



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA APLICADA À
AGROPECUÁRIA

HENRIQUE LOW NOGUEIRA

ANÁLISE DA PRODUÇÃO E QUALIDADE DO LEITE ATRAVÉS DE ANÁLISES
BIOQUÍMICA E DE EXPRESSÃO DE GENES EM BÚFALAS (*Bubalus bubalis*)

BELÉM

2023

HENRIQUE LOW NOGUEIRA

**ANÁLISE DA PRODUÇÃO E QUALIDADE DO LEITE ATRAVÉS DE ANÁLISES
BIOQUÍMICA E DE EXPRESSÃO DE GENES EM BÚFALAS (*Bubalus bubalis*)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia aplicada à agropecuária.

Orientadora: Priscila di Paula Bessa Santana

Coorientador: Ednaldo da Silva Filho

BELÉM

2023

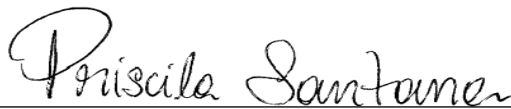
HENRIQUE LOW NOGUEIRA

**ANÁLISE DA PRODUÇÃO E QUALIDADE DO LEITE ATRAVÉS DE ANÁLISES
BIOQUÍMICA E DE EXPRESSÃO DE GENES EM BÚFALAS (*Bubalus bubalis*)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia aplicada à agropecuária.

APROVADO EM __/__/__

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Priscila di Paula Bessa Santana - Orientadora

Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA

Documento assinado digitalmente



Luiza Helena da Silva Martins

Data: 15/06/2023 15:53:29-0300

Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. Luiza Helena da Silva Martins

Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA

Documento assinado digitalmente



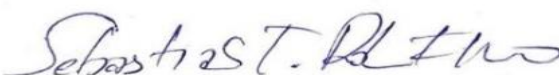
NATHALIA NOGUEIRA DA COSTA DE ALMEI

Data: 16/06/2023 15:46:39-0300

Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. Nathalia Nogueira da Costa

Universidade Federal do Pará – UFPA



Prof. Dr. Sebastiao Tavares Rolim Filho

Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA

Dedico

A Deus por ter me dado o dom da vida. As minhas mães Maria Jose Barbosa Low e Adriana de Jesus Gomes Carneiro, e a todos os meus familiares que me apoiaram todos os dias.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço à DEUS, por me dar forças todos os dias;

À minha orientadora **Priscila di Paula Bessa Santana** e coorientador **Ednaldo da Silva Filho** pelo apoio e dedicação durante os dois anos de mestrado;

À toda equipe do Laboratório de Biologia Molecular da UFRA;

Obrigado aos Professores **Luiza Helena da Silva Martins, Marcela da Silva Cordeiro, Nathalia Nogueira da Costa, Sebastiao Tavares Rolim Filho**, por aceitarem compor a banca de avaliação da minha dissertação;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro recebido durante o período de 2 anos de realização do mestrado;

E a todas as pessoas que me ajudaram diretamente ou indiretamente na realização deste trabalho.

“Henrique Low Nogueira

RESUMO

O leite de búfala se destaca no cenário global devido seu grande potencial nutritivo e energético e, no Brasil, a produção de leite de búfala encontra-se em expansão por conta de sua qualidade, e pela natureza rústica dos búfalos. Contudo, assim como outros ruminantes, os búfalos também são suscetíveis ao calor exibindo alterações fisiológicas e comportamentais, características do estresse térmico. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar os parâmetros bioquímicos e moleculares do leite e sangue a fim de relacionar com possíveis impactos do estresse térmico na produção e qualidade do leite em grupos de búfalas (*Bubalus bubalis*) com diferentes médias de produção diária de leite, a saber: grupo com maior média de litros de leite, MAp (n=6; 3.46 L) e com menor média, MEp (n=6; 5.93 L). Foram realizadas a análise composicional do leite, como gordura, proteína e lactose, análise de contagem de células somáticas (CCS) e concentração de cortisol no sangue e, por fim, as análises de expressões dos genes *HSP70*, *HSP90*, *TLR-2* e *TLR-4*. Quanto a análise bioquímica do leite, o porcentual de gordura, proteína e lactose não foi diferente entre os grupos ($p > 0.05$), bem como a concentração de cortisol sérico ($p > 0.05$) e a CCS ($p > 0.05$), a qual ficou abaixo de 200 mil células/mL caracterizando ausência de infecção por mastite clínica e subclínica. Quanto a análise molecular, a expressão de todos os genes, ou seja, *HSP70* (0.96 MEp versus 0.58 MAp), *HSP90 α* (0.98 MEp versus 0.03 MAp), *HSP90 β* (0.95 MEp versus 0.48 MAp), *TLR-2* (1.02 MEp versus 0.16 MAp) e *TLR-4* (1.26 MEp versus 0.07 MAp) foi maior no grupo MEp comparado ao MAp, respectivamente ($p < 0.05$). O teste de correlação foi realizado e demonstrou significância apenas entre os parâmetros: Produção x *HSP90 α* (-0.89; $p < 0.05$), Produção x *HSP90 β* (-0.66; $p < 0.05$), *TLR-2* x Produção (-0.72; $p < 0.05$) e *TLR-4* x Produção (-0.67; $p < 0.05$). Os resultados moleculares indicam que os animais (MEp) estavam sob estresse, pelo menos em nível celular, sendo prejudicial para a produção do leite. Contudo, este prejuízo se deu apenas na quantidade de leite produzido e não na qualidade do leite, pois nenhum dos parâmetros de composição como lipídeos, proteínas e lactose demonstraram alterações significativas entre os grupos. Já os dados de correlação demonstraram que os parâmetros produção e expressão de genes foram correlacionados negativamente, ou seja, quando os genes estão super expressos a produção tende a diminuir. Portanto, concluímos que, neste estudo, houve relação entre estresse térmico com produção, entretanto, não houve relação entre estresse térmico e qualidade do leite.

Palavras-chaves: Produção e qualidade do leite; Estresse térmico; *HSPs*; *Toll like*.

ABSTRACT

Buffalo milk stands out on the global stage due to its great nutritional and energy potential and, in Brazil, buffalo milk production is expanding due to its quality and the rustic nature of buffaloes. However, like other ruminants, buffaloes are also susceptible to heat, exhibiting physiological and behavioral changes, characteristic of heat stress. In this context, the objective of this study was to evaluate the biochemical and molecular parameters of milk and blood in order to relate to possible impacts of thermal stress on the production and quality of milk in groups of buffaloes (*Bubalus bubalis*) with different averages of daily milk production, namely: group with the highest average of liters of milk, MAp (n=6; 3.46 L) and with the lowest average, MEp (n=6; 5.93 L). The compositional analysis of the milk, such as fat, protein and lactose, analysis of somatic cell count (CCS) and cortisol concentration in the blood and, finally, the analyzes of expression of the genes *HSP70*, *HSP90*, *TLR-2* and *TLR-4*. As for the biochemical analysis of the milk, the percentage of fat, protein and lactose was not different between the groups ($p > 0.05$), as well as the concentration of serum cortisol ($p > 0.05$) and CCS ($p > 0.05$), which was below 200,000 cells/mL, characterizing the absence of clinical and subclinical mastitis infection. As for the molecular analysis, the expression of all genes, that is, *HSP70* (0.96 MEp versus 0.58 MAp), *HSP90 α* (0.98 MEp versus 0.03 MAp), *HSP90 β* (0.95 MEp versus 0.48 MAp), *TLR-2* (1.02 MEp versus 0.16 MAp) and *TLR-4* (1.26 MEp versus 0.07 MAp) was higher in the MEp group compared to the MAp group, respectively ($p < 0.05$). The correlation test was performed and showed significance only between the parameters: Production x *HSP90 α* (-0.89; $p < 0.05$), Production x *HSP90 β* (-0.66; $p < 0.05$), *TLR-2* x Production (-0.72; $p < 0.05$) and *TLR-4* x Production (-0.67; $p < 0.05$). The molecular results indicate that the animals (MEp) were under stress, at least at the cellular level, being detrimental to milk production. However, this damage occurred only in the amount of milk produced and not in the quality of the milk, since none of the composition parameters such as lipids, proteins and lactose showed significant changes between the groups. The correlation data showed that the production and gene expression parameters were negatively correlated, that is, when genes are overexpressed, production tends to decrease. Therefore, we conclude that, in this study, there was a relationship between heat stress and production, however, there was no relationship between heat stress and milk quality.

Keywords: Milk production and quality; Thermal stress; *HSPs*; *toll like*.

LISTA DE SIGLAS

CCS – Contagem de Células Somáticas

HSP – Proteína de Choque Térmico

TLR – Toll Like

MAP – Maior Produção

MEP – Menor Produção

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais	10
1 Introdução	10
1.1 Objetivo geral	12
1.2 Objetivos específicos	12
2 Revisão de literatura	13
2.1 Produção leiteira	13
2.2 Característica físico-químico do leite	14
2.3 Fatores que interferem na qualidade do leite	15
2.4 Relação do estresse térmico e a produção de leite	16
2.5 Impacto econômico do estresse térmico	17
2.6 Relação de <i>HSPs</i> e estresse térmico	17
2.7 <i>HSPs</i> em búfalos	19
2.8 <i>TLR-2</i> e <i>TLR-4</i>	19
3 Referencias	22
CAPÍTULO 2 – Avaliação bioquímica e de expressão gênica do leite de búfalas (<i>Bubalus bubalis</i>) no Pará, Brasil	26
Introdução	30
Materiais e Métodos	31
Análise estatística	34
Resultados	35
Discussão	38
Conclusão	44
Agradecimentos	45
Referências	45
Anexo 1: Certificado de aprovação do CEUA.	54

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1 Introdução

Por motivo de sua imensa capacidade adaptativa, os búfalos destacam-se nos diversos ambientes, por conta de sua ampla distribuição geográfica, habitando em regiões de baixa temperatura á ambiente mais quentes e úmidos como a região norte do Brasil (Taveira *et al.*, 2018). Ainda que esses animais possam ser capazes de manter boas condições corporais em variados ambientes, em que os bovinos não se desenvolvem bem, como pastagem de valor nutritivo baixo e campos alagados, os búfalos também se mostram suscetíveis ao calor e, em temperaturas elevadas demonstram alterações fisiológicas e diminuição na produção de leite (Damasceno *et al.*, 2010).

A temperatura, essa é a principal variável climática que determina a adaptação dos animais nas mais variadas regiões interferindo no comportamento e metabolismo (Damasceno *et al.*, 2010), ocasionando o estresse térmico. Neste sentido, o estresse térmico é o conjunto das alterações que ocorrem no organismo animal na tentativa de reagir às condições ambientais como: altas temperaturas, alta umidade do ar e excesso de radiação solar (Cruz *et al.*, 2011), gerando a redução da produtividade animal e graves consequências econômicas para a agropecuária global (Bernabucci *et al.*, 2010).

No Brasil, a atividade leiteira destaca-se no setor agropecuário, mesmo que os fatores climáticos ocasionem problemas nesta produtividade, em algumas regiões do país, acaba influenciando na diminuição da imunidade e dos desempenhos reprodutivos e produtivos dos animais (Araújo *et al.*, 2020 *apud* Berman, 2011). Com o estresse térmico afetando negativamente vários aspectos da produção leiteira, a produção de leite e as perdas reprodutivas consequentemente ocasiona um impacto significativo no rendimento econômico das granjas produtoras de leite (Cruz *et al.*, 2011).

Compreender os aspectos adaptativos ao estresse térmico nos animais no contexto climático atual, é cada vez mais importante, tendo em vista a falta de raças termotolerantes, impactando a produtividade em vários países (Gade *et al.*, 2010). Portanto, diversos estudos têm sido desenvolvidos para se conhecer as diversas respostas dos animais submetidas ao estresse térmico, e consequentemente avaliar a fisiologia animal relacionada com a termorregulação e termotolerância. Essas respostas incluem mecanismos celulares e características genéticas, dentre as quais, encontre-se a expressão das proteínas de choque térmico (heat shock protein - *HSP*) (Geraldo, 2013).

As proteínas de choque térmico (*HSPs*) são grupos de proteínas bem conhecidas e altamente conservadas e são responsáveis por minimizar vários estresses. Essas chaperonas moleculares conservadas evolutivamente desempenham um papel vital na sobrevivência dos seres vivos em resposta a alta temperatura ambiental (Wu *et al.*, 2017). Possibilitando que as células se adaptem progressivamente a mudança ambiental, impactando significativamente na adaptação térmica e na tolerância ao estresse (Hoter *et al.*, 2018).

Essas proteínas têm sido indicadas como principais responsáveis pela termotolerância, destacando-se as *HSPs70* e *HSP90*, pela sua abundância e sensibilidade à temperatura (Maróti *et al.*, 2011). No entanto, ainda não está totalmente claro o porquê o estresse tem efeitos tão negativos sobre os animais nos níveis celular e molecular. Portanto, é necessário identificar e compreender os genes relacionados à termotolerância e as proteínas que eles codificam os quais podem ser eficazes na redução do estresse térmico (Raza *et al.*, 2021).

1.1 Objetivo geral

- Avaliar os parâmetros bioquímicos e moleculares do leite e sangue a fim de relacionar com possíveis impactos do estresse térmico na produção e qualidade do leite em grupos de búfalas (*Bubalus bubalis*) com diferentes médias de produção diária de leite.

