração de toda a equipe LAFA, muito obrigada!

Dedico as estagiárias Poliana Mancin e Ariadne Lucena, pelo cuidado e manejo dos animais, como também pelas boas risadas e conversas que deixavam a rotina mais leve.

Agradeço à Faculdade Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, por fazer da universidade minha casa durante esse período. Aos professores das diferentes disciplinas ministradas em que participei no mestrado.

Agradeço aos meus amigos, Elizângela, Samuel e Vinícius, em que vivemos momentos especiais e assim iniciamos uma linda amizade.

Às instituições financiadoras, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Por fim, agradeço toda minha família e amigos, pelo suporte e por acreditar na minha capacidade. Em especial aos meus pais, pelo amor, o carinho e o incentivo incondicional.

“Nossas profissões terão a grandeza que dermos a elas. Esse desafio é de cada um de nós.”

Mário Eduardo Pulga

RESUMO

Vasconcelos, M. L. **Efeito de diferentes estressores na produção de leite de cabras Saanen e suas relações com estresse oxidativo na glândula mamária.** 2021. 99 f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2021.

A exploração da Caprinocultura vem crescendo e sendo considerada uma opção rentável, principalmente para exploração leiteira, pois o leite de cabra é considerado um alimento de alto valor nutritivo e indicado nos casos em que indivíduos possuem problemas digestivos ou intolerância ao leite de vaca. A melhoria na qualidade do leite, manutenção e aumento da produção leiteira são os principais elementos deste agronegócio. Em geral, as cabras são descritas como robustas em comparação com outras espécies de gado em condições adversas do meio ambiente e manejo. No entanto, o estresse altera sua homeostase com consequências negativas na produção de leite. Por outro lado, a maioria dos estudos relacionados ao estresse em zootecnia é realizado apenas com um estressor, e esses estudos não consideram que o estresse pode ser cumulativo e agravar as perdas produtivas. Por essas razões, o presente estudo analisou os efeitos do estresse agudo cumulativo causado por diferentes estressores na produção de leite, na qualidade do leite e sua influência na expressão de células epiteliais mamárias em 30 cabras Saanen em final de lactação. Os animais foram expostos a diferentes estressores ambientais e de manejo ou mantidos em condições de conforto (grupo controle). Os estressores foram estresse por calor, administração de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), cuidados com os cascos e chuva durante quatro dias consecutivos em dezembro de 2018 e fevereiro de 2019. Embora, as cabras submetidas aos diferentes estressores foram capazes de restabelecer a homeostase, a exposição aos desafios ambientais e de manejo (calor, ACTH, cuidado do casco e chuva) diminuíram a produção de leite das cabras, demonstrando um efeito cumulativo dos estressores agudos. De fato, houve efeitos significativos dos estressores na frequência respiratória, temperatura retal, cortisol, insulina, triiodotironina e nas concentrações de fator de crescimento semelhante à insulina 1 das cabras ($P \leq 0,005$) em comparação com o observado no grupo controle. Houve efeito significativo do estresse sobre a glicose, ureia, triglicerídeos, colesterol, lipoproteína de alta densidade e lipoproteína de baixa densidade. Os estressores

também aumentaram significativamente a expressão dos genes GR, CAT, SOD e IFN- γ no tecido mamário das cabras Saanen. Por essas razões, os estressores resultaram em um aumento da contagem de células somáticas (CCS) no leite e uma diminuição na produção de leite em comparação às cabras controle. Nesse contexto, os resultados deste estudo indicam que os produtores devem evitar os efeitos cumulativos dos estressores agudos, pois eles têm um impacto negativo na produção de leite.

Palavras-chave: antioxidantes, caprinocultura, estresse, produção de leite

ABSTRACT

Vasconcelos, M. L. **Effect of different stressors on milk production of Saanen goats and their relationship with oxidative stress in the mammary gland.** 2021. 99 f. M. Sc. Dissertation - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2021.

Goat husbandry is considered a profitable option to farmers mainly for dairy, in fact goat's milk have a high nutritional value and is indicated when people have digestive problems or intolerance to cow's milk. However, the improvement of production and quality of milk are the main goal of this agribusiness. In general, goats are described to be more robust compared to other livestock species to adverse environmental conditions and management. However, the stress changes its homeostasis having negative consequences on milk production. By other way, most of studies related to stress in animal science are performed with just a stressor, and these studies not considering that stress may be cumulative and aggravate productive losses. For these reasons, the present study analyzed the effects of cumulative acute stress caused by different stressors on milk yield, milk quality and its influence on the expression of mammary epithelial cells in 30 Saanen goats at the end of lactation. The animals were exposed to different environmental and management stressors or maintained under conditions of comfort (control group). The stressors were heat stress, adrenocorticotrophic hormone (ACTH) administration, hoof care and rain during four consecutive days in December 2018 and February 2019. Although, goats subjected to different stressors were able to restore homeostasis, the exposure of goats to environmental and management challenges (heat stress, ACTH, hoof care, and rain) decreased the milk yield of Saanen goats, demonstrating a cumulative effect of the acute stressors. In fact, there were significant effects of the stressors on respiratory rate, rectal temperature, cortisol, insulin, triiodothyronine and insulin-like growth factor 1 concentrations of the goats ($P \leq 0.05$) compared with that observed in control group. There was a significant stress effect on glucose, urea, triglycerides, cholesterol, high-density lipoprotein and low-density lipoprotein. The stressors also significantly increased the expression of *GR*, *CAT*, *SOD* and *IFN- γ* genes in the mammary tissue of Saanen goats. For these reasons, the stressors resulted in an increase of somatic cell count (SCC) in milk and a decrease of milk yield in comparison to the control goats.

In this context, the results of this study indicate that farmers should avoid the cumulative effects of acute stressors because they have a significant negative impact on milk production.

Key words: antioxidants, goat farming, stress, milk production

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 REVISÃO DE LITERATURA	14
1.1.1 O agronegócio da caprinocultura	14
1.1.2 Função social da caprinocultura.....	15
1.1.3 Raça Saanen	16
1.1.4 Desenvolvimento da glândula mamária	16
1.1.5 Estrutura e função da Glândula mamária.....	19
1.1.6 Síntese de leite, proliferação e apoptose das células epiteliais mamárias.....	21
1.1.7 Estresse	22
1.1.8 Estresse Oxidativo	26
1.1.9 Antioxidantes.....	28
REFERÊNCIAS	31
2. EFEITO DE DIFERENTES ESTRESSORES NAS RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E HORMONAIS DE CABRAS SAANEN EM LACTAÇÃO E O IMPACTO DO ESTRESSE CUMULATIVO NA PRODUÇÃO DE LEITE	40
RESUMO	40
ABSTRACT	41
2.1 INTRODUÇÃO	42
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS	43
2.2.1 Animais, habitação e rotina de manejo	43
2.2.2 Desenho Experimental.....	44
2.2.3 Desafios Experimentais.....	45
2.2.3.1 <i>Desafio 1 (calor)</i>	45
2.2.3.2 <i>Desafio 2 (ACTH)</i>	46
2.2.3.3 <i>Desafio 3 (casqueamento)</i>	46
2.2.2.4 <i>Desafio 4 (chuva)</i>	47
2.2.4 Amostras e análises laboratoriais.....	48
2.2.5 Análise Estatística.....	49
2.3 RESULTADOS	50
2.4 DISCUSSÃO	57

2.5 CONCLUSÃO.....	60
REFERÊNCIAS.....	61
3. EFEITO DO ESTRESSE CUMULATIVO NA LACTAÇÃO SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA, ESTRESSE OXIDATIVO NA GLANDULA MAMÁRIA E PRODUÇÃO DE CABRAS SAANEN	65
RESUMO.....	65
ABSTRACT.....	66
3.1 INTRODUÇÃO	67
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	68
3.2.1 Habitação e rotina de manejo	69
3.2.2 Organização experimental	69
3.2.3 Análises experimentais	75
3.2.4 Análise da expressão gênica	75
3.3 RESULTADOS	78
3.3.1 Produção e qualidade de leite.....	78
3.3.2 Expressão gênica.....	81
3.3.3 Metabólitos	83
3.3.4 Cortisol	88
3.4 DISCUSSÃO	91
3.5 CONCLUSÃO.....	95
REFERÊNCIAS.....	96

1. INTRODUÇÃO

A caprinocultura no território brasileiro, tem uma elevada importância socioeconômica como fonte de alimento. Embora as criações exerçam grande papel social, uma nova realidade está sendo absorvida também por esta atividade, o “Agronegócio da Caprinocultura”, com foco industrial e técnicas desenvolvidas para a produção de alimentos mais finos de maior valor agregado, onde o objetivo é alcançar mais lucro para os empresários (COSTA, 2008; LÔBO et al., 2010).

Embora, as cabras possuam uma boa adaptabilidade, sua produtividade pode diminuir quando inseridas em regiões diferentes da sua região de origem, assim algumas raças europeias com características fenotípicas de clima temperado, sofrem uma baixa no seu desempenho produtivo (BAUGARD; RHOADS, 2013; SILANIKOVE; KOLUMAN, 2015), quando inseridas em regiões com climas menos favoráveis as suas condições fenotípicas. Além deste, vários outros fatores podem interferir no bom desempenho dos animais de produção, já que as respostas produtivas dos caprinos estão relacionadas à fatores genéticos e ambientais.

Alguns estudos anteriores mostram que condições climáticas estressantes reduzem a produção e também diminuem as características físico-química do leite, pois mecanismos fisiológicos foram utilizados para restabelecer a homeostasia dos animais, redirecionando as fontes energéticas da produção para perda de temperatura corporal (BRASIL et al., 2000; McDOWEEL et al., 1969).

Existem vários outros fatores nas propriedades, como por exemplo, práticas de manejo que podem causar estresse agudo nos animais. No estudo de Mehdid et. al. (2019), utilizando um cão como estressor em estímulo visual e auditivo de latidos, houve aumento de cortisol relacionado ao estresse agudo em cabras desafiadas pelo estressor de manejo, bem como redução na produção e alterações na composição do leite. Porém, há poucas informações sobre o estresse causado por fatores de manejo em cabra. Aparentemente, o estresse altera a integridade epitelial mamária, prejudicando a função da glândula mamária (BOMFIM et al., 2018; HOOPER et al., 2020; WENG et al., 2018).

Alguns estudos em outras espécies de animais, estuda o efeito do estresse oxidativo na glândula mamária ocasionado por outros fatores, como micotoxinas e mastite subclínica (SILANIKOVE et al., 2014; WANG et al., 2019). Entretanto, o efeito do estresse cumulativo na glândula mamária em cabras nunca foi estudado. O

aumento do metabolismo geral no animal, faz com que o metabolismo da glândula mamária também aumente, ocasionando aumento na taxa de produção de Espécies Reativas de oxigênio (ERO). Um desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes, em favor do primeiro, ocasiona o estado de estresse oxidativo, podendo causar sérios danos às células (CASE; DOMANN, 2012; HOTTENBERG; HOEK, 2017).

A somatória de diferentes fatores estressantes pode promover diferentes respostas metabólicas e imunológicas que reduzem a produção de leite. Em função da importância do agronegócio, há necessidade de mais informações a respeito das causas do estresse e seu impacto na produção de leite, e assim será possível minimizar seus impactos na glândula mamária, cuja função principal é a síntese de leite.

Portanto, para compreender os impactos causados pelo estresse cumulativo e sua relação com alterações fisiológicas na glândula mamária de cabras leiteiras, foram reproduzidos experimentalmente estressores diferentes, simulando situações que ocorrem rotineiramente na criação caprina. Deste modo, este projeto tem por objetivo estudar o efeito do estresse cumulativo sobre o processo oxidativo e sua relação com a apoptose na glândula mamária, produção e qualidade do leite.

1.1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1.1 O agronegócio da caprinocultura

Historicamente o mercado dos caprinos tem sido de grande importância, sua utilização para fins comerciais é facilitada por serem animais de alta adaptação, favorecendo a criação em regiões, mas precárias e de escassez de recursos naturais (OLIVEIRA; LIMA, 1994). Além de contribuir como alimento funcional para saúde humana, os caprinos geram renda e oferecem outros benefícios aos proprietários, incluindo a utilização da carne e couro, variando a importância de cada produto em função das exigências do mercado local (MILLER; LU, 2019; SILVA; FAVARIN, 2020).

A indústria global de cabras leiteiras está expandindo, motivado por estudos que comprovam que os produtos à base de leite de cabra é um alimento saudável, nutritivo e indicado como substituto do leite de vaca em casos de problemas digestivos ou intolerância (CHÁVARI et al., 2020). Conforme dados da Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) em 2019, a população mundial de cabras de leite foi de aproximadamente 218 milhões em 2017, com crescimento de 16% de 2007 a 2017 na produção global de leite.

Além do crescimento populacional do rebanho, outros fatores contribuem expressivamente no aumento da produção de leite de cabras no Brasil. A utilização de novos recursos tecnológicos na cadeia produtiva, que inicia desde a seleção de animais de alto valor genético, melhoramento em bem estar animal, nutrição e mecanização de ordenha (MORAES et al., 2020; LIMA et al., 2020; RAMOS et al., 2020; SILVA et al., 2020), contribuem positivamente na produtividade da caprinocultura e crescimento econômico país. Todo esse investimento em desenvolvimento, tornou o Brasil no maior produtor de leite de cabra do continente americano (GONÇALVES et al., 2008).

A produção de leite caprino da região Sudeste, mesmo com pequeno número de animais supera às de outras regiões, representando 21% do total produzido no país. Sendo também considerada a região de maior potencial de crescimento para o mercado de produtos lácteos de origem caprina, embora o consumo de leite “in natura” é consumido em menor escala, quando comparado ao consumo de queijos, iogurtes, leite em pó, bebidas lácteas e doces fabricados com leite de cabra (LIMA, 2015; SILVA

et al., 2012). Além destes produtos, a indústria de cosméticos, vem estudando e explorando os benefícios funcionais do leite de cabra (SILVA; FAVARIN, 2020).

No entanto, produtos de alta qualidade só podem ser processados quando a matéria prima também é de boa qualidade, assim apenas um leite de boa qualidade poderá atender as expectativas dos consumidores exigentes, nos atributos nutricionais, higiênicos e sensoriais, além de agregar mais valor ao produto (RIBEIRO; RIBEIRO, 2010). Assim alguns preconceitos vêm sendo quebrados em relação a importância da caprinocultura leiteira e seu potencial em expressar resultados economicamente satisfatórios.

1.1.2 Função social da caprinocultura

No território brasileiro o maior rebanho de caprinos está na região nordeste, conforme dados do IBGE de 2017. Nesta região de zonas mais secas, a criação de cabra requer menos espaço e alimento comparado ao gado, tendo um custo de produção menor (MILLER; LU, 2019). Assim, o leite de cabra é valorizado e apreciado nas regiões mais secas do Brasil, sendo às vezes a única fonte de proteína da família do produtor, comprovando a contribuição deste agronegócio na questão social.

Em 2010 o Brasil ficou em 1º lugar no ranking HungerFREE pela instituição Action Aid International que trabalha por um mundo livre de pobreza e injustiça, mostrando que as taxas de fome infantil no país foram reduzidas em 50% em pouco mais de 10 anos. Identificando como grande contribuinte o Programa de Aquisição de Alimento (PAA) do Fome Zero do governo federal, que tem como uma das suas modalidades estimular a produção do leite e o consumo do leite caprino e bovino para combater a pobreza e a fome em regiões precárias (BRASIL, 2019; GONÇALVES; MARTES, 2011).

Além da produção leiteira caprina gerar lucros para a população local, também traz um modelo familiar, que não precisa de grandes investimentos (terra, construção), utilizando os membros da família no sistema produtivo, sendo uma alternativa viável da eficácia das mulheres nos negócios rurais, podendo ocupar toda a família (VIEIRA et al., 2009).

Neste contexto, o aumento de investimentos em cabras pode avançar os objetivos do desenvolvimento, especialmente a erradicação da fome e também ajudar no aumento da contribuição de mulheres no segmento agropecuário. O agronegócio

da caprinocultura, pode objetivar a alcançar mais lucros aos empresários e interage em cadeia produtiva envolvendo outros setores do mercado, que vai desde fornecedores de insumos até o consumidor final, envolvendo também área de pesquisa, tecnologia e indústrias (COSTA, 2008).

1.1.3 Raça Saanen

A maior produtividade de leite da região sudeste comparada as demais regiões do país, ocorre em função da maior representatividade de raças caprinas europeias de aptidão leiteira nesta região, por exemplo da raça Saanen, utilizada neste experimento. De modo geral, as raças europeias de clima temperado se adaptam melhor às condições climáticas da região Sudeste que em outras regiões onde predomina o clima tropical (LÔBO et al., 2010; PAIVA et al., 2020).

De fato, a raça Saanen tem origem no Vale Saanen na Suíça, sendo caracterizada como animais de pelagem curta e de coloração branca, medem de 70 a 90 centímetros de altura, com peso vivo entre 50 e 80 quilos. Por ter sua origem no hemisfério norte em regiões de clima temperado a raça Saanen apresenta marcante influência quanto às variações do fotoperíodo, pois iniciam seu ciclo reprodutivo anual em função da intensidade da luminosidade, o que reflete significativamente na sua eficiência reprodutiva e produtiva (GALINA, 1995).

De modo geral, as cabras da Saanen produzem em média 3,0 litros diários de leite, com composição variando em média 3,8% de gordura, 3,4% de proteína e 4,1% de lactose e período lactacional de 8 a 10 meses. No Brasil, a média diária da produção de leite por animal tem variado de 2,5 a 4,9 litros para uma lactação com duração entre 260 a 305 dias (PARK et al., 2007; RIBEIRO, 1997).

O leite de cabra tem em suas frações proteicas e lipídicas características que lhe conferem maior digestibilidade, ou seja, possuem menor glóbulos de gordura com predominância de ácidos graxos de cadeia curta e proteínas de maior valor biológico quando comparado ao leite de outras espécies (OLALLA et al., 2009).

1.1.4 Desenvolvimento da glândula mamária

A organogênese da glândula mamária começa na embriogênese e continua até o primeiro parto, momento em que ocorre o desenvolvimento e diferenciação funcional

das células. O primeiro sinal do desenvolvimento mamário, é uma passagem do ectoderma germinativo em locais precisos (ventrolateral) ao longo de duas linhas simétricas no embrião, esse espessamento é chamado de linha mamária (AKERS, 2002; ROBINSON, 2007).

A linha mamária é dividida em placóides individuais, que aumentam de tamanho e formam os brotos mamários. As células ao redor derivadas do mesoderma se organizam em camadas concêntricas, formando o primeiro mesênquima mamário. A proliferação celular aumenta e os brotos se alongam formando uma árvore ductal empurrando o mesênquima mamário para camadas mais profundas da derme, onde futuramente se encontram com a camada de gordura formada. Os ductos na camada adiposa forma um pequeno sistema ductal e as células do mesênquima formam o mamilo (ROBINSON, 2007).

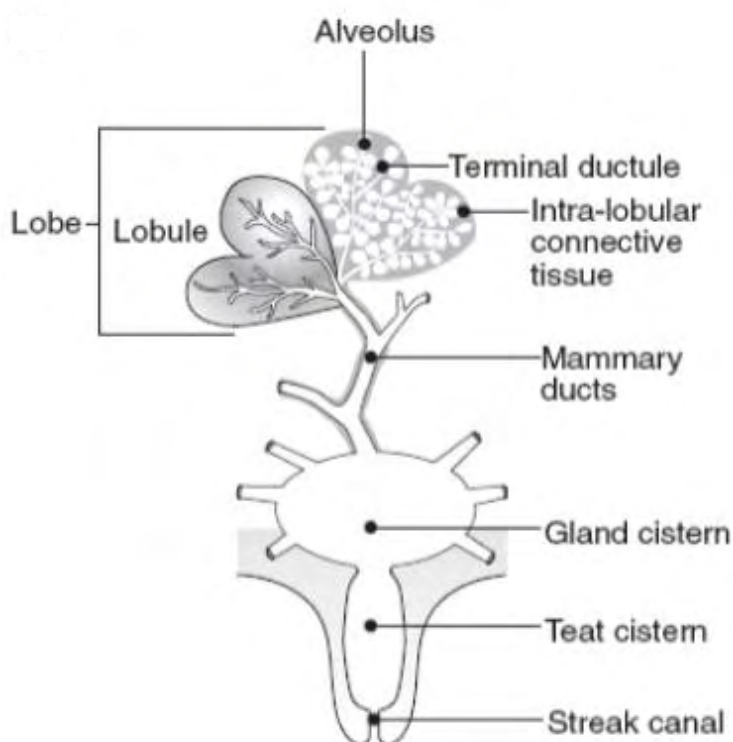
Nesse período embrionário o desenvolvimento é independente de hormônios, os eventos ocorrem por resultado da expressão genética. Na fase pós-natal/pré-púbere inicia a interferência hormonal pela ação do estrogênio, concomitante o fator de crescimento das células epiteliais (IGF-1) e epidérmicos (EGF), assim, os ductos epiteliais continuam se alongando e ramificando dentro da camada de gordura em velocidade moderada, não preenchendo-a completamente até a fase de puberdade (AKERS, 2002; COWIE et al., 1952; DALLARD et al., 2005; HENNIGHAUSEN; ROBINSON, 2001).

A puberdade é marcada pela ação do estrogênio e no final desta fase a ação da progesterona, responsável pelo desenvolvimento dos ductos epiteliais preenchendo toda a camada de gordura por suas extremidades formando brotos terminais, que iniciaram a formação de alguns alvéolos, formado por células epiteliais diferenciadas que revestem estruturas côncavas (SHYAMALA, 1999). A diferenciação estrutural da glândula mamária estará completa durante a fase de gestação, onde a taxa de multiplicação celular aumenta, ocasionado pelo pico de progesterona e ação dos esteroides da placenta (DELOUIS et al., 1980).

A estrutura lóbulo-alveolar no final da gestação, a partir de 120 dias em cabras, está completamente desenvolvida, então com ação da prolactina e o fator de diferenciação dos osteoclastos finalizam a proliferação e diferenciação alveolar, crescimento da glândula mamária e inicia a síntese do leite (DELOUIS et al., 1980; HENNIGHAUSEN; ROBINSON, 2001). A glândula mamária constituída em maior parte por parênquima glandular que desempenha a função da síntese láctea, é

formada por lobos que por vez são formados pela junção de vários lóbulos, que é constituído pelo conjunto de alvéolos e células epiteliais (Figura 1), a junção entre estas estruturas são feitas pelos ductos alveolares, ductos dos lóbulos e lobos (LI et al., 1999).

Figura 1 - Estrutura morfológica dos lobos, destacando o alvéolo e as células epiteliais da glândula mamária.



Fonte: Adaptado de Safayi, S. **Mammary Remodelling and Metabolic Activity in Dairy Goats: Role of Parity, Dry Period and Nutrient Supply**. Advisor: Mette Olaf Nielsen, 2008.

No final da gestação as concentrações de lactogênio placentário e a prolactina estão aumentados, estimulando a glândula para secretar pequenas quantidades de componentes específicos do leite. Os nutrientes necessários para síntese leiteira chegam à glândula mamária através da irrigação sanguínea acomodada no estroma glandular, de origem mesodérmica formada por tecido conjuntivo e adiposo em menor parte, que também acomoda os tecidos nervosos e linfáticos, além de dar função estrutural e sustentação (LÉRIAS et al., 2014). O sangue arterial que irriga a glândula mamaria chega das artérias que atravessam o anel inguinal e se dividem e se ramificam por toda a estrutura anatômica da glândula mamária. O sangue retorna por

um conjunto de veias, permitindo um grande fluxo de sangue pela glândula, com um fluxo lento para que haja um tempo de maior exposição que facilita as trocas de metabólitos do sangue para os alvéolos (RIBEIRO, 1997).

1.1.5 Estrutura e função da Glândula mamária

Início da secreção abundante de leite acontece no parto pela ação ainda da prolactina. Durante o processo de síntese de leite, uma parte do leite fica acumulado nos alvéolos, mas cada alvéolo é revestido por células mioepiteliais com capacidade de contração que promovem o fluxo do leite dos alvéolos periféricos até os ductos principais da glândula (BRITO; SALES, 2007; HENNIGHAUSEN; ROBINSON, 2001).

Dos ductos principais, o leite flui até as cisternas da glândula e do teto, nestes diferentes compartimentos o leite permanece armazenado até a amamentação ou ordenha. Na cabra, estima-se que 75% do leite fica armazenado nas cisternas enquanto a outra parte do leite fica acumulado nos alvéolos, diferente da vaca que possui apenas 20 a 25% do leite na região cisternal (BRITO; SALES, 2007; HAENLEIN; CACCESE, 1992; RIBEIRO, 1997; SALAMA et al., 2004).

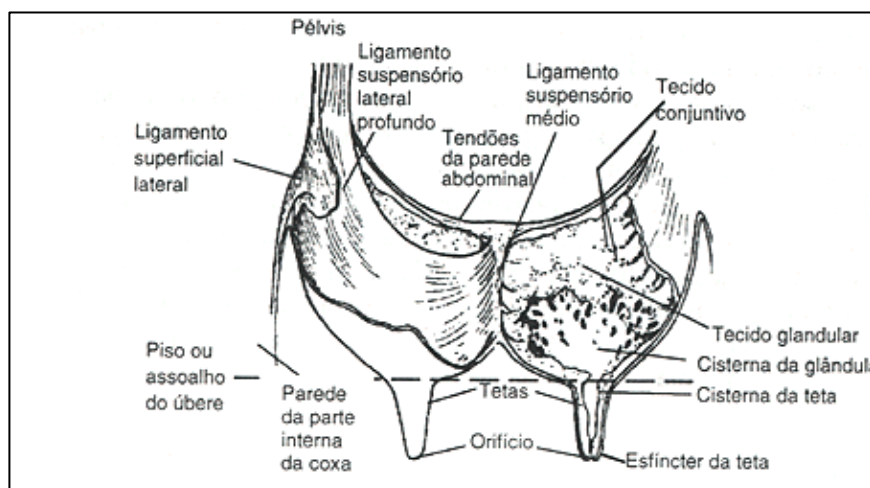
Após o nascimento do neonato, a produção de leite já está pronta para alimentá-lo, mas é necessário estímulos hormonais e mecânicos para saída do leite. Com os movimentos de sucção do bezerro ou da ordenha, o sistema nervoso aferente sinaliza o lobo posterior da hipófise que libera o hormônio ocitocina, este hormônio auxilia na decida do leite, atuando sobre as fibras musculares lisas dos alvéolos forçando a decida do leite para os ductos coletores e cisterna do úbere (ESPE, 1947). Após o estímulo inicial da ocitocina, a prolactina é o principal hormônio atuante durante a ordenha de cabras. A ejeção do leite se dá pelo aumento de pressão intracisternal e o relaxamento do tônus muscular até esvaziar as cisternas (BRUCKMAIER et al., 1994).

No caso dos caprinos os ductos se fundem de forma que só haja um ducto terminal por glândula, esse ducto também é delineado por um conjunto de fibras musculares lisas, que forma uma estrutura de defesa chamada de esfíncter, que se abre com a pressão exercida pela ordenha ou mamada. Na porção proximal do orifício do teto, sendo apresentada com maior diâmetro, forma a prega de Fürstenberger, uma estrutura constituída de diversos desdobramentos recobertos por membranas, que

atua como válvula reforçando o fechamento do orifício (BIRGEL, 2004; HAENLEIN; CACCESE, 1992).

Toda a estrutura funcional da síntese de leite nas cabras está inserida no úbere, que é constituído de duas glândulas mamárias independentes, localizadas na região inguinal junto à parede ventral do abdômen, sem qualquer comunicação com a cavidade abdominal, exceto pelo canal inguinal por onde os vasos sanguíneos, linfáticos e a inervação conectam o úbere. Cada glândula é sustentada por ligamentos suspensórios fortes em forma de bolsa, formando feixes de tecido elástico inseridos no arco pélvico que sustentam o úbere a parede abdominal e separam os pares glandulares (Figura 2) (BRITO; SALES, 2007; HAENLEIN; CACCESE, 1992).

Figura 2 - Estrutura do úbere e da glândula mamária.



Fonte: Ribeiro, S. D. A. **Caprinocultura: criação racional de caprinos**. São Paulo, SP: Nobel, 1997.

O úbere é conectado ao sistema nervoso central (SNC) por nervos sensoriais (aférentes) e motores (eferentes). Os nervos aferentes inervam a glândula mamária e a pele que a recobre, e são importantes para ejeção do leite. As inervações eferentes originam-se do plexo mesentérico (simpático lombar), e induzem a vasoconstrição e a vasodilatação. Os nervos da glândula mamária estão localizados no tecido conjuntivo (BIRGEL, 2004; PARK; LINDBERG, 2006). Toda essa estrutura é revestida por pele, que deve ser fina e com boa capacidade de retração após a ordenha (RIBEIRO, 1997).