1.2 Objetivos específicos

- Avaliar a produção e qualidade (proteína, gordura e lactose) do leite de búfalas com diferentes médias de produção diária de leite empregando análise centesimal;

- Analisar a qualidade do leite por meio da contagem de células somáticas no leite;

- Investigar os indicadores de estresse fisiológico e celular através da dosagem do hormônio cortisol;

- Investigar os indicadores de estresse fisiológico e celular no leite empregando análises de expressão gênica (*HSP70*, *HSP90* e receptores *Toll-like*).

2 Revisão de literatura

2.1 Produção leiteira

A produção leiteira destaca-se como uma das principais aptidões das búfalas, que contribuem com 11% do total da produção mundial de leite, tornando esses animais a segunda maior fonte de produção de leite no mundo (Zhang *et al.*, 2022).

É observado que os búfalos são animais que se adaptam com facilidade nos mais variados ambientes, portanto, encontram-se distribuídos pelo mundo todo. De acordo com FAO, (2018) a população de búfalos no mundo é de 201,1 milhões, deste montante, destaca-se o continente asiático (Índia, Paquistão e China) que é responsável por 96,9% da produção de leite, sendo Índia a maior produtora com 57% da produção de leite de búfala. (Ricci e Domingue, 2012; Cavali e Pereira, 2020).

No ranking mundial da produção de leite o Brasil ocupa a terceira colocação com mais de 34 bilhões de litros por ano, tendo a predominância de pequenas e médias propriedades. Sendo essa uma das principais atividade geradora de renda para a agropecuária, empregando mais de 4 milhões de pessoas em 2022 (MAPA, 2022). Essa crescente produtividade começa a ganhar destaque no território brasileiro a partir da década de 90, quando são implementadas diversos programas e normas relacionadas a produção de leite, fim do tabelamento dos preços, com a menor intervenção do Estado, a abertura comercial e a implementação do Plano Real, além de ter maior tecnificação da produção, maior competitividade e aumento do consumo (Vilela *et al.*,2015).

Com a implementação de normas e técnicas de melhoramento genético e instalações mais adequadas, a produtividade leiteira bubalina no Brasil passou a ter grandes demanda, chegando a produzir 35.305.047 mil litros de leite no ano de 2021, com o valor de produção chegando a 68.173.032 mil reais. Dentro desse cenário se destaca o estado de Minas gerais, sendo o maior produtor com 9.611.706 mil litros e arrecadando o valor de 19.407.987 mil Reais. O estado do Pará é a maior produtora da região norte, chegando a produzir 575.740 mil litros de leite bubalino e arrecadando 942.891 mil Reais no ano de 2021, se destacando o município de Marabá (IBGE: PPM, 2021).

Diante de tal representatividade no cenário nacional, a produtividade leiteira no estado do Pará tem grande importância social e econômica, devido a qualidade da fabricação de queijos, tornando a região conhecida nacionalmente pelo o queijo marajoara (Seixas *et al.*,



2014). A produtividade leiteira no estado do Pará segue crescendo ano após ano, gerando empregos em diversas áreas e movimentando a economia local.

2.2 Característica físico-químico do leite

O leite e seus derivados são parte integrante da alimentação humana e são considerados portadores de diversos constituintes essenciais, como proteínas, lipídeos, caseínas, lactose e diversos compostos bioativos de grande importância para diversos processos bioquímicos e fisiológicos (Khan *et al.*, 2019).

A composição do leite bubalino apresenta características distintas na composição físico-químico em comparação ao leite bovino, como níveis maiores de lipídios, proteína e valor calórico, bem como alto teor total de sólidos, com teor proteico médio de $3,91 \pm 0,61\%$ e teor de gordura de $6,87 \pm 0,88\%$ (Amaral *et al.*, 2005; Tanamati *et al.*, 2019). Esta composição está ligada diretamente a rentabilidade dos derivados e qualidade dos produtos, tornando o leite de búfala cerca de 40-50% mais produtivo (Lima, *et al.*, 2014; Pastel *et al.*, 2020).

Figura 1: Análise láctea comparativa entre vaca e búfala

Vaca X Búfala	
	
Cálcio: 1,30%	Cálcio: 1,30%
Ferro: 37 ppm	Ferro: 61 ppm
Gordura: 3,68%	Gordura: 8,16%
Proteínas: 3,7%	Proteínas: 4,5%
Vitamina A: 185 UI	Vitamina A: 204 UI
Calorias: 62, 83	Calorias: 104

Fonte: Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Distrito Federal, 2018.

Em relação aos aspectos físico-químicos consideram-se o pH (6,4 a 6,9), acidez (0,14 a 0,18 g de ácido láctico/ 100 mL; densidade relativa 1,028 a 1,034 g / mL) e índice crioscópico (máximo -0,512 °C), expressos pela Instrução Normativa 76 de 26 de novembro de 2018, e são considerados como parâmetros relevantes para a caracterização do leite (MAPA, 2018).

Dado o exposto, os parâmetros para definir a qualidade do leite são sobretudo a composição química de gordura, proteína, lipídios, lactose, sais minerais e vitamina, além de características físico-químicas e microbiológicas como contagem de células somáticas e bacterianas (Brito e Dias 1998 *apud* Cavalcante, 2019).

2.3 Fatores que interferem na qualidade do leite

Diversos fatores podem contribuir para uma baixa qualidade do leite, dentre eles, encontra-se fatores como: espécie, idade, raça, tipo de manejo, alimentação, ambiente, dentre outros (Gonçalves *et al.*, 2019). Além do mais, os teores de gordura, proteína, lactose, sais minerais e vitaminas, são influenciadas por fatores como alimentação, manejo, genética, condição corporal e situação de estresses (Brito e Dias, 1998).

A qualidade do leite pode ser afetada de diversas formas, dentre elas, devido ao estresse térmico, que pode afetar a microbiologia do leite, afetando diretamente os processos de ordenhas, manejo sanitário e sanidade da fêmea (Cavalcante, 2019). Além da influência de fatores genéticos, a produção e composição do leite, também sofrem influência de efeitos de cunho nutricional (qualidade do alimento ofertado) e do ambiente como a temperatura, pluviosidade e umidade relativa do ar, fatores esses que podem contribuir para baixa qualidade do leite e, conseqüentemente, do produto final (Noro *et al.*, 2006; Cavalcante, 2019).

Outro fator para determinar a qualidade do leite é a contagem de células somáticas (CCS), considerada um dos critérios mais importantes para a avaliação da qualidade higiênico sanitária do leite, e como medida do padrão de qualidade, pois está relacionada com a composição, rendimento industrial e segurança alimentar do leite (Skrzypek *et al.*, 2004).

A contagem de células somáticas do leite indica, de maneira quantitativa, o grau de infecção da glândula mamária (Machado *et al.*, 2000). O limite de contagem de células somáticas do leite é de 200.000 células/ml em búfalos, pode ser usado como medida indireta para distinguir o úbere com (>200.000 células/ml) ou sem (<200.000 células/ml) mastite subclínica (Tanamati *et al.*, 2019).

Quando ocorre a inflamação da glândula mamária, devido a infecção por bactérias patogênicas, é iniciado uma série de eventos que resultam na baixa síntese do leite, alteração na composição e aumento na contagem de células somáticas. Apesar das búfalas seres menos susceptíveis a infecções na glândula mamaria, é necessário ter bastante cuidado nos processos de ordenha, para prevenir ocorrência de infecções. Pois, quando as glândulas mamárias são infectadas, a quantidade de células de defesa aumenta, podendo corresponder a até 99% das células encontradas no leite (Pegolo *et al.*, 2021; Muller e Rampel., 2021). Segundo Jorge *et al.*, (2005), o leite de búfalas apresenta uma baixa CCS comparando-se com rebanhos bovinos de alto padrão de qualidade.

Além disso, outro fator que influencia na produção e qualidade de leite é o estresse. Por exemplo, o estresse térmico modifica as concentrações dos hormônios cortisol, dos hormônios tireoidianos e metabólitos lipídicos, podendo acarretar alterações fisiológicas e comportamentais nos animais (Sgorlon *et al.*, 2015).

2.4 Relação do estresse térmico e a produção de leite

Um desequilíbrio entre a produção de calor metabólico dentro do corpo animal e sua dissipação ao redor resulta em estresse térmico (Das *et al.*, 2016). O impacto negativo do estresse térmico em animais leiteiros inclui diminuição na ingestão de ração, produção de leite, qualidade do leite, fertilidade e aumento da respiração, frequência cardíaca, atividade ofegante, fluxo sanguíneo periférico, sudorese entre outros (Kapila *et al.*, 2016)

Quando os animais estão em estado de estresse térmico, eles respondem por meio de alterações comportamentais, metabólicas e fisiológicas, impulsionadas pelos sistemas- nervoso central, periférico e endócrino. Como medida ao estresse térmico, são ativados diversos mecanismo incluindo a síntese de hormônios para manter a homeostasia (Collier *et al.*, 2019).

O estresse térmico além de afetar a produção e qualidade do leite, também pode estar associado a hiperfunção da glândula tireoide e liberação de cortisol em animais, que por sua vez, estimula o sistema imunológico durante situação de estresse agudo, porém mediante estresse crônico tem sido associada à supressão imunológica (Bagatha *et al.*, 2019).

Ao alterar a função do sistema imunológico pode-se modificar a suscetibilidade do animal à doença (Ju *et al.*, 2014). Uma hipótese comum é que os estressores suprimem componentes do sistema imunológico, elevando assim a suscetibilidade de um animal à doença (Stephanou *et al.*, 2011 *apud* Bagatha *et al.*, 2019). Dessa forma, o estresse térmico estimula as vias de transdução de sinal, alterando a expressão genética dos mediadores de células imunes, e resultando na ativação da resposta ao choque térmico promovendo a atividade de citocinas.

A expressão de proteínas de choque térmico (*HSPs*) é a resposta celular mais conhecida mediante o estresse térmico (Wankar *et al.*, 2021). As *HSPs* intracelulares, particularmente *HSP70* e *HSP90*, estão envolvidos no processamento e apresentação de antígenos (Archana *et al.*, 2017), e estão associadas às vias Toll likes, onde desempenham um papel na estimulação de *TLR4* para a proliferação de células dendríticas (Fang *et al.*, 2011). Conforme Ju *et al.*, (2014), o estresse térmico induz o aumento da expressão de *TLR2* e *TLR4* e a indução de fatores inflamatórios.

2.5 Impacto econômico do estresse térmico

O estresse térmico reduz a qualidade do leite e os rendimentos, causando grandes perdas econômicas a cada ano. Este está associado a uma carga econômica significativa para os produtores de gado globalmente. Para as indústrias de laticínios o aumento de temperatura gera enormes prejuízos financeiro em todo o mundo. O estresse térmico resulta em perdas econômicas totais que variam entre US\$ 1,9 e US\$ 2,7 bilhões por ano. Estima-se que o aquecimento global reduza a produtividade animal em 25% nos países tropicais e subtropicais, responsáveis por mais da metade da produção de leite e carne (Abdelnour *et al.*, 2019); Bagath *et al.*, 2019; Collier *et al.*, 2019),

Como o estresse térmico implica em prejuízos aos animais e aos produtores, órgãos como a ONU, tem se posicionado sobre as mudanças climáticas globais, ao descrever que a temperatura ambiental teve um aumento de 1,5 °C e que está previsto para até ao final do século XXI um aumento de 0,3 a 4,8 °C (IPCC, 2018). Também é indicado que, principalmente os países em desenvolvimento tendem a ser mais vulneráveis a eventos climáticos extremos, pois dependem em grande parte de setores sensíveis ao clima, como agricultura Das *et al.*, (2016).

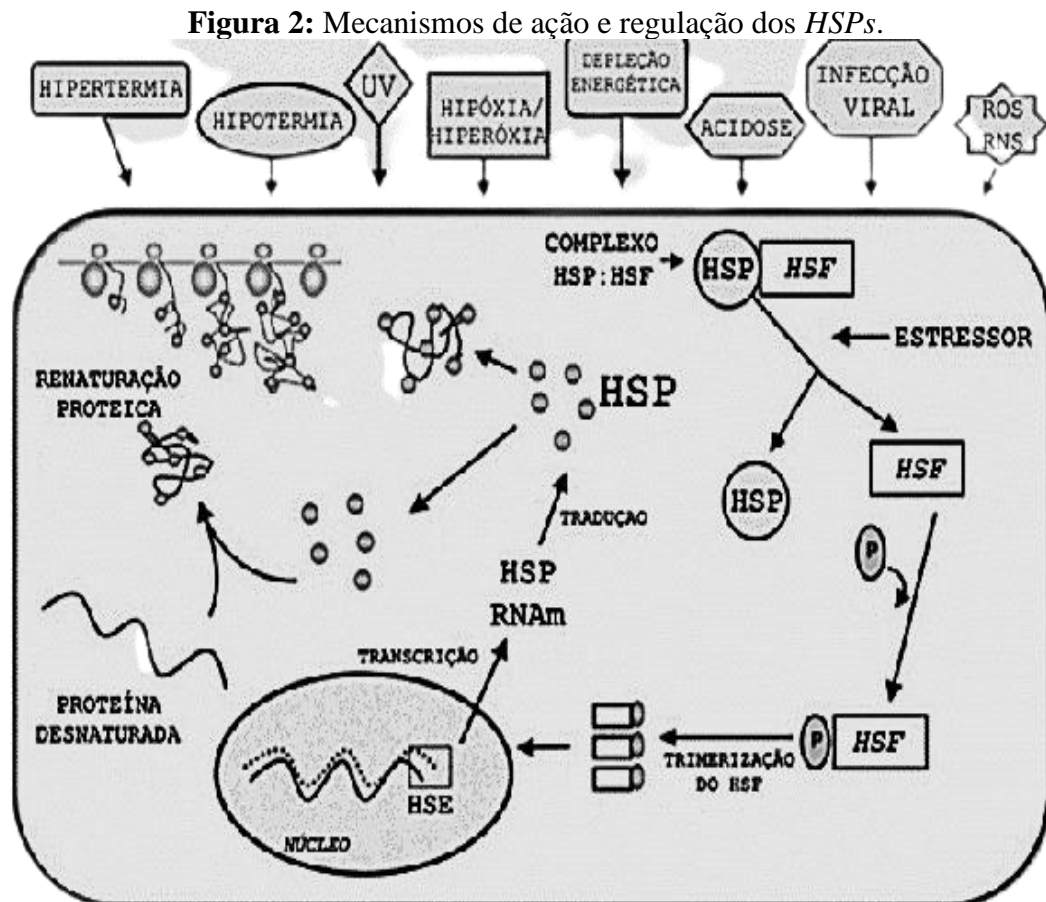
Para Das *et al.*, (2016), a mudança de temperatura é uma das principais ameaças à sobrevivência de várias espécies, ecossistemas e à sustentabilidade dos sistemas de produção pecuária em todo o mundo, especialmente em países tropicais e temperados. As condições ambientais variam de acordo com as localizações geográficas, mas o impacto nos trópicos e regiões subtropicais é profundo (Wankar *et al.*, 2021).