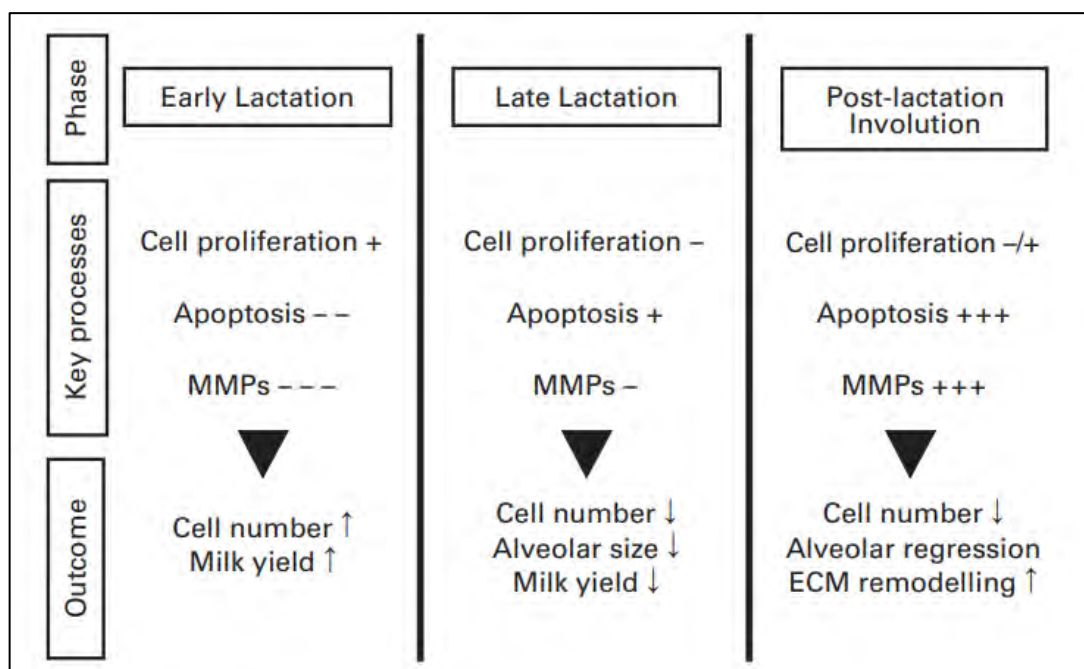
A capacidade da glândula mamária em produzir leite é determinada pela quantidade de células epiteliais secretoras e seu nível de atividade. Variações no número de células mamárias ocorrem durante a gestação e a lactação, podendo ser

responsável por variações na produção de leite. A quantidade produzida de leite está diretamente relacionada com a quantidade de células mamárias e não ao tamanho da glândula mamária (BOUTINAUD et. al., 2003; CAPUCO et al., 2003).

1.1.6 Síntese de leite, proliferação e apoptose das células epiteliais mamárias

O número de células epiteliais mamárias e sua atividade secretora, é influenciado pelo equilíbrio entre taxa de proliferação celular, diferenciação e apoptose das células epiteliais (CAPUCO, 2003). A taxa de proliferação celular é positiva e continua até a fase de pico lactacional, ou seja, a taxa de proliferação celular excede a taxa de apoptose. Após o pico lactacional, a fase lactacional persiste até começar a fase de involução celular que ocorre gradativamente, nesta fase a taxa de apoptose excede a taxa de proliferação celular (CAPUCO, 2003; KNIGHT, 1987).

Figura 3. Remodelação celular durante as fases da lactação.



Fonte: STEFANON, B. et al. **Mammary apoptosis and lactation persistency in dairy animals.** Journal of Dairy Research, v. 69, n.1, p. 37-52, 2002.

A queda na produção de leite está relacionada com a redução do número de células secretoras, com um subsequente declínio na atividade celular (KNIGHT; PEAKER, 1983). Alguns fatores como manejo e condições ambientais podem afetar a proliferação ou causar a apoptose destas células epiteliais no período de lactação,

alterando a fase de proliferação ou potencializando a fase de involução (CAPUCO, 2003).

Em cabras primíparas a taxa de apoptose é maior comparada as múltiparas, pois cabras primíparas estão em fase de crescimento e remodelamento contínuo da glândula mamária durante a lactação, diferente das múltiparas, que a glândula mamária está totalmente desenvolvida, explicando o fato de que múltiparas produzem mais que primíparas (SAFAYI et al., 2010).

A apoptose é um mecanismo de controle do desenvolvimento normal de um tecido para manter suas funções via proliferação e diferenciação celular, caracterizado por um processo de morte celular programada, decorrente da fragmentação do DNA, responsável pela remoção ordenada de células supérfluas, envelhecidas ou danificadas (LI et al., 2014; KROEMER et al., 1998; WANG, 1999). O processo de apoptose pode ser desencadeado por duas vias: via extrínseca, induzida pela ativação de receptores de morte localizados na superfície celular; via intrínseca, que envolve as mitocôndrias, gerados pelo processo metabólico principalmente da respiração mitocondrial fisiológica (FERNADEZ-CHECA, 2003). A via intrínseca é desencadeada nos ruminantes por fatores externos, como estresse, infecções, distúrbios reprodutivos e infecções parasitárias (BERNABUCCI, et al., 2002; CELI, 2010).

1.1.7 Estresse

O estresse é definido como um estado de ameaça a homeostase do organismo, que é restabelecida por um complexo de respostas adaptativas fisiológicas e comportamentais (CANNON, 1929). As respostas adaptativas comportamentais incluem: aumento da excitação, alerta e vigilância, melhor percepção e atenção focalizada, bem como, euforia ou desconforto. Simultaneamente as respostas adaptativas fisiológicas que incluem: elevações na temperatura corporal, inibição da ingestão de alimentos e água, aumentos no tônus cardiovascular (frequência cardíaca, fração de ejeção cardíaca, pressão arterial), frequência respiratória e metabolismo intermediário (gliconeogênese, lipólise); ocorrem para promover principalmente um redirecionamento adaptativo de oxigênio, nutrientes e energia, aumentando a disponibilidade deste substratos para determinados órgãos e tecidos, melhorando assim a eficiência geral do organismo frente ao estressor (CHROUSOS, 2006). As respostas podem ser específicas e/ou generalizada ao estressor, para que

ocorra um bom restabelecimento da hemostasia (CHROUSOS; LORIAUX; GOLD, 1988).

O estresse pode ser caracterizado de duas formas, agudo ou crônico, ao depender da duração em que ocorre (SANTOS; CASTRO, 1998). Nos animais de produção o estresse agudo ocasionado por diferentes tipos de estressores, por exemplo, estressores térmicos, transporte, isolamento social, contensão, desmame, entre outros, são exemplos de fatores que causam estresse agudo e tem um grande impacto em perda produtiva nos animais (CHEN et al., 2015). Durante o estresse, dois eixos de sinalização são acionados para iniciar as respostas, são eles o sistema nervoso central e periférico (autônomo e somático) e o sistema endócrino, que coordenam as diferentes respostas fisiológicas e comportamentais necessários frente aos diferentes estressores ambientais ou psicológicos, propiciando na maioria das vezes adaptações bem-sucedidas (CHROUSOS, 2006).

Para retornar ao estado homeostático, o sistema nervoso central (SNC) ao detectar uma ameaça a hemostasia desenvolve mecanismos de defesa biológica, em quatro fases: respostas do sistema nervoso autônomo, resposta comportamentais, respostas neuroendócrinas e respostas imunes, respostas que se sobrepõe influenciando umas às outras. Embora o animal tenha quatro fases disponíveis para responder a um estressor, todas as quatro não são necessariamente utilizadas, pois diferentes estressores estimulam com diferentes eficiências as respostas biológica. Assim as respostas ao estressor são influenciadas por vários fatores, dependendo de como animal identifica sensorialmente um estímulo estressor ou se projeta nele. Além disso, outras variações também influenciam o estímulo estressor, como experiência anterior, idade, relacionamento social e sua predisposição genética (MOBERG, 2000).

Todas as respostas do animal serão dependentes da percepção pelo SNC dos estímulos desencadeados, por exemplo, térmicos, táteis, visuais, auditivos e olfatórios, que são transmitidos à diferentes órgãos acessórios do SNC, as quais preparam o organismo para ação processando essas informações, permitindo que seja desencadeada respostas frente ao estressor, que pode ser uma ameaça à vida do animal (BARRETO, 2010).

Após o mecanismo de neurocepção as respostas eferentes, são programadas em determinadas áreas do SNC (Córtex límbico: porções do córtex cerebral), que transmite impulsos para os centros inferiores e influencia o controle autonômico. Ao sistema límbico está integrado os processos emocionais, cognitivos e homeostáticos,

e dentre as reações ligadas ao sistema límbico está o medo e reações de fuga e luta, promovendo respostas fisiológicas que relacionam o organismo ao meio externo e interno. O SNC ativa o sistema nervoso autônomo (SNA) por centros localizados no tronco cerebral, no hipotálamo e na medula espinhal. O sistema nervoso autônomo (SNA) opera por meio de reflexos viscerais, provocando respostas reflexas apropriadas diretamente aos órgãos viscerais e glândulas para controlar suas atividades, e esses sinais são transmitidos pelo sistema nervoso simpático e parassimpático (BARRETO, 2010).

Dependendo do tipo de estressor, o SNA, por meio dos reflexos viscerais, dá condições ao organismo para uma resposta comportamental, em que o animal confrontará ou evitará o estressor simplesmente se retirando da ameaça. Por exemplo, (mecanismo de luta ou fuga descrito por Selye em 1956) buscando sombra se a temperatura corporal ficar elevada ou fugir de predadores. Essas respostas comportamentais podem fornecer pistas potenciais para prever um estado de estresse do animal. Porém algumas vezes nos animais domésticos as opções comportamentais são limitadas pelo confinamento (MOBERG, 2000).

O mecanismo de reflexos viscerais desencadeado pelo SNA, afeta diversos sistemas, incluindo o sistema cardiovascular e gastrointestinal, as glândulas exócrinas e a medula adrenal, desencadeando uma resposta imediata do organismo (MOBERG, 2000). A estimulação dos nervos simpáticos e parassimpáticos das supras renais faz com que seja liberada epinefrina (adrenalina) e norepinefrina (noradrenalina), causando efeitos sobre diferentes órgãos (SANTOS; CASTRO, 1998).

Em geral essa linha de defesa mediada pelo SNA causa respostas fisiológicas de curta duração podendo não ser suficiente frente ao desafio estressor que o animal se encontra. Assim, a ativação do sistema endócrino iniciada pelo hipotálamo que libera hormônios pelo eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), quem tem como alvo o córtex da adrenal causados inicialmente por estimulação simpática direta, são mais prolongados, pois os hormônios do eixo HPA são sintetizados e liberados mais lentamente, sendo distribuídos sistemicamente pelo sangue, tendo uma meia vida muito mais duradoura, promovendo também repostas biológicas mais demoradas (CHEN et al., 2015; MOBERG, 2000).

Ao receber os estímulos internos e externos via eferente que conduz a informação, ocorre associação da ativação do eixo HPA, mobilizando um efeito demorado no organismo, caracterizando mais uma forma de resposta frente a um

determinado estressor. Assim, a ativação dos dois sistemas gera uma cascata de síntese de substâncias reguladoras com liberação de hormônios específicos. A ativação do eixo HPA causado por neurotransmissores do SNA, em resposta ao estresse, estimula o hipotálamo a sintetizar e liberar hormônio corticotrófico (CRH), que promove a produção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela glândula pituitária ou hipófise anterior, sendo este liberado na circulação e atuando no córtex da adrenal estimulando a produção glicocorticoides, principalmente cortisol. Normalmente, o eixo HPA é controlado por feedback negativo, pois o produto final (glicocorticoide), retroalimenta e inibe a produção da substância iniciadora (CRH), reduzindo o ACTH a um nível normal de controle e como consequência voltando aos limites basais de glicocorticoides no organismo. Contudo, durante o estresse este sistema de retrocontrole não reduz eficientemente a síntese e liberação dos hormônios do eixo HPA (MILLER; O'CALLAGHAN, 2002).

O aumento da síntese e liberação de ACTH e posteriormente liberado na corrente sanguínea, estimula o aumento da atividade glandular adrenocortical a secretar mais hormônio cortisol (glicocorticoide). O aumento do cortisol resulta em elevação da glicemia sanguínea, gliconeogênese e glicogenólise. O cortisol possui várias funções metabólicas para controle do metabolismo de proteínas, carboidratos e gorduras, fornecendo ao organismo energia necessária para aumentar as demandas metabólicas em uma situação de emergência (MILLER; O'CALLAGHAN, 2002). Proporcionando ao organismo restabelecimento da sua homeostasia, em decorrência da produção e mobilização de substrato energético durante o estresse (GONZÁLEZ; SILVA, 2017).

A redução da resposta imune durante o estresse está associada ao efeito anti-inflamatório do cortisol, que inibe a proliferação de linfócitos causando lise das células imaturas. Este fator ocorre, pois, as células do sistema imunológico são mais sensíveis aos esteroides (DUNN, 1998). Outro fator associado à inibição do sistema imune frente ao estresse é a redução da capacidade das células de defesa em iniciar o processo de destruição de antígenos. Quando estimulados por antígenos, os linfócitos produzem uma quantidade baixa de ACTH e outros hormônios, essa pequena quantidade de ACTH produzida pelos linfócitos é suficiente para ativar o córtex da adrenal e desencadear uma resposta hormonal semelhante a causada pelo estresse (BLALOCK et. al., 1985). Os glicocorticoides encontrados em elevadas concentrações no organismo exercem efeito supressor sobre os linfócitos e macrófagos, que embora

deixem o organismo mais suscetível a patógenos, também evitam respostas imunes exacerbadas contra outros tipos células não infectadas (FONSECA et. al., 2015; GONZÁLEZ; SILVA, 2017).

A resposta imune também acelera o metabolismo e a oxidação celular, embora este processo seja fundamental para destruição do antígeno, nem sempre os mecanismos antioxidantes e de desintoxicação evitam seus efeitos deletérios, assim o desencadeamento da resposta imune também contribui para o aumento das espécies reativas de oxigênio (BLALOCK et al., 1985). Assim como a supressão do sistema imune, as diferentes respostas ocasionadas por condições de estresse em animais, desencadeiam o processo de estresse oxidativo (ABDELNOUR et al., 2019).

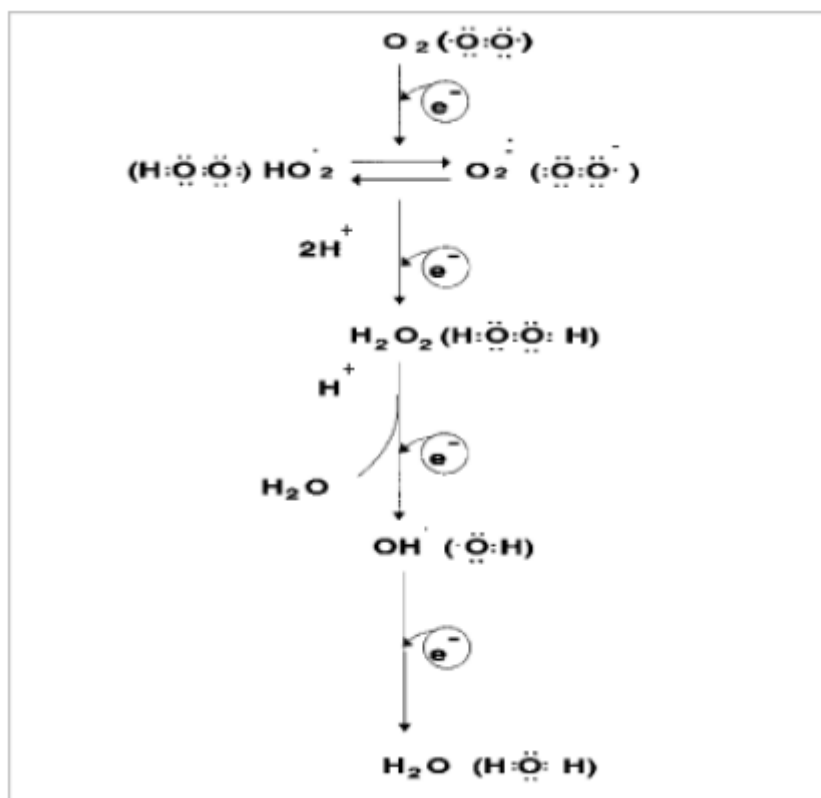
1.1.8 Estresse Oxidativo

Na estrutura dos átomos e moléculas, os elétrons geralmente estão associados em pares, com cada par se movendo dentro de uma região definida do espaço ao redor do núcleo, este espaço é referido como um orbital atômico ou molecular. Os radicais livres são definidos quando, existe pelo menos um elétron desemparelhado em um orbital, como ocorre nos radicais centrados no oxigênio (O_2). Sendo estes os radicais mais abundantes no organismo, isto é, quando no processo normal do metabolismo celular ocorre a redução do O_2 que contém 12 elétrons, após o processo de redução este ganhará um elétron, ao possuir número ímpar (13 elétrons), ocorrerá a formação do superóxido ($O_2^{\cdot-}$) que contém um radical livre (CHIHUAILAF et al., 2002; FERREIRA; MATSUBARA, 1997; HALLIWELL, 1994; HALLIWELL; GUTTERIDGE 1999).

Juntamente com a formação do $O_2^{\cdot-}$, formam-se intermediários reativos denominadas coletivamente de espécies reativas de oxigênio ou ROS. As ROS são potentes oxidantes que danificam as células se produzidas em quantidades excessivas (COMHAIR; ERZURUM, 2002; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). A produção das ROS que ocorre a partir do processo de redução do oxigênio, podem ser classificadas em radicais ou não radicais, ou seja, que contém ou não o elétron desemparelhado, porém o potencial deletério das ROS independe ao estado radical. Sendo assim, o grupo que contém o radical é formado pela hidroxila (OH^{\cdot}), superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e a hidroperoxila (HO_2^{\cdot}), em contrapartida ocorre a formação do peróxido de

hidrogênio (H_2O_2) oxidante sem radical (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; LYKKESFELDT; SVENDSEN, 2007).

Figura 4 - Redução do oxigênio e processo de formação das ERO.



Fonte: FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. **Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo.** Revista da Associação Médica Brasileira, v. 43, n. 1, 1997.

Após a produção das ROS, o estresse oxidativo é caracterizado quando as taxas de produção de oxidantes (ROS) se eleva e as repostas induzidas ou sinalizadas pelo estado redox que regula quimicamente respostas protetoras antioxidantes, não são suficientes para competir ou minimizar os danos causados pelas ROS na célula, impossibilitando o estado original de homeostase redox (equilíbrio entre taxa de produção de oxidantes e liberação de antioxidantes) após exposição temporária à ROS (DRÖGE, 2002).

Todos os componentes celulares estão suscetíveis à ação das ROS, porém um alvo estabelecido de estresse oxidativo é a mitocôndria, principalmente o poro de transição da permeabilidade mitocondrial (PTP), causando um aumento na permeabilidade da membrana mitocondrial interna e externa (HIBAOU et al., 2009). Assim, um excesso na produção de ROS, diminui o potencial da membrana

mitocondrial, desencadeando um aumento na permeabilidade da membrana externa, permeabilidade formada por multiproteínas que podem funcionar como um sensor de estresse e danos, que desencadeia o processo de apoptose pela via intrínseca mediada por mitocôndrias que liberam fatores apoptogênicos (FERNADEZ-CHECA, 2003; KROEMER et al., 1998).

Os danos mitocondriais ocorrem por meio de alterações na família da proteína Bcl-2 e Bax, que são os principais reguladores da integridade mitocondrial (LI et al., 2014). Bcl-2 é uma proteína funcional e estrutural, que impede a ruptura da membrana mitocondrial por meio da inibição da permeabilidade, evitando a morte celular pela liberação do Citocromo c no citosol, vazão da glutatona e ativação das caspases (desmonte da célula). Bax é uma proteína considerada pro-apoptótica, permanece no citosol que combate a proteção Bcl-2 (ADAMS; CORY, 1998; KROEMER et al., 1998).

Na indução de apoptose, a proteína Bax sofre alterações morfofuncionais, que permitem sua translocação do citosol para as mitocôndrias, oligomerizando e formando poros na superfície da membrana externa mitocondrial para causar a liberação do Citocromo c (HOU et al., 2003). Para que ocorra o completo processo de morte celular, o Citocromo c é liberado no citosol e subsequentemente causa o desmonte da célula pela ativação das caspases (proteases de cisteínas específica do aspartato). A transdução e execução de sinais apoptóticos depende da ação de uma cascata de caspases, responsável pela clivagem de proteínas celulares que são caracteristicamente proteolizadas. A caspase 3 é um fator chave de apoptose, ativado nesse sistema pela caspase 9, após ativada a caspase 3 aumenta a polimerase (PARP) (WANG et al., 1999).

As células da glândula mamária assim como, todas as outras células do organismo de mamíferos, utilizam o oxigênio durante o processo de oxidação de compostos orgânicos, mecanismo pelo qual as células geram energia necessária para seu metabolismo, podendo também serem influenciadas pelo sistema oxidante e antioxidantes presentes na glândula mamária (COMHAIR; ERZURUM, 2002; SUN et al., 2019).

1.1.9 Antioxidantes

O organismo possui um complexo mecanismo antioxidante para combater as ROS formadas pelo metabolismo celular, quando essas são geradas em condições

normais, ou seja, em baixas concentrações (COMHAIR; ERZURUM, 2002). O sistema de defesa contra as ROS não é abundante no organismo, sendo assim, o distúrbio no equilíbrio pró-oxidante-antioxidante em favor do primeiro (pró-oxidante), caracteriza a condição de estresse oxidativo que danifica a funcionalidade das células (HALLIWELL, 1994; SIES, 1991).

O mecanismo de eliminação de oxidação é realizado por um sistema bioquímico natural de eliminação, que envolve vias enzimáticas e não enzimáticas, que promovem o processo de eliminação das ROS ou redução do seu efeito tóxico. As enzimas mais conhecidas do sistema de defesa enzimático são: glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione reduzida (GSH), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e Tio redoxina (Trx) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; MUNRO; PAMENTER, 2019). Os antioxidantes não enzimáticos têm geralmente origem exógena, sendo relacionados à ingestão, digestão e absorção de alguns alimentos, os principais são: alfa-tocoferol (principal constituinte da Vitamina E), betacaroteno, ácido ascórbico (Vitamina C), compostos fenólicos e vários outros minerais essenciais (zinco, cobre, manganês, selênio e ferro). De modo geral, a atividade dos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos é influenciada pela taxa metabólica e qualidade da nutrição antioxidativa animal (HALLIWELL; GUTTERIDGE 1989).

As mitocôndrias por serem um dos principais alvos da ação de ERO, possuem três tipos de antioxidantes: CAT, GSH e Trx, as duas últimas enzimas são consideradas as mais importantes e utilizam vias distintas e complementares, a atividade dessas duas enzimas requer redutores equivalentes na forma de NADPH. Assim, a mensuração da atividade de CAT, GSH e Trx fornece informações importantes sobre o processo antioxidante que permitem comparar diferentes tecidos e animais (MUNRO; PAMENTER, 2019).

Na glândula mamária, a enzima antioxidante chave da glândula mamária é a GSH, sendo sintetizado pelo mGSH. A presença de GSH é universal em toda a célula, porém a maior parte é encontrada no citosol e em menor quantidade nas mitocôndrias. Sua função é neutralizar os agentes causadores de apoptose, como as ROS. A concentração de GSH pode ser considerado como um marcador da vulnerabilidade celular aos diferentes fatores de estresse (FERNADEZ-CHECA, 2003).

Os desequilíbrios metabólicos nos animais de interesse zootécnico podem ser definidos como doenças de produção (PAYNE et al., 1987). Em geral, o maior requerimento de energia, resulta no aumento da utilização de oxigênio, aumentando

o estresse oxidativo no organismo dos animais de alta produção (PATHAN et al., 2011). Contudo, os efeitos negativos do aumento da atividade metabólica e o estresse oxidativo podem ser agravados pelo estresse térmico, deficiência nutricional, indisponibilidade dos componentes precursores dos antioxidantes, situações muito comuns, em animais leiteiros da alta produção criados em ambiente tropical ou subtropical (BERNABUCCI et al., 2005; Di TRANA et al., 2006; MILLER et al., 1994).

Nesta situação, embora taxa metabólica seja alta e a concentração de glicose plasmática aumente, indicando que existe um redirecionamento de glicose para outros tecidos em detrimento da glândula mamária, a ação conjunta destes fatores aumenta a produção de ROS e reduzem a produção de leite em ruminantes (ABDELNOUR et al., 2019).

REFERÊNCIAS

- ABDELNOUR, S. A. et al. **Stress biomarkers and proteomics alteration to thermal stress in ruminants: A review.** Journal of Thermal Biology, v. 79, p. 120-134, 2019.
- ADAMS, J. M.; CORY, S. **The Bcl-2 Protein Family: Arbiters of Cell Survival.** Science, v. 281, n. 5381, p.1322-1326, 1998.
- AKERS, R. M. **Lactation and The Mammary Gland: Overview of Mammary Development.** 1th ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2002.
- ALAM, M. G. S.; DOBSON, H.; FITZPATRICK, R. J. **Endocrine response to different doses of ACTH in cows.** British Veterinary Journal, v. 142, n. 3, p. 239-245. 1986.
- ALDERSON, A.; POLLAK, E. J. **Age-Season Adjustment Factors for Milk and Fat of Dairy Goats.** Journal of Dairy Science, v. 63, n. 1, p. 148-151, 1980.
- APHA: **Standard Methods for the Examination of Dairy Products.** Editores H. Michael Wehr, e Joseph F. Frank. 17th ed. Washington: American Public Health Association. 2004.
- BARRETO, J. E. F.; SILVA, L. P. **Sistema límbico e as emoções – uma revisão anatômica.** Revista Neurociência, v. 18, n. 3, p. 386-394, 2010.
- BAUMGARD, L. H; RHOADS Jr, R. P. **Effects of Heat Stress on Postabsorptive Metabolism and Energetics.** Annual Review Animal Biosciences. v.1, n. 7, p. 1-7, 2013.
- BERNABUCCI, U., et al. **Markers of oxidative status in plasma and erythrocytes of transition dairy cows during hot season.** Journal of Dairy Science, v.85, n. 9, p. 2173-2179, 2002.
- BERNABUCCI, U.; RONCHI, B.; LACETERA, N. et al. **Influence of body condition score on the relationship between metabolic status and oxidative stress in periparturient dairy cows.** Journal of Dairy Science, v. 88, n. 6, p. 2017-2026, 2005.
- BIRGEL, E. H. **Semiologia da glândula mamária de ruminantes** In: FEITOSA, F. L. Semiologia veterinária. A arte do diagnóstico. São Paulo: Roca. 2004.
- BLALOCK, J.E.; HARBOUR-MENAMLN, D.; SMITH, E.M. **Peptide hormones shared by the neuroendocrine and immunologic systems.** The Journal of Immunology. v.135, n. 2, p. 858-8619, 1985.
- BOMFIM, G. F. et al. **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, n. 7, p. 6486-6496, 2018.

BOUATTOUR, M.A.; CASALS, R.; ALBANELL, E. et al. **Feeding Soybean Oil to Dairy Goats Increases Conjugated Linoleic Acid in Milk.** Journal of Dairy Science. v. 91, n. 6. p. 2399–2407, 2008.

BOUTINAUD, M. et al. **Growth Hormone and Milking Frequency Act Differently on Goat Mammary Gland in Late Lactation.** Journal of Dairy Science, v. 86, n. 2, p. 509-520, 2003.

BRASIL, L. H. A. et al. **Efeitos do Estresse Térmico Sobre a Produção, Composição Química do Leite e Respostas Termorreguladoras de Cabras da Raça Alpina.** Revista Brasileira de Zootecnia, v. 29, n. 6, p. 1632-1641, 2000.

BRASIL. Secretária da Agricultura, Pecuária, Irrigação, Pesca e Aquicultura. **PAA Leite distribui mais de 2 milhões de litros nos quatro primeiros meses de 2019.** Página institucional. Disponível em: <<http://www.adab.ba.gov.br/2019/05/1906/PAA-Leite-distribui-mais-de-2-milhoes-de-litros-nos-quatro-primeiros-meses-de-2019.html>>. acesso em: 22 jan. 2020.

BRITO, J. R. F.; SALES, R. O. **Saúde do Úbere.** Uma Revisão. Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal, v.1, n.1, p. 67-90, 2007.

BRUCKMAIER, R. M. et al. **Machine milking of dairy goats during lactation: udder anatomy, milking characteristics, and blood concentrations of oxytocin and prolactin.** Journal of Dairy Research, v. 61, p. 457-466, 1994.

CANNON, W. B. **Bodily changes in pain, hunger, fear and rage.** 2th ed. New York: Appleton.

CAPUCO, A. V. et al. **Lactation persistency: Insights from mammary cell proliferation studies.** Journal of Animal Science, v. 81, n. 15, p. 18-31, 2003.

CASE, A. J.; DOMANN, F. E. **Manganese superoxide dismutase is dispensable for post-natal development and lactation in the murine mammary gland.** Free Radical Research, v. 46, n. 11, p. 1361-1368. 2012.

CELI, P. **The role of oxidative stress in small ruminant's health and production.** Revista Brasileira de Zootecnia, v. 39, p. 348-363, 2010.