2.6 Relação de HSPs e estresse térmico

O estresse térmico aumenta a expressão das HSPs afim de melhorar a resistência das células ao aumento de temperatura ambiente, promovendo contra a morte celular ou danos a mesma (Hu *et al.*, 2016). As proteínas de choque térmico, fazem parte de uma grande família e funcionam como chaperonas moleculares, as quais modulam a resposta ao estresse térmico e minimizam lesões celulares (Araújo *et al.*, 2020).

Os genes HSPs promovem proteção contra danos celulares, alívio de tensões como esgotamento energético, citocinas, isquemia e desenvolvimento de termotolerância (Hassan *et al.*, 2019). No entanto, a função mais crucial dessa proteína é a proteção ao choque térmico através da resistência contra a desnaturação de proteínas celulares (Feder *et al.*, 1999).

A resposta celular ao estresse térmico inclui a ativação de fatores de choque térmico, melhoramento da expressão das *HSPs*, aumento dos níveis de oxidação de aminoácidos e glicose, redução do metabolismo de ácidos graxos e estimulação dos sistemas imunológico e endócrino através da secreção extracelular de (Raza *et al.*, 2021).



Fonte: Google

Quando em estresse, os níveis de *HSPs* aumentam em até 15% do que o total de proteínas intracelulares, sendo seu nível normal de 5% (Pawar *et al.*, 2014) e estão presentes em abundância tanto nas células procarióticas como em eucarióticas (Hooper, 2015), os genes *HSP70* e *HSP90* são observados em todos seres vivos. As *HSPs* são dependentes de triptofato de adenosina e são classificadas de acordo com sua massa molecular que varia entre 10 e 100 kDA, e são representadas pela família *HSP10*, *HSP40*, *HSP70*, *HSP90*, *HSPB1*, *HSPD* e *HSPH1* (Rehman, 2020).

Recentemente, foi proposta uma nova classificação baseada em letras/números para simplificar e universalizar a nomenclatura dos *HSPs*. Por exemplo, os nomes anteriores das famílias *HSP* – *HSP70*, *HSP90*, *HSP110* e pequenos *HSPs* (*sHSPs*) – que ainda são utilizáveis na comunidade científica, foram referidos como *HSPA*, *HSPC*, *HSPH* e *HSPB*,

respectivamente. Além disso, os membros de cada família receberam números como HSPA1, HSPA2, HSPA6, HSPA8. (Kampinga *et al.*, 2009 *apud* Hoter, *et al.*, 2018).

2.7 HSPs em búfalos

Por meio de análises de bioinformática, observou-se que o *HSP70* em búfalos está localizado nos cromossomos 2 e 20, respectivamente, e contém dois exons ligados por um intron (Raza *et al.*, 2021).

Já o *HSP90- α* em búfalos está localizado no cromossomo 20 e 23, entretanto, o gene *HSP90- β* está localizado nos mesmos cromossomos do *HSP70* e contém 12 exons intercalados por 11 introns em todos os animais estudados (Hooper, 2015).

Entre as *HSPs*, destaca-se a proteína de massa molecular de 70 KDa, sendo a mais abundante e altamente conservada. Esta família é codificada pelo gene *HSP70* e possuem proteínas que variam entre 68 a 73 KDa de massa molecular (Gade *et al.*, 2010). Apesar de possuírem pesos moleculares semelhantes, essas moléculas possuem padrões de induções e expressão genica distintas (Castro, 2013).

As *HSP70* auxiliam nos processos de dobramento de proteínas nas células e no controle de qualidade de proteínas desdobradas e no dobrável co-e pós-transacional de proteínas recém-sintetizadas. Além disso, estão relacionadas com vias de transdução de sinais que controlam a homeostase celular, a proliferação, a diferenciação e a morte celular (Mayer e Bukau, 2015).

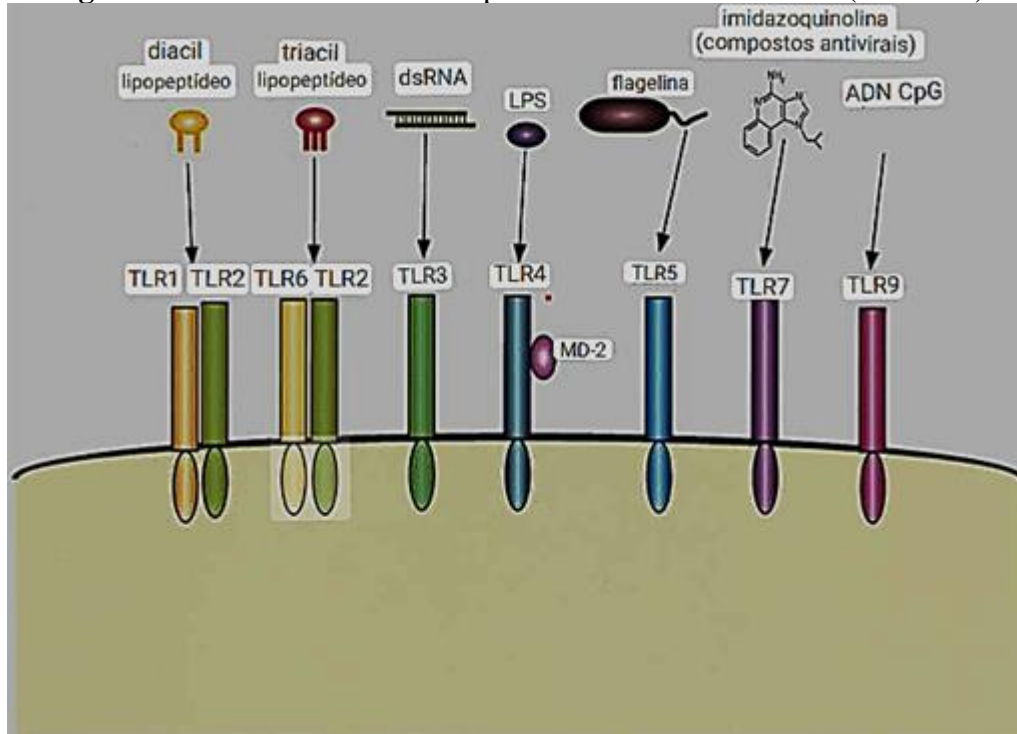
Os *HSP90* são chaperonas moleculares que promovem o dobramento de proteínas sintetizadas de novo ou dobradas incorretamente, neutralizando a sua agregação e representam cerca de 1-2% do total de proteínas celulares de mamíferos sob condições não estressantes. Em mamífero há dois membros de *HSP90*, o *HSP90* alfa e *HSP90* beta, ambos se encontram localizadas no citoplasma, reticulo endoplasmático e nas mitocôndrias. Ademais, induzem a imunidade adaptativa pela ativação de células apresentadoras de antígenos e células dendríticas (Hoter, *et al.*, 2018). As proteínas de choque térmico não só desenvolvem termotolerância em espécies pecuárias, como gado leiteiro, mas também considerados um potencial marcador biológico para quantificar a magnitude do estresse térmico em diferentes espécies pecuárias (Rehman *et al.*, 2020).

2.8 TLR-2 e TLR-4

Os *Toll-likes* fazem parte de uma família de receptores de membrana celular e são fundamentais para o funcionamento do sistema imunológico. Cada receptor tem um

determinado papel, iniciado através de suas propriedades ligantes e são importantes nas vias de sinalização celular e no perfil de síntese de citocinas. Qualquer tipo de alteração nas propriedades ligantes pode acarretar o aumento da susceptibilidade a infecções e desregulação anti-inflamatórias (Fernandes, 2019).

Figura 3: Conhecimento dos receptores de membrana celular (*Toll likes*)



Fonte: Kiyoshi T. e Shizuo A., 2003.

Os receptores *Toll likes* (*TLRs*) são proteínas de transmembrana tipo 1 expressas em quase todos os tipos de células e ativam o sistema imunológico inato (Shivakumara *et al.*, 2018). Essas proteínas possuem três domínios: 1 - domínio intracelular do receptor Toll/interleucina, que fornece transmissão de sinal da superfície celular para proteínas adaptadoras; 2 - domínio transmembranar; e 3 - domínio extracelular com repetições ricas em leucina, responsáveis pelo reconhecimento do ligante. Os *TLR-2* e *TLR-4* são receptores associados à membrana envolvidos no reconhecimento de lipídeos (Sidletskaya *et al.*, 2020).

Os membros da família *Toll like* são divididos em dois de acordo com a sua localização celular. *TLR-1*, *TLR-2*, *TLR-4*, *TLR-5*, *TLR-6* e *TLR-11* são expressos exclusivamente na superfície celular e reconhecem componentes da membrana microbiana, enquanto *TLR-3*, *TLR-7*, *TLR-8* e *TLR-9* estão localizados em vesículas intracelulares, como o endossomo ou lisossomo e o retículo endoplasmático (Sidletskaya *et al.*, 2020).

Os *Toll likes* já foram descritos por diversos autores que demonstram o padrão de expressão de mRNAs de *TLR* em búfalos, caprinos e bovinos e ovinos. Elas são expressas principalmente nas células apresentadoras de antígenos, como macrófagos, monócitos, linfócitos B e células dendríticas e possui um papel fundamental na indução do sistema imune inata durante o estresse térmico em caprinos (Abdelnour *et al.*, 2019).

O estresse térmico desencadeia uma série de resposta celular iniciada por meio de proteínas de choque térmico, que por sua vez pode sinalizar os receptores *Toll likes*, esses receptores e *HSPs* possivelmente desempenham um papel significativo no combate ao efeito deletério do estresse térmico, de modo a manter a homeostase e como os *HSPs* são os ligantes endógenos de *TLR-2* e *TLR-4*, eles desempenham um papel essencial na ativação do sistema imunológico dos seres vivos durante o estresse térmico (Avishek *et al.*, 2015).

3 Referencias

- AMARAL, F. R. et al. **Qualidade do leite de búfalas: composição.** Revista Brasileira de Reprodução Animal, v.29, n. 2, p. 106-110, 2005.
- ARAÚJO, M. D. S. et al. **Caracterização do gene do choque térmico (HSP-70.1) e sua relação com características de produção em bovinos leiteiros criados no semiárido brasileiro.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. v.72, n.3, p.985-992, 2020.
- 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.
- ARCHANA, P. R. et al. **Role of heat shock proteins in livestock adaptation to heat stress.** J. Dairy Vet. Anim. Res. v.5, n.1, p.13-19, 2017.
- AVISHEK, P. S.S. et al. **Expression of TLR genes in Black Bengal goat (Capra hircus) during different seasons.** Small Ruminant Research. v.124, p.17-23, 2015.
- BERNABUCCI, U. et al. **Metabolic and hormonal acclimation to heat stress in domesticated ruminants.** Animal. v.4, n.7, p.1167-1183, 2010.
- BAGATH, M. et al. **The impact of heat stress on the immune system in dairy cattle: A review.** Research in Veterinary Science, v.126, p.94-102, 2019.
- BRASIL. **Instrução Normativa nº 68 de 2006. Oficializar os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos.** Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, 14 dez. 2006.
- BRITO, J. R. F.; DIAS, J. C. **A qualidade do leite. Juiz de Fora (Brasil):** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1998
- CASTRO, S.V. et al. **Proteínas de choque térmico Hsp70: estrutura e atuação em resposta ao estresse celular.** Acta Vet. Bras., v.7, p.261-271, 2013.
- CAVALCANTE, P. **Avaliação da produção, composição química e indicadores de qualidade do leite de búfalas criadas no semiárido nordestino.** Orientador: Maria Ribeiro. Dissertação (mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2019.
- CAVALI, J.; PEREIRA, R. G. A. **Produção leiteira de búfalos.** SALMAN, A. K. D.; FEIFER, L. F. M. P. (ed.). **Pecuária. Leiteira na Amazônia.** Brasília: Embrapa, 2020, p.391-399.
- COLLIER, R. J. et al. **Heat stress: physiology of acclimation and adaptation.** Animal Frontiers. v.9, ed.1, p.12–19, 2019.
- CRUZ, L. V. et al. **Zefeitos do estresse térmico na produção leiteira: revisão de literatura.** Revista científica eletrônica de medicina veterinária. Ano IX, n.16, 2011. Periódicos Semestral. Disponível em: http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/3Kbw8tpmIaJpspv_2013-626-10-55-41.pdf. Acesso em: 18 de agosto, 2022.
- DAMASCENO, F. A. et al. **Adaptação de bubalinos ao ambiente tropical.** Revista Eletrônica Nutritime, Artigo 125. v.7, n.5, p.1370-1381, 2010.
- DAS, R. et al. **Impact of heat stress on health and performance of dairy animals: A review.** Veterinary World. v.9, n.3, p.260-268, 2016.