CHÁVARI, A. C. T. et al. **Yield, composition, and fatty acid profile of milk from Anglo Nubian goats fed a diet supplemented with vegetable oils.** Revista Brasileira de Zootecnia, v. 49, e20200071.

CHIHUAILAF, R. H.; CONTRERAS, P.A.; WITTEWER, F.G. **Pathogenesis of oxidative stress: consequences and evaluation in animal health.** Veterinária México, v.33, n. 3, p.265-283, 2002.

CHROUSOS, G. P. **Stressors, Stress, and Neuroendocrine Integration of the Adaptive Response: The 1997 Hans Selye Memorial Lecture.** ANNALS Of The New York Academy of Sciences. 2006.

CHROUSOS, G.; LORIAUX, D.; GOLD, P. **Mechanisms of physical and emotional stress**. New York: Plenum Press, 1988.

COMHAIR, S. A. A.; ERZURUM, S. C. **Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases**. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, v. 283, n. 2, p. 246–255, 2001.

COSTA, R. G. et al. **Caracterização do sistema de produção caprino e ovino na região semi-árida do estado da Paraíba**. Brasil. Arquivo de Zootecnia, v. 57, n. 218, p. 195-205, 2008.

COWIE, A. T. et al. **Studies on the hormonal induction of mammary growth and lactation in the goat**. Journal of Endocrinology, v. 8, n. 1, p. 64, 1952.

DALEY, V. L. et al. **Bovine Mammary Gland Biopsy Techniques**. Journal of Visualized Experiments, v. 23, n. 142, 2018.

DALLARD, B. E. et al. **Immunolocalization and expression. Of insulin-like growth factor I (IGF-I) in the ovine mammary gland during mammogenesis, lactation and involution**. Small Ruminant Research. v. 58, n. 1, p.1-11, 2005.

DELOUIS, C. et al. **Relation Between Hormones and Mammary Gland Function**. Journal of Dairy Science, v. 63, n. 9, p. 1492-1513, 1980.

DI TRANA, A. et al. **The effect of hot season and nutrition on the oxidative status and metabolic profile in dairy goats during mid lactation**. Animal Science, v.82, n. 5, p. 717-722, 2006.

DRÖGE, W. **Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function**. Physiological Reviews, v. 82, n.1, p. 47–95, 2002.

DUNN, A. J. **Nervous system-immune system interaction: an overview**. Journal of Receptor Research, v. 8, n. 1-4, p. 589-607, 1988.

DÜRR, J.W. **Programa nacional de melhoria da qualidade do leite: uma oportunidade única**. In: O COMPROMISSO com a qualidade do leite no Brasil. Passo Fundo, RS: Editora Passo Fundo, 2004.

ESPE, D. **Some Observations on Nerve Regeneration in the Udder**. Journal of Dairy Science, v. 30, n. 1, p. 9-12, 1947.

FEITOSA, F. L. F. **Semiologia da Glândula Mamária de Ruminantes**. In: BIRGEL E. H. Semiologia Veterinária: A Arte do Diagnóstico. 2 ed. São Paulo: Roca, 2008.

FERNANDEZ-CHECA, J. C. **Redox regulation and signaling lipids in mitochondrial apoptosis**. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 304, n. 3, p. 471-479, 2003.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. **Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo.** Revista da Associação Médica Brasileira, v. 43, n. 1, 1997.

FONSECA N. C.; GONÇALVES, J. C.; ARAUJO, G. S. **Influência do estresse sobre o sistema imunológico.** Artigo de Revisão. 2015.

FULKERSON, W. J.; JAMIESON, P. A. **Pattern of cortisol release in sheep following administration of synthetic acth or imposition of various stressor agents.** Australian Journal of Biological Science, v. 35, n. 2, p. 215-222. 1982.

GALINA, M. A. et al. **Reproductive performace of Mexican dairy goats under various management systems.** Small Ruminant Research, v. 18, n. 3, p. 249-253, 1995.

GONÇALVES Jr, O.; MARTES, A. C. B. **Desenvolvimento e construção de mercados – o caso da caprinovinocultura no Nordeste.** In: Anais do I Circuito de Debates Acadêmicos. Brasília, 2011.

GONÇALVES, A. L. et al. **Avaliação de sistemas de produção de caprinos leiteiros na Região Sudeste do Brasil.** Revista Brasileira de Zootecnia, v. 37, n. 2, 2008.

GONZÁLEZ, F. H. D. e SILVA, S. C. **Introdução à bioquímica clínica veterinária.** 3 ed. Porto Alegre: Editora UFRGS, 2017.

GUTIERREZ, N. et al. **Exploração de Pequenos Ruminantes no Estado do Ceará.** Pesquisa e agropecuária brasileira, v. 24, n. 5, p. 509-516, 1989.

HAENLEIN, G. F. W.; CACCESE, R. **The udder.** In: VARNER, M., Goat Handbook. Porto Alegre: Sulina, 1992.

HAJDENWURCEL, J. R. **Atlas de microbiologia de alimentos.** São Paulo: Fonte Comunicações e Editora, 1998. 66p.

HALLIWELL, B. **Free Radicals and Antioxidants: A Personal View.** Nutrition Reviews, New York: v.52, p.253-265, 1994.

HALLIWELL, B. **Free Radicals and other reactive species in Disease.** National University of Singapore, Singapore: Mar. 2015.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine.** 3. th. New York: Oxford University Press, 1999. 936p.

HART, K. A. et al. **Synthetic adrenocorticotropic hormone stimulation tests in healthy neonatal foals.** Journal of Veterinary Internal Medicine, 21, n. 2, p. 314-21, 2007.

HENNIGHAUSEN, L.; ROBINSON, G. W. **Signaling Pathways in Mammary Gland Development.** Developmental Cell. v.1, n. 4, p. 467-475, 2001.

HIBAOU, Y.; ROULET, E; RUEGG, U. T. **Melatonin prevents oxidative stress-mediated mitochondrial permeability transition and death in skeletal muscle cells.** Journal of Pineal Research, v. 47, n. 3, p.238-52, 2009.

HOOPER, H. B.; SILVA, P. S.; OLIVEIRA, S. A.; MERINGHE, G. K. F.; LACASSE, P.; NEGRÃO, J. A. **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, n. 2, p. 1982-1992, 2020.

HOTTENBERG, H.; HOEK, J. B. **The path from mitochondrial ROS to aging runs through the mitochondrial permeability transition pore.** Aging Cell. v. 16, n. 5, p. 943-955, 2017.

HOU, Q. et al. **Apoptosis modulatory activities of transiently expressed Bcl-2: Roles in cytochrome c release and Bax regulation.** Apoptosis, v. 8, n. 6, p. 617-629, 2003.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo agropecuário 2016: Produção da Pecuária Municipal.** Rio de Janeiro: IBGE, v. 44, 2016.

KNIGHT, C. H. **Compensatory changes in mammary development and function after hemimastectomy in lactating goats.** Journals of Reproduction & Fertility, Reproduction, v. 79, n. 2, p. 343–352, 1987.

KNIGHT, C. H.; PEAKER, M. **Mammary development and regression during lactation in goats in relation to milk secretion.** Quarterly Journal of Experimental Physiology, v. 69, n. 2, p. 331–338. 1984.

KROEMER, G.; DALLAPORTA, B.; RESCHE-RIGON, M. **The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis.** Annual Review of Physiology, v. 60, p. 619-642, 1998.

LÉRIAS, J. R. et al. **The mammary gland in small ruminants: major morphological and functional events underlying milk production – a review.** Journal of Dairy Research. v. 81, n. 3, p. 304-318, 2014.

LI, D.; MA, H. et al. **Deoxynivalenol induces apoptosis in mouse thymic epithelial cells through mitochondria-mediated pathway.** Environmental Toxicology and Pharmacology. v. 38, n. 1, p.163-171, 2014.

LI, P. et al. **Identification of cell types in the developing goat mammary gland.** Histochemical Journal, v. 31, n. 6, p. 379-393, 1999.

LIMA, A. R. C. et al. **Energy expenditure of Saanen and Anglo-Nubian goats at different temperatures.** Small Ruminant Research, v. 193, 106256, 2020.

LIMA, F. T. et al. **Estudo Exploratório do Mercado das Potencialidades de Consumo do Leite De Cabra e Seus Derivados Entre Paulistanos.** Informações Econômicas, SP, v. 45, n. 3, 2015.

LÔBO, R. N. B. et al. **Brazilian goat breeding programs**. Small Ruminant Research, v. 89, n. 2-3, p. 149-154, 2010.

LYKKESFELD, J.; SVENDSEN, O. **Oxidants and antioxidants in disease: Oxidative stress in farm animals**. The Veterinary Journal, v. 173, n. 3, p. 502-511.
LYTHGOE, H. C. **Composition of Goat Milk of Known Purity**. Journal of Dairy Science, v. 23, n. 11, p. 1097–1108, 1940.

MACHADO, L. P. et al. **Lesão oxidativa eritrocitária e mecanismos antioxidantes de interesse em Medicina Veterinária**. Revista de Ciências Agroveterinárias, v. 8, n. 1, p. 84-94, 2009.

MADUREIRA, K.M.; GOMES, V; ARAÚJO, W. P. **Características físico-químicas e celulares do leite de cabras Saanen, Alpina e Toggenburg**. Revista Brasileira de Ciência Veterinária, v.24, n.1, p. 39-43, 2017.

MARTINS, R. C. B.; JERICÓ, M. M. **Uso de baixa dose de ACTH sintético no teste de estimulação da função adrenal para o diagnóstico e controle do hiperadrenocorticismo canino: avaliação da eficácia diagnóstica**. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 37, n. 3, p. 241-247, 2017.

McDOWELL, R. E. et al. **Effect of Heat Stress on Energy and Water Utilization of Lactating Cows**. Journal of Dairy Science, v. 52, n. 2, p. 188–194. 1969.

MEHDID, A. et al. **Effect of stress on somatic cell count and milk yield and composition in goats**. Research in Veterinary Science, v. 125, p. 61-70, 2019.

MILLER, B. A.; LU, C. D. **Current status of global dairy goat production: an overview**. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, v. 32, n. 8, p. 1219-1232, 2019.

MILLER, D. B.; O'CALLAGHAN, J. P. **Neuroendocrine Aspects of the Response to stress**. Metabolism, v. 51, n. 6, p. 5-10, 2002.

MILLER, J. K. et al. BREZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E.; MADSEN, F.C. **Oxidative stress, antioxidants and animal function**. Journal of dairy Science, n. 76, n. 9, p. 2812-2823, 1993.

MILLER, J. K. et al. **Transition metals, oxidative status, and animal health: Do alterations in plasma fast-acting antioxidant lead to disease in livestock? Biotechnology in the feed industry**. In: Proc. Alltech's Tenth Annu. Symp. ed. Nottingham Univ. Press, Nottingham, UK. p. 283-301, 1994.

MOBERG, G. P. **The Biology Animal Stress. Biological Response to Stress: Implications for Animal Welfare**. California, 2000.

MORAES, M. C. C. et al. **Factors affecting pregnancy rates for goat embryos recovered and transferred by transcervical route**. Small Ruminant Research, v. 192, 106215, 2020.

MUNRO, D.; PAMENTER, M. E. **Comparative studies of mitochondrial reactive oxygen species in animal longevity: Technical pitfalls and possibilities.** *Aging Cell*, v. 18, n. 5, 2019.

OLALLA, M. et al. **Nitrogen fractions of Andalusian goat milk compared to similar types of commercial milk.** *A Food Chemistry*, v. 113, n 3, p. 835-838, 2009.

OLIVEIRA A. A. P.; LIMA V. P. M. S. **Aspectos econômicos da caprino-ovinocultura tropical brasileira.** In: I Semana da Caprinocultura e da Ovinocultura Tropical Brasileira. Sobral, CE. 1994. p. 7-46.

PAAPE, M.J. et al. **Milk somatic cells and lactation in small ruminants.** *Journal of Dairy Science*, v. 84, p.237-244, 2001.

PAAPE, M.J. et al. **Monitoring goat and sheep milk somatic cell counts.** *Small Ruminant Research*, v. 68, p. 114-125, 2007.

PACKARD Jr., V. S. et al. **Direct Microscopic Methods for Bacteria or Somatic Cells.** in: *Methods for the Examination of Dairy Products*, R. T. Marshall, 16th ed. Am. Public Health Assoc., Washington, DC. 1992.

PAIVA, R. D. M. et al. **Population structure and effect of inbreeding on milk yield of Saanen goats in Brazilian production systems.** *Small Ruminant Research*, v. 192, n. 106194, 2020.

PARK, C. S.; LINDBERG, G. L. **Glândula Mamária e Lactação.** In: DUKES, H. H. *Fisiologia dos Animais Domésticos*. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

PARK, Y. W. et al. **Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk.** *Small Ruminant Research*, v. 68, p. 88–113, 2007.

PATHAN, M. M. et al. **Production Antioxidant Status In Parturient Meshana Buffaloes.** *Indian Journals of Animal Research*, v. 45, n. 3, p. 211-214, 2011.

PAYNE, J. M.; PAYNE, S. **The metabolic profile.** Oxford: Oxford university Press, 1987, 179p.

RAMOS, J. S. et al. **Efeito do tipo de ordenha sobre o exame da glândula mamária de cabras Saanen.** *Arquivos do Instituto Biológico*, v.87, 2020.

RIBEIRO, A. C.; RIBEIRO, S. D. A. **Specialty products made from goat milk.** *Small Ruminant Research*. v. 89, n. 2–3, p. 225-233, 2010.

RIBEIRO, S. D. A. **Caprinocultura: Criação Racional de Caprinos.** São Paulo: Nobel, 1997. 318p.

ROBINSON, G. W. **Cooperation of signaling pathways in embryonic mammary gland development.** *Nature Reviews Genetics*, v. 8, p. 963–972, 2007.

SAFAYI, S. et al. **Breast remodeling in primiparous and multiparous dairy goats during lactation.** Journal of Dairy Science, v. 93, n. 4, p. 1478-1490, 2010.

SALAMA, A. A. K. et al. **Changes in Cisternal Udder Compartment Induced by Milking Interval in Dairy Goats Milked Once or Twice Daily.** Journal of Dairy Science, v. 87, n. 5, p. 1181-1187, 2004.

SANTOS, A. M; DE CASTRO, J. J. **STRESS.** Análise Psicológica, v. 16, n.4, p. 675-690, 1998.

SELYE, H. **The stress of life.** New York: McGraw-Hill. 1956.

SHYAMALA, G. **Progesterone Signaling and Mammary Gland Morphogenesis.** Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia. v. 4, n. 1, p. 89-104, 1999.

SIES, H. **Oxidative stress: From basic research to clinical application.** The American Journal of Medicine, v. 91, n. 3, p. 31-38, 1991.

SILANIKOVE, N.; KOLUMAN, N. **Impact of climate change on the dairy industry in temperate zones: Predications on the overall negative impact and on the positive role of dairy goats in adaptation to earth warming.** Small Ruminant Research, v. 123, n. 1, p. 27-34, 2015.

SILANIKOVE, N.; SHAPIRO, U. M. F.; LEITNER, G. **Subclinical mastitis in goats is associated with upregulation of nitric oxide-derived oxidative stress that causes reduction of milk antioxidative properties and impairment of its quality.** Journal of Dairy Science, v. 97, n. 6, p. 3449–3455, 2014.

SILVA, H. W.; FAVARIN, S. **A importância econômica da criação de cabra leiteira para o desenvolvimento rural.** Revista Científica Rural, v. 22, 2020.

SILVA, H. W.; GUIMARÃES, C. R. B.; OLIVEIRA, T. S.; **Aspectos da Exploração da Caprinocultura Leiteira no Brasil.** Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS), v.2, n.2, p.121-125, 2012.

SILVA, L. S. et al. **Soybean oil modulates the fatty acid synthesis in the mammary gland, improving nutritional quality of the goat milk.** Small Ruminant Research, v. 183, 106041, 2020.

SILVA, M. G. C. M. S.; Del Valle, T. A. **Produção de Caprinos – Lavras:** Ed. UFLA, 2018. 109p.

STEFANON, B.; SGORLON, S.; GABAI, G. **Usefulness of nutraceuticals in controlling oxidative stress in dairy cows around parturition.** Veterinary Research Communications, v. 29, n. 2, p. 387-390. 2005.

SUN, X. et al. **Lycopene alleviates H₂O₂ -induced oxidative stress, inflammation and apoptosis in bovine mammary epithelial cells via the NFE2L2 signaling pathway.** Food & Function, v. 10, n. 10, p. 6276–6285, 2019.

TRONCO, V. M. **Manual para Inspeção da Qualidade do leite**, 4. Ed. – Santa Maria: ed. UFSM, 203p, 2010.

VERKERK, G. A.; MACMILLAN, K. L.; MCLEAVY, L. M. **Adrenal cortex response to adrenocorticotrophic hormone in dairy cattle**. Domestic Animal Endocrinology, v. 11, n. 1, p. 115-123, 1994.

VIANA NETO, A. M. et al. **Período de gestação de cabras Saanen e seus mestiços**. VIII Congresso Nordestino de Produção Animal. Fortaleza, CE. v.30. n.1. p.133-140, 2013.

VIEIRA, M. M. M. et al. **Aspectos Fisiológicos e bioclimáticos de caprinos na região semiáridas**. Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 10, n. 5, p. 356-369, 2016.

VIEIRA, R. A. M. et al. **Criação de cabras leiteiras na agricultura doméstica: rebanho e índices econômicos de um estudo de caso no Rio de Janeiro, Brasil**. Revista Brasileira de Zootecnia. v. 38, n. 1, 2009.

WANG, I.K.; LIN-SHIAU, S. Y.; LIN, J.K. **Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells**. European Journal of Cancer, v. 35, p. 1517-1525, 1999.

WANG, J. et al. **Deoxynivalenol induces oxidative stress, inflammatory response and apoptosis in bovine mammary epithelial cells**. Animal Physiology and Animal Nutrition, v. 103, n. 6, p. 1663-1674, 2019.

WENG, X. et al. **Effects of heat stress and dietary zinc source on performance and mammary epithelial integrity of lactating dairy cows**. Journal of Dairy Science, v. 101, n. 3, p. 2617–2630, 2018.

2. EFEITO DE DIFERENTES ESTRESSORES NAS RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E HORMONAIS DE CABRAS SAANEN EM LACTAÇÃO E O IMPACTO DO ESTRESSE CUMULATIVO NA PRODUÇÃO DE LEITE

RESUMO

Este estudo analisou o efeito do estresse agudo cumulativo ocasionado por diferentes estressores em 30 cabras Saanen em lactação (± 150 dias). Os animais foram submetidos a diferentes estressores ambientais e de manejo ou mantidos em condições de conforto (grupo controle). Os estressores foram estresse por calor, administração de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), casqueamento e chuva. Houve efeito significativo dos estressores na frequência respiratória (FR), temperatura retal (TR), e na concentração de glicose, cortisol, insulina e triiodotironina (T3) nas cabras ($P \leq 0,05$). O efeito dos estressores resultaram em aumentos na contagem das células somáticas (CCS) no leite e queda de produção leiteira quando comparado as cabras controle. Embora essas respostas fisiológicas causadas pelo estresse agudo tenham restabelecido a homeostase, o estresse agudo cumulativo imposto às cabras pelos diferentes desafios reduziu a produção leiteira e aumento a CCS do leite. Neste contexto, os resultados mostram que os produtores devem evitar os efeitos cumulativos de estressores agudos, pois eles têm um impacto negativo na produção leite.

Palavras-chave: estresse agudo, cabras, lactação, glândula mamária

EFFECT OF DIFFERENT STRESSORS ON PHYSIOLOGICAL AND HORMONAL RESPONSES IN LACTATION SAANEN GOATS AND THE IMPACT OF CUMULATIVE STRESS ON MILK PRODUCTION

ABSTRACT

This study analyzed the effects on milk production and quality of cumulative acute stress caused by different stressors in 30 Saanen goats in lactation (± 150 days). The animals were exposed to different environmental and management stressors or maintained under conditions of comfort (control group). The stressors were heat stress, adrenocorticotrophic hormone (ACTH) administration, hoof care, and rain. There were significant effects of the stressors on respiratory rate (RR), rectal temperature (RT), and glucose, cortisol, insulin, triiodothyronine (T3) concentrations of the goats ($P \leq 0.05$). The stressors resulted in an increase of somatic cell count (SCC) in milk and a decrease of milk yield in comparison to the control goats. Although these acute-stress-triggered physiological responses restore homeostasis, the cumulative acute stress imposed on goats by the different challenges significantly reduced milk yield and increased the SCC in milk. In this context, the results of this study indicate that farmers should avoid the cumulative effects of acute stressors because they have a significant negative impact on milk production.

Key words: acute stressors, goat, lactation, mammary gland

2.1 INTRODUÇÃO

O estresse ambiental é a principal causa da baixa produtividade em animais leiteiros. Além de reduzir a produção de leite, esse estresse também prejudica a qualidade do leite e tem impactos negativos nos lucros da fazenda (HAMZAOUI et al., 2013). A interação entre animal e ambiente promove respostas fisiológicas que permitem os animais restabelecerem sua homeostase. No entanto, em condições ambientais adversas, podem ocorrer alterações hormonais, bioquímicas e hematológicas, mesmo em cabras, que são consideradas animais rústicos quando comparado com outras espécies de ruminantes (CONTRERAS-JODAR et al., 2019; FONSECA et al., 2016; STACHOWICZ et al., 2019).

Na produção animal, alguns fatores podem causar estresse agudo nos animais, por exemplo, práticas de manejo como vacinação, desmame, mudança de lote, corte de cascos e transporte (HERTEM et al., 2014; HULBERT; MOISÁ, 2016; MEHDID et al., 2019; POLYCAR et al., 2016; PATT et al., 2013; RIBEIRO et al., 2018). A identificação dos fatores que influenciam negativamente a produtividade das cabras leiteiras, possibilitam implementar adequações no sistema produção para melhorar seu bem-estar (MEHDID et al., 2019; PATT et al., 2013). De modo geral, as cabras leiteiras enfrentam um conjunto de desafios estressantes diariamente, assim a interação entre esses fatores estressantes ambientais e de manejo, podem desencadear respostas fisiológicas e comportamentais quando os animais tentam restaurar a homeostase (AL-SAMAWI et al., 2014; BERNABUCCI et al., 2009; BOMFIM et al., 2018; GUPTA et al., 2018; KRUGER et al., 2016). Para atenuar os efeitos desses estressores, as cabras mobilizam suas reservas energia para sistemas que necessitaram de um maior aporte energético, como o sistema respiratório e o cardiovascular (MOBERG, 2000; VIEIRA et al., 2016). Esta situação pode impactar negativamente a produção e a qualidade do leite. No entanto, existem poucas investigações sobre a interação entre diferentes estressores em animais de produção, e mais estudos são necessários.

Nesse contexto, é importante estudar as alterações fisiológicas (frequência respiratória, frequência cardíaca, e temperatura retal) envolvidas nas respostas ao estresse para melhorar o conforto e bem-estar de animais leiteiros (AL-SAMAWI et al., 2014; MOBERG, 2000; KRUGER et al., 2016). As respostas fisiológicas relacionadas ao estresse também causam modificações coordenadas nos perfis

hormonais e metabólicos associados a alterações na disponibilidade e no fluxo de nutrientes para a produção como resultado de mudanças nos processos anabólicos e catabólicos (BERNABUCCI et al., 2009). Portanto, o estudo dos perfis metabólicos e hormonais é uma ferramenta importante para avaliar uma possível influência negativa do estresse na produção de leite (BAUMGARD et al., 2017).

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência do estresse cumulativo em cabras da raça Saanen expostas a estressores ambientais e de manejo. Isso foi realizado simulando situações que ocorrem rotineiramente na criação de caprinos, para entender seus efeitos nas respostas fisiológicas e hormonais relacionadas à produção e qualidade do leite de cabra. A hipótese testada foi que os estressores cumulativos alteram negativamente a produção de leite de cabras Saanen.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento e as análises foram em Pirassununga/SP (21°58'S, 47°26'W), região com característica climática classificada como úmido subtropical (classificação Köppen-Geiger). A semana experimental ocorreu nos dias 10, 11, 12 e 13 de dezembro de 2018, que corresponde a um período quente e chuvoso. Todos os procedimentos realizados com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal (protocolo 9546150719), que segue a legislação federal brasileira.

2.2.1 Animais, habitação e rotina de manejo

Este estudo utilizou 30 cabras Saanen saudáveis, não grávidas, lactantes (150 ± 30 dias) com idade média de 2,7 ± 1,25 anos (24 primíparas e 6 múltiparas), peso vivo de 63,3 ± 11,4 kg e escore corporal de 3,0 ± 0,63. Os animais foram criados em sistema de criação semi-extensivo e mantidos em piquetes de *Cynodon spp.* (tifton) com acesso a sombra, comedouro e água. À noite, as cabras foram mantidas em baias coletivas parcialmente cobertas de dimensões 2 x 5 x 6m² (altura, largura e profundidade). As cabras foram alimentadas duas vezes ao dia (08h00 e 15h00) e tiveram livre acesso a cochos contendo uma dieta total composta por silagem de milho e concentrado (uma mistura de milho e farelo de soja). A proporção de matéria seca da dieta era de 50% de silagem e 50% de concentrado para fornecer suas necessidades nutricionais com base nas diretrizes do National Research Council

[NRC] (2007). Essa dieta total foi ajustada semanalmente considerando a fase de lactação e o peso vivo corporal para garantir 10% de sobras. Os animais também tiveram livre acesso a água fresca e sal mineral.

As cabras foram ordenhadas uma vez ao dia com o equipamento regulado para vácuo de 48 KPa e pulsação de 120 ciclos por minuto. Os animais foram conduzidos calmamente até a sala de ordenha e submetidos ao pré-dipping dos tetos com antisséptico iodado 0,5 a 1,0%, bem como a secagem para retirada da solução. Isso foi seguido por um teste da caneca de fundo preto (para detecção de mastite clínica), fixação e remoção do conjunto de teteiras e pós-dipping dos tetos com a mesma solução iodada. A produção de leite foi mensurada diariamente durante toda a lactação por copos coletores individuais. A qualidade do leite foi avaliada semanalmente durante a lactação. Os dados coletados foram registrados separadamente em planilhas de produção e qualidade do leite de cada animal.

2.2.2 Desenho Experimental

Os 30 animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos homogêneos em relação ao período de lactação e a produção de leite de cada animal. O grupo controle foi composto por 15 cabras que mantiveram sua rotina habitual sendo mantidas nos piquetes com acesso à sombra, água e dieta total. Já o grupo estresse, também composto por 15 cabras, foram submetidas a quatro desafios estressantes de manejo e ambiental aplicados sequencialmente em dias consecutivos, para avaliar a influência do estresse cumulativo sobre a produção e qualidade de leite. Durante a os dias experimentais ocorreram coletas de dados dos parâmetros fisiológicos, frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR) e temperatura retal (TR), e coletas de amostras de sangue dos animais desafiados e controle. Essas sucessões de coletas (parâmetros fisiológicos e sangue) ocorram antes (08h00), durante (12h00) e após (16h00) os tratamentos experimentais. As amostras de sangue após serem coletadas foram imediatamente para análise de cortisol, insulina, triiodotironina (T3), fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1 (IGF1) e glicose.

Seguindo a rotina diária de manejo, às 07h00, as 30 cabras foram conduzidas calmamente até a sala de ordenha e ordenhadas. Após a ordenha, às 08h00, todos os animais foram conduzidos à sala de espera para aferição dos parâmetros fisiológicos e coleta de sangue. A partir das 10h00, as 15 cabras do grupo estresse

foram submetidas aos desafios diários (estresse por calor, administração de ACTH, manejo de casqueamento e exposição à chuva). Simultaneamente, os 15 animais do grupo controle foram mantidos em condições de conforto ambiental e não foram expostas aos diferentes estressores estudados. Para realizar a coleta de dados, aferição dos parâmetros fisiológicos e coleta de sangue, durante os tratamentos experimentais às 12h00, os animais permaneceram em seus respectivos ambientes conforme os tratamentos experimentais, grupo estresse recendo o agente estressor e grupo controle em sua rotina habitual de manejo. Às 15h00, ao término da exposição das cabras estresse aos desafios estressores, todas as cabras foram levadas a suas respectivas baias e mantidas no mesmo ambiente em condições idênticas de alojamento, com acesso a dieta total e água *ad libitum* seguindo a rotina habitual do setor. E uma hora após (16h00) todas as cabras retornarem a rotina, ocorreu a última coleta de dados do dia, com a mensuração da TR, FC e FR e coleta de amostras de sangue em ambos os grupos. A temperatura e umidade relativa do ar dos ambientes foram registradas diariamente em intervalos de 10 minutos com um data Logger (HOBO U12-001, Cape Cod, MA, USA) com precisão de 0,21 Graus Celsius. A temperatura do globo negro (T_{gn}) foi registrada às 08h00, 12h00 e 16h00.

2.2.3 Desafios Experimentais

2.2.3.1 Desafio 1 (calor)

Os animais do grupo estresse sempre foram submetidos aos diferentes desafios às 10h00. No primeiro dia da semana experimental (10/12) as cabras do grupo estresse foram expostas ao calor relacionado a temperatura ambiental e exposição ao sol. As cabras deste grupo foram mantidas em um piquete com pastagem de Tifton por 5 horas (10h00 às 15h00) sem sombra e água para atenuar o efeito do calor. Enquanto isso, as cabras controle permaneceram em um piquete de tifton com acesso à sombra e água. Às 15h00 ao finalizar os tratamentos, todos os animais experimentais foram conduzidos para suas respectivas baias, onde tiveram acesso a concentrado, volumoso e água.

Especificamente nesse dia, a temperatura e umidade relativa do ar eram 26,2°C e 60% às 10h00, 30,8°C e 48% às 12h00, e 34,2°C e 42% às 16h00, respectivamente. Para analisar a adaptabilidade dos animais ao fator climático, levou-se em

consideração as informações climáticas durante o período dos tratamentos (das 10h00 às 15h00). A partir destas variáveis climatológicas determinou o índice de temperatura de globo negro e umidade (ITGU). O cálculo do ITGU foi o mesmo citado por BUFFINGTON et al. (1977). Correspondendo a 75,2 às 10h00; 80,1 às 12h00; 84,0 às 15h00.

$$ITGU = T_{gn} + 0,36 T_d - 330,08$$

T_{gn} – temperatura do globo negro

T_d – temperatura do ponto de orvalho

2.2.3.2 Desafio 2 (ACTH)

O segundo desafio consistiu na administração do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). As cabras deste grupo receberam um estressor fisiológico padrão (0,6 mg de ACTH Kg⁻¹ de PV por via intravenosa). Simultaneamente, as cabras do grupo controle receberam placebo também por via intravenosa, para relacionar o efeito da aplicação na liberação hormonal neste grupo, e partir desta informação como nível basal para comparar apenas o efeito do estressor ACTH nas cabras do grupo estresse. Esse procedimento foi realizado na sala de espera às 10h00 no segundo dia da semana experimental (11/12). Em seguida, os animais ACTH e controle foram levadas para o piquete de tifton que dispõe de sombra e água. A dose de ACTH administrada neste estudo foi utilizada em estudos prévios para comparar o impacto de diferentes estressores agudos na liberação de cortisol (ALAM et al., 1986; BOMFIM et al., 2018; FULKERSON; JAMIESON, 1982; VERKERK et al., 1994).

2.2.3.3 Desafio 3 (casqueamento)

O terceiro desafio foi o manejo de casqueamento, que se resume a uma prática de rotina para manter a saúde dos cascos dos animais. Assim, no terceiro dia da semana experimental (12/12) iniciando os tratamentos às 10h00, as cabras estresse foram levadas até um corredor de acesso ao tronco de contenção para caprinos e mantidas nesse espaço até a finalização do casqueamento nas 15 cabras. Elas foram conduzidas individualmente e calmamente uma a uma ao tronco de contenção onde foi realizada a manipulação nos cascos. O casqueamento em si durou 5 minutos para

cada animal, nesse período os cascos eram analisados, limpados com rineta para retirar o acúmulo de matéria orgânica e quando necessário realizado aparas do excesso de cascos com tesoura específica de casco. Novamente, enquanto as cabras do grupo casqueamento eram desafiadas, os animais do grupo controle mantiveram a sua rotina habitual permanecendo em um piquete com pasto de Tifton, que dispõe de sombra e água. Ao finalizar o desafio de casqueamento nas cabras estresse, as mesmas foram conduzidas para um piquete de Tifton que dispõe de sombra e água.

2.2.2.4 Desafio 4 (chuva)

O quarto desafio consistiu na exposição das cabras do grupo estresse a uma chuva artificial no dia 13/12. Para realizar este evento simulando um dia de chuva, foram criados dois ambientes em duas baias sem cobertura equipadas com aspersores de irrigação e cobertas por sombrite para reduzir a luminosidade. A simulação da chuva seguiu os dados do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) para calcular a quantidade e o tempo de precipitação da água no mês de dezembro para a região onde ocorreu o experimento. Para assegurada uma precipitação moderada em torno de 30 mm de chuva no período de 5 horas, o que corresponde a uma chuva moderada-forte em região subtropical, calculou a precipitação com um pluviômetro dias antes da execução experimental. O volume de água utilizada variou de 5 a 10 mm de precipitação por hora, com intervalos de 30 minutos de chuva e 30 minutos sem chuva. Isso foi feito para simular períodos de maior e menor intensidade de chuva, também característicos da região subtropical. Como em dias chuvosos, todas as cabras alocadas no Laboratório permanecem em suas baias, as cabras do grupo controle permaneceram em suas baias sem exposição à chuva artificial, como em sua rotina habitual. Ressaltando que, durante a semana experimental era previsto a ocorrência de chuva segundo a previsão do tempo da região.

A temperatura e a umidade relativa do ar onde as cabras permaneceram durante a exposição à chuva foram 26.0°C e 69% às 10h00, 28.3°C e 71% às 12h00, e 38.2 °C e 37% às 16h00, respectivamente. Durante o desafio (das 10h00 às 15h00), os animais expostos à chuva foram submetidos a temperatura do ar de $30.7 \pm 3.7^\circ\text{C}$, e umidade relativa do ar de $59 \pm 11\%$, e THI de 77. Devido à aspersão de água e uso de sombrite para simular de chuva, a temperatura do globo negro média não foi mensurada durante este desafio.

2.2.4 Amostras e análises laboratoriais

As coletas das variáveis fisiológicas FR, FC e TR e as amostras de sangue de cada animal foram analisadas e coletadas durante os quatro dias experimentais em horário específicos do dia, antes (08h00), durante (12h00) e após (16h00) os tratamentos (desafio ou controle). A FC e FR foram mensuradas por ausculta com estetoscópio flexível na região torácica, para FC foi utilizado a contagem de batimentos cardíacos por minuto, enquanto para FR foi avaliado a contagem de movimentos respiratórios por minuto. Para a mensuração da TR, foi aferida a temperatura interna com termômetro clínico digital com precisão de $\pm 0,10^{\circ}\text{C}$, introduzido diretamente no reto do animal. Imediatamente após essas medidas, nos mesmos horários (08h00, 12h00 e 16h00), amostras de sangue foram coletadas dos animais desafiados e controle. As amostras de sangue foram coletadas da veia jugular em tubos e mantidas em gelo até serem centrifugadas a 3000 RPM a 4°C durante 17 minutos. O plasma obtido foi transferido para tubos e armazenados a -20°C até as análises laboratoriais.

As concentrações plasmáticas de cortisol, insulina, T3, IGF1 e glicose foram determinadas utilizando um leitor de Elisa (Multiscan MS Labsystem, Tiilitie, Vantaa, Finlândia). Todas as amostras foram analisadas em duplicatas. A glicose foi analisada usando kit enzimático (Glicose GOD-PAP, Laborlab), e os hormônios foram analisados usando kits imunoenzimáticos (EIA) para IGF-1 (MyBioSource, San Diego, CA, EUA), T3 total (Monobind Inc., Lake Forest, CA, EUA), insulina (Monobind Inc., Lake Forest, CA, EUA), cortisol (Monobind Inc., Lake Forest, CA, EUA).

A produção e a qualidade do leite foram mensuradas diariamente durante o experimento. Para a análise microbiológica, as amostras de leite foram coletadas assepticamente após desprezar os três primeiros jatos diretamente dos tetos para tubos estéreis. As amostras foram constituídas por 50% de leite de cada teto. A análise físico-química e contagem de células somáticas (CCS) foram realizadas a partir de uma porção representativa do total da produção de cada animal retirada dos copos coletores após a ordenha. As porcentagens de gordura, proteína e lactose do leite foram determinadas usando o Analisador Especialista MilkScope Automático (Razgrad, Bulgária). Para CCS, foram feitos esfregaços com 10 μL de leite em duplicata preparados e corados com pyronina Y e metil green para análise microscópica (RAYNAL-LJUTOVAC, et al., 2007). A CCS foi obtida da média de dois

campos contando as células e multiplicado pelo fator do microscópio. O resultado final foi convertido para uma escala logarítmica.

A análise microbiológica de leite cru seguiu a metodologia e procedimentos descritos no Standard Methods for the Examination of Dairy Products (WEHR; FRANK, 2004). Resumidamente, as bactérias mesófilas foram contadas em placa de ágar preparadas com três diferentes meios de cultura e inoculadas com 0,1 mL de leite puro que determinação do número de colônias bacterianas. O resultado foi expresso em unidades formadoras de colônias por mililitro de leite (UFC ml⁻¹) (HAJDENWURCEL, 1998). As amostras foram espalhadas em placas com ágar Plate Count Agar, Baird-Parker suplementadas com emulsão de telurito de gema de ovo para identificação de *Staphylococcus*, bem como ágar MacConkey para identificação de coliformes totais (bactérias gram negativas originárias do trato gastrintestinal). As placas foram incubadas à 37°C por 48 horas (TRONCO, 2010).

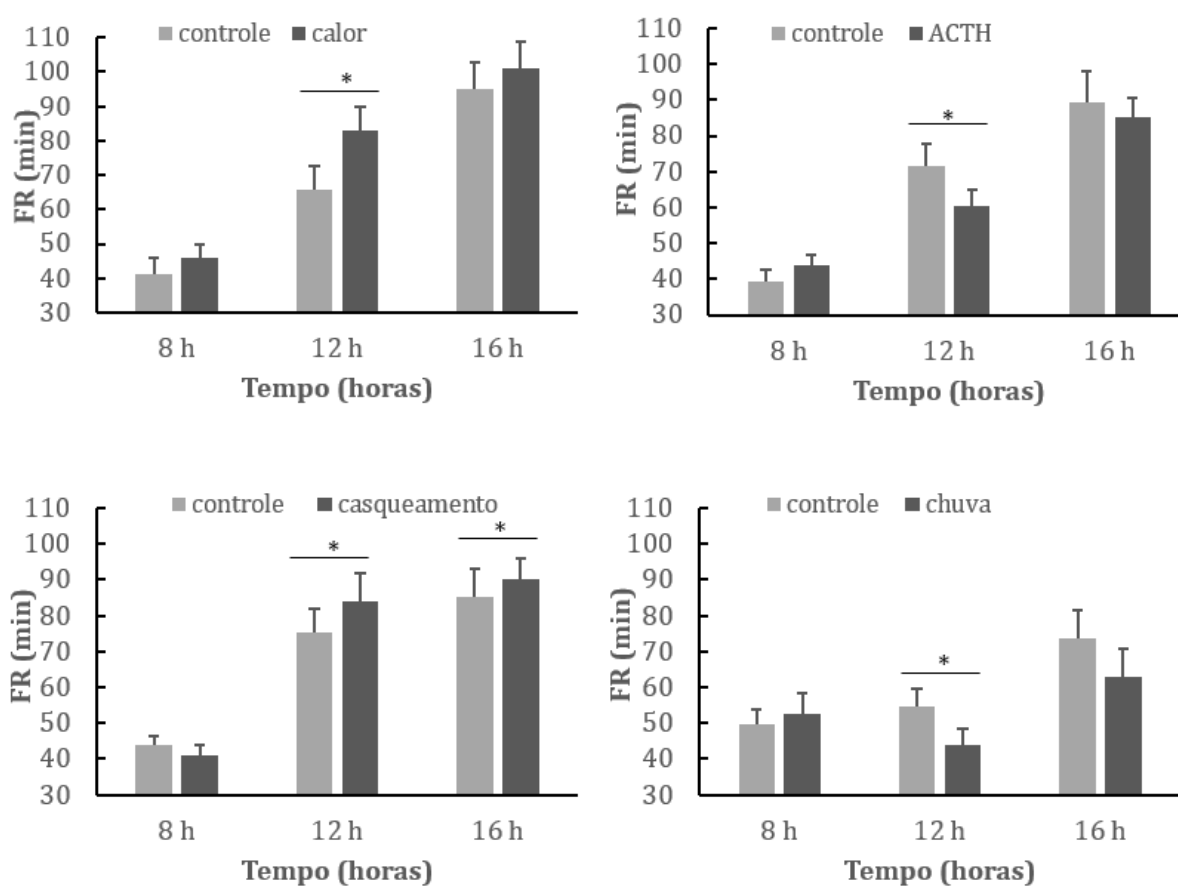
2.2.5 Análise Estatística

Os dados foram analisados pelo pacote de software Statistical Analysis System [SAS] (versão 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC). Inicialmente foi realizada a análise descritiva dos dados pelos procedimentos FREQ and MEANS, e a normalidade dos dados foi testada pelo procedimento Shapiro-Wilk. O procedimento MIXED foi usado na análise de variância (ANOVA) dos resultados. O modelo estatístico utilizou o efeito de cada tratamento (estresse por calor, ACTH, casqueamento, chuva ou controle), hora de amostragem, animal e interação entre hora de amostragem e tratamento como causas dos efeitos em TR, FR, FC, cortisol, insulina, triiodotironina, IGF-1 e glicose. Para determinar os efeitos dos desafios na produção, composição e qualidade do leite, o modelo estatístico incluiu o efeito de cada um dos quatro tratamentos de estresse e o animal como causas de variação. Quando houve efeito significativo, as médias foram testadas usando o teste de Fisher com o limiar para significância estabelecido em $P \leq 0,05$. As correlações entre as respostas fisiológicas, produção e qualidade do leite foram avaliadas pelos coeficientes de correlação de Pearson. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média.

2.3 RESULTADOS

A Tabela 1 mostra os efeitos dos tratamentos sobre FR, TR, FC, cortisol, insulina, T3, IGF-1 e glicose nas cabras submetidas aos diferentes desafios em comparação aos animais controle. Em relação as respostas termorregulatórias, os resultados mostram efeito significativo da interação tratamento-hora para FR em todos os quatro desafios. De fato, a FR das cabras expostas ao estresse por calor foi significativamente maior do que o observado nas cabras controle às 12h00 (Figura 1). Já as cabras submetidas ao casqueamento apresentaram FR maior às 12h00 e 16h00 do que os animais controle. Por outro lado, às 12h00, a FR das cabras submetidas ao ACTH e a chuva foi significativamente menor do que a aferição no grupo controle (Figura 1).

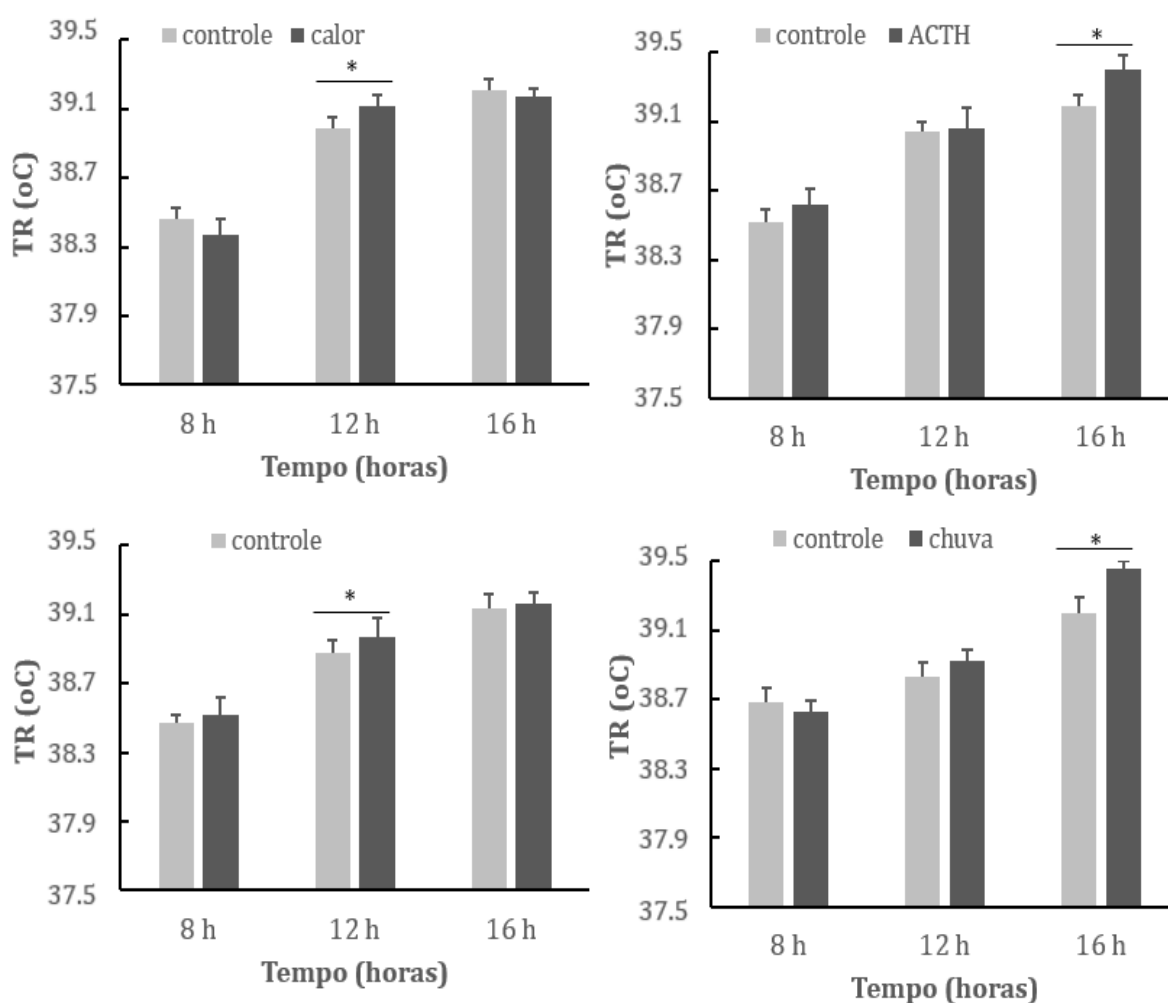
Figura 1 – Avaliação das médias da frequência respiratória (FR) das cabras do grupo controle e desafio durante os dias experimentais, nos períodos antes (8h), durante (12h) e após (16h) os tratamentos.



* Os dados estão apresentados com média \pm erro padrão ($p \leq 0,05$)

A análise da TR das cabras também mostrou uma interação significativa de tratamento-hora para os quatro desafios (Tabela 1). Cabras expostas ao estresse por calor e casqueamento tiveram uma TR mais alta às 12h00 do que os animais controle (Figura 2). A TR foi significativamente maior nas cabras submetidas aos desafios ACTH e chuva às 16h00 do que no grupo controle (Figura 2). Em relação à FC, houve interação significativa de tratamento-hora apenas para o desafio ACTH (Tabela 1), pois às 16h00 as cabras que receberam ACTH apresentaram aumento na FC em comparação aos animais controle (Figura 3).

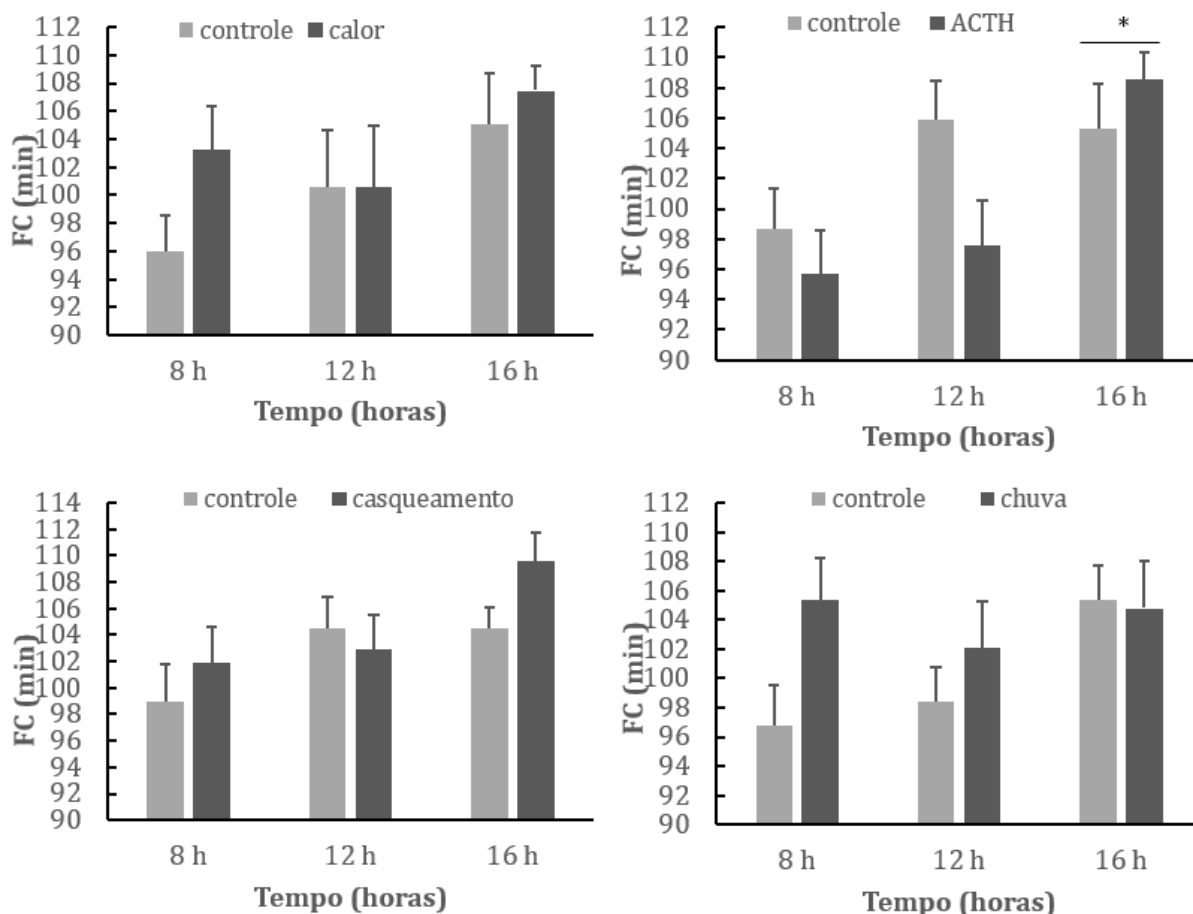
Figura 2 - Avaliação das médias da temperatura retal (TR) das cabras do grupo controle e desafio durante os dias experimentais, nos períodos antes (8h), durante (12h) e após (16h) os tratamentos.



*Os dados estão apresentados com média \pm erro padrão ($p \leq 0,05$)

°C temperatura em graus Celsius.

Figura 3 – Avaliação das médias da frequência cardíaca (FC) das cabras do grupo controle e desafio durante os dias experimentais, nos períodos antes (8h), durante (12h) e após (16h) os tratamentos.

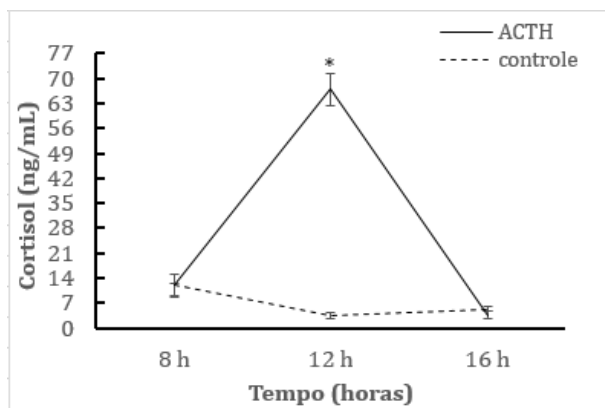


*Os dados estão apresentados com média \pm erro padrão ($p \leq 0,05$)

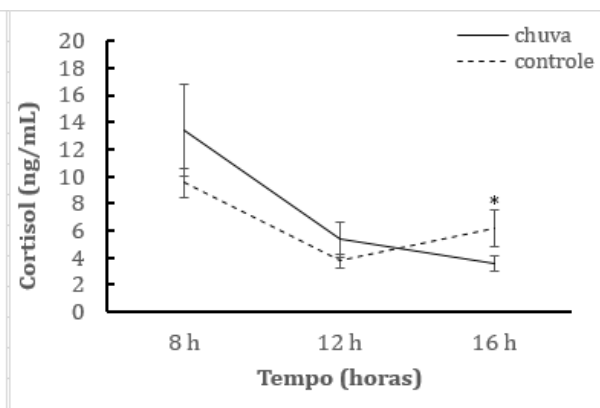
As concentrações de cortisol foram significativamente maiores para as cabras submetidas aos desafios ACTH e à chuva do que os animais controle. No entanto, os desafios estresse por calor e casqueamento não alteraram significativamente a liberação de cortisol (Figura 4). Como observado na Figura 4A, as cabras submetidas ao desafio ACTH apresentaram pico de cortisol às 12h00, enquanto os animais controle mantiveram em níveis basais em todas as coletas. No entanto, no desafio chuva, o cortisol foi significativamente menor às 16h00 nas cabras desafiadas comparado as cabras controle (Figura 4B).

Figura 4 – Média da concentração sérica hormonal das cabras do tratamento controle e desafio durante os dias experimentais. Avaliação do cortisol nos dias dos desafios ACTH e chuva. Avaliação de insulina e triiodotironina (T3) no dia do desafio chuva. Avaliação do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) no dia do desafio casqueamento. Essas avaliações foram executadas nos períodos antes (8h), durante (12h) e após (16h) os tratamentos.

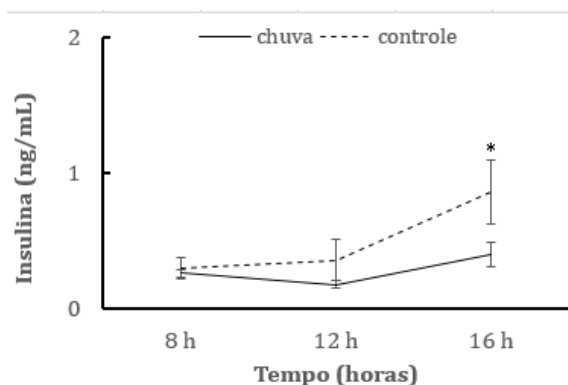
4A



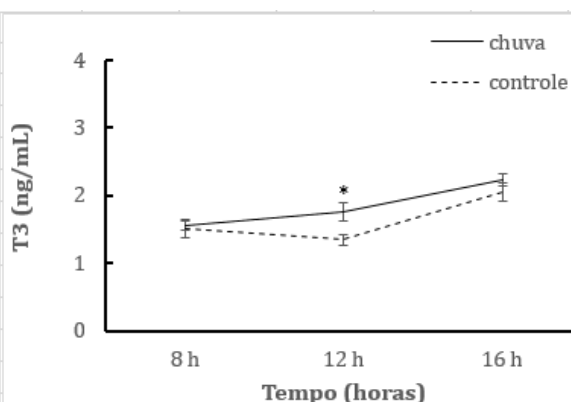
4B



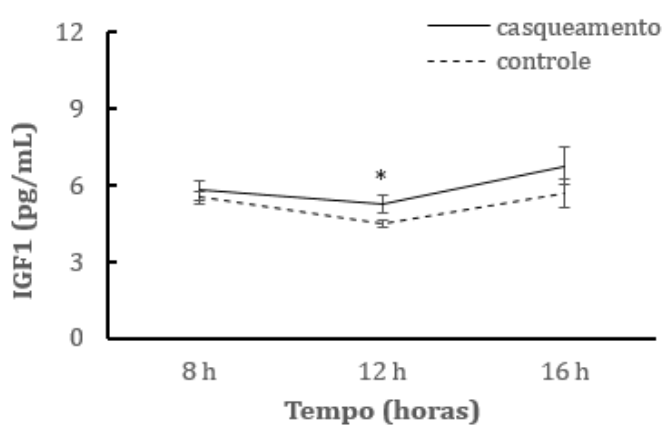
4C



4D



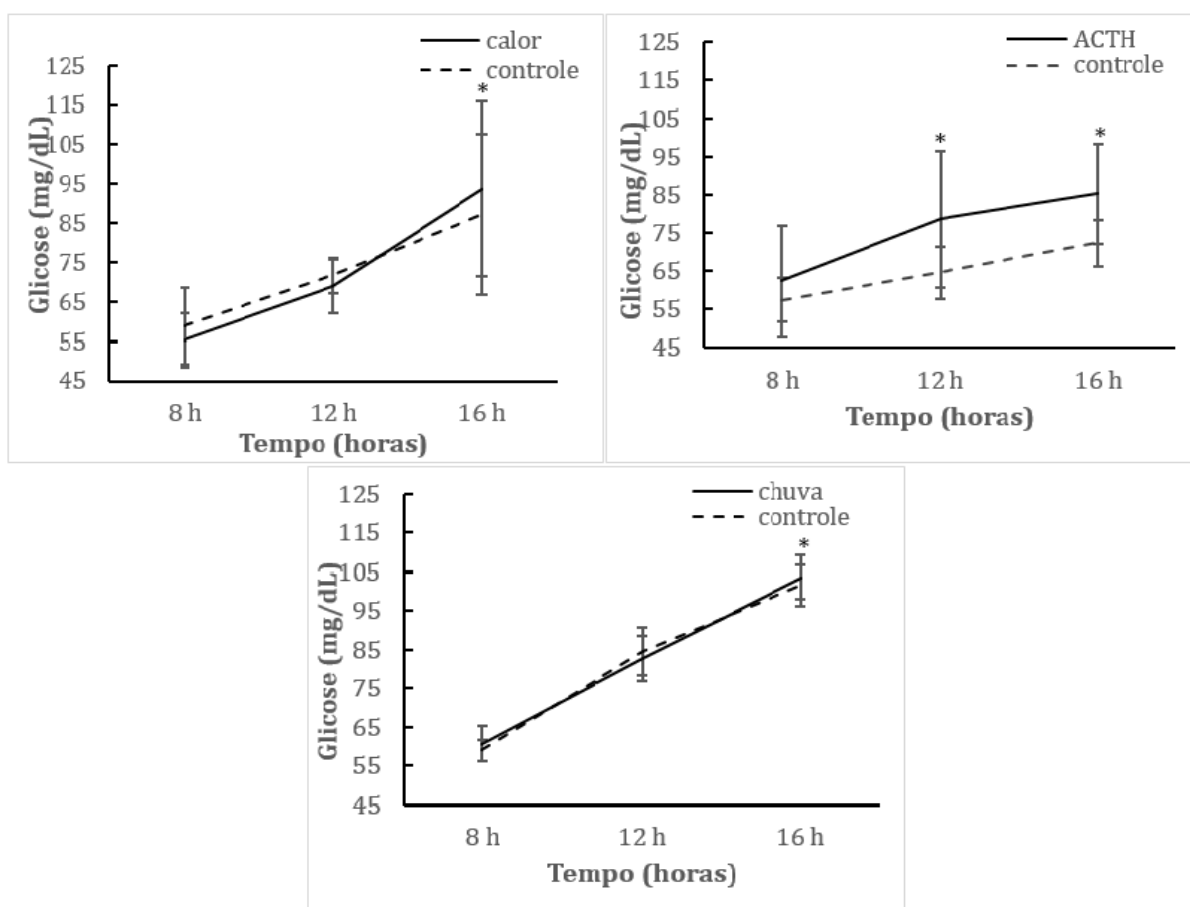
4E



*Os dados estão apresentados com média \pm erro padrão ($p \leq 0,05$)

A secreção de insulina foi reduzida durante os desafios estresse por calor e chuva (Figura 4C) em comparação com os animais controle, enquanto os desafios ACTH e casqueamento não alteraram significativamente a concentração de insulina (Tabela 1). Para T3, foi observado aumento significativo na liberação desse hormônio durante o desafio chuva (Figura 4D). Os diferentes desafios não influenciaram a liberação de IGF-1 nos animais experimentais (Tabela 1), exceto no desafio casqueamento às 16h00 (Figura 4E). Com relação a concentração de glicose em resposta aos desafios, a Tabela 1 mostra que houve efeito significativo da interação de tratamento-hora nas cabras desafiadas pelo calor, ACTH e chuva em comparação com o grupo controle. Os desafios estresse por calor, ACTH e chuva aumentaram significativamente a concentração de glicose às 16h00 (Figura 5).