- FANG, H. et al. **Toll-like receptor 4 (TLR4) is essential for Hsp70-like protein 1 (HSP70L1) to activate dendritic cells and induce Th1 response.** *J Biol Chem.* v.286, n.35, p.30393-30400, 2011.
- FAO. **Food safety risk analysis. An overview and framework manual.** Rome, 2018. Disponível em: <[www.fao.org/docrep/i9166e/i9166e_Chapter 6 Meat.pdf](http://www.fao.org/docrep/i9166e/i9166e_Chapter_6_Meat.pdf)>. Acesso em: 22 de agosto, 2022.
- FEDER, M. E; HOFMANN, G. E. **Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology.** *Annu Rev Physiol.* v.61, p.243-282, 1999.
- FERNANDES, L. **Análise da expressão gênica das proteínas de choque térmico 60 e 70 e dos receptores Toll-like 2 e 4 em diferentes graus de displasia em portadores de queilite actínica e carcinoma epidermóide de lábio.** Orientador: Celson Jr. tese (Doutorado em Ondotologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.
- GADE, N. et al. **Molecular Characterization of Heat Shock Protein 70-1 Gene of Goat (Capra hircus).** *Molecular Biology International.* v.2010. p7, 2010.
- GERALDO, A. C. A. P. M. **Termotolerancia em fêmeas bovinas: Abordagens celular e fisiológica.** Orientador: Evaldo Titto. Tese (Doutorado em ciências) –Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.
- GONÇALVES, M. C. G.; MALPASS, G. R. P. M.; OKURA, M. H.; GRANATO, A. C. **Avaliação do shelf life para produtos lácteos nos Estados Unidos da América, Europa e Brasil.** *Revista Brasileira de Ciência, Tecnologia e Inovação, Uberaba - MG,* v. 4, n. 3, p. 267–283, 2019
- HASSAN, F. et al. **Prospects of HSP70 as a genetic marker for thermo-tolerance and immuno-modulation in animals under climate change scenario.** *Animal nutrition.* v.5, n.4, p.340-350, 2019.
- HOOPER, H. B. **Expressão gênica de proteínas de choque térmico como marcador molecular de termotolerancia em vacas nelores.** Orientador: Evaldo Titto. Dissertação (Mestrado em ciências) –Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.
- HOTER, A. et al. **Differential Glycosylation and Modulation of Camel and Human HSP Isoforms in Response to Thermal and Hypoxic Stresses.** *Int J Mol Sci.* v.19, n.2, p.402, 2018.
- HU, H.; ZHENG Y.; CHENG, N.; WANG, J. **The effect of heat stress on gene expression and synthesis of heat-shock and milk proteins in bovine mammary epithelial cells.** *Anim Sci J.* v.87, n.1, p.84-91, 2016.
- JORGE, A. M. et al. **Correlação entre o California Mastitis Test (CMT) e a contagem de células somáticas (CCS) do leite de búfalas Murrah.** *Revista Brasileira de Zootecnia,* v. 34, n. 6, p. 2039–2045, 2005.
- JACOB, P.; HIRT, H.; BENDAHMANE, A. **The heat-shock protein/chaperone network and multiple stress resistance.** *Plant Biotechnol J.* v.15 ed.4 P. 405-424, 2017.
- JU, X. H. et al. **Heat stress upregulation of Toll-like receptors 2/4 and acute inflammatory cytokines in peripheral blood mononuclear cell (PBMC) of Bama miniature pigs: an in vivo and in vitro study.** *Animal.* v.8, n.9, p.1462-1468, 2014.

- KAMPINGA, H. H. et al. **Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins**. Cell Stress Chaperones. v.14, n.1, p.105-11, 2009.
- KAPILA, N. et al. **Impact of Heat Stress on Cellular and Transcriptional Adaptation of Mammary Epithelial Cells in Riverine Buffalo (Bubalus Bubalis)**. Plos One. v.13, n.1, p.157237, 2016.
- KHAN I. T. et al. **Antioxidant properties of Milk and dairy products: a comprehensive review of the current knowledge**. Lipids Health Dis. v. 18, ed. 41. p. 4-18, 2019.
- LIMA, T. C. C. et al. **Composição e qualidade do leite e do soro do leite de bufalas no estado do rio grande do Norte**. Acta Veterinaria Brasilica, v.8, n.1, p.25-30,2014.
- MAPA. **Apresentação do Projeto de Melhoria da Competitividade do Setor Lácteo Brasileiro**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/camaras-setoriais/documentos/camaras-setoriais/leite-e-derivados/anos-antiores/projetodemelhoria-de-competitividade.pdf>. Acesso em 21 de agosto, 2022.
- MARÓTI, A. Á. et al. **Possible genetic sign of heat stress adaptation in Hungarian Grey Bos taurus breed**. Acta Biol. Hung., v.62, n.1, p.65-72. 2011.
- MAYER, M. P; Bukau, B. **Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism**. Cell Mol Life Sci. v.62, n.6, p.670-684, 2005.
- MULLER, T.; REMPEL, C. **Quality of bovine milk produced in Brazil – physical-chemical and microbiological parameters: an integrative review**. Vigilância Sanitária em Debate, vol. 9, núm. 3, pp. 122-129, 2021 INCQS-FIOCRUZ.
- NORO, G. et al. **Fatores ambientais que afetam a produção e a composição do leite em rebanhos assistidos por cooperativas no Rio Grande do Sul**. Revista Brasileira de Zootecnia, v. 35, n. 3, p. 1129–1135, 2006.
- PAWAR, H. N. et al. **Heat and cold stress enhances the expression of heat shock protein 70, heat shock transcription factor 1 and cytokines (IL-12, TNF- α and GM-CSF) in buffaloes**. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. v.3, n.21, p.307-317, 2014.
- Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas., 2018. Relatório especial: **o aquecimento global de 1,5°C e o relatório de síntese de mudanças climáticas**, 2018. Disponível em <https://www.ipcc.ch/site/assets/uploads/2019/07/SPM-Portuguese-version.pdf>. Acesso em 17 de agosto, 2022.
- PATEL, A. S. et al. **Total carotene content and quality characteristics of pumpkin flavoured buffalo milk**. Heliyon. v6, n.7, p.04509, 2020.
- POZZATT P. N. **Perfil bioquímico, microbiológico e celular do leite de vacas girolandas do parto aos 180 dias de lactação**. Orientador: Fabíola de Oliveira Paes Leme Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária. Belo Horizonte, 2014.
- RAZA, S. H. A. et al. **In silico genomic and proteomic analyses of three heat shock proteins (HSP70, HSP90- α , and HSP90- β) in even-toed ungulates**. Electronic Journal of Biotechnology. v.53, p.61-70, 2021.
- REHMA, S. U. et al. **Genomic Identification, Evolution and Sequence Analysis of the HeatShock Protein Gene Family in Buffalo**. Genes. v.11, n.11, p.1388, 2020.

- RICCI, G. D; DOMINGUES, P. F. **O leite de búfala. Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP.** Journal of Continuing Education in Animal Science of CRMV-SP. v.10, n.1, p.14-19, 2012.
- TANAMATI, F. et al. **Differential expression of immune response genes associated with subclinical mastitis in dairy buffaloes.** Animal. V.13, n.8, P.651-1657, 2019.
- TAVEIRA, R. Z. et at. **Avaliação da tolerância ao calor em búfalas leiteiras da raça Murrah.** Revista Espacios, v.38, n.18.p15.2018.
- SEIXAS, V. et al. **DIAGNÓSTICO SOCIOECONÔMICO DOS PRODUTORES DE QUEIJOS DO MARAJÓ.** Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes, v. 69, n. 5, p. 309-321, 2014
- SIDLETSKAYA, K.; VITKINA, T.; DENISENKO, Y. **The Role of Toll-Like Receptors 2 and 4 in the Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease.** Int J Chron Obstruct Pulmon Dis. v.23, ed.15, p.1481-1493, 2020.
- SKRZYPEK, R.; WÓJTOWSKI J.; FAHR D. **Factors affecting somatic cell count in cow bulk tank milk - A case study from Poland.** Journal of Veterinary Medicine Serries A: Physiology Pathology Clinical Medicine, v.51, p.127-131, 2004.
- SHIVAKUMARA, P. N. et al. **Uma, Molecular characterization and differential mRNA expression profiling of Toll-like receptor-2 gene in Vechur (Bos indicus) and crossbred (Bos indicus X Bos taurus) cattle of Kerala in response to anthrax vaccination.** Meta Gene. v.16, ed.1, p. 15-20, 2018.
- SGORLON, S. et al. **Factors affecting milk cortisol in mid lactating dairy cows.** BMC Vet Res. v.11, ed. 259 2015.
- PEGOLO, S. D. et al. **Cecchinato, Associations between differential somatic cell count and milk yield, quality, and technological characteristics in Holstein cows.** Journal of Dairy Science. v.104, ed. 4, p.4822-4836, 2021.
- VILELA, D. et al. **Para onde caminha o leite.** Revista Balde. Branco, n. 603, p. 41-43, jan. 2015.
- Zhang, X. Et al. **Evaluation of type traits in relation to production, and their importance in early selection for milk performance in dairy buffaloes.** Animal. v.16, ed.11 p. 100653,2022.
- WANKAR, A. K.; RINDHE S. N.; DOJAD N. S. **Heat stress in dairy animals and current milk production trends, economics, and future perspectives: the global scenario.** Trop Anim Health Prod. v.53, ed.70, 2021.
- WU, J. et al. **Heat Shock Proteins and Cancer, Trends in Pharmacological.** Sciences. v.38, ed.3, p226-256, 2017.

CAPÍTULO 2 – Avaliação bioquímica e de expressão gênica do leite de búfalas (*Bubalus bubalis*) no Pará, Brasil

Title: Biochemical and gene expression evaluation of the Milk from dairy buffalo (*Bubalus bubalis*) in Pará, Brazil

Resumo: No Brasil, a produção de leite de búfala encontra-se em expansão por conta de sua qualidade e pela natureza rústica dos búfalos. Assim como outros ruminantes, os búfalos também são suscetíveis ao calor exibindo alterações fisiológicas e comportamentais características do estresse térmico. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar os parâmetros bioquímicos e moleculares do leite e sangue a fim de relacionar com possíveis impactos do estresse térmico na produção e qualidade do leite em grupos de búfalas (*Bubalus bubalis*) com diferentes médias de produção diária de leite na fazenda Bubrás (Bujaru, Pará, Brasil). Foram selecionados dois grupos exibindo diferentes médias de produção diária de leite: grupo com maior média, MAp (n=6; 5.93 litros/dia) e com menor média, MEp (n=6; 3.46 litros/dia). As búfalas foram mantidas em condições iguais de manejo para a coleta do leite (40 ml) e sangue (5 ml). Brevemente foram feitas a análise composicional do leite, como teores de gordura, proteína e lactose por meio de espectrometria de absorção no infravermelho médio (ISO 9622 | IDF 141); a análise de contagem de células somáticas (CCS) por Citometria de fluxo (ISO 13366-2 | IDF 148-2); quantificação de cortisol em plasma sanguíneo por radioimunoensaio e; análise de expressão dos genes *HSP70*, *HSP90 α* , *HSP90 β* , *TLR-2* e *TLR-4*. Os dados de produção, composição bioquímica, CCS e cortisol foram comparados empregando teste t de Student e teste linear de Pearson, com significância de 0.05. Quanto a análise bioquímica do leite os percentuais de lipídeos (5.80 ± 0.04 versus 4.87 ± 0.1 , $p=0.69$), proteínas (4.16 ± 0.07 versus 4.61 ± 0.05 , $p=0.13$) e lactose (4.74 ± 0.05 versus 4.43 ± 0.04 , $p=0.83$) não diferiram entre os grupos MAp e MEp, respectivamente. Também não diferiram quanto a CCS (MAp $106.4 \times 10^3/\text{ml} \pm 0.07$ versus MEp $139 \times 10^3/\text{ml} \pm 0.1$, $p=0.36$) a qual ficou abaixo de 200 mil células/ml caracterizando ausência de infecção por mastite clínica e subclínica. Já o cortisol também não diferiu entre os grupos MAP e MEp ($0.67 \mu\text{g/dL} \pm 0.01$ versus $0.79 \mu\text{g/dL} \pm 0.2$, $p=0.12$). Quanto as concentrações de cortisol estão dentro dos valores de normalidade de até $2 \mu\text{g/dl}$, ou seja, não indicaram estresse fisiológico. Já as análises de expressão de todos os genes, ou seja, *HSP70* (0.96 MEp versus 0.58 MAp), *HSP90 α* (0.98 MEp versus 0.03 MAp), *HSP90 β* (0.95 MEp versus 0.48 MAp), *TLR-2* (1.02 MEp versus 0.16 MAp) e *TLR-4* (1.26 MEp versus 0.07 MAp) foi maior no grupo MEp comparado ao MAp, respectivamente ($p < 0,05$). Por fim, não houve correlação entre produção de leite e os parâmetros bioquímicos de lipídeo ($r=0.12$, $p=0.7$), proteína ($r=-0.26$, $p=0.41$), lactose ($r=0.46$, $p=0.12$) e nem cortisol ($r=-0.42$, $p=0.17$), mas apresentaram correlação entre produção e *HSP90 α* ($r=-0.89$, $p=0.0001$),

HSP90 β ($r=-0.66$, $p=0.018$), *TLR-2* ($r=-0.72$, $p=0.001$) e *TLR-4* ($r=-0.67$, $p=0.01$). Logo, baseado nos parâmetros estudados não podemos afirmar que as búfalas se encontravam em situação de estresse térmico. Contudo, o grupo MEp apresentou expressão elevada de todos os genes, indicando estresse celular e este impactando diretamente na produtividade. Por outro lado, podemos afirmar que, apesar da diferença de produção entre os grupos, a qualidade do leite se manteve inalterada. Como não encontramos correlação entre produção e os demais parâmetros analisados e, além disso, as búfalas estavam sob as mesmas condições de manejo, então a diferença de produção entre os grupos pode estar relacionada a fatores genéticos e não ambientais. Concluimos que, neste estudo, houve relação entre estresse térmico com produção, entretanto, não houve relação entre estresse térmico e qualidade do leite.