Figura 5 – Média da concentração plasmática de glicose das cabras controle e desafio, nos dias calor, ACTH e chuva. Essas avaliações foram realizadas nos períodos antes (8h), durante (12h) e após (16h) os tratamentos.



* Os dados estão apresentados com média \pm erro padrão ($p \leq 0,05$)

mg/dL: miligramas por decilitro

Tabela 1 – Resumo das médias e desvio-padrão nas análises dos parâmetros fisiológicos, hormonais e dos metabólitos durante os dias experimentais nas cabras dos tratamentos desafio e controle.

Coletas	Tratamentos		T	Valor-P	
	calor (n = 15)	Control (n = 15)		H	T*H
TR (°C) ¹	38.88 ± 0.07	38.89 ± 0.06	0.68	0.01	0.01
FR (freq/min) ¹	76.62 ± 6.15	67.29 ± 6.53	0.08	0.01	0.01
FC (bat/min) ¹	103.73 ± 3.12	100.53 ± 3.44	0.25	0.11	0.23
Cortisol (ng/mL)	9.86 ± 2.09	7.56 ± 2.04	0.19	0.35	0.46
Insulina (ng/mL)	0.216 ± 0.06	0.787 ± 0.22	0.04	0.72	0.44
T3 (ng/mL) ¹	1.694 ± 0.13	1.704 ± 0.15	0.93	0.45	0.69
IGF-1 (pg/mL) ¹	9.62 ± 1.02	10.55 ± 0.70	0.19	0.91	0.86
Glicose (mg/mL)	72.67 ± 12.02	72.56 ± 11.50	0.96	0.01	0.01
Coletas	ACTH (n = 15)	Control (n = 15)	T	Valor-P	
				H	T*H
TR (°C) ¹	39.03 ± 0.10	38.92 ± 0.06	0.10	0.01	0.01
FR (freq/min) ¹	63.02 ± 4.50	66.84 ± 6.00	0.40	0.01	0.01
FC (bat/min) ¹	100.62 ± 2.57	103.29 ± 2.76	0.23	0.01	0.01
Cortisol (ng/mL)	27.54 ± 2.93	6.88 ± 1.41	0.00	0.01	0.01
Insulina (ng/mL)	0.464 ± 0.05	0.533 ± 0.13	0.44	0.17	0.25
T3 (ng/mL) ¹	1.489 ± 0.09	1.560 ± 0.14	0.48	0.82	0.47
IGF-1 (pg/mL) ¹	6.60 ± 0.41	6.49 ± 0.41	0.73	0.14	0.54
Glicose (mg/mL)	75.39 ± 15.20	64.75 ± 6.12	0.01	0.01	0.01
Coletas	casqueamento (n = 15)	Control (n = 15)	T	Valor-P	
				H	T*H
TR (°C) ¹	38.88 ± 0.09	38.82 ± 0.07	0.38	0.01	0.01
FR (freq/min) ¹	71.82 ± 5.47	68.18 ± 5.60	0.45	0.01	0.01
FC (bat/min) ¹	104.80 ± 2.51	102.66 ± 2.26	0.28	0.01	0.06
Cortisol (ng/mL)	7.12 ± 2.25	6.72 ± 1.19	0.80	0.01	0.12
Insulina (ng/mL)	0.463 ± 0.06	0.599 ± 0.16	0.27	0.36	0.14
T3 (ng/mL) ¹	1.608 ± 0.13	1.484 ± 0.16	0.29	0.04	0.19
IGF-1 (pg/mL) ¹	5.94 ± 0.48	5.23 ± 0.31	0.05	0.01	0.02
Glicose (mg/mL)	62.83 ± 1.61	66.70 ± 3.39	0.10	0.07	0.08
Coletas	chuva (n = 15)	Control (n = 15)	T	Valor-P	
				H	T*H
TR (°C) ¹	39.00 ± 0.06	38.9 ± 0.08	0.26	0.01	0.01
FR (freq/min) ¹	53.24 ± 5.83	59.29 ± 5.61	0.33	0.01	0.01
FC (bat/min) ¹	104.09 ± 3.07	100.18 ± 2.49	0.21	0.06	0.12
Cortisol (ng/mL)	7.41 ± 1.75	6.48 ± 1.00	0.50	0.01	0.01
Insulina (ng/mL)	0.285 ± 0.05	0.509 ± 0.15	0.03	0.01	0.01
T3 (ng/mL) ¹	1.848 ± 0.10	1.629 ± 0.11	0.02	0.01	0.01
IGF-1 (pg/mL) ¹	5.37 ± 0.84	4.52 ± 0.23	0.09	0.58	0.57
Glicose (mg/mL)	82.27 ± 5.27	81.60 ± 4.69	0.87	0.01	0.01

T- Tratamento; H – Hora; T*H – Interação de Tratamento e Hora

¹TR: temperatura retal; FR: frequência respiratória; FC: batimento cardíaco; T3: triiodotironina; IGF-1: fator de crescimento semelhante à insulina 1.

A Tabela 2 apresenta o efeito cumulativo dos diferentes desafios na produção e qualidade do leite. O efeito cumulativo dos diferentes desafios influenciou na CCS e na gordura do leite, mas não houve efeito nos resultados da análise microbiológica do leite.

Tabela 2 – Avaliação da média e desvio-padrão da produção de leite dos dias experimentais dos diferentes tratamentos. Avaliação do efeito dos tratamentos na gordura (%), proteína (%), lactose (%), contagem de células somáticas (CCS), contagem microbiológica do leite após realizar os diferentes tratamentos.

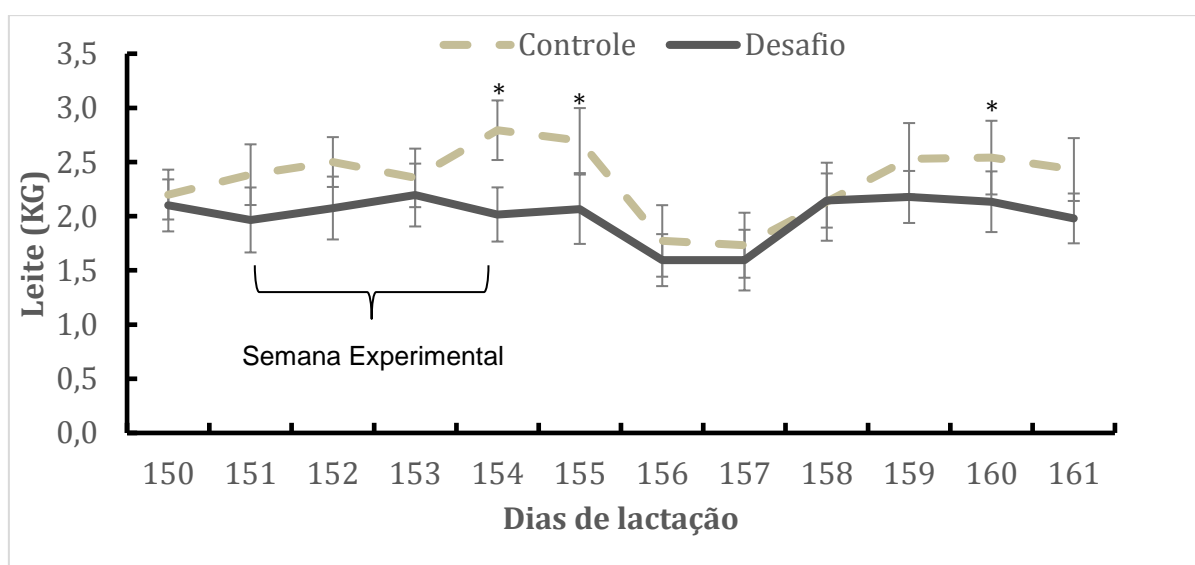
coletas	Desafio (n = 15)	Controle (n = 15)	Valor-P		
			T	D	T*D
Produção leite (kg)	1.99 ± 0.27	2.35 ± 0.29	0.003	0.480	0.550
Gordura (%)	3.79 ± 0.33	3.55 ± 0.34	0.452	0.001	0.011
Proteína (%)	2.94 ± 0.04	3.06 ± 0.13	0.296	0.801	0.522
Lactose (%)	4.37 ± 0.44	4.00 ± 0.04	0.365	0.287	0.339
CCS (cells/mL) ¹	2,209.43 ± 225.94	1,557.28 ± 140.7	0.000	0.001	0.000
Contagem Total de bactérias (CFU/mL) ²	5.01 ± 4.85	2.24 ± 1.19	0.333	0.511	0.888
Enterobacteriaceae (CFU/mL)	1.34 ± 0.30	1.22 ± 0.22	0.324	0.375	0.425
<i>Staphylococcus</i> sp. (CFU/mL)	573.41 ± 150.52	234.50 ± 54.71	0.328	0.402	0.586

¹ Valores × 10³/mL; ² CFU: unidades formadoras de colônias, valores × 10²/mL.

T- Tratamento; D- Dia; T*D- interação de Tratamento e Dia.

Conforme demonstrado na Figura 6, os quatro desafios não exerceram nenhum efeito significativo na produção ou na qualidade do leite. No entanto, uma diminuição significativa da produção de leite foi observada após a exposição aos diferentes estressores experimentais em comparação aos animais controle, que persistiu na semana pós desafios.

Figura 6 – Média e desvio-padrão da produção de leite (Kg) das cabras submetidas aos diferentes tratamentos durante a semana experimental e pós experimental.



* Os dados estão apresentados com média ± erro padrão (p<0,05)

2.4 DISCUSSÃO

As cabras submetidas aos desafios calor e casqueamento mostraram um aumento na FR como respostas características para manutenção do equilíbrio térmico. Durante esses dois desafios, a FR aumentou significativamente (>80 respirações/min), acima da faixa fisiológica (12 a 25 respirações/min). A temperatura do ar variou de 30.8°C a 34.2°C durante esses desafios, que ultrapassam a zona de termoneutralidade para esta espécie (SANTOS et al., 2014). Outros estudos com animais leiteiros demonstraram que os mecanismos regulatórios evaporativos, como o aumento de FR são eficientes para reduzir a temperatura interna (BERNABUCCI et al., 2009; SANTOS et al., 2014; VIEIRA et al., 2016).

A utilização da FR como mecanismo termorregulatório ocorre naturalmente de acordo com as modificações climáticas ao longo do dia (RIBEIRO et al., 2008), fato ocorrido nas cabras controle que não passaram pelos diferentes desafios e mesmo assim a FR destas cabras oscilou durante o dia. Já nas cabras desafiadas pelos diferentes estressores em dias consecutivos, a FR dessas cabras durante esses desafios, foi significativamente mais requerida como mecanismo termorregulatório diante das adversidades climáticas causadas pelo estressores ambientais (calor e chuva), como também foi mais utilizado nos estressores de manejo, desafios ACTH e casqueamento, pois esses estressores desencadearam respostas específicas frente a esses estressores de manejo para que as cabras pudessem retornar a homeostase, e esse mecanismo de resposta aumenta o metabolismo geral dessas cabras e ocasiona modificações na temperatura interna. Cada estressor mobilizou alterações na FR, aumentando ou diminuindo dependendo do desafio, como resposta fisiológica de termorregulação.

Durantes os desafios calor e casqueamento o aumento da FR é utilizado como mecanismo de perda de calor por evaporação de água por respiração, mas esse mecanismo não foi capaz de dissipar o calor excedente, de forma que TR dos animais submetidos ao estresse por calor e casqueamento (39,1 e 38,9 °C, respectivamente) foi significativamente maior do que os animais controle durante o mesmo período do dia (FURTADO et al., 2008). Em contraste, as cabras submetidas aos desafios ACTH e à chuva também utilizaram a FR como resposta fisiológica para manter o equilíbrio térmico, esses desafios reduziram significativamente a FR das cabras em comparação ao grupo controle, principalmente o desafio chuva, já que a exposição direta a água

reduz a temperatura externa e interna do animal, e a redução da FR fez com que diminuísse a troca de calor com o meio e não ocasionasse uma maior queda na temperatura interna. Porém, não foi observada diferença significativa na TR das cabras submetidas ao ACTH e chuva e os animais controle, demonstrando que a redução da FR foi eficaz na manutenção da temperatura interna dos animais desafiados. Resultados semelhantes foram descritos por outros estudos com cabras Saanen durante os períodos chuvosos (SANTOS et al., 2014).

Segundo Bianca e Kunz (1978), a TR e a FR são considerados as melhores variáveis fisiológicas para estimar condições de estresse ambiental em comparação a FC. No presente estudo, as cabras que receberam ACTH apresentaram FC maior do que os animais controle. Outros estudos também relataram uma associação entre altas concentrações de cortisol e aumento da FC (GUPTA et al., 2018; GÓMEZ et al., 2018).

Ao analisar os efeitos dos diferentes desafios estressores sob a liberação hormonal nas cabras, foi observado nesse estudo que a administração de ACTH foi o desafio de maior impacto na liberação de cortisol, como também houve aumento na concentração plasmática de cortisol sob o efeito do desafio chuva. Isso indica que esses desafios foram os mais potentes como estressor em comparação aos outros desafios utilizados para desencadear o estresse nas cabras. Na rotina de criação de cabras, o desafio estressor ACTH pode ser substituído por outros estressores de manejo como vacinação, vermifugação e primeira ordenha, outros estudos demonstraram que a liberação de cortisol desses estressores é similar ao efeito da administração de ACTH (VERKERK et al., 1994; NEGRÃO; MARNET, 2003; BOMFIM et al., 2018). O aumento da liberação de cortisol nos animais desempenha um papel vital na resposta ao estresse agudo, pois este hormônio está relacionado a hiperglicemia e o redirecionamento energético para processos fisiológicos e comportamentais para ajudar a sobrevivência imediata (HOUGH et al., 2015).

Ainda observando os efeitos do estresse sobre a taxa hormonal, foi observado aumento significativo das concentrações T3 nos animais desafiados durante a exposição da chuva artificial. Isso significa que durante este estressor as cabras promoveram um na liberação de T3 para aumentar o metabolismo basal e conseqüentemente a termogênese, já que o efeito da chuva reduziu a sua temperatura interna, o que contribuiu para a manutenção da TR dos animais submetidos ao desafio chuva. Outros estudos também demonstraram que existe uma interação entre cortisol

e T3 para promover hiperglicemia e aumento termogênico (AL-SAMAWI et al., 2014; BOMFIM et al., 2018; CANAES et al., 2009; CAROPRESE et al., 2010; ROMERO et al., 2015).

Ao contrário das expectativas (OLLIER et al., 2016; PONCHON, 2017), o IGF-1 não alterou significativamente durante os desafios, apenas no desafio casqueamento sendo este estressor o que menos requereu respostas mais potentes. No entanto, as cabras submetidas aos diferentes desafios apresentaram níveis de insulina mais baixos do que os animais controle, e os desafios estresse por calor e chuva reduziram significativamente desse hormônio. O aumento da secreção de cortisol durante o estresse influencia negativamente a liberação e ação da insulina, já que a insulina está relacionada com o anabolismo, fator este que não é considerado diante de um estado de estresse, mas sim a utilização de reservas energéticas para promover a metabolização de glicogênio hepático, proteínas e gordura necessárias para restauração da homeostase (CHEN, et al., 2015; MORMÈDE et al., 2007; TREVISI; BERTONI, 2009). Assim, foi possível concluir que o desafio chuva teve maior impacto sobre os hormônios estudados. Nesse contexto, nossos resultados demonstram que os desafios promoveram alterações hormonais e glicêmicas necessárias para a manutenção da homeostase.

A duração dos estressores impostos aos animais é geralmente usada para classificar o estresse em agudo ou crônico. O estresse agudo é estabelecido no caso de uma curta duração do estressor, variando de alguns minutos a horas, que é imediatamente seguido por um retorno da concentração de cortisol ao nível basal e a restauração da homeostase (CHEN et al., 2015; MORMÈDE et al., 2007; TREVISI; BERTONI, 2009). No presente estudo, os estressores impostos promoveram a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e a rápida liberação de cortisol, resposta hormonal que caracteriza o estresse agudo. Além disso, os diferentes estressores também mobilizaram respostas fisiológicas adaptativas que conjuntamente as respostas hormonais restabeleceram a homeostasia das cabras durante o estresse.

Os estressores utilizados foram considerados individualmente de pouca potência, pois não houve queda na produção de leite das cabras desafiadas durante a semana experimental. Mas o efeito cumulado desses estressores, ocasionaram um estresse cumulativo que resultou em declínio prolongado na produção de leite das cabras em dias esporádicos, sendo no último dia de desafio (dia de lactação 154), e em dias pós experimental (dia de lactação 155 e 160), bem como o linear de produção

das cabras desafiadas permanece abaixo durante a semana experimental e pós experimental em comparação as cabras não desafiadas. Outros estudos descreveram um efeito persistente de outros estressores na produção de leite de cabras (CANAES et al., 2009; HOOPER et al. 2020). Assim, nossos resultados destacam a necessidade de evitar manejos estressantes em dias de condições climáticas desfavoráveis, como dias muito quentes, chuvoso ou frios.

Em relação a qualidade do leite, houve efeito significativo do estresse cumulativo sobre a CCS do leite das cabras submetidas aos desafios experimentais, que apresentaram CCS maior do que os animais controle. O cortisol é um imunossupressor, portanto o aumento da CCS observado no presente estudo não pode ser explicado pelo aumento das células de defesa no leite. Além disso, os estressores não alteraram a taxa de mastite das cabras experimentais, nem aumentaram significativamente o número de estafilococos nem a contagem total bacteriana no leite. De fato, outros estudos associaram o aumento do cortisol e da CCS com um aumento da taxa de apoptose do tecido mamário e consequentemente ao aumento do número das células epiteliais mamárias presente no leite de animais estressados (CANAES et al., 2009; CAROPRESE et al., 2010; ROMERO et al., 2015).

2.5 CONCLUSÃO

Cabras submetidas a diferentes estressores foram capazes de restaurar a homeostase. No entanto, os desafios ambientais e de manejo diminuíram a produção de leite das cabras Saanen. Assim, os resultados demonstraram um efeito cumulativo desses estressores agudos.

REFERÊNCIAS

- ALAM, M. G. S.; DOBSON, H.; FITZPATRICK, R. J. **Endocrine response to different doses of ACTH in cows.** British Veterinary Journal, v. 142, n. 3, p. 239-245. 1986.
- AL-SAMAWI, K. A.; AL-HASSAN, M. J.; SWELUM, A. A. **Thermoregulation of female Aardi goats exposed to environmental heat stress in Saudi Arabia.** Indian Journal of Animal Research, v. 48, n. 4, p. 344-349, 2014.
- APHA: **Standard Methods for the Examination of Dairy Products.** Editores H. Michael Wehr, e Joseph F. Frank. 17th ed. Washington: American Public Health Association. 2004.
- BAUMGARD, L. H.; COLLIER, R. J.; BAUMAN, D. E. **A 100-Year Review: regulation of nutrient partitioning to support lactation.** Journal Dairy Science, v. 100, n. 12, p. 10353–10366, 2017.
- BERNABUCCI, U. et al. **Metabolic and hormonal acclimation to heat stress in domesticated ruminants.** Animal, v. 4, n. 7, p. 1167–1183, 2009.
- BIANCA, W.; KUNZ, P. **Physiological reactions of three breeds of goats to cold, heat and high altitude.** Livestock Production Science, v. 5, n. 1, p. 57-69, 1978.
- BOMFIM, G. F. et al. **Effect of acute stressors, adrenocorticotrophic hormone administration cortisol release on milk yield, the expression of key genes, proliferation and apoptosis in goat mammary epithelial cells.** Journal of Dairy Science, v. 101, n. 7, p. 6486-6496, 2018.
- BUFFINGTON, C. S. et al. **Black globe humidity comfort index for dairy cows.** St. Joseph: ASAE, 1977. 19 p.
- CANAES, T. S. et al. **Influência do transporte e mudanças de local de manejo nas variáveis fisiológicas e produtivas de cabras Alpinas.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 61, n. 4, p. 2009.
- CAROPRESE, M. et al. **Relationship between cortisol response to stress and behavior, immune prolife, and production performance of dairy ewes.** Journal of Dairy Science, v. 93, n. 6, p. 2395-2403, 2010.
- CHEN, Y. et al. **Models and Methods to investigate acute stress response in cattle.** Animals, v. 5, n. 4, p. 1268-1295, 2015.
- CONTRERAS-JODAR, A. et al. **Heat stress modifies the lactational performances and the urinary metabolomic profile related to gastrointestinal microbiota of dairy goats.** Plos One, v. 14, n. 2, e0202457, 2019.
- FONSECA, W. J. L. et al. **Effect of heat stress on milk production of goats from Alpine and Saanen breeds in Brazil.** Archivos de Zootecnia, v. 65, n. 252, p. 615-621, 2016.

FULKERSON, W. J.; JAMIESON, P. A. **Pattern of cortisol release in sheep following administration of synthetic acth or imposition of various stressor agents.** Australian Journal of Biological Sciences, v. 35, n. 2, p. 215-222, 1982.

FURTADO, D. A., et al. **Effects of termal environment and supplementation levels on the physiological parameters of moxotó goats in confined and semi-confined rising systems.** Engenharia Agrícola, v. 28, n. 3, p. 396-405, 2008.

GÓMEZ, Y., et al. **Evaluation of visible eye white and maximum eye temperature as non-invasive indicators of stress in dairy cows.** Applied Animal Behavior Science, v. 198, p.1-8, 2018.

GUPTA, D., et al. **Physiological response to transportation stress at different flocking densities in hot humid and winter seasons in goats and assessment of pretreatment of Vitamin C, Electrolyte and Jaggery.** Indian Journal of Animal Research, v. 53, n. 3, p. 299-306, 2018.

HAJDENWURCEL, J. R. **Atlas de microbiologia de alimentos.** São Paulo, SP: Fonte Comunicações e Editora. 1998.

HAMZAQUI, S., et al. **Physiological responses and lactational performances of late-lactation dairy goats under heat stress conditions.** Journal of Dairy Science, v. 96, n. 10, p. 6355-6365, 2013.

HERTEM, T. V., et al. **The effect of routine hoof trimming on locomotion score, ruminating time, activity, and milk yield of dairy cows.** Journal of Dairy Science, v. 97, n. 8, p. 4852-4863, 2014.

HOOPER, H. B., et al. **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, n. 2, p. 1982–1992, 2020.

HOUGH, D. et al. **Relative contribution of P450c17 towards the acute cortisol response: Lessons from sheep and goats.** Molecular and Cellular Endocrinology, v. 408, p. 107-113, 2015.

HULBERT, L. E.; MOISÁ, S. J. **Stress, immunity and the management of calves.** Journal Dairy Science, v. 99, n. 4, p. 3199-3216, 2016.

KRUGER, L. P. et al. **The effect of environmental factors and husbandry practices on stress in goats.** Small Ruminant Research, v. 141, p. 1-4, 2016.

MEHDID, A. et al. **Effect of stress on somatic cell count and milk yield and composition in goats.** Research in Veterinary Science, v. 125, p. 61-70, 2019.

MOBERG, G. P. **The Biology Animal Stress. In Biological Response to Stress: Implications for Animal Welfare.** p. 1-21, California, USA, 2000.

MORMÈDE, P. et al. **Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare.** *Physiology and Behavior*, v. 92, n. 3, p. 317-39, 2007.

NEGRÃO, J. A.; MARNET, P. G. **Cortisol, adrenalin, noradrenalin and oxytocin release and milk yield during first milkings in primiparous ewes.** *Small Ruminant Research*, v. 47, n. 1, p. 69-75, 2003.

OLLIER, S., et al. **Effect of reducing milk production using a prolactin-release inhibitor or a glucocorticoid on metabolism and immune functions in cows subjected to acute nutritional stress.** *Journal of Dairy Science*, v. 99, n. 12, p. 9949-9961, 2016.

PATT, A. et al. **Factors influencing the welfare of goats in small established groups during the separation and reintegration of individuals.** *Applied Animal Behavior Science*, v. 144, n. 1-2, p. 63-72, 2013.

POLYCARP, T. N.; OBUKOWHO, E. B.; YUSOFF, S. M. **Changes in haematological parameters and oxidative stress response of goats subjected to road transport stress in a hot humid tropical environment.** *Comparative Clinical Pathology*, v. 25, p. 285-293, 2016.

PONCHON, B. et al. **Relationship between glucocorticoids and prolactin during mammary gland stimulation in dairy cows.** *Journal Dairy Science*, v. 100, n. 2, p. 1521-1534, 2017.

RAYNAL-LJUTOVAC, K. et al. **Somatic cells of goat and sheep milk: Analytical, sanitary, productive and technological aspects.** *Small Ruminant Research*, v. 68, n. 1-2, p. 126-144, 2007.

RIBEIRO, M. N. et al. **Physiological and biochemical blood variables of goats subjected to heat stress – a review.** *Journal of Applied Animal Research*, v. 46, n. 1, p. 1036-1041, 2018.

RIBEIRO, N. L. et al. **Avaliação dos índices de conforto térmico, parâmetros fisiológicos e gradiente térmico de ovinos nativos.** *Engenharia Agrícola*, v. 28, n. 4, 2008.

ROMERO, G. et al. **Within-day and effect of acute stress on plasma and milk cortisol in lactating goats.** *Journal Dairy Science*, v. 98, n. 2, p. 832-839, 2015.

SANTOS, F. S. M., et al. **Adaptabilidade de caprinos Sannen e Marota mantidos em clima tropical semiúmido.** *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v. 15, n. 4, 2014.

STACHOWICZ, J. et al. **Under temperate weather conditions, dairy goats use an outdoor run more with increasing warmth and avoid light wind or rain.** *Journal of Dairy Science*, v. 102, n. 2, p. 1508-1521, 2019.

TREVISI, E.; BERTONI, G. **Some physiological and biochemical methods for acute and chronic stress evaluation in dairy cows**. Italian Journal of Animal Science, v. 8, p. 265-286, 2009.

TRONCO, V. M. **Manual para Inspeção da Qualidade do leite**. 4. Ed. – Santa Maria, Curitiba, PR: ed. UFSM. 2010.

VERKERK, G. A.; MACMILLAN, K. L.; MCLEAY, L. M. **Adrenal cortex response to adrenocorticotrophic hormone in dairy cattle**. Domestic Animal Endocrinology, v. 11, n. 1, p. 115-123, 1994.

VIEIRA, M. M. M., et al. **Aspectos fisiológicos e bioclimáticos de caprinos nas regiões semiáridas**. Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 10, n. 5, p. 356-369, 2016.

3. EFEITO DO ESTRESSE CUMULATIVO NA LACTAÇÃO SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA, ESTRESSE OXIDATIVO NA GLÂNDULA MAMÁRIA E PRODUÇÃO DE CABRAS SAANEN

RESUMO

Este estudo analisou os efeitos do estresse agudo cumulativo causado por diferentes estressores (estresse por calor, administração de hormônio adrenocorticotrófico, cuidado do casco e exposição à chuva) na produção de leite e sua influência na expressão gênica de células epiteliais mamárias em cabras Saanen em período lactacional. No presente estudo, 30 cabras foram submetidas a desafios ambientais e (exposição ao sol e chuva) de manejo (ACTH e cuidado do casco) aplicados sequencialmente, que diminuíram a produção de leite de cabras Saanen, demonstrando um efeito cumulativo dos estressores agudos. Na verdade, houve efeitos significativos ($P \leq 0,05$) dos estressores sobre a glicose, cortisol, ureia, triglicerídeos, colesterol, lipoproteína de alta densidade (HDL) e lipoproteína de baixa densidade (LDL) para restaurar a homeostase. Os estressores também aumentaram a expressão gênica do receptor de glicocorticoide (GR), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e interferon (IFN- γ) no tecido mamário de cabras Saanen. Por essas razões, os estressores resultaram em um aumento da contagem de células somáticas (CCS) no leite e uma diminuição na produção de leite de 25,4% em comparação às cabras controle. Por fim, novos estudos devem ser realizados para entender o efeito dos estressores cumulativos na expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo e apoptose das células epiteliais.

Palavras-chave: cabras, estresse, estresse oxidativo, glândula mamária, lactação, produção de leite

EFFECT OF CUMULATIVE STRESS IN LACTATION ON GENE EXPRESSION, OXIDATIVE STRESS ON GLAND MAMMARY AND SAANEN GOATS PRODUCTION

ABSTRACT

This study analyzed the effects of cumulative acute stress caused by different stressors (heat stress, adrenocorticotrophic hormone administration, hoof care and exposure to rain) on milk yield and its influence on gene expression of mammary epithelial cells in Saanen goats in lactation period. In the present study, 30 goats subjected to environmental and management challenges (heat stress, ACTH, hoof care, and rain) decreased the milk yield of Saanen goats, demonstrating a cumulative effect of the acute stressors. In fact, there were significant effects ($P \leq 0,05$) of the stressors on glucose, urea, triglycerides, cholesterol, high-density lipoprotein and low-density lipoprotein to restore homeostasis. The stressors also significantly increased the expression of glucocorticoids (GR), catalase (CAT), superoxide *dismutase* (SOD) and interferon (IFN- γ) genes in the mammary tissue of Saanen goats. For these reasons, the stressors resulted in an increase of somatic cell count (SCC) in milk and a decrease of milk yield by 25% in comparison to the control goats. Finally, further studies must be performed to understand the effect of cumulative stressors on the expression of genes related to oxidative stress and apoptosis of the epithelial cells.

Key words: goats, stress, lactation, mammary gland, milk production, oxidative stress

3.1 INTRODUÇÃO

Animais lactantes de alta produção são mais susceptíveis a condições de estresse, até mesmo as cabras que são consideradas animais resistentes (SLIMEN et al., 2015). Dentre os diferentes estressores o estresse térmico é aquele que causa maior queda na produção de leite (HAMZAOUI et al., 2013; TAO et al., 2018), porém outros estressores como manejo relacionado a sanidade dos animais, por exemplo, vacinação, casqueamento, aplicação de medicações, inseminação; bem como, o transporte de animais, isolamento social e até mesmo a permanência sob chuva pode causar estresse agudo em cabras (GUPTA et al., 2020; HERTEM et al., 2014; KANNAN et al., 2020; KRUGER et al., 2016; POLYCARP; OBUKOWHO; YOUSOFF, 2016; VASCONCELOS et al., 2020). A combinação desses estressores pode ocorrer na caprinocultura (KRUGER et al., 2016) gerando estresse cumulativo.

Embora, as alterações metabólicas, hormonais e comportamentais permitam que cabras leiteiras restabeleçam sua homeostasia ao condicionamento ambiental (ALMEIDA et al., 2019). O tempo de exposição e o tipo de estressor influenciam as respostas fisiológicas, determinando o quanto será necessário mobilizar seus recursos fisiológicos e reservas energéticas para minimizar seus impactos no seu organismo como um todo (COLLIER; RENQUIST; XIAO, 2017). Deste modo, para avaliar os diferentes tipos de estresse utiliza-se diferentes marcadores biológicos, dentre eles o nível plasmático de cortisol vem sendo utilizado como marcador universal do estresse. Além deste, a mensuração dos parâmetros metabólicos e imunológicos podem indicar pistas de como as cabras tentam adaptar-se as diferentes condições adversas (MAGISTRELLI et al., 2012; SEJIAN; MAURYA; NAQVI, 2010). Em animais de lactação, a mobilização dessas respostas ocorre em detrimento do suprimento temporário dos precursores da síntese de leite, permitindo que os animais utilizem esses recursos biológicos para regulação da homeostase (MOHANKUMAR, et al., 2012).

Ao mesmo tempo, o aumento do metabolismo geral do animal ocasionado pelo estresse pode resultar em um aumento do estresse oxidativo no organismo do animal, bem como na glândula mamária. O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre pró e antioxidantes em favor do primeiro (pró-oxidante), assim o estresse oxidativo é caracterizado quando ocorre aumento das espécies reativas de oxigênio (EROS), consideradas potentes oxidantes com capacidade de danificar as

células, resultando em estímulos apoptogênicos através da via intrínseca (BERNABUCCI et al., 2002; SIES, 1991). Na glândula mamária o aumento do estresse oxidativo tem potencial para diminuir as células epiteliais mamárias, resultando na diminuição da produção de leite (HOU, et al., 2003; SLIMEN et al., 2015; WANG et al., 2019). Deste modo, tanto as alterações fisiológicas quanto metabólicas causadas pelos diferentes estressores ambientais podem aumentar o estresse oxidativo na glândula mamária sendo responsável pela queda acentuada da produção de leite de cabras.

No entanto, a maior parte dos estudos relacionados ao estresse em animais de produção ocorrem pela exposição a um único tipo de estressor, ativando levemente o eixo do estresse e cria uma memória relacionada aquele evento estressor, o que facilita uma resposta mais rápida e mais forte, assim a produção logo é recuperada quando estressor é removido (MILLER; NISTICO, 1989; MOHANKUMAR et al., 2012), o que não condiz com os diferentes estressores naturais e que pode facilitar o retorno a homeostasia pelo animal frente aquela adversidade. Porém, quando expostos a mais de um estressor simultaneamente, o efeito combinado desses estressores podem causar redução na produção (MAURYA et al., 2015), já que cada estressor pode ativar diferentes níveis de respostas para estressores específicos (MOHANKUMAR et al., 2012).

Contudo, poucos estudos têm correlacionado o efeito combinado de diferentes estressores, sobre as respostas fisiológicas e metabólicas e estresse oxidativo na glândula mamária. Deste modo, a hipótese deste estudo é que o estresse cumulativo nas cabras causará perdas produtivas, relacionadas ao estresse oxidativo na glândula mamária. Portanto, este estudo foi executado para identificar os efeitos causados pelo estresse cumulativo de diferentes estressores ambientais (sol e chuva) correlacionados com estressores de manejo (casqueamento e ACTH) na produção de leite de cabras Saanen.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos com os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal (protocolo 9546150719) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos que é regida pela legislação brasileira. O experimento e todas as análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Fisiologia (FZEA) da Universidade de

São Paulo, localizado na cidade de Pirassununga/SP, Brasil (em 21 ° 57'02 '' S, 47 ° 27'50 '' W). A realização experimental ocorreu entre 10 à 14 de dezembro de 2018 e 11 à 14 de fevereiro de 2019, período caracterizado como quente e chuvoso. Essa região é classificada como úmido subtropical com precipitações médias anuais de 1.300 a 2.000 mm de novembro a março.

3.2.1 Habitação e rotina de manejo

As cabras foram criadas em sistema semi-extensivo, permanecendo no período noturno em baias coletivas e no período diurno mantidas em piquetes de *Cynodon spp* (tifton) que dispõe de sombra, cocho de alimentação e água. A alimentação foi fornecida duas vezes ao dia com livre acesso a dieta total que contém: silagem de milho e concentrado na proporção de matéria seca 50% de silagem e 50% de concentrado para fornecer suas necessidades nutricionais (NRC 2007).

A rotina de ordenha ocorreu no período da manhã seguindo esta ordem: as cabras seguiram calmamente até a sala de ordenha, realizou-se o pré-dipping (iodo 0,5%), teste da caneca de fundo preto e em seguida o acoplamento da ordenhadeira reguladas com o nível de vácuo de 48 KPa e taxa de pulsação de 120 ciclos por/min. Ao final da ordenha de cada animal foi registrado sua produção de leite mensurada por copos coletores individuais do tipo proveta, em seguida ocorreu o desacoplamento da ordenhadeira e pós-dipping (iodo 0,5%). Assim, a produção de leite individual de leite foi mensurada diariamente durante toda a lactação.

3.2.2 Organização experimental

Neste estudo foram utilizadas 30 cabras da raça Saanen em período lactacional de 150 ± 30 dias em dezembro e 205 ± 30 dias em fevereiro, primíparas e multíparas, saudáveis (peso vivo $63,3 \pm 11,4$ kg, escore corporal $3,0 \pm 0,63$). Os 30 animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos homogêneos em relação a produção de leite de cada animal: o grupo controle (CT; n = 15) e o grupo estresse (ES; n = 15). Para a expressão gênica, foram sorteadas 14 cabras, para obter 7 animais homogêneos em produção de cada grupo experimental (CT; n = 7, ES; n = 7).

3.2.2.1 Semana experimental

Durante a semana experimental as 15 cabras do grupo ES passaram por 4 estressores considerados relacionados ao manejo e ambiental aplicados sequencialmente (1 estressor por dia), enquanto as 15 cabras do grupo CT mantiveram sua rotina habitual, após ordenha permaneceram nos piquetes com disposição de comida, sombra e água, não passando pelos eventos estressores.

Durante os 4 dias de eventos estressores a rotina e coleta de dados foram organizados desta forma: Às 8h00 após a finalização da ordenha das 30 cabras foram conduzidas para sala de espera da ordenha onde ocorreu a mensuração de parâmetros fisiológicos, frequência respiratória (FR), batimentos cardíacos (FC) e temperatura retal (RT), e coleta de sangue dos dois grupos (CT e ES). Às 10h00 iniciou-se o estressor para as 15 cabras do grupo ES, sendo os estressores diários respectivamente: exposição ao sol, aplicação de ACTH, manejo de casqueamento e exposição à chuva. Portanto, enquanto o grupo ES permaneceu por 5 horas (10h00 às 15h00) em locais estratégicos para realização dos tratamentos (estressores), as 15 cabras do grupo CT ficaram mantidas em condições de conforto ambiental habitual sem passar pelos efeitos estressores estudados.

Às 12h00 foi realizada mensuração dos parâmetros fisiológicos e a segunda coleta de sangue nos dois grupos (CT e ES), nesse período tanto as cabras em situação de estresse quanto as cabras não estressadas permaneceram em seus respectivos ambientes/tratamentos. Passadas às 5 horas de estressores do grupo ES, todas as cabras (CT e ES) foram conduzidas para suas respectivas baias às 15h00, permanecendo em suas rotinas habituais com disposição de sombra, comida e água *ad libitum*. Às 16h00 foi realizada a última mensuração dos parâmetros fisiológicos e coleta de sangue nas baias habituais dos dois grupos. Assim as coletas de dados e amostras de sangue de todas as cabras foram obtidas antes (08h00), durante (12h00) e após (16h00) os tratamentos (estresse e controle) conforme apresentado no Quadro 1.

Quadro 1 – Esquema geral das colheitas



As amostras de sangue foram coletadas por punção da veia jugular e armazenadas em caixa térmica contendo gelo, em seguida foram centrifugadas a 3000 RPM a 4°C durante 17 minutos para obtenção do plasma para posteriores análises experimentais ficando acondicionado em tubos e estocado a -20 °C.

A temperatura e umidade relativa do ar dos ambientes em que permaneceram as cabras ES foram registradas todos os dias pelo equipamento Data Logger (HOBO U12-001) com precisão de 0,21 Graus Celsius, com intervalo de registro dos dados de 10 minutos.

Neste estudo, as cabras foram submetidas aos desafios estressores em duas ocasiões, em dezembro de 2018 e em fevereiro de 2019, a diferença é que em fevereiro os grupos experimentais foram invertidos no intuito de avaliar os efeitos dos diferentes estressores em todas as cabras. A temperatura e umidade relativa do ar média em dezembro durante os desafios 1 (10/12/2018), 2 (11/12/2018), 3 (12/12/2018) e 4 (13/12/2018), no período das 10h00 às 15h00, foram respectivamente de 30.5°C e 44%, 31.9°C e 46%, 33.3°C e 45%, 30.7°C e 59%. A temperatura e umidade relativa do ar média em fevereiro durante os desafios 1 (11/02/2019), 2 (12/02/2019), 3 (13/02/2019) e 4 (14/02/2019) média das 10 às 15h foram respectivamente 33.2°C e 55%, 26.0°C e 58%, 26.6°C e 62%, 29.2°C e 63%.

Os efeitos do estresse cumulativo sobre a temperatura retal, as frequências cardíaca e respiratória foram previamente descritas e discutidas por Vasconcelos et al. (2020).

3.2.2.2 *Tratamentos experimentais*

Em dezembro de 2018 e fevereiro de 2019 as 15 cabras ES passaram por diferentes tratamentos considerados estressores (exposição ao Sol, aplicação de

ACTH, manejo de casqueamento e exposição à chuva). Simultaneamente, as cabras do grupo controle foram mantidas em sua rotina normal em condições de conforto e bem-estar.

No primeiro dia as cabras ES ficaram expostas ao sol, permanecendo por 5 horas (entre 10h00 e 15h00) em um piquete de tifton, sem sombra e água. Enquanto as cabras CT permaneceram em outro piquete contendo tifton, sombra e água. As variáveis climatológicas durante o período de estresse por calor em dezembro registraram a média da temperatura e umidade relativa do ar de 26,2°C e 60% às 10h00, 30,8°C e 48% às 12h00, e 34,2°C e 42% às 16h00. Com essas informações determinou o índice de temperatura de globo negro e umidade (ITGU), sendo este de 75.2, 80.1 e 84.0 respectivamente. O cálculo do ITGU foi o mesmo citado por BUFFINGTON et al. (1977).

$$ITGU = T_{gn} + 0,36 T_d - 330,08$$

T_{gn} – temperatura do globo negro

T_d – temperatura do ponto de orvalho.

Em fevereiro, a média da temperatura e umidade relativa do ar foi de 30,9°C e 60% às 10h00, 33,0°C e 55% às 12h00 e às 35,7°C e 49% 15h00, o índice de temperatura de globo negro e umidade (ITGU) foi de 81.6, 84.0 e 86.9 respectivamente.

O segundo estressor aplicado no dia 2 às 10h00, foi a administração do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) nas cabras do grupo ES, sendo este um estressor fisiológico padrão 0,6 mg de ACTH Kg/PV por via intravenosa (ALAM; DOBSON; FITZPATRICK, 1986; BOMFIM et al., 2018; FULKERSON; JAMIESON, 1982; VERKERK; MACMILLAN; MCLEAY, 1994). Concomitante, as cabras CT receberam placebo também por via intravenosa, para relacionar o efeito da aplicação na liberação hormonal neste grupo, e assim retirar o efeito da aplicação nas cabras ES e obter apenas o efeito do estressor ACTH. Esses procedimentos foram realizados na sala de espera da ordenha, após a administração de ACTH e placebo nos respectivos grupos, todas as cabras foram conduzidas para o piquete de tifton que dispõe de sombra e água, ao qual estavam habituadas.

Já no terceiro dia as cabras ES passaram pelo estresse de manejo de casqueamento, enquanto as cabras CT permaneceram no piquete que dispõe de pastagem, sombra e água. O estressor manejo de casqueamento compreendeu a um casqueamento de rotina utilizado para manter a saúde dos cascos, em que esse

casqueamento é realizado de forma rápida, e ocorreu da seguinte forma: as cabras ES foram conduzidas até o corredor de acesso ao tronco de contenção para caprinos, e em seguida um animal por vez foi contido no tronco e passou pelo procedimento de retirada de matéria orgânica e aparado do excesso de casco, procedimentos realizados com rineta e tesoura para corte de cascos, esse procedimento foi realizado de maneira rápida durando 5 minutos para cada animal.

O último evento estressor foi a exposição das cabras ES à chuva no quarto dia. Evento realizado com chuva artificial, e para realização da chuva equipou-se duas baias sem cobertura, com aspersores de irrigação e cobertas por sombrite para reduzir a luminosidade. A simulação da chuva seguiu os dados do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) para calcular a quantidade e o tempo de precipitação da água nas baias seguindo as referências do mês de dezembro e fevereiro na região onde ocorreu o experimento. Assim, garantiu-se uma precipitação de 30 mm de chuva no período de 5 horas, o que corresponde a uma chuva moderada-forte em região subtropical, o cálculo da precipitação foi medido com um pluviômetro. O volume de água utilizada variou de 5 a 10 mm de precipitação por hora, com intervalos de 30 minutos de chuva e 30 minutos sem chuva, característico da região subtropical. Como em dias chuvosos, todas as cabras do Laboratório permanecem em suas baias, as cabras do grupo controle foram mantidas em suas baias sem exposição à chuva artificial, como em sua rotina habitual. Ressaltando que, durante a semana experimental era previsto a ocorrência de chuva segundo a previsão do tempo da região. Em dezembro, a temperatura e umidade relativa do ar onde da baia das cabras ES durante o período de exposição à Chuva, foi de 26.0°C e 69% as 10h00, 28.0°C e 72% as 12h00 e 38.2°C e 37% as 15h00. Em fevereiro, a temperatura e umidade relativa do ar na baia das cabras ES foi de 24.9°C e 72% as 10h00, 27.9°C e 66% às 12h00 e 34.9°C as 15h00.

Às 15h00 após o término dos 4 estressores do grupo ES realizados em 4 dias consecutivos, todas as cabras foram conduzidas às suas respectivas baias, mantidas em conforto ambiental com disponibilidade de comida, sombra e água. Uma hora após a volta da rotina, às 16h00, fez-se a última coleta de dados (parâmetros fisiológicos e sangue) das 30 cabras em suas respectivas acomodações.

3.2.2.4 *Produção diária de leite e coleta de leite*

A produção individual das cabras foi mensurada diariamente, enquanto a coletada de leite para realização das análises físico-química, contagem de células somáticas (CCS) e microbiológicas do leite foram realizadas um dia após à submissão das cabras aos tratamentos ES e CT. Antes de iniciar a ordenha de cada cabras, foram coletadas amostras de leite assepticamente dos tetos após desprezar os 3 primeiros jatos, composto de 50% de leite de cada teto, as amostras foram armazenadas em tubos estéreis para análise microbiológica. Ao término da ordenha, 50 mL de leite foram retiradas dos copos coletores contendo uma parcela representativa da totalidade da produção de leite de cada cabra, essas amostras foram armazenadas em tubos estéreis, para análise físico-química e CCS.

3.2.2.5 *Biópsia*

A biópsia da glândula mamária de 14 cabras homogêneas e representativas dos tratamentos CT e ES ocorreu um dia após a realização do último estressor das cabras ES. Antes do procedimento de biópsia, as cabras foram ordenhadas e em seguida com uma prévia de 15 a 20 minutos antes do procedimento de biópsia as cabras receberam injeções I.M. de um antiinflamatório (1 mg/kg, Diclofenaco 50, Ourofino, São Paulo, Brasil) e um antibiótico (5 mg/kg, Gentamax, Ceva, São Paulo, Brasil). Após foi realizada a tricotomia e desinfecção com álcool 70% e iodopovidona a 10% no local da incisão na glândula mamária e aplicação do anestésico local. Na área de incisão foi injetada por via subcutânea 1 mL de lidocaína a 2% (Anestésico L, Pearson Saúde Animal, São Paulo, Brasil), aplicada em vários pontos. Uma pequena incisão (0,5 cm) foi feita com bisturi (lâmina nº 15) na pele e cápsula do úbere, a biópsia do núcleo foi realizada e retirou-se amostras de tecido mamário que foi armazenado em tubo com solução fisiológica. Os tecidos foram armazenados em tubo eppendorf e congelados à -80°C para posterior análise da expressão gênica. Finalizado a coleta de material, a incisão foi fechada tratada topicamente com antiinflamatório / antibiótico spray (Terra-Cortril, Zoetis, São Paulo, Brasil) e anti-séptico (Aerocid Total, Agener, São Paulo, Brasil), procedimento repetido uma vez ao dia até a cicatrização do tecido.

3.2.3 Análises experimentais

A partir da coleta de sangue dos animais foi determinado as concentrações plasmáticas de cortisol (CORT) e glicose (GLIC), colesterol (CHOL), triglicerídeos (TG), creatinina (CREAT), ureia (UREA), lipoproteína de alta densidade (HDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL). As análises destes metabólitos foram realizadas utilizando o leitor do tipo Elisa (Multiscan MS Labsystem, Tiilitie, Vantaa, Finland), todas as amostras foram analisadas em duplicatas. Os metabólitos foram analisados por kit enzimático: GLIC (Glicose GOD-PAP, Laborlab), COLES (Colesterol Total COD-PAP, Laborlab), URE (Bioclin, ref: k047), CREAT (Creatinina Enzimática, Bioclin), HDL (Colesterol HDL, Labtest); e o hormônio CORT foi analisado usando kit imunoenzimático (Cortisol Test System, Monobind).

A análise microbiológica foi realizada em 3 meios de cultura para contagem de bactérias mesófilas, ágar Plate Count Agar (PCA), Baird-Parker (BP) e MacConkey (MC), a metodologia utilizadas segue os procedimentos descritos no Standard Methods for the Examination of Dairy Products e a contagem de colônias foi expressa por UFC/mL após 48 horas incubadas em estufa à 37°C (TRONCO, 2010). Uma parcela representativa da produção total de cada cabra foi coletada após a ordenha para análise físico-química e a contagem de células somáticas (CCS). As porcentagens de gordura, proteína e lactose no leite foram determinadas usando o equipamento MilkScope Expert Automático (Razgrad, Bulgária). Para CCS, foi realizado esfregaço de leite em duplicado (10 µL) foram preparados e corados com pyronina Y e verde de metila e sua contagem realizada em microscopia direta (RAYNAL-LJUTOVAC et al., 2007). O CEC foi obtido pela média de dois campos contendo leucócitos e multiplicado pelo fator microscópio. O resultado final foi convertido em escala logarítima.

3.2.4 Análise da expressão gênica

Neste experimento, a técnica PCR-RT foi utilizada para expressão gênica da glutathione (GSR), tioredoxina redutase (TRX), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), superóxido dismutase (SOD), Acetil-CoA carboxilase alfa (ACACA), Lipin 1 (LPIN₁), das interleucinas 1, 6, 8 (IL-1, IL-6 e IL-8), do fator de necrose tumoral (TNF- α) e interferon (IFN- γ) na glândula mamária.

A partir do tecido mamário, foi isolado o RNA realizando a extração com kit PureLink RNA Mini (Invitrogen, Carlsbad, CA). O RNA purificado foi então eluído com água livre de RNases para prosseguir com a reação para degradação 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. A transcrição reversa do cDNA totalizou um volume de 20 µL empregando-se a enzima GoScript Reverse Transcriptase (Promega). Basicamente, o protocolo iniciou-se com a incubação do RNA com 0,5 µg de oligonucleotídeo oligo-dT (Promega) por 5 minutos a 70°C. Após adicionou-se 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 ocorreu a 42°C durante 60 minutos, seguindo por 15 minutos a 70°C e resfriamento a 4°C (MERIGHE et al., 2010).

As amostras foram submetidas ao processo de reações em cadeia da polimerase em tempo real e posteriormente os fragmentos gênicos amplificados analisados. A sequência dos primers está descrita na Tabela 1. Os genes foram amplificados em reações separadas e cada reação foi realizada em duplicata, assim em 20 µL de reação havia 1,0 µL de cDNA das amostras; 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 10 µL Sybr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems).

Tabela 1 - Sequência de primer da expressão gênica

Gene		Primer Sequencies	Código in Genbank	Amplification
GR	Direto	5'-CCATTTCTGTTACGGTGTG-3'	XM_005683087	132
	Reverso	5'-CTGAACCGACAGGAATTGGT-3'		
SOD1	Direto	5'-TGTTGCCATCGTGGATATTGTAG-3'	NM_001285550	102
	Reverso	5'-CCCAAGTCATCTGGTTTTTCATG-3'		
GPx1	Direto	5'GCAAGGTGCTGCTCATTGAG3'	XM_005695962	82
	Reverso	5'CGCTGCAGGTCATTCATCTG-3'		
CAT	Direto	5'-GCTCCAAATTACTACCCCAATAGC 3'	NM_001035386	104
	Reverso	5'-GCACTGTTGAAGCGCTGTACA-3'		
GSR	Direto	5'-GAGAACGCTGGCATTGAG-3'	NM_001114190	143
	Reverso	5'-AGCAGGCAGTCAACATCT-3'		
TRXR1	Direto	5'-AGGAGAAAGCTGTGGAGAAA-3'	NM_174625	94
	Reverso	5'-TTATCCCTTGATGGAATCGT-3'		
TNF-α	Direto	5'-TCTTCTCAAGCCTCAAGTAACAAGC-3'	EU276079	103
	Reverso	5'-CCATGAGGGCATTGGCATAAC-3'		
IL-1β	Direto	5'-TCCACCTCCTCTCACAGGAAA-3'	NM_174093	99
	Reverso	5'-TACCCAAGGCCACAGGAA-3'		
IL6	Direto	5'- TGCTGGTCTTCTGGAGTATC-3'	NM_173923	153
	Reverso	5'- GTGGCTGGAGTGGTTATTAG-3'		
IL8	Direto	5'-TGTGAAGCTGCAGTTCTGTCAA-3'	AF232704	130
	Reverso	5'-TTTCACAGTGTGGCCCACTCT-3'		
IFN-γ	Direto	5'- TTCAGAGCCAAATTGTCTCC-3'	NM_174086	205
	Reverso	5'- AGTTCATTTATGGCTTTGCGC-3'		
ACACA	Direto	5'-TGGTCTGGCCTTACACATGA-3'	NM_174224	112
	Reverso	5'-TGCTGGAGAGGCTACAGTGA-3'		
LPIN1	Direto	5'-GAGGGGAAGAAACACCACAA-3'	NM_001206156	202
	Reverso	5'-GTAGCTGACGCTGGACAACA-3'		
GAPDH	Direto	5'-GGTGATGCTGGTGCTGAG-3'	NM_001034034	181
	Reverso	5'-TGACAATCTTGAGGGTGTTG-3'		

GR: receptor de glicocorticoide; SOD1: superóxido dismutase; GPx1: glutationa peroxidase; CAT: catalase; GSR: glutationa; TRXR1: tioredoxina redutase; TNF- α : fator de necrose tumoral; IL-1 β ; ; IL6; ; IL8: interleucinas 1, 6, 8; IFN- γ : interferon ; ACACA: Acetil-CoA carboxilase alfa ; LPIN1: Lipin 1; GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.

3.2.5 Análise Estatística

Os dados foram analisados utilizando o software Statistical Analysis System [SAS] (versão 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC) pelo teste de ANOVA. Primeiro foi realizada uma análise descritiva dos dados pelos procedimentos FREQ and MEANS, e a normalidade desses dados foi testado por Shapiro-Wilk. Para analisar os efeitos de cada tratamento (exposição ao Sol, administração de ACTH, manejo de casqueamento e exposição à chuva) foram considerados interação dia/tratamento para causas de variação de cortisol, colesterol total, HDL, creatinina, ureia, triglicerídeos e glicose, e para análise das expressões gênicas, produção e qualidade de leite utilizou o efeito de tratamento (semana) como causa de variação, essas análises de variância foram determinadas usando MIXED. Quando houve efeito significativo utilizou-se o limiar de significância de $P \leq 0,05$ e as médias foram comparadas usando o teste de Fisher. Os resultados estáticos foram apresentados como média e erro padrão médio.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Produção e qualidade de leite

A Tabela 2 apresenta o efeito cumulativo dos diferentes estressores sobre a produção e qualidade do leite, em função dos efeitos de tratamento (estresse X controle), mês do desafio e interação tratamento/mês. Na Tabela 2 é possível observar que não houve efeito significativo sobre a produção, qualidade físico-química e microbiológica do leite durante os quatro desafios impostos experimentalmente (Tabela 2). Contudo, nas Figuras 1 e 2 são apresentadas as interações significativas relacionadas à produção do leite e CCS. Na Figura 1 é possível observar que houve redução da produção de leite das cabras ES quando comparada as cabras CT durante e após os desafios, tendo as cabras submetidas ao estresse cumulativo (ES) em dezembro e fevereiro uma redução na produção leiteira por vários dias quando comparado as cabras controle (CT), porém a queda na produção de leite das cabras ES foi significativamente menor em dias esporádicos, sendo em dezembro os dias 154, 155 e 160, e em fevereiro os dias 213 e 214. Assim as cabras ES tiveram uma redução da produção de leite de 13,62% em dezembro e 11,8% em fevereiro de

produção leiteira quando comparado as cabras CT durante a após os desafios estressores. Já na Figura 2, observa-se que a CCS foi significativamente maior no grupo ES tanto em dezembro quanto em fevereiro em comparação ao grupo CT.