Palavras-chaves: Produção e qualidade do leite; Estresse térmico; *HSPs*; *Toll like*.

Abstract: In Brazil, buffalo milk production is expanding due to its quality and the rustic nature of buffaloes. Like other ruminants, buffaloes are also susceptible to heat, exhibiting physiological and behavioral changes characteristic of heat stress. In this context, the objective of this study was to evaluate the biochemical and molecular parameters of milk and blood in order to relate to possible impacts of thermal stress on the production and quality of milk in groups of buffaloes (*Bubalus bubalis*) with different averages of daily milk production at the Bubrás farm (Bujaru, Pará, Brazil). Two groups exhibiting different averages of daily milk production were selected: the group with the highest average, MAp (n=6; 5.93 liters/day) and the group with the lowest average, MEp (n=6; 3.46 liters/day). The buffaloes were kept under the same management conditions for the collection of milk (40 ml) and blood (5 ml). The compositional analysis of the milk was briefly carried out, such as fat, protein and lactose contents through by mid-infrared absorption spectrometry (ISO 9622 | IDF 141); analysis of somatic cell count (SCC) by flow cytometry (ISO 13366-2 | IDF 148-2); quantification of cortisol in blood plasma by radioimmunoassay and ; expression analysis of the genes *HSP70*, *HSP90 α* , *HSP90 β* , *TLR-2* and *TLR-4*. Production data, biochemical composition, CCS and cortisol were compared using Student's t test and Pearson's linear test, with a significance of 0.05. As for the biochemical analysis of milk, the percentages of lipids (5.80 ± 0.04 versus 4.87 ± 0.1 , $p=0.69$), proteins (4.16 ± 0.07 versus 4.61 ± 0.05 , $p=0.13$) and lactose (4.74 ± 0.05 versus 4.43 ± 0.04 , $p=0.83$) did not differ between MAp and MEp groups, respectively. They also did not differ in terms of CCS (MAp $106.4\times 10^3/\text{ml}\pm 0.07$ versus MEp $139\times 10^3/\text{ml}\pm 0.1$, $p=0.36$) which was below 200,000 cells/ml, characterizing the absence of clinical and

subclinical mastitis infection. Cortisol also did not differ between the MAP and MEp groups ($0.67\mu\text{g/dL}\pm 0.01$ versus $0.79\mu\text{g/dL}\pm 0.2$, $p=0.12$). When cortisol concentrations are within the normal range of up to $2\mu\text{g/dl}$, that is, they did not indicate physiological stress. The expression analyzes of all genes, that is, *HSP70* (0.96 MEp versus 0.58 MAP), *HSP90 α* (0.98 MEp versus 0.03 MAP), *HSP90 β* (0.95 MEp versus 0.48 MAP), *TLR-2* (1.02 MEp versus 0.16 MAP) and *TLR-4* (1.26 MEp versus 0.07 MAP) was higher in the MEp group compared to the MAP group, respectively ($p<0.05$). Finally, there was no correlation between milk production and the biochemical parameters of lipid ($r=0.12$, $p=0.7$), protein ($r=-0.26$, $p=0.41$), lactose ($r=0.46$, $p=0.12$) and neither cortisol ($r=-0.42$, $p=0.17$), but correlated between production and *HSP90 α* ($r=-0.89$, $p=0.0001$), *HSP90 β* ($r=-0.66$, $p=0.018$), *TLR-2* ($r=-0.72$, $p=0.001$) and *TLR-4* ($r=-0.67$, $p=0.01$). Therefore, based on the parameters studied, we cannot state that the buffaloes were in a situation of thermal stress. However, the MEp group showed high expression of all genes, indicating cellular stress and this directly impacting productivity. On the other hand, we can say that, despite the difference in production between the groups, the quality of the milk remained unchanged. As we found no correlation between production and the other analyzed parameters and, in addition, the buffaloes were under the same management conditions, then the difference in production between the groups may be related to genetic and not environmental factors. We conclude that, in this study, there was a relationship between thermal stress and production, however, there was no relationship between thermal stress and milk quality.

Keywords: Milk production and quality; Thermal stress; *HSPs*: *Toll like*.

Introdução

As búfalas são a segunda maior fonte de produção de leite no mundo, perdendo apenas para vacas e contribuem com 11% do total da produção mundial de leite (Zhang *et al.*, 2022). No cenário atual de mudanças climáticas, o aumento da temperatura e umidade tem sido um perigo constante para a produtividade leiteira em búfalos (Hassan *et al.*, 2019), e outros ruminantes nos países tropicais e subtropicais (Mishra, 2021). Pois, embora os búfalos apresentem grande adaptação aos ambientes, também sofrem os efeitos da exposição à radiação solar direta ou ao trabalhar por longos períodos ao sol quente (Kapila *et al.*, 2016).

O perigo está em longos períodos de exposição a alta temperatura que podem induzir o estresse térmico e, levar a diminuição da produtividade animal (Hassan *et al.*, 2019). A literatura relata que, em animais leiteiros, o estresse térmico pode prejudicar a produtividade e qualidade do leite (Kapila *et al.*, 2016; Collie *et al.*, 2019; Daltro *et al.*, 2020). E como qualidade do leite entende-se também parâmetros como a análise de sua composição (Arbello *et al.*, 2021), e a quantificação de células somáticas que também é um importante parâmetro de sanidade do leite (Pegolo *et al.*, 2021). Porém poucos estudos relataram a relação do estresse térmico com a qualidade do leite no Brasil e muito menos na região amazônica (Vinicio *et al.*, 2021).

O estresse térmico ativa várias respostas fisiológicas nos animais como o aumento da sudorese, a secreção de hormônio cortisol, dentre outros (Becker *et al.*, 2020; Raza *et al.*, 2021). Além disso, ativa respostas em nível celular através da transcrição gênica em diferentes tecidos ou células animais (Kapila *et al.*, 2016). Uma das respostas ao estresse térmico ocorre por meio do aumento da expressão de proteínas de choque térmico (*HSPs*) em búfalos (Lan *et al.* 2022) e outras espécies animais (Astakhova *et al.*, 2015; Hall *et al.*, 2016). Pois as *HSPs* auxiliam no dobramento de proteínas recém-sintetizadas, e se relacionam com vias de transdução de sinais que controlam a homeostase celular, a proliferação, a diferenciação e a morte celular (Mayer & Bukau, 2005).

Outra resposta celular ao estresse é a ativação do sistema imunológico através da expressão de receptores *Toll likes* (*TLR-2* e *TLR-4*) os quais são ligantes endógenos de *HSPs*, e juntos atuam no combate aos efeitos deletérios do estresse térmico na célula (Avishek *et al.*, 2015). A expressão mediada por *HSPs* contribui para o papel anti-inflamatório por meio de mecanismos dependentes de *TLR2* e *TLR4* (Khandia *et al.*, 2017).

Dado o exposto, neste estudo, objetivamos elucidar o papel do estresse térmico na produtividade e qualidade leiteira de búfalas (*Bubalus bubalis*). Para tanto, foram avaliados indicadores fisiológicos (cortisol sérico) e celulares (expressão gênica) de estresse e suas

relações com a qualidade de leite em grupos de búfalas com diferentes produtividades e submetidas a temperatura ambiente elevada.

Materiais e Métodos

Local, animais e delineamento experimental

Este estudo foi realizado na fazenda Experimental da Bubrás, que se encontra localizada no município de Bujaru (Pará, Brasil) a 87 kms da capital Belém (coordenadas geográficas - latitude: -1.52123 e longitude: -48.04414), a temperatura local variou de 22 °C a 32 °C (Weather Spark). Todos os procedimentos de coleta foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural da Amazônia (Ceua/UFRA), com processo nº 2820150222 / 2022 (Anexo 1).

Foram selecionadas 12 fêmeas saudáveis, com idade entre 46 a 112 meses. Os animais foram mantidos em pastagens próximas ao curral de manejo durante todo período experimental, com espaço coberto (sombreamento). Para o estudo os animais foram classificados conforme as médias de produção de leite por dia medida ao longo do período de 3 meses de ordenha (meses de agosto a outubro), segundo os dados coletados na própria fazenda. O grupo de maior produtividade, MAp (n=6) exibiu média de produção de 5,93 litros e o grupo de menor produtividade, MEp (n=6) exibiu média de 3,46 litros de leite por dia.

A coleta do leite foi realizada manualmente utilizando luvas estéreis e empregando o procedimento pós *dipping* nas mamas para evitar possível contaminação. Foram coletadas 40 mL de leite para a realização das análises de composição bioquímica, 30 mL para análise de expressão gênica relativa, além de 5 mL de amostras de sangue periférico obtida da veia cava caudal para dosagem de cortisol. As amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Biologia Molecular da UFRA onde foram feitas as análises moleculares, para o Laboratório de Engenharia de Alimento da UFPA onde foram feitas as análises centesimais e contagem de células somáticas, e ao Laboratório Ânimavet Medicina Veterinária Diagnóstica LTDA, Belém para a quantificação do cortisol.

Análises da qualidade do leite e CCS

As amostras individuais de leite foram coletadas em frascos estéreis de 40 mL contendo conservante Bronopol e deixado por 10 minutos a temperatura ambiente até o bronopol ser completamente dissolvido, em seguida armazenadas em caixa térmica com temperatura de 6°C para transporte até o Laboratório de Engenharia de Alimento da UFPA.

Todas as amostras de leite foram analisadas em duplicata no equipamento automático Bentley Instruments Inc. Modelos: Dairy Spec FT e Somacount FC (Bentley Instruments, Inc. Minnesota, EUA). Para tanto, o equipamento foi devidamente calibrado com as seguintes soluções: solução buffer adicionada de Triton™ X-100 a 0.1% em volume final de 10 L de água destilada a 50°C; Solução corante - Somaglo a 0.25% diluída em solução Buffer; e solução sanitizante alcalina 2% composta de RBS™ Detergente para limpeza e calibração do equipamento. Após a calibração, as amostras de leite foram aquecidas a 40°C em banho termostático e processadas para medir as absorbâncias e, assim estimar o teor de lipídeo, proteína e lactose. As análises de composição bioquímica de lipídeo, proteínas e lactose foram feitas empregando o método analítico de composição centesimal por meio de espectrometria de absorção no infravermelho médio (ISO 9622 | IDF 141), enquanto para a contagem de células somáticas (CCS) foi empregado o método de Citometria de fluxo (ISO 13366-2 | IDF 148-2).

Medição do cortisol

A coleta de 5 mL de sangue obtido da veia cava caudal foi feita usando tubos a vácuo com heparina, durante o período da tarde e após a ordenha do dia. Foram armazenadas em caixa térmica em temperatura de 6 °C e encaminhadas ao Laboratório Ânimavet Medicina Veterinária Diagnóstica LTDA (<http://animavetpa.com.br/>, Belém, Pará) para a quantificação de cortisol. Foi utilizado o Kit de radioimunoassay de cortisol animal (Beijing North Institute of Biological Technology, Pequim, China) para determinar o nível de cortisol no plasma sanguíneo de cada animal (5 µl), de acordo com as instruções do fabricante. A radioatividade foi medida utilizando um contador gama (Cobra 5005; Perkin Elmer Vida e Ciências Analíticas, Pequim, China). Em seguida, os valores foram calculados por interpolação a partir das curvas padrão usando o software RiaSmart (PerkinElmer Life and Analytical Sciences).

Análise da expressão gênica

Separação da gordura do leite e isolamento do RNA

Primeiramente, foi realizada a separação da gordura do leite, para isso 600 µl de leite contidos em tubos de 1,5 mL foram centrifugados a 12000 rpm a 4°C por 8 minutos. A gordura sobrenadante foi removida cuidadosamente com uma espátula e o leite restante foi transferido para novos tubos aos quais foi adicionado 600 µl de Trizol® e armazenados a -80°C por 1 hora para potencializar o efeito do trizol. Em seguida, foram descongelados a temperatura ambiente para a extração do RNA total usando o método Trizol conforme descrito por Chomczynski & Sacchi, (1987) com modificações. A pureza do RNA foi realizada usando Espectrofotômetro

(Biodrop μ Lite, Biodrop, Cambridge, Inglaterra) e calculada com base na razão de absorção, as amostras com razão de 1,6 a 1,9 foram consideradas adequadas para análise.

Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-PCR)

O RNA total extraído (1 μ g) de células do leite foi transcrito reversamente em DNA complementar (cDNA) usando o kit de síntese de cDNA Revert (Thermo Scientific, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante. Foram utilizados Primers específicos para *GAPDH*, *β -ACTINA*, *TRL-2*, *TRL-4* (Gross *et al.*, 2014; García *et al.*, 2017; Tanamati *et al.*, 2019). Os primers para as proteínas de choque térmico (*HSP70*, *HSP90 α* e *HSP90 β*) foram desenhados usando sequências homologas em búfalos, conforme descrito na Tabela 1. A especificidade dos primers foi testada através da comparação das sequências do primer e do gene correspondente em búfalos, resultando em 100% de identidade.

Tabela 1 – Primers utilizados para análise da expressão gênica.

GENES	SEQUÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS (5'-3')	AMPLICON	GENBANK
<i>HSP70</i>	F: AACATGAAGAGGCCGTGGAGG R: GTTACACACCTGCTCCAGCTCC	171 pb	JN604432.1
<i>HSP90-α</i>	F: GGCGCTGATATCTCCATGAT R: ACTTCTAGAGGCCTGGCACA	74 pb	AB072368.1
<i>HSP90-β</i>	F:ACAGCCGTTCTCTTGAGTCAC R:TGGGCAATTTCTGCCTGGAA	176 pb	NM_001034034.1
<i>GAPDH</i>	F: AGGTCATCCCTGAGCTCAACGG R:TCGCAGGAGACAACCTGGTCCTCA	199 pb	NM_001034034.2
<i>β-ACTINA</i>	F: GACATCCGCAAGGACCTCTA R: GGGCAGTGATCTCTTTCTGC	227 pb	NM_001290932.1
<i>TLR-2</i>	F: CAGTTTAACCCAGTGCCTTC R: CTCCAAAGTCTTCAGCTGCT	241 pb	AF368419.1, NM_001290891.1
<i>TLR-4</i>	F:TGCCTCCACTACAGGGACTTT R:TGGGACACCACGACAATAAC	101 pb	AY634630.1, NM_001290903.1

As reações foram feitas em duplicata usando kit qPCR SybrMaster (Cellco Biotec, São Paulo, Brasil) com adição de oligonucleotídeos iniciadores (0,5 μ M), cDNA (0,04 μ l) e água ultrapura sem nuclease em volume final de 10 μ l. As condições de ciclagem foram as seguintes: aquecimento inicial a 50°C por 2 min e 95°C por 5 min e, em seguida, o conteúdo foi amplificado por 35 ciclos na temperatura de hibridização apropriada. A temperatura de hibridização para todos os genes foi de 58°C. Foi empregado o equipamento Applied Biosystems® 7500RT-PCR (Thermo Fisher Scientific Inc, Massachusetts, EUA). O cálculo da expressão relativa foi realizado usando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Análise estatística

Os dados de produção, composição bioquímica, CCS e cortisol foram analisados por meio de estatística descritiva simples e comparados empregando teste t de Student, com nível de significância de $p < 0.05$. A quantificação relativa de todos os genes foi realizada usando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde $CT = (CT_{\text{MédioAlvo}} - CT_{\text{MédioEndógeno}}) - CT_{\text{MédioCalibrador}}$. As análises de produção, composição bioquímica, CSS, cortisol e expressão relativa foram correlacionados empregando teste linear de Pearson no software BioEstat 5.0 (Ayres, 2017).

Resultados

Produção e qualidade de leite

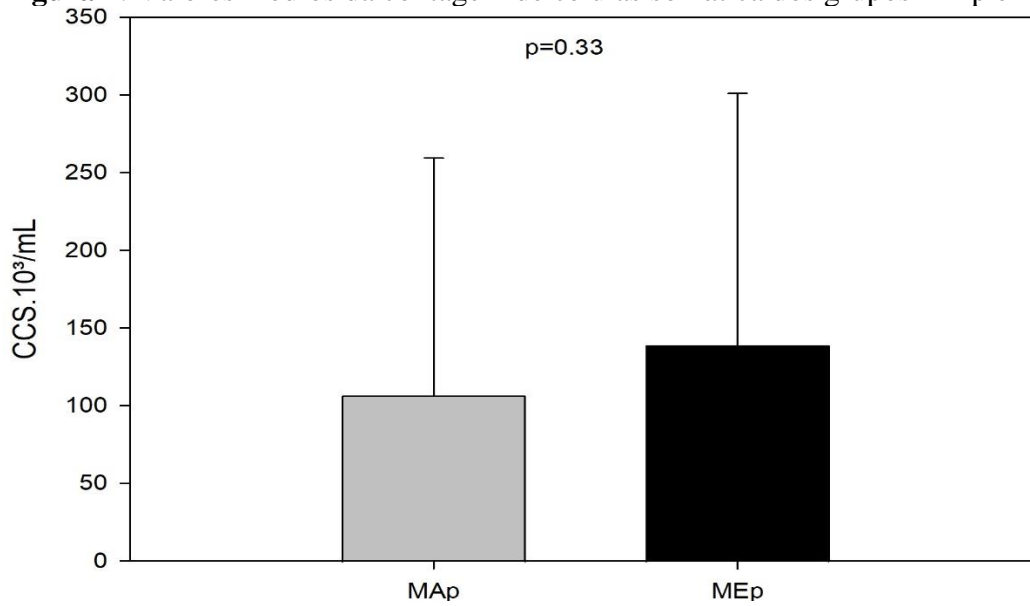
Ao avaliar os grupos de animais considerados de maior (MAp) e menor produtividade (MEp) foi observada diferença na produção medida em litros de leite por dia ($p = 0.00003$), conforme ilustrado na Tabela 2. Os grupos MAp e MEp não diferiram quanto aos parâmetros nutricionais do leite como lipídeos (5.80 ± 0.04 versus 4.87 ± 0.1 , $p = 0.69$), proteínas (4.16 ± 0.07 versus 4.61 ± 0.05 , $p = 0.13$) e lactose (4.74 ± 0.05 versus 4.43 ± 0.04 , $p = 0.83$) quantificados por litro de leite.

Tabela 2: Parâmetros de produção e qualidade de leite de búfalas do grupo de Maior (MAp) e Menor produtividade (MEp). Valores expressos em média \pm desvio padrão e valor de P.

Parâmetros	MAp Média \pm D.P.	MEp Média \pm D.P.	Valor de P.
Produção (Litros/dia)	5.93 \pm 0.1	3.46 \pm 0.4	0.00003
Proteína (%)	4.16 \pm 0.07	4.61 \pm 0.5	0.13
Lipídios (%)	5.80 \pm 0.4	4.87 \pm 0.1	0.69
Lactose (%)	4.74 \pm 0.05	4.43 \pm 0.4	0.83
CCS/mL ($\times 10^3$ células/mL)	106.4 \pm 0.07	139 \pm 0.1	0.36

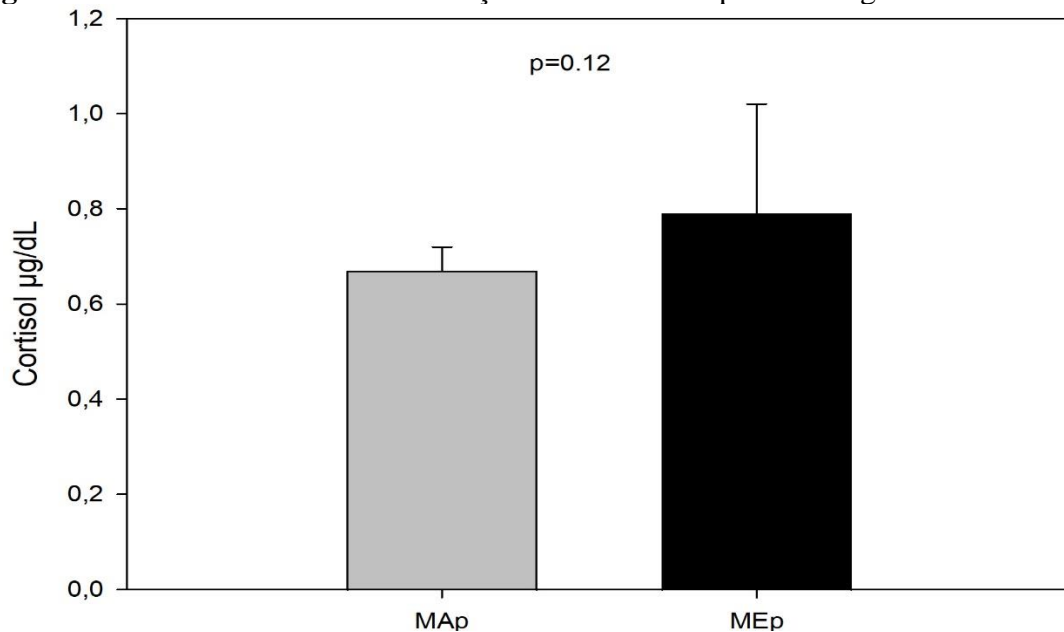
Contagem de células somática (CCS) do leite

Em relação a Contagem de células somáticas (CCS), necessária para descartar mastite clínica e subclínica, além da qualidade da glândula mamária do animal, demonstra que não houve diferença entre os grupos MAp e MEp (106.4 ± 0.07 versus 139 ± 0.1 , $p = 0.36$) conforme ilustrado na figura 1.

Figura 1: Valores médios da contagem de células somática dos grupos MAp e MEp.

Concentração de cortisol

De forma similar, a concentração de cortisol em plasma sanguíneo não diferiu entre os grupos MAP e MEp (0.67 ± 0.01 versus 0.79 ± 0.2 , $p = 0.12$) conforme ilustrado na figura 2.

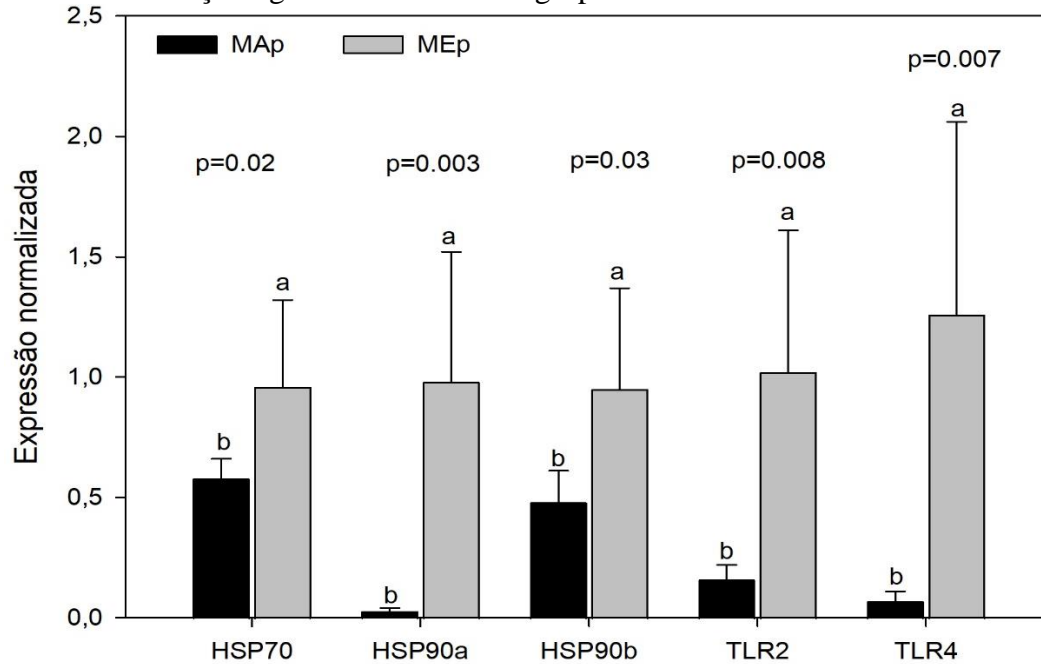
Figura 2: Valores médios da concentração de cortisol em plasma sanguíneo.

Expressão relativa de genes

A expressão relativa de todos os genes foi maior no grupo MEp comparado ao grupo MAp, como o gene *HSP70* (0.96 ± 0.36 versus 0.58 ± 0.08 , $p = 0.02$), *HSp90α* (0.98 ± 0.54 versus 0.03 ± 0.01 , $p = 0.003$), *HSP90β* (0.95 ± 0.42 versus 0.48 ± 0.13 , $p = 0.03$), *TLR-2* (1.02 ± 0.59

versus 0.16 ± 0.06 , $p = 0.008$) e *TLR-4* (1.26 ± 0.80 versus 0.07 ± 0.04 , $p = 0.007$), respectivamente, como demonstrado na figura 3.

Figura 3: Expressão relativa dos genes entre os grupos de MAp e MEp. Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os grupos.



Relação dos parâmetros de produção e qualidade com expressão de genes

Foi observada correlação negativa, ou seja, inversamente proporcional, entre produção e *HSp90α* ($p = 0.0001$; $r = -0.8$), produção e *HSP90β* ($p = 0.01$; $r = -0.6$), produção e *TLR-2* ($p = 0.001$; $r = -0.7$) e produção com *TLR-4* ($p = 0.01$; $r = -0.6$). Contudo, não houve correlação de *HSP70* com lipídeo ($p = 0.3$; $r = -0.2$), *HSP70* com proteína ($p = 0.41$; $r = -0.2$) e *Hsp70* com lactose ($p = 0.9$; $r = 0.03$). Também não houve correlação entre cortisol e CSS ($p = 0.76$; $r = 0.09$), nem entre cortisol e produção ($p = 0.17$; $r = -0.4$) e cortisol com *HSP70* ($p = 0.69$; $r = -0.1$), como demonstra a tabela 3.

Tabela 3: Coeficiente de correlação de Pearson entre os parâmetros de Produção de leite, gordura, proteína, lactose e expressão de gênese. Em ** indica significância ($p < 0.05$).

Correlação	r (Pearson)	P
Produção x <i>HSP70</i>	-0.47	0.1157
Produção x <i>HSP90α</i>	-0.89	0.0001**
Produção x <i>HSP90β</i>	-0.66	0.018**
Produção x CCS	-0.21	0.49
Produção x Cortisol	-0.41	0.17
<i>HSP70</i> x Lipídeo	-0.28	0.36
<i>HSP70</i> x Proteína	-0.26	0.41
<i>HSP70</i> x Lactose	0.03	0.90
<i>HSP70</i> x CCS	0.09	0.75
<i>HSP70</i> x Cortisol	-0.12	0.69
Cortisol x CCS	0.09	0.76
<i>TLR-2</i> x Produção	-0.72	0.001**
<i>TLR-4</i> x Produção	-0.67	0.01**
<i>TLR-2</i> x Lipídeo	-0.03	0.91
<i>TLR-2</i> x Proteína	0.37	0.22
<i>TLR-2</i> x Lactose	-0.47	0.11
<i>TLR-4</i> x Lipídeo	-0.24	0.43
<i>TLR-4</i> x Proteína	0.29	0.35
<i>TLR-4</i> x Lactose	-0.23	0.45

Discussão

Parâmetros bioquímicos e fisiológicos impactam na produção leiteira

Nesse estudo foram realizadas análises bioquímicas e molecular do leite e sangue a fim de relacionar com possíveis impactos do estresse térmico na produção e qualidade do leite em grupos de búfalas (*Bubalus bubalis*) com diferentes médias de produção. Estudos anteriores já haviam indicado a relação do estresse térmico com produção (Bhanuprakash *et al.*, 2016; Pramod *et al.*, 2021), porém os parâmetros físico-químico e fisiológicos (cortisol e expressão de genes) no leite e sangue, ainda não haviam sido medidos e relacionados. Nesse aspecto,

nosso estudo foi pioneiro em relacionar os conjuntos de dados de expressão de genes, composição química do leite e cortisol sanguíneo com a produção e qualidade leiteira. Descobrir os impactos do estresse térmico nos animais e na produção leiteira é o objetivo de diversos pesquisadores e é um assunto que vem ganhando grande proporção. Neste contexto, este estudo proporciona o avanço no entendimento da relação entre proteínas de choque térmico (*HSPs*) e a produção leiteira de búfalas, no qual é demonstrado que o grupo de animais com a menor média de produção tiveram maior expressão das proteínas de choque térmico, o que indica que esses animais estavam em condições de estresse, portanto, a fim de minimizar os danos, as células ativam os mecanismos de expressões de genes na tentativa de manter a homeostasia animal (Mayer & Bukau, 2005).

Quanto a produção de leite, ambos os grupos de búfalas (3.46 a 5.93 litros/dias) produziram médias similares a literatura que relata valores de 3.53 a 5.93 litros/dia (Gonçalves 2008; Cavalcante, 2019; Rassi *et al.*, 2019) para a espécie. A diferença de produção entre os grupos (MAp e MEp) pode ser motivado por fatores ambientais ou genéticos. Quanto aos aspectos ambientais, diversos autores relataram que a produção leiteira é influenciada por fatores como alimentação, raça e ambiente (Safari *et al.*, 2019; Castellano *et al.*, 2019; Cavalcante, 2019). Em bovinos, foi relatado que a estação do ano com maiores temperaturas influenciou negativamente a produção e qualidade do leite (Alhussien & Dang, 2018). Em outro estudo com vacas leiteiras foi relatado que a ingestão de rações contendo micotoxinas diminuiu a produção de leite, gordura, proteína e lactose no leite (Wu *et al.*, 2022). Da mesma forma, em búfalos a temperatura e umidade elevadas também ocasionaram estresse térmico e diminuição da produtividade (Choudhary & Sirohi, 2019). Portanto, a literatura indicara que os búfalos, similar aos bovinos, têm susceptibilidade ao estresse térmico podendo, inclusive, afetar sua imunidade, produção e qualidade do leite. Dessa forma, a produção animal é otimizada melhorando a qualidade da alimentação, além das condições de manejo e ambiental (Eldawy, 2021). Especialmente na Amazônia, o ambiente impacta no conforto térmico de búfalos, pois a temperatura ambiental elevada causa a diminuição da produção (revisado por Garcia *et al.*, 2023).

Embora muitos estudos sobre a produção de leite tenham sido desenvolvidos, pouco tem centrado no efeito do estresse térmico na produção de leite de búfalas (Pereira *et al.*, 2020). Portanto, foram analisados os parâmetros bioquímicos: os grupos apresentaram porcentagens similares de proteína, lipídeo e lactose ($p > 0,05$) e estiveram dentro dos valores descritos na literatura: lipídeo (5.05 a 8.48%), proteína (3.51 a 4.48%) e lactose (4.02 a 5.63%) (Santa 2011; Nasr, 2016; Cavalcante, 2019). Mesmo que ainda não haja uma regularização acerca de padrões

de qualidade do leite em búfalos no Brasil, diversos autores utilizam como base o estudo de Santa (2011), realizado com búfalas leiteiras em Belém do Pará, que analisou os parâmetros físico e químico do leite empregando o método de titulação, pH, acidez, sólidos solúveis e composicional centesimal.

Espectroscopia de infravermelho foi outro método empregado para determinação da composição do leite em búfalas por Nars, (2016), o mesmo obteve os seguintes resultados: gordura 5.61 % , proteína 4.15% e lactose 5.62%, e analisou os impactos das elevadas temperaturas sobre a produção e qualidade do leite de búfalas na Índia.

No presente estudo, embora os grupos tenham exibido diferentes médias de produção diária de leite (5.93 *versus* 3.46), não houve diferença na composição do leite nos grupos de búfalas estudados, provavelmente, porque estavam sob mesmas condições ambientais como temperatura ambiente, manejo e nutrição. Quanto aos aspectos biológicos, foram selecionadas búfalas com idade e estágio da lactação semelhantes. Logo, fatores genéticos podem explicar esta diferença de produção de leite entre os grupos estudados ou mesmo fatores ambientais como temperatura ambiente elevada como demonstra a literatura (Nars, 2006; Li *et al.*, 2021; Dou *et al.*, 2021). Contudo, seja qual forem os fatores, não foram capazes de afetar a qualidade do leite medida em termos de composição bioquímica. Sendo assim, seria importante implementar na fazenda possíveis melhorias no manejo para minimizar a influência dos fatores ambientais na produção leiteira das búfalas (Soares *et al.*, 2013; Cavalcante, 2019).

Além disso, outro fator observado na diferencia entre os grupos pode estar relacionado as características genéticas dos animais, ou seja, alterações polimórficas. Os polimorfismos genéticos são variações na sequência de DNA que podem criar ou destruir sítios de reconhecimento de enzimas de restrição e parecem estar associados a apenas uma base. Algumas dessas alterações ocorrem em sequências não codificadoras do gene, que na maioria dos casos não causam efeito em suas funções; outras ocorrem em sequências codificadoras, levando à síntese de proteínas defeituosas (Lima *et al.*, 2006). Desse modo, os polimorfismo genéticos podem impactar na produção e nos componentes do leite.

Em um estudo com polimorfismo genético da proteína STAT5A e suas relações com características de produção e composição do leite em gado, foi demonstrado uma substituição C para T na posição 6853 dentro do exon 7, este, impactou diretamente na produção de leite, gordura e proteína e porcentagem de proteína ($P < 0.01$). Além do mais, as vacas sem alteração polimórficas (CC) produziram mais leite que as vacas com alteração genética (CT) (5418.68 vs 5149.54 kg) (Selvaggi *et al.*, 2009). Deb *et al.*, (2013), estudando polimorfismo do gene *HSP70.1* em vacas, relataram a deleção de citosina no promotor *HSP70.1* na posição base 895.

As vacas homozigotas (CC) tiveram melhor tolerância significativa ($P < 0,05$) ao verão do que as vacas com deletados (C-). A deleção da citosina na região promotora afetou negativamente as características de produção de leite, pois, as vacas com deleção de citosina (C-) tiveram menor produção total de leite, produção máxima e % de proteína ($P < 0,01$) e % de gordura ($P < 0,05$). Já Freitas (2014), estudando polimorfismos associado a produção e qualidade do leite em búfalas Murrah, descreveu dois genes candidatos: DGAT1, reconhecidamente envolvido com o conteúdo de gordura no leite e A2M, apresenta associação aos processos celulares do sistema imune, como a contagem de células somáticas (CCS), diretamente ligada à qualidade do leite e saúde dos animais.

Portanto, a variação genética dentro de raças de animais leiteiros em pontos específicos para termotolerância e produção de leite, pode permitir a seleção genética para o melhoramento a termotolerância e produtividade, aumentando a resiliência e o bem-estar animal. Além do mais, a seleção genética animal para termotolerância fornece soluções cumulativas e permanentes na produção leiteira a um custo relativamente baixo (Carabaño, 2016; Ansari *et al.*, 2019; Hariyono & Prihandini, 2020).

Outro parâmetro para mensurar a qualidade do leite é a contagem de células somáticas, o qual indica de maneira quantitativa o grau de infecção da glândula mamária (Costa *et al.*, 2020). Sendo considerado um parâmetro bem consolidado que indica a saúde do úbere e qualidade do leite (Pegolo *et al.*, 2021). Em estudo promovido em Búfalas, foi determinada que a quantidade de 200.000 CCS/ml é o limite máximo que indica a ausência de processos inflamatórios por mastite, sendo que valores acima deste limite indicam resposta inflamatória a mastite subclínica, e valores de 400.000 CCS/ml, é o limite indicado pela União Européia para consumo humano (Sloga *et al.*, 2015; Tanamati *et al.*, 2019). Considerando estes os valores de referência, no presente estudo, os valores de CCS para ambos os grupos estudados (139.0 a 106.4×10^3 CCS/mL) estiveram dentro da faixa de normalidade, indicando a boa condição das glândulas mamárias e ausência de infecção e mastite nos animais.

Além disso, outro parâmetro fisiológico que pode indicar o bem-estar animal é o nível sérico de cortisol no sangue (Mishra, 2021). O cortisol é um hormônio esteroide sintetizado a partir do colesterol, e secretado pelo córtex das glândulas adrenais, seu nível plasmático é elevado em resposta ao estresse por situação de calor ou frio intenso, infecção, doenças entre outros (Yadav *et al.*, 2013). Quanto aos valores séricos do cortisol e sua relação particularmente com o estresse térmico há relatos que o estresse aumenta as concentrações plasmáticas de cortisol (Chen *et al.*, 2018; Kovacs *et al.*, 2019; Mishra 2021), bem como relatos opostos, ou seja, que não suportam essa relação (Sutherland *et al.*, 2006; Farooq *et al.*, 2010).

Foi relatado que vacas leiteiras submetidas a ambiente com alta temperatura exibiram 2,9 µg/dl de cortisol no leite, comparado as vacas controle que foi de 1,5 µg/dl, concluindo que o estresse térmico resulta em concentrações mais altas de cortisol (Chen *et al.*, 2018). Da mesma forma, os bezerros submetidos a estresse térmico apresentaram maior concentração de cortisol comparado aos bezerros não submetidos (Kovács *et al.*, 2019). Em contrapartida, Farooq *et al.*, (2010), demonstraram que não houve aumento nos níveis de cortisol plasmático em vacas quando submetidas a temperaturas elevadas. Em suínos, níveis similares de cortisol foram detectados em animais colocado sob estresses por calor em comparação aos animais não submetidos a estresse por calor (Hicks *et al.*, 1998, Sutherland *et al.*, 2006). De forma similar, no presente estudo, embora as búfalas do grupo MEp apresentarem estresse celular em comparação ao grupo MAp, não houve diferencia nas concentrações de cortisol nos dois grupos e não exibiram concentrações de cortisol sérico compatível com estresse fisiológico, pois o cortisol variou de 0.67 a 0.79 µg/dl sendo abaixo de 2 µg/dl considerado valor de referência segundo a estudos que mediram a concentração de cortisol por meio de radioimunoensaio e Elisa (Thinh *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2018).

Expressão dos genes HSPs e de imunidade indicam estresse em nível celular

Neste estudo avaliamos os níveis de expressão dos genes *HSP70*, *HSP90α*, *HSP90β* relacionados com a termotolerância, e dos genes relacionados a imunidade (*Toll likes*) com o objetivo de compreender os mecanismos de resposta ao estresse térmico e seu impacto na produção e qualidade do leite. Como resultado, observamos que o grupo com menor média de produção (MEp) apresentou maior nível de expressão de todos os genes estudados, os quais se relacionam, de forma direta e indireta, a respostas de estresse a nível celular. As proteínas de choque térmico (*HSPs*) são induzidas por temperaturas elevadas, entre outros tipos de estresse, e mediam respostas bioquímicas e transcricionais de sobrevivência e adaptação ao estresse (Kumar *et al.*, 2019). Por isso, atualmente, as *HSPs* são consideradas indicadores de estresse em diversas espécies animais como bovinos, búfalos e outros ruminantes (Manjari *et al.*, 2015; Bagath *et al.*, 2019; Costa *et al.*, 2020).

No presente estudo, dois grupos de búfalas com diferentes médias de produção de leite apresentaram também diferença nos níveis de expressão de *HSPs* constitutivas e indutivas, sendo que o grupo de menor produtividade mostrou maior expressão de *HSPs*. Além disso, foi observada correlação negativa, ou seja, inversamente proporcional, entre o parâmetro de Produtividade e a expressão de *HSP90α* (-0.89; $p = 0.0001$) e, também de *HSP90β* (-0.66; $p = 0.01$). De forma similar, um estudo com a raça Murrah, foi relatado correlações entre a

quantidade de leite e porcentagem de gordura e proteína iguais a -0,174 e -0,079, respectivamente (Peeva, 1997). Outro estudo com búfalo (Murrah) mostrou que produção de leite diminuiu com o aumento da temperatura, concomitante ao aumento na expressão de *HSP70*, logo, deduziram a correlação negativa entre produção de leite e *HSP70* (Pawar *et al.*, 2014).

Esses dados sugerem que o grupo de búfalas de menor produção (MEp) estavam sob efeito de estresse celular e em consequência disso tiveram menor capacidade para produzir leite. Do ponto de vista celular, as células estariam sobrecarregadas com gastos energéticos para eliciar a resposta ao estresse e, logo, garantir sua homeostasia, por outro lado comprometendo sua capacidade de produção de leite. Já é sabido que as *HSPs* podem ser estimuladas por meio de estresses fisiológicos (como diferenciação celular, restrição calórica, fatores de crescimento, estimulação hormonal e desenvolvimento de tecidos), estresses patológicos (como infecções parasitárias ou bacterianas, inflamação e febre) e ambientais estresses (como calor ou estresse frio, estresse oxidativo, radiação UV, aminoácidos e metais pesados) (Abdelnour *et al.*, 2019).

O estresse térmico pode afetar a expressão de outros genes, como por exemplo os da resposta imune, ativando a imunidade ao expressar receptores *Toll-Like (TLRs)*. Os *TLRs* são proteínas transmembrana do tipo I que reconhecem padrões e são expressos principalmente nas células apresentadoras de antígenos, como macrófagos, monócitos, linfócitos B e células dendríticas desempenhando um papel fundamental na imunidade inata (Takeda & Akira, 2003; Yan *et al.*, 2007). Estudos anteriores, demonstraram que suínos expostos a períodos consecutivos de estresse térmico tiveram aumento significativo na expressão de *TLR2* e *TLR4* em comparação a suínos não expostos ($P < 0,05$), bem como os níveis plasmáticos de citocinas inflamatórias (Eicher *et al.*, 2004; Ju *et al.*, 2014). Isto ocorre devido o estresse térmico desencadear uma série de respostas celulares iniciadas pelas proteínas *HSPs* as quais ativam os receptores *TLRs*, e juntos, possivelmente atuam no combate aos efeitos deletérios do estresse térmico em nível celular (Avishek *et al.*, 2015).

Portanto, de acordo com nossos resultados, o estresse a nível celular das glândulas mamárias foi prejudicial para a produção do leite no grupo de búfala (MEp). Contudo, este prejuízo se deu apenas na quantidade de leite produzido e não na qualidade do leite, pois nenhum dos parâmetros de composição como lipídeos, proteínas e lactose apresentou relação com as expressões gênicas (*HSP70* x Lipídeo -0.2; *HSP70* x Proteína -0.2; *HSP70* x Lactose -0.03; *TLR-2* x Lipídeo -0.03; *TLR-2* x Proteína 0.3; *TLR-2* x Lactose -0.4; *TLR-4* x Lipídeo -0.2; *TLR-4* x Proteína 0.2; e *TLR-4* x Lactose -0.2; $p > 0,05$). Ess

Estudos anteriores lidaram com animais que exibiam parâmetros fisiológicos de estresse como concentração elevada de cortisol e em seguida, identificaram efeitos na produção de leite (Chen *et al.*, 2018; Kovács *et al.*, 2019). Porém, o grupo de animais usados neste estudo não apresentaram parâmetros fisiológicos de estresse, possivelmente, as condições de manejo na fazenda minimizaram os efeitos desta sobre o estresse animal. Contudo, ainda assim foi encontrado indício de estresse em nível celular e isso não foi o suficiente para afetar a qualidade do leite, porém, mostrou correlação com a produção de leite.

Por outro lado, por falta de estudo relacionados aos genes *HSPs* e *TLRs* em células somáticas do leite em búfalas e, também a falta de outros parâmetros como medição simultânea de THI e índices fisiológicos (por exemplo, temperatura corporal) neste estudo, seria muito útil para o entendimento acerca do por que apenas a produção foi afetada e a composição não, além de explicar se a célula estava em estresse térmico ou outro tipo de estresse, uma vez que as *HSPs* não se limitam apenas ao estresse térmico. No entanto, está claro que as *HSPs* podem ser utilizadas como marcador para estresse. Ademais, além de fatores ambientais, fisiológicos e alimentação, outra hipótese acerca de diferenciação na produtividade pode estar relacionada a polimorfismos em genes relacionadas ao estresse térmico e qualidade do leite.

Portanto, mais investigações ainda são necessárias para entender os mecanismos básicos induzidos pelo estresse térmico relacionados a produção e qualidade do leite de búfalas. Ademais, proporcionar condições ambientais com baixa temperatura, sombreamento, higienizado, além de uma alimentação qualidade pode minimizar os danos por estresse térmico e contribuir para uma melhor produtividade animal.

Conclusão

A produção de leite foi influenciada pelo estresse celular, entretanto, a composição do leite não diferenciou entre os dois grupos. Além do mais, observamos que os animais estavam dentro dos parâmetros que indicam ausência de infecção por mastite clínica e subclínica e, também não apresentavam concentrações elevadas de cortisol, hormônio indicador de estresse, ou seja, não influenciando a produção e qualidade do leite.

Os níveis de expressões dos genes indicadores de estresse térmico (*HSPs*) e de imunidade (*Toll likes*), foi maior no grupo de menor produção, influenciando na produtividade destes animais. Entretanto, nenhum dos parâmetros analisados influenciou na qualidade do leite de ambos os grupos estudados.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro recebido durante os 2 anos de realização do mestrado.

Referências

Abdelnour SA, Mohamed EAE, Asmaa FK, Muhammad A, Ayman ET, Ahmed EN, 2019. Stress biomarkers and proteomics alteration to thermal stress in ruminants: A review. *Journal of Thermal Biology*. 79: 120-134. DOI.org/10.1016/j.jtherbio.2018.12.013.

Alhussien MN, Dang AK, 2018. Impact of different seasons on the milk somatic and differential cell counts, milk cortisol and neutrophils functionality of three Indian native breeds of cattle. *Journal of Thermal Biology*. 78: 27-35. DOI: 10.1016/j.jtherbio.2018.08.020.

Ansari MS, Ojali MR, Forutan M, Riasi A, Brito LF, 2019. Investigating the genetic architecture of conception and non-return rates in Holstein cattle under heat stress conditions. *Trop Anim Health Prod*. 51(7):1847-1853. DOI: 10.1007/s11250-019-01875-5.

Astakhova LN, Zatsepina OG, Funikov SY, Zelentsova ES, Schostak NG, Orishchenko KE, Evgen'ev MB, Garbuz DG, 2015. Activity of heat shock genes' promoters in thermally contrasting animal species. *PLoS One*. 20;10(2): e0115536. DOI: 10.1371/journal.pone.0115536.

Arbello DDR, Braccin VP, JIMÉNEZ EM, Erhardt MM, Richards NSPS, 2021. Microbiological and physical-chemical analysis of milk produced in Santana do Livramento City – Rio Grande do Sul. *Research, Society and Development*. 10 (6): e24310615561. DOI: 10.33448/rsd-v10i6.15561.

Ayres M, Ayres JRM, Ayres DL, Santos AS, 2007. *BioEstat 5.0; Aplicações estatística nas áreas das ciências biológicas e médicas*. Belém: Sociedade Civil de Mamirauá, Brasília, 2005. 364p.

Avishek P, Dangi SS, Gupta M, Jai S, Nipuna T, Naskar S, Nanda PK, Mohanty N, Das AK, Bandopadhyay S, et al, 2015. Expression of TLR genes in Black Bengal goat (*Capra hircus*) during different seasons. *Small Ruminant Research*. 124: 17-23. DOI.org/10.1016/j.smallrumres.2015.01.011.

- Bagath G, Krishnan C, Devaraj VP, Rashamol P, Pragna AM, Lees V, Sejian, 2019. The impact of heat stress on the immune system in dairy cattle: A review. *Research in Veterinary Science*. 126: 94-102. DOI: 10.1016/j.rvsc.2019.08.011.
- Becker CA, Collier RJ, Stone AE, 2020. Physiological and behavioral effects of heat stress in dairy cows. *J Dairy Sci*. 103(8): 6751-6770. DOI: 10.3168/jds.2019-17929.
- Bhanuprakash V, Singh U, Sengar G, Sajjanar B, Bhusan B, Raja TV, Alex R, Kumar S, Singh R, Kumar A, et al, 2016. Differential effect of thermal stress on HSP70 expression, nitric oxide production and cell proliferation among native and crossbred dairy cattle. *Journal of Thermal Biology*. 59: 18-25. DOI.org/10.1016/j.jtherbio.2016.04.012.
- Castellano HLE, Nally JEL, André MA, 2019. Dairy science and health in the tropics: challenges and opportunities for the next decades. *Trop Anim Health Prod*. 51: 1009–1017. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-01866-6>.
- Carvalho LB, Silva N, Brito JRF, 2005. Qualidade do leite de búfalas: composição. *Rev Bras Reprod Anim*, Belo Horizonte, v.29, n.2, p.106-110. Disponível em www.cbra.org.br.
- Carabaño M, 2016. The challenge of genetic selection for heat tolerance: The dairy cattle example. *Advances in Animal Biosciences*. 7(2): 218-222. DOI:10.1017/S2040470016000169
- Cavalcante P, 2019. Avaliação da produção, composição química e indicadores de qualidade do leite de búfalas criadas no semiárido nordestino. Dissertação. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 67 pp.
- Collier RJ, Baumgard LH, Zimbelman RB, Xiao Y, 2019. Heat stress: physiology of acclimation and adaptation. *Animal Frontiers*. 9(1): 12–19, <https://doi.org/10.1093/af/vfy031>.
- Costa A, Neglia G, Campanile G, Marchi M, 2020. Milk somatic cell count and its relationship with milk yield and quality traits in Italian water buffaloes. *Journal of Dairy Science*. 103(6): 5485-5494. DOI.org/10.3168/jds.2019-18009.
- Costa A, Negrini R, Marchi M, Campanile G, Neglia G, 2020. Phenotypic Characterization of Milk Yield and Quality Traits in a Large Population of Water Buffaloes. *Animals (Basel)*. 19;10(2): 327. DOI: 10.3390/ani10020327.
- Chen L, Li X, Li Z, Deng L, 2020. Analysis of 17 elements in cow, goat, buffalo, yak, and camel milk by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). *RSC Adv*. 13;10(12):6736-6742. doi: 10.1039/d0ra00390e.

- Chen S, Wang J, Peng D, Li D, Chen J, Gu X, 2018. Exposure to heat-stress environment affects the physiology, circulation levels of cytokines, and microbiome in dairy cows. *Sci Rep* 8: 14606. DOI.org/10.1038/s41598-018-32886-1.
- Chomczynski P, Sacchi N, 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*. 162(1): 156-159. DOI: 10.1006/abio.1987.9999.
- Choudhary BB, Sirohi S, 2019. Sensitivity of buffaloes (*Bubalus bubalis*) to heat stress. *J Dairy Res*. 86(4): 399-405. DOI: 10.1017/S0022029919000773.
- Daltro, AM, Bettencourt AF, Ximenes CAK, Daltro DS, PINHO APS, 2020. Efeito do estresse térmico por calor na produção de vacas leiteiras. *Pesquisa Agropecuária Gaúcha*. 26(1): 288-311. DOI: <https://doi.org/10.36812/pag.2020261288-311>.
- Damasceno FA, Viana FA, Tinôno JM, Gomes IFF, Achiassi RCC, Leonardo, 2010. Adaptação de bubalinos ao ambiente tropical. *Revista Eletrônica Nutritime*. 7(5): 1370-1381.
- Deb R, Sajjanar B, Singh U, Kumar S, Brahmane MP, Singh R, Sengar G, Sharma A, 2013. Promoter variants at AP2 box region of Hsp70.1 affect thermal stress response and milk production traits in Frieswal cross bred cattle. *Gene*. 532(2): 230-235. DOI.org/10.1016/j.gene.2013.09.037.
- Dou J, Schenkel F, Hu L, Khan A, Khan MZ, Yu Y, Wang Y, Wang Y, 2021. Genome-wide identification and functional prediction of long non-coding RNAs in Sprague-Dawley rats during heat stress. *BMC Genomics