Tabela 2 – Efeito dos tratamentos sobre a produção e qualidade do leite em dezembro e fevereiro. Média e desvio-padrão da produção de leite durante os dias experimentais, e da gordura (%), proteína (%), lactose (%), contagem de células somáticas (CCS), contagem microbiológica do leite um dia após os tratamentos.

coletas	Estresse (n = 30)	Controle (n = 30)	P-valor		
			T	M	T*M
Leite (kg)	1,75 ± 0,32	1,87 ± 0,34	0,47	0,20	0,22
Gordura (%)	3,61 ± 0,67	3,37 ± 0,62	0,43	0,97	0,80
Proteína (%)	2,99 ± 0,56	3,00 ± 0,55	0,70	0,04	0,11
Lactose (%)	4,04 ± 0,75	4,03 ± 0,74	0,91	0,07	0,19
CCS (cells/mL) ¹	1732900 ± 3,16	1481735 ± 2,75	0,09	0,15	0,00
ContagemTotal bacterial (CFU/mL) ¹	287 ± 86	5261 ± 1358	0,51	0,56	0,51
Enterobacteriaceae (CFU/mL) ²	—	—	—	—	—
<i>Staphylococcus</i> sp. (CFU/mL) ³	103 ± 34	96 ± 47	0,31	0,38	0,40

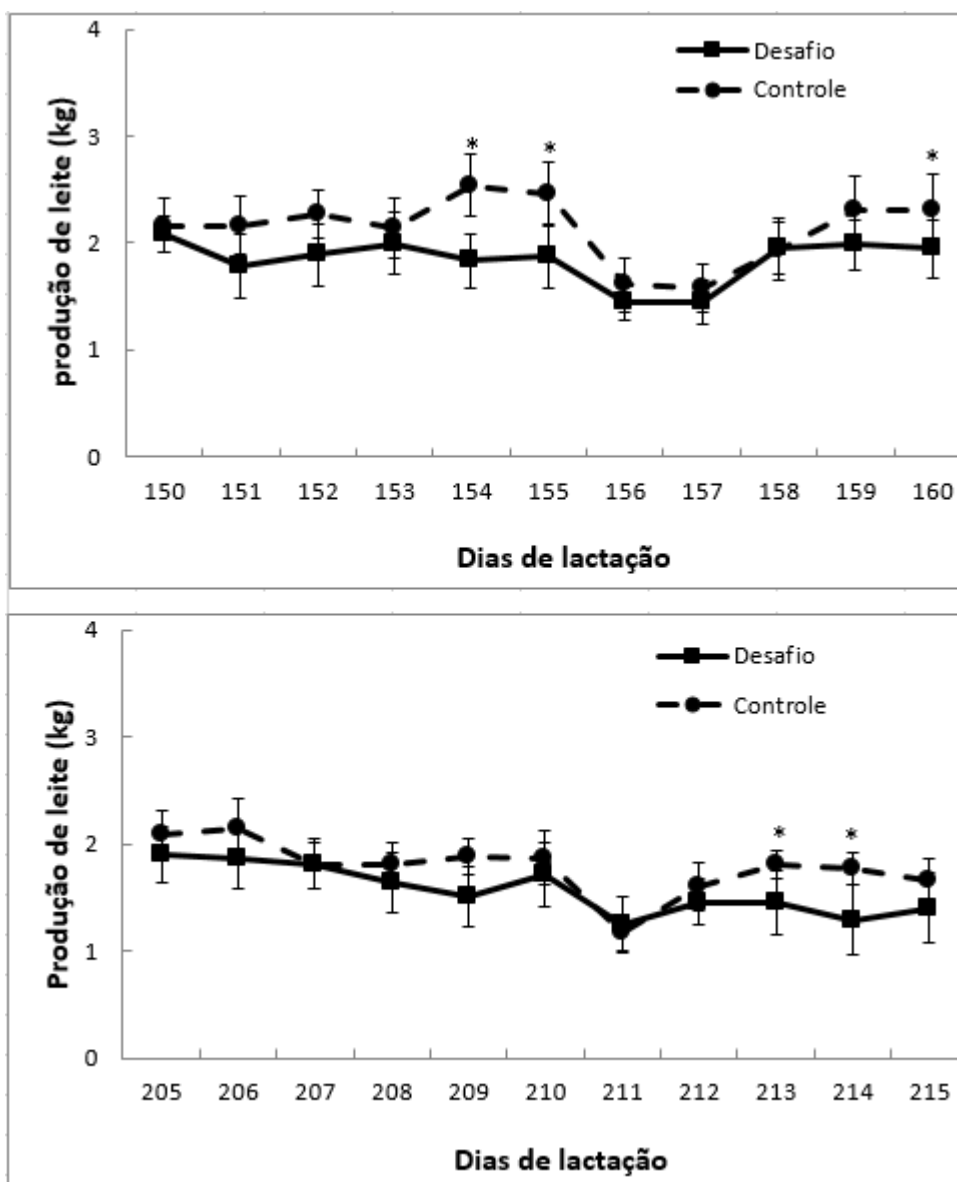
¹ Valores × 10³/mL.

² CFU: Unidades Formadoras de Colônias, valores × 10²/mL.

³ Contagem foi insuficiente para análise estatística.

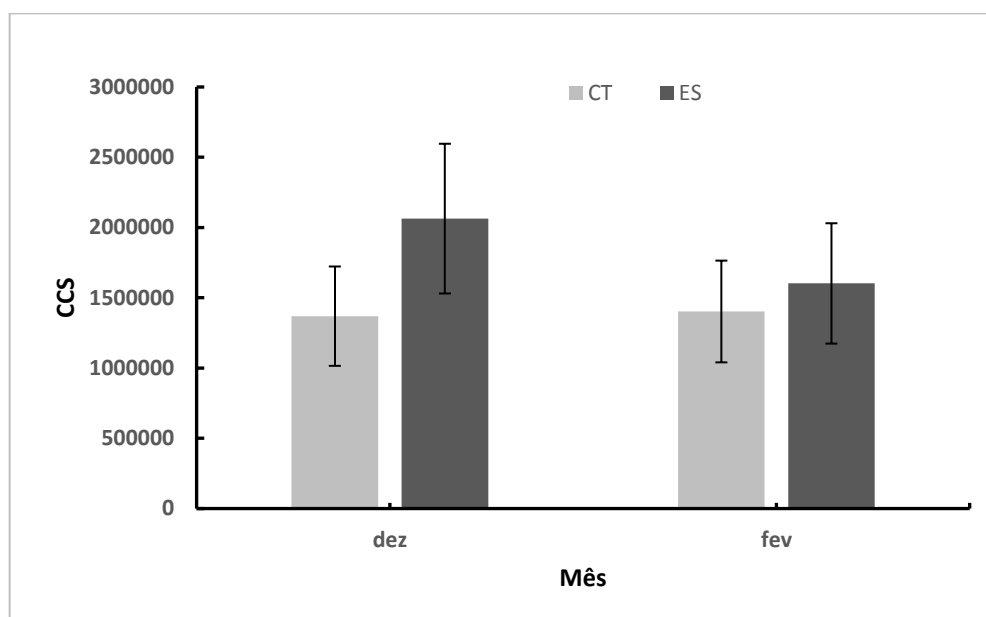
⁴ T – tratamento; M - Mês

Figura 1 – Produção de leite das cabras controle (CT) e estresse (ES) durante a semana experimental (151 a 154 dias de lactação; 206 a 209 dias de lactação), e semana pós – experimental em dezembro e fevereiro. Queda na produção de leite das cabras ES foi significativa ($p \leq 0,05$) nos dias 154, 155 e 160 de dezembro, e em fevereiro nos dias 213 e 214.



* Os dados estão apresentados com média \pm erro padrão ($p \leq 0,05$)

Figura 2 - Contagem de Células Somáticas (CCS) das cabras controle (CT) e estresse (ES) em dezembro e fevereiro após os dias experimentais.



3.3.2 Expressão gênica

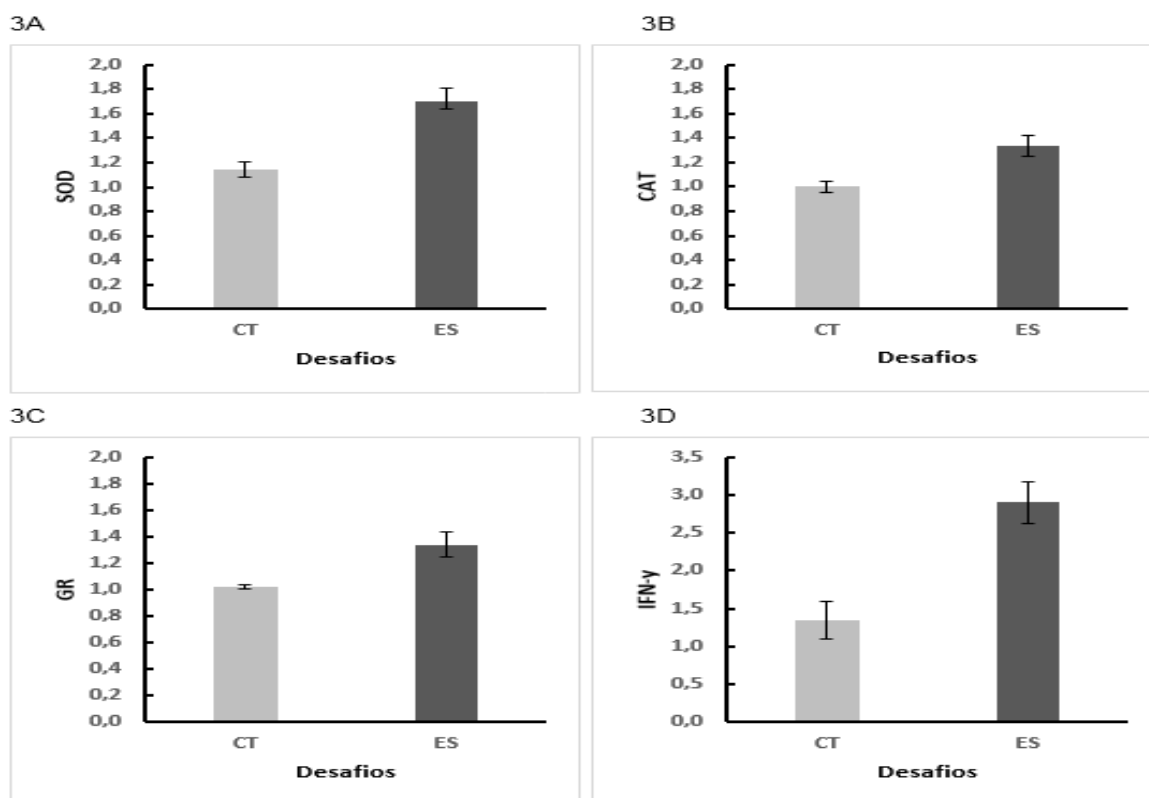
A tabela 3 apresenta o efeito do estresse cumulativo sobre as expressões gênicas do receptor do cortisol (GR), da proteína LPIN₁, das enzimas (GSH, TRX, CAT, GPX, SOD e ACACA) e das citocinas (IL-1, IL-6 e IL-8, TNF- α e IFN- γ) mensuradas na glândula mamária após a submissão aos tratamentos experimentais. Nas Figuras 3A, 3B, 3C e 3D é possível observar que as cabras submetidas aos desafios estressantes apresentaram maior expressão de GR, SOD, CAT e IFN- γ quando comparadas às cabras controle. No entanto, não houve nenhum efeito significativo sobre a expressão gênica da GSH, TRX, GPX e ACACA. IL-1, IL-6 e IL-8 e de TNF- α na glândula mamária.

Tabela 3 – Resultado da biópsia na glândula mamária das cabras controle (CT) e estresse (ES) após a submissão aos tratamentos experimentais, a partir da expressão gênica do receptor do cortisol, dos antioxidantes glutathiona (GSR), tioredoxina redutase (TRX), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPX) e superóxido dismutase (SOD), da enzima Acetil-CoA carboxilase alfa (ACACA), da proteína Lipin 1 (LPIN₁), das interleucinas 1, 6, 8 (IL-1, IL-6 e IL-8), do fator de necrose tumoral (TNF- α) e do interferon (IFN- γ).

Genes	Estresse (n = 14)	Controle (n = 14)	P-valores T
GR	1,34 \pm 0,09	1,02 \pm 0,02	0,036
SOD	1,70 \pm 0,11	1,14 \pm 0,06	0,008
GPX1	1,07 \pm 0,31	1,00 \pm 0,03	0,384
CAT	1,33 \pm 0,08	1,00 \pm 0,04	0,027
TRX	1,09 \pm 0,12	1,33 \pm 0,26	0,573
GSR	0,99 \pm 0,14	2,77 \pm 1,41	0,392
IFN-γ	2,89 \pm 0,28	1,34 \pm 0,24	0,012
TNFα	2,21 \pm 0,45	1,33 \pm 0,27	0,255
IL-1β	1,38 \pm 0,16	1,21 \pm 0,26	0,696
IL-6	4,14 \pm 0,82	1,63 \pm 0,48	0,176
IL-8	3,01 \pm 0,50	2,76 \pm 1,29	0,898
LPIN1	1,67 \pm 0,33	1,50 \pm 0,25	0,773
ACACA	1,62 \pm 0,23	1,09 \pm 0,25	0,224

¹ T – tratamento

Figura 3 – Análise da expressão dos genes antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), do receptor de cortisol (GR) e interferon IFN- γ na glândula mamária das cabras controle (CT) e estresse (ES). Valores referentes a semana experimental de dezembro e fevereiro, com interação significativa ($P < 0,05$) entre os grupos.



3.3.3 Metabólitos

A Tabela 4 apresenta o efeito cumulativo dos diferentes estressores em função de tratamento, mês, hora e tratamento/hora na concentração plasmática de glicose, colesterol, triglicerídeos, creatinina, ureia, lipoproteína de alta densidade, lipoproteína de baixa densidade. Tanto TG quanto HDL foram influenciados significativamente pelos desafios impostos, na Figura 4 observa-se que a concentração de TG e HDL das cabras ES foram significativamente menores quando comparado às cabras CT.

Tabela 4 – Efeito dos tratamentos controle (CT) e estresse (ES) sobre as médias das concentrações dos metabólitos durante as semanas experimentais de dezembro e fevereiro.

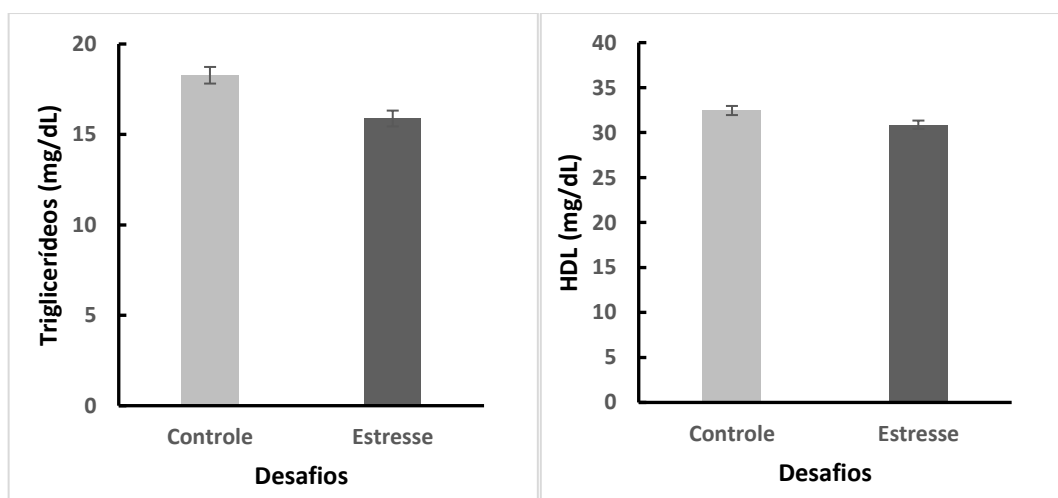
Trait[mg/dL] ¹	Estresse (n = 30)	Controle (n = 30)	P-valor			
			T	M	H	T*H
GLC (mg/dL)	74,56 ± 3,01	73,90 ± 2,77	0,086	0,002	0,000	0,050
UREA (mg/dL)	54,67 ± 2,13	58,50 ± 2,15	0,002	0,026	0,002	0,000
CREAT(mg/dL)	74,56 ± 1,86	73,90 ± 1,75	0,231	0,000	0,323	0,400
TG (mg/dL)	15,88 ± 0,46	18,27 ± 0,46	0,008	0,000	0,074	0,619
CHOL (mg/dL)	99,29 ± 3,83	106,42 ± 3,74	0,015	0,000	0,026	0,043
HDL (mg/dL)	30,87 ± 0,46	32,45 ± 0,51	0,028	0,023	0,401	0,737
LDL (mg/dL)	62,79 ± 4,19	70,85 ± 3,73	0,030	0,001	0,017	0,031

¹ GLC: glicose; CREAT: creatinina; TG: Triglicerídes; CHOL: Cholesterol, HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade.

² (mg/dL): miligramas por decilitro.

³ T – tratamento; M - Mês; H – Hora.

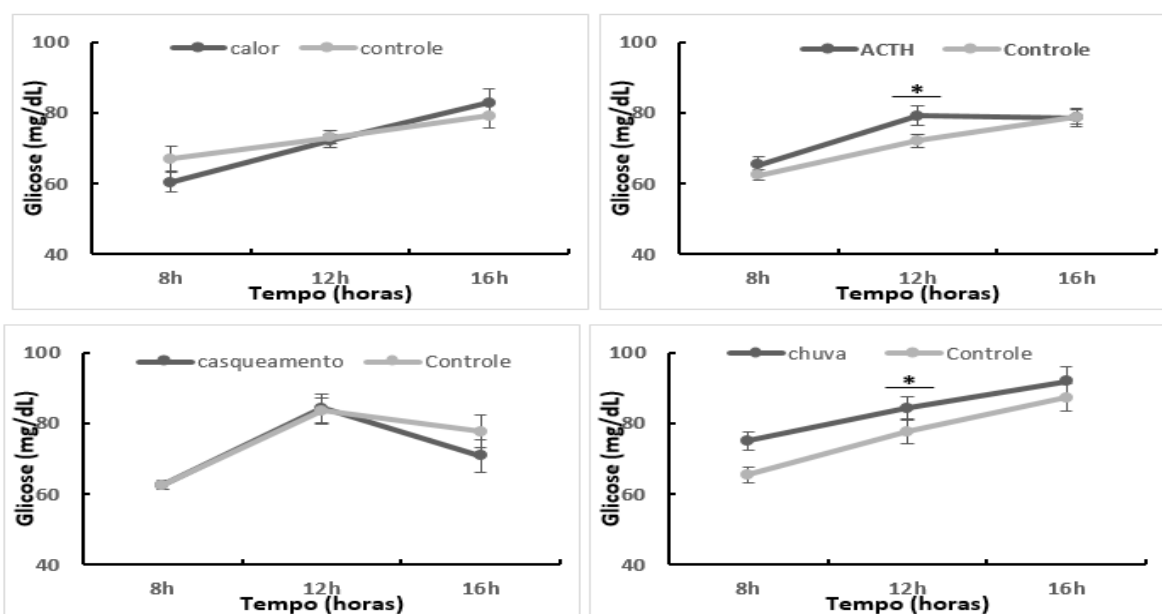
Figura 4 - Média e desvio padrão da concentração plasmática de triglicerídeos (TG) e lipoproteína de alta densidade (HDL) das duas semanas experimentais (dezembro e fevereiro), das cabras controle (CT) e estresse (ES), com interação significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos.



¹ (mg/dL): miligramas por decilitro.

Por outro lado, as cabras estressadas apresentaram maiores concentrações de GLC quando comparadas as cabras controle (Tabela 4). A Figura 5 demonstra que a concentração de GLC aumentou significativamente nas cabras submetidas à administração de ACTH e exposição à Chuva às 12h00 comparado as cabras do grupo CT. Porém, os desafios Sol e Casqueamento não alteraram significativamente a concentração de glicose.

Figura 5 – Efeito na concentração plasmática de glicose (GLC) das cabras controle (CT) e estresse (ES) durante os dias experimentais, nos períodos antes (8h), durante (12h) e após (16h) os tratamentos. Médias e desvio padrão ($p \leq 0,05$) referente as semanas experimentais de dezembro e fevereiro.



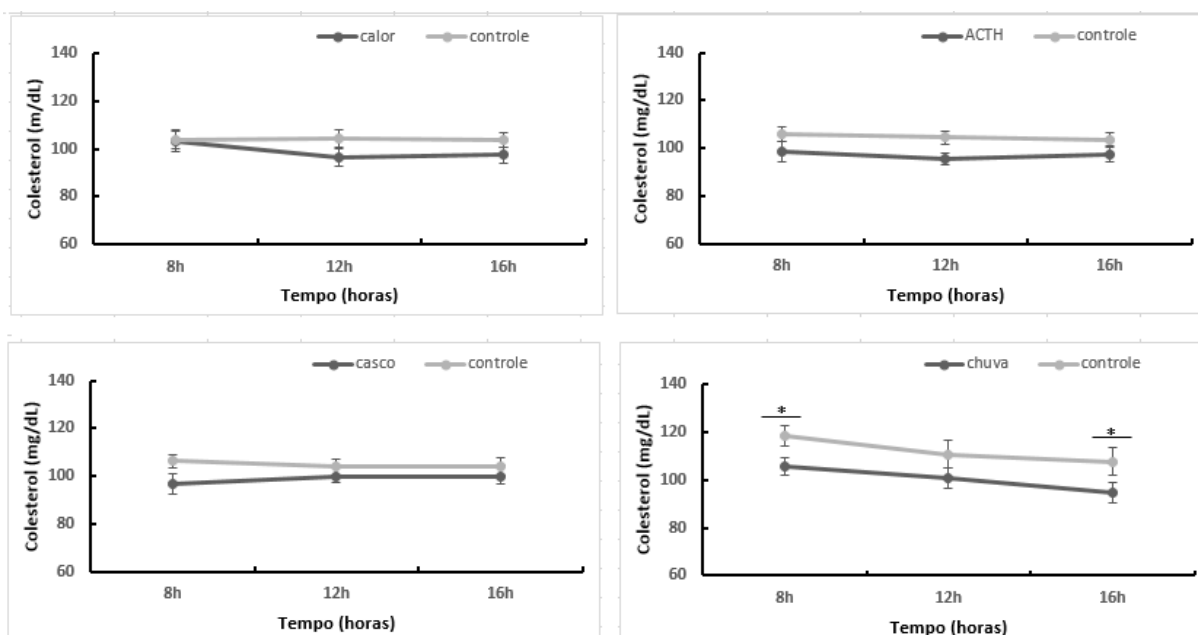
* Os dados estão apresentados com média \pm erro padrão ($p \leq 0,05$)

¹ (mg/dL): miligramas por decilitro.

Em contraste, as concentrações de CHOL, UREA e LDL foram significativamente menores para o grupo ES (Tabela 4) quando comparado as concentrações destes metabólitos do grupo controle (CT). Nas Figuras 6, 7 e 8 são apresentadas as interações tratamento/hora para CHOL, UREA e LDL. Neste caso, houve redução da concentração de CHOL durante a exposição à Chuva às 08h00 e às 16h00 quando comparado as cabras CT (Figura 7). Para a UREA (Figura 8), houve redução significativa da sua concentração antes do evento estressor, administração de ACTH, às 08h00 nas cabras ES comparadas as cabras CT. Na Figura 9, é possível

observar que as cabras apresentaram concentrações de LDL significativamente menores quando comparado as cabras CT, sendo que a partir do 2 dia experimental (estressor ACTH), esse efeito foi observado durante todas as coletas realizadas.

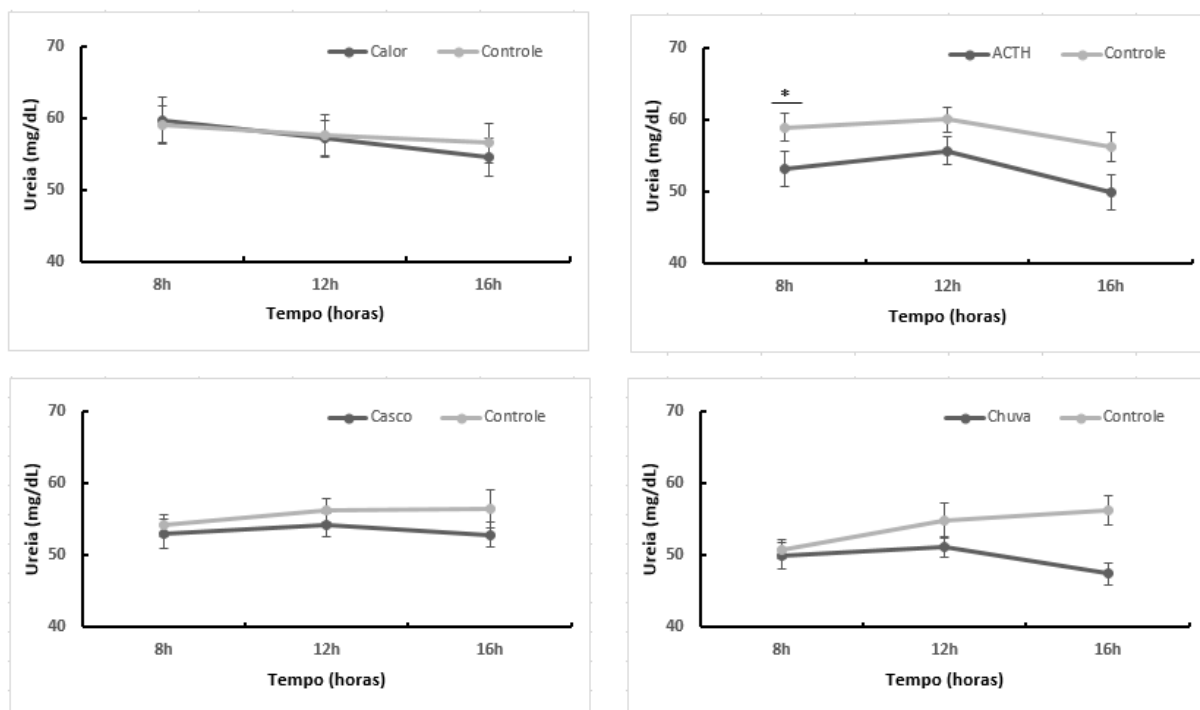
Figura 6 - Efeito na concentração plasmática de colesterol (CHOL) das cabras controle (CT) e estresse (ES) durante os dias experimentais, nos períodos antes (8h), durante (12h) e após (16h) os tratamentos. Médias e desvio padrão ($p \leq 0,05$) referente as semanas experimentais de dezembro e fevereiro.



* Os dados estão apresentados com média \pm erro padrão ($p \leq 0,05$)

¹ (mg/dL): miligramas por decilitro.

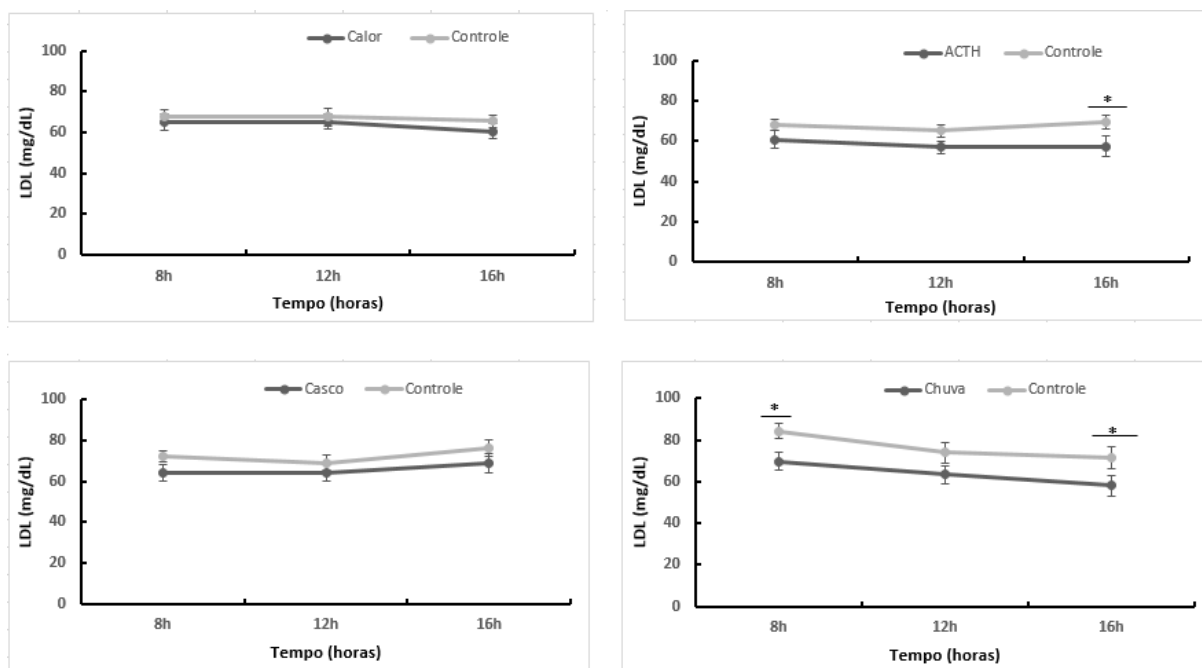
Figura 7 - Efeito na concentração plasmática de ureia das cabras controle (CT) e estresse (ES) durante os dias experimentais, nos períodos antes (8h), durante (12h) e após (16h) os tratamentos. Médias e desvio padrão ($p \leq 0,05$) referente as semanas experimentais de dezembro e fevereiro.



* Os dados estão apresentados com média \pm erro padrão ($p \leq 0,05$)

¹ (mg/dL): miligramas por decilitro.

Figura 8 - Efeito na concentração plasmática de lipoproteína de baixa densidade (LDL) das cabras controle (CT) e estresse (ES) durante os dias experimentais, nos períodos antes (8h), durante (12h) e após (16h) os tratamentos. Médias e desvio padrão ($p \leq 0,05$) referente as semanas experimentais de dezembro e fevereiro.



* Os dados estão apresentados com média \pm erro padrão ($p \leq 0,05$)

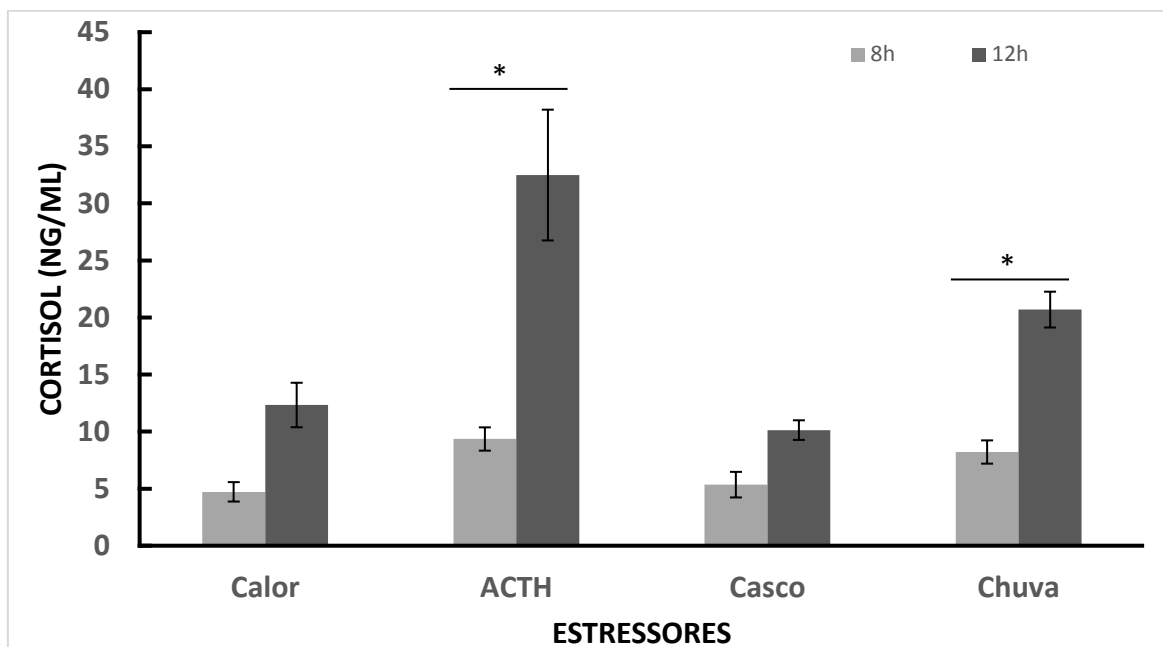
¹ (mg/dL): miligramas por decilitro.

Finalmente, na Tabela 4 é possível observar que os diferentes estressores não influenciaram significativamente a concentração de CREAT nas cabras submetidas aos diferentes estressores (ES) comparado às cabras CT.

3.3.4 Cortisol

A Figura 9 demonstra que houve diferentes liberações de cortisol em função dos diferentes estressores experimentais, ou seja, a concentração de cortisol foi significativamente maior após os estressores ACTH e Chuva, quando comparadas aos desafios Sol e Casco.

Figura 9 – Média e desvio padrão ($p \leq 0,05$) da concentração plasmática de cortisol das cabras estresse (ES) às 8h00 antes dos desafios e às 12h00 durante os desafios, valores referentes as semanas experimentais de dezembro e fevereiro.

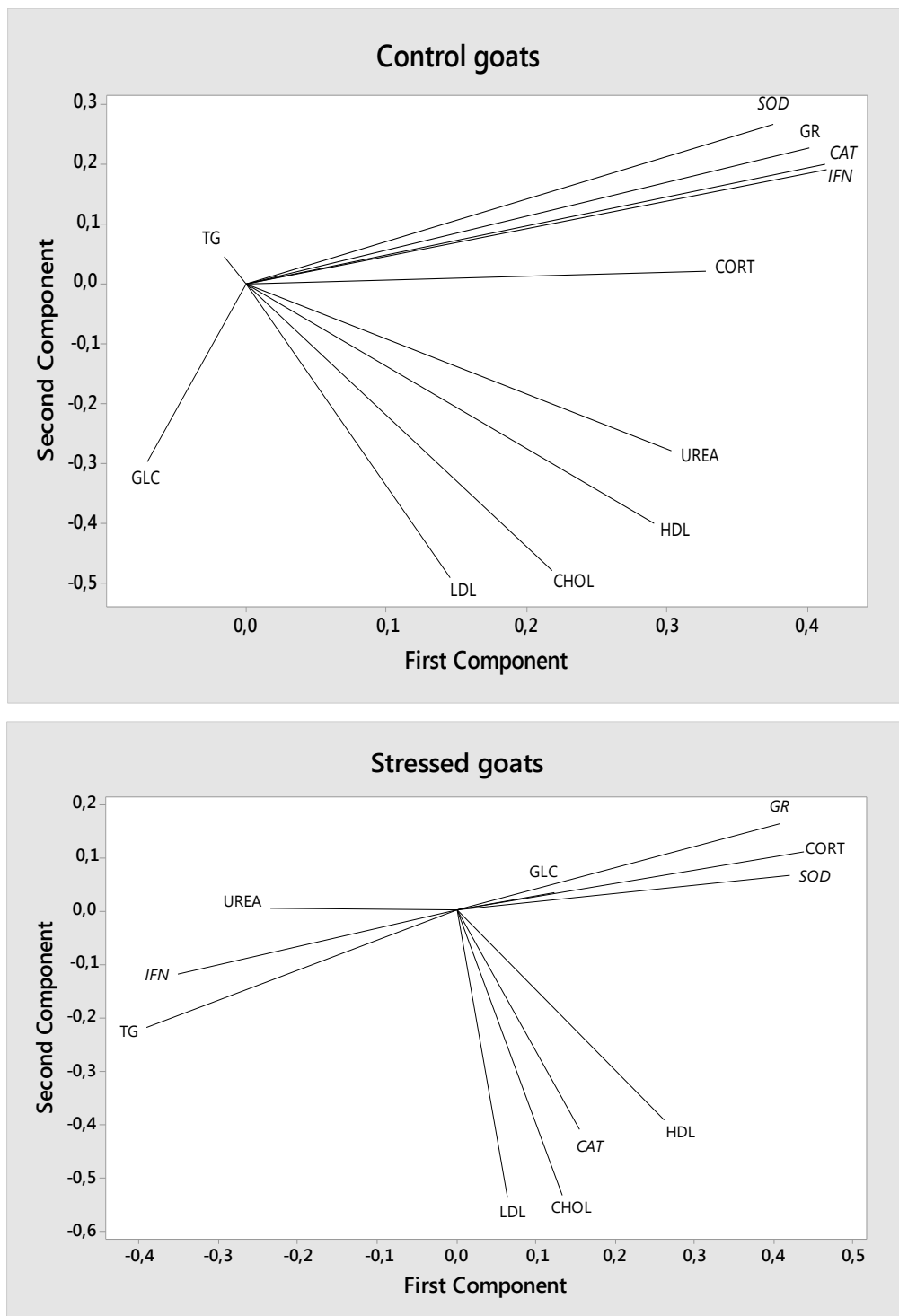


* Os dados estão apresentados com média \pm erro padrão ($p \leq 0,05$)

¹ (mg/dL): miligramas por decilitro.

A Figura 10, mostra as interações entre o cortisol, os metabólitos, e a expressão dos genes na glândula mamária das cabras submetidas aos tratamentos CT e ES após os eventos estressores. Como demonstram os gráficos das ACPs, houve uma expressiva diferença nas relações entre essas variáveis para as cabras submetidas ao estresse cumulativo ou tratamento controle.

Figura 10 - Relações entre o cortisol, os metabólitos, e a expressão dos genes na glândula mamária das cabras controle (CT) e estresse (ES) após os eventos estressores de dezembro e fevereiro.



3.4 DISCUSSÃO

Todos os desafios estressores promoveram respostas fisiológicas nas cabras do grupo ES. Assim, é possível observar que todos estressores estimularam o eixo HPA como resposta principal, porém houve variação quanto intensidade da mobilização das reservas energética na tentativa de restabelecer a homeostase. É importante ressaltar que o efeito do ACTH é a forma fisiológica de induzir um efeito estressor, mas no manejo de rotina o efeito do estressor ACTH é equivalente ao efeito por exemplo do estresse causado por aplicação de medicação ou transporte (GUPTA et al., 2020; KRUGER et al., 2016).

Outros autores destacaram que as alterações hormonais relacionadas ao estresse, fornecem a energia necessária para dar suporte as respostas fisiológicas que possibilitam o retorno a homeostasia dentro de algumas horas (BOMFIM et al., 2018; CANAES; NEGRÃO, 2009; FULKERSON; JAMIESON, 1982; GAIATO; DELGADO; NEGRÃO, 2012). De fato, recentemente nosso grupo demonstrou que o estresse cumulativo causou alterações significativas na temperatura retal, nas frequências cardíaca e respiratória, liberação de insulina, T3, IGF1 e na concentração de glicose plasmática (VASCONCELOS et al., 2020).

A utilização combinada desses parâmetros fisiológicos é utilizada como respostas essenciais para avaliação do estresse térmico (LIMA et al., 2020; TEAMA, 2018). Estes parâmetros também são utilizados para explicar como o estresse térmico pode diminuir a produção de leite dependendo da intensidade do estressor (BIANCA; KUNZ, 1978; HOOPER et al., 2020; SANTOS et al., 2014). Classicamente, o aumento da concentração plasmática de glicose é relacionado ao aumento da liberação de cortisol, visto que é necessário o aumento da energia disponível para retorno à homeostasia. Essa mesma relação entre estresse e metabolismo foi observada no presente estudo, principalmente durante os estressores ACTH e Chuva quando as concentrações de cortisol e glicose foram maiores, sugerindo que estes dois estressores foram mais intensos que o calor e casqueamento para as cabras Saanen. Normalmente em animais em período de lactação, quando ocorre maior gliconeogênese e glicogenólise, há aumento na disponibilidade de energia e glicose, sendo esse maior aporte de glicose associado à maior síntese de leite na glândula mamária (WANKHADE et al., 2017). Contudo, no presente estudo houve queda na

produção leiteira das cabras submetidas ao estresse cumulativo, o que sugere que a glicose foi desviada para atender outros mecanismos fisiológicos.

De modo geral, o estresse agudo reduz o consumo de alimentos, promove a mobilização das reservas energéticas corporais (glicogênio, gordura e músculos), causando redução do peso vivo dos animais (BAUMGARD; RHOADS Jr, 2013; COSTA et al., 2015; SLIMEN et al., 2015). Contudo, a mobilização de reservas energéticas pode ocorrer mesmo sem que haja redução do consumo energético do animal em situações de estresse agudo, no intuito de aumentar a taxa metabólica para prover a energia necessária para retorno à homeostasia (SLIMEN et al., 2015). Deste modo, nossos resultados demonstraram que as cabras submetidas ao estresse cumulativo, ajustaram seu metabolismo de lipídeos e aumentaram a mobilização da gordura corporal para provimento de energia necessária para retorno à homeostasia. Pois, o estresse cumulativo causou aumentos significativos na concentração plasmáticas de cortisol. Tendo em vista que o cortisol regula o balanço entre anabolismo e catabolismo, no presente estudo o estresse cumulativo causou lipólise para suprir energia necessária para reduzir os efeitos negativos dos estressores estudados. Como houve redução da concentração de triglicerídeos, colesterol, LDL e HDL e aumento da concentração de glicose, podemos sugerir que houve lipólise e aumento da neoglicogênese para as cabras submetidas ao estresse cumulativo, o que indica que após os eventos estressores ocorreu uma modificação no metabolismo para aumentar a disponibilidade de energia (MAURYA et al., 2015; SLIMEN et al., 2015).

Em relação a redução plasmática de ureia nas cabras ES, sugere que as cabras após o primeiro dia de estresse (sol), reduziram o consumo de alimentos no intuito de reduzir a carga térmica, resultando em menor produção de calor endógeno já que a energia gerada no processo de metabolização aumenta a carga térmica (PEIXOTO; OSÓRIO, 2007). Mas essa provável redução no consumo alimentar que ocasionou a redução plasmática de ureia não foi suficiente para alterar a produção de leite das cabras desafiadas neste dia.

No presente estudo, mesmo sendo observada uma queda produtiva desde aplicação do primeiro estressor, a redução da produção de leite das cabras ES foi significativamente menor nos dias pós experimento, comprovando que os estressores utilizados não foram potentes isoladamente, porém a mobilização das respostas

adaptativas, hormonais e metabólicas desencadeadas conforme cada estressor, conjuntamente resultaram em estresse cumulativo.

O estresse cumulativo também é responsável pelas modificações que ocorreram diretamente na glândula mamária das cabras. As cabras ES alteraram quantitativamente os marcadores do sistema antioxidante, pois apresentaram maior taxa de SOD e CAT, indicativo de que houve necessidade de aumentar suas defesas para combater as espécies reativa de oxigênio (EROS). Os estressores foram responsáveis pelas diferentes respostas fisiológicas de modo que aumentaram as EROS na glândula mamária das cabras. O aumento dos antioxidantes ocorreu em resposta ao aumento nos níveis de EROS para manter em estado estacionário aos oxidantes gerados. O estresse oxidativo resulta em uma perturbação nas concentrações de oxidantes e antioxidantes, visto que as EROS são prejudiciais às células, que resulta em dano tecidual (CELI, 2010; HALLIWELL, 2015; SLIMEN et al., 2015).

Ainda sob efeito do estresse cumulativo na glândula mamária, houve também aumento na expressão gênica do GR. O GR tem múltiplas funções na glândula mamária, como suprimir a transcrição de citocinas pró-inflamatórias e fator de necrose tumoral, e também relaciona-se com a apoptose, pois após os glicocorticoides se difundirem na membrana plasmática das células, eles se ligam ao receptor (GR) que se transloca até o núcleo e induz fatores pró-apoptose como Bax e Bcl-2 (FARIA; LONGUI, 2016; WANG et al., 2003). Outros estudos com ruminantes também encontraram relação do GR no aumento do metabolismo celular (KRONFELD; HARTMANN, 1973; OLLIER et al., 2016), reforçando os achados deste estudo relacionado ao aumento do metabolismo celular resultando no aumento da formação de EROS.

Mesmo o GR ser relacionado com a imunossupressão, nem todas as citocinas pró-inflamatórias são suprimidas. O aumento do gene IFN- γ na glândula mamária das cabras estressadas demonstrado neste estudo, está relacionado com a ativação do sistema imune, por também ser um mecanismo de resposta acionado pelo estresse. Além disto o IFN- γ inibi o crescimento e induz a apoptose celular. Uma maior disponibilidade desta citocina, sugere que a sua ação é necessária para aumentar a ativação de macrófagos, já que estes estão altamente relacionados com a fagocitose de resíduos celulares (SUN et al., 2019). O mesmo resultado foi encontrado no estudo de CHEN et al. (2015), utilizando dois estressores diferentes, separação materna e

transporte, resultou em aumento de IFN- γ , mas também ocasionou a imunossupressão de outras citocinas pró-inflamatórias.

A partir desses resultados da glândula mamária das cabras estressadas, podemos sugerir que o aumento da expressão gênica dos antioxidantes SOD e CAT, do GR e da citocina pró-inflamatória IFN- γ , ocorreram em detrimento de maiores taxas apoptogênicas ocasionado pelo aumento do estresse oxidativo na glândula mamária induzido por um estresse cumulativo, que resultou no declínio celular da glândula mamária e conseqüentemente impactou a produção de leite das cabras.

Existe uma correlação entre o estresse ao aumento da CCS, caracterizada pela ação do aumento de cortisol que diminui a resposta imune e ocasiona aumento na perda de células secretoras (KITCHEN, 1981; BRASIL et al., 2000; CANAES; NEGRÃO, 2009). A CCS de cabras tem características diferentes no final da lactação, com o aumento da apoptose na glândula mamária, ocorre uma tendência a aumentar mais do que outros ruminantes (MEHDID et al., 2019). Porém, no nosso estudo o aumento da CCS no final da lactação em fevereiro (\pm 205 dias de lactação) foi menor que a CCS de dezembro (\pm 150 dias de lactação) no grupo ES, mas também foi maior que o grupo CT nos dois meses, indicativo de que o aumento da CCS das cabras estressadas nesses meses foi exclusivamente por efeito do estresse oxidativo aumentando as taxas de apoptose, com mais efeito em dezembro do que em fevereiro.

No presente estudo, mesmo tendo observado uma maior disponibilidade de energia, esta foi utilizada para manter as diferentes respostas frente aos estressores, em detrimento da produção de leite, comprovando que o estresse cumulativo representado por vários estressores aplicados sequencialmente reduzem a produção de leite. É importante considerar as diferentes interações dos processos analisados após os eventos estressores nas cabras ES, que mostra como essa interação foi diferente comparando os dois grupos, reafirmando que houve redirecionamento interligado do glicocorticoide ao aumento glicêmico, mobilização conjunta da lipólise e alterações na expressão gênica das ES.

Assim, este estudo mostra que, as diferentes respostas adaptativas, hormonais e o redirecionamento energético frente aos estressores, bem como o susceptível aumento do estresse oxidativo na glândula mamária, conjuntamente contribuíram para um declínio na produção de leite totalizando uma queda de 25,4%, comprovando que vários estressores aplicados sequencialmente causam estresse cumulativo em cabras lactantes e interferem na glândula mamária. Considerando que o grau de involução

na fase final de lactação seja maior ao comparar com as outras fases da lactação, em fevereiro o grupo CT tendeu a diminuir a sua produção de leite, no entanto a produção de leite das cabras ES em fevereiro declinou mais comparado as cabras CT, resultado do aumento da apoptose das células epiteliais e da involução da glândula mamária que potencializaram a redução na produção na fase final da lactação.

3.5 CONCLUSÃO

Neste estudo podemos concluir que, mesmo as cabras sendo consideradas animais resistentes, os diferentes estressores induziram o estresse agudo cumulativo nas cabras lactantes, intensificando o processo de involução na glândula mamária na fase final de lactação, aumentando a contagem de células somáticas (CCS) e reduzindo a produtividade das cabras.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. M. et al. **Biomarkers of fitness and welfare in dairy animals**. *Healthy Living*. v. 86, p. 379-387, 2019.
- BAUMGARD, L. H.; RHOADS Jr., R. P. **Effects of heat stress on postabsorptive metabolism and energetics**. *Review in Advance*, v. 1, n. 7, p. 1-7, 2013.
- BERNABUCCI, U., et al. **Markers of oxidative status in plasma and erythrocytes of transition dairy cows during hot season**. *Journal of Dairy Science*, v.85, n. 9, p. 2173-2179, 2002.
- BIANCA, W.; KUNZ, P. **Physiological reactions of three breeds of goats to cold, heat and high altitude**. *Livestock Production Science*, v. 5, n. 1, p. 57-69, 1978.
- BOMFIM, G. F. et al. **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, n. 7, p. 6486-6496, 2018.
- BRASIL, L. H. A. et al. **Efeitos do Estresse Térmico Sobre a Produção, Composição Química do Leite e Respostas Termorreguladoras de Cabras da Raça Alpina**. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 29, n. 6, p. 1632-1641, 2000.
- BUFFINGTON, C. S. et al. **Black globe humidity comfort index for dairy cows**. St. Joseph: ASAE, 1977. 19 p.
- CANAES, T.; NEGRÃO, J. A. **Aspectos fisiológicos, comportamentais e produtivos de cabras Alpinas submetidas ao transporte**. *Revista Brasileira de Zootecnia*. v. 38, n. 5, p. 893-897, 2009.
- CELI, P. **The role of oxidative stress in small ruminant's health and production**. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 39, p. 348-363, 2010.
- CHEN, Y. et al. **Models and Methods to investigate acute stress response in cattle**. *Animals*, v. 5, n. 4, p. 1268-1295, 2015.
- COLLIER, R. J.; RENQUIST, B. J.; XIAO, Y. **A 100-Year Review: Stress physiology including heat stress**. *Journal of Dairy Science*. v. 100, n. 12, p. 10367-10380, 2017.
- COSTA, D. F. et al. **Influência do estresse calórico na fisiologia hormonal de bovinos**. *Agropecuária Científica no Semiárido*, v. 11, n. 2, p. 33-38, 2015.
- FARIA, C. D. C.; LONGUI, C. A. **Aspectos moleculares da sensibilidade aos glicocorticoides**. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 50, n. 6, 2006.
- GAIATO, A. P. R.; DELGADO, T. G. F.; NEGRÃO, J. A. **Qualidade e quantidade do leite produzido por cabras da raça Saanen submetidas a estresse por três dias**

consecutivos. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 64, n.5, p. 1373-1380, 2012.

GRIEBEL, P.; HILL, K.; STOOKEY, J. **How stress alters immune responses during respiratory infection.** Animal Health Research Reviews. v. 15, n. 2, p. 161-5, 2014.

GUPTA, D. et al. **Ameliorative effect of Vitamin C, Electrolyte and Jaggery on Transportation Stress at different flocking densities in Hot Humid and Winter Seasons on Hormonal parameters of goats.** Livestock Science, v. 242, 104271, 2020.

HALLIWELL, B. **Free Radicals and Other Reactive Species in Disease.** In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, 2015.

HAMZAOU, S. et al. **Physiological responses and lactational performances of late-lactation dairy goats under heat stress conditions.** Journal of Dairy Science, v. 96, n. 10, p. 6355-6365, 2013.

HERTEM, T. V. et al. **The effect of routine hoof trimming on locomotion score, ruminating time, activity, and milk yield of dairy cows.** Journal of Dairy Science, v. 97, n. 8, p. 4852-4863, 2014.

HOOPER, H. B., et al. **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, n. 2, p. 1982-1992, 2020.

HOU, Q. et al. **Apoptosis modulatory activities of transiently expressed Bcl-2: Roles in cytochrome c release and Bax regulation.** Apoptosis, v. 8, n. 6, p. 617-629, 2003.

KANNAN, G. et al. **Behavior of goats subjected to different social isolation treatments.** Journal of Animal Science, p. 98, n. 4, p. 458, 2020.

KITCHEN, B. J. **Review of the progress of dairy science: Bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests.** Journal of Dairy Research, v. 48, n. 1, p. 167-188, 1981.

KRONFELD, D. S., & HARTMANN, P. E. (1973). **Glucose redistribution in lactating cows given dexamethasone.** Journal Dairy Science, 56(7), 903-8, 1973.

KRUGER, L. P. et al. **The effect of environmental factors and husbandry practices on stress in goats.** Small Ruminant Research, v. 141, p. 1-4, 2016.

LIMA, A. R. C. et al. **Energy expenditure of Saanen and Anglo-Nubian goats at different temperatures.** Small Ruminant Research, v. 193, 106256, 2020.

MAGISTRELLI, D. et al. **Analysis of weaning-induced stress in Saanen goat kids.** Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, v. 97, n. 4, p. 732–739, 2012.

MAURYA, V. P. et al. **Impact of heat stress, nutritional restriction and combined stresses (heat and nutritional) on growth and reproductive performance of Malpura rams under semi-arid tropical environment.** *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, v. 100, n. 5, p. 938–946, 2015.

MEHDID, A. et al. **Effect of stress on somatic cell count and milk yield and composition in goats.** *Research in Veterinary Science*, v. 125, p. 61-70, 2019.

MERIGHE, G. K. F. et al. **Effect of culture time and gender of nuclei donor cells on bovine development produced by nuclear transfer.** *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 39, n. 10, p. 2166-2173, 2010.

MILLER, E.; NISTICO, G. **Brain messengers and the pituitary.** Academic, New York, 1989.

MOHANKUMAR, S. M. J. et al. **Neuroendocrine Regulations of Adaptive Mechanisms in Livestock.** *Environmental Stress and Amelioration in Livestock Production*, 11, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, MI, USA. 2012.

OLLIER, S. et al. **Effect of reducing milk production using a prolactin-release inhibitor or glucocorticoid on metabolism and immune functions in cows subjected to acute nutritional stress.** *Journal of Dairy Science*, v. 99, n. 12, p. 9949-9961, 2016.

PEIXOTO, L. A. O.; OSÓRIO, M. T. M. **Perfil metabólico proteico e energético na avaliação do desempenho reprodutivo em ruminantes.** *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 13, n. 3, p. 299-304, 2007.

POLYCARP, T. N.; OBUKOWHO, E. B.; YUSOFF, S. M. **Changes in haematological parameters and oxidative stress response of goats subjected to road transport stress in a hot humid tropical environment.** *Comparative Clinical Pathology*, v. 25, p. 285-293, 2016.

RAYNAL-LJUTOVAC, K. et al. **Somatic cells of goat and sheep milk: Analytical, sanitary, productive and technological aspects.** *Small Ruminant Research*, v. 68, n. 1-2, p. 126-144, 2007.

SANTOS, F. S. M. et al. **Adaptabilidade de caprinos Sannen e Marota mantidos em clima tropical semiúmido.** *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v. 15, n. 4, 2014.

SEJIAN, V.; MAURYA, V. P.; NAQVI, S. M. K. **Adaptive capability as indicated by endocrine and biochemical responses of Malpura ewes subjected to combined stresses (thermal and nutritional) in a semi-arid tropical environment.** *International Journal of Biometeorology*, p. 54, n. 6, p. 653–661, 2010.

SIES, H. **Oxidative stress: From basic research to clinical application.** *The American Journal of Medicine*, v. 91, n. 3, 1991.

SLIMEN, I. B. et al. **Heat stress effects on livestock: molecular, cellular and metabolic aspects, a review.** Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, v. 100, n. 3, p. 401-412, 2015.

SUN, X. et al. **Lycopene alleviates H₂O₂ -induced oxidative stress, inflammation and apoptosis in bovine mammary epithelial cells via the NFE2L2 signaling pathway.** Food & Function, v. 10, n. 10, p. 6276–6285, 2019.

SUN, X. et al. **Oxidative stress, NF-κB signaling, NLRP3 inflammasome, and caspase apoptotic pathways are activated in mammary gland of ketotic Holstein cows.** Journal of Dairy Science, v. 104, n. 1, p. 849-861, 2020.

TAO, S. et al. **Symposium review: The influences of heat stress on bovine mammary gland function.** Journal of Dairy Science, v. 101, n. 6, p. 5642-5654, 2018.

TEAMA, F. E. I. **Evaluation of some oxidative-stress and antioxidant markers in goats during estrous cycle under Egyptian environmental conditions.** Revista Brasileira de Zootecnia, v. 47, e20160382, 2018.

TRONCO, V. M. Manual para Inspeção da Qualidade do leite, 4. Ed. – Santa Maria, Curitiba, PR: ed. UFSM. 2010.

VASCONCELOS, M. L. et al. **Effect of cumulative stress on milk production of Saanen goats.** Revista Brasileira de Zootecnia. Artigo submetido para publicação.

WANG, J. et al. **Deoxynivalenol induces oxidative stress, inflammatory response and apoptosis in bovine mammary epithelial cells.** Animal Physiology and Animal Nutrition, v. 103, n. 6, p. 1663-1674, 2019.

WANG, Z. et al. **Microarray analysis uncovers the induction of the proapoptotic BH3-only protein Bim in multiple models of glucocorticoid-induced apoptosis.** Journal Biological Chemistry. v. 278, n. 27, p. 22861-23867, 2003.

WANKHADE, P. R. et al. **Metabolic and immunological changes in transition dairy cows: A review.** Veterinary World, v. 10, n. 11, p. 1367-1377, 2017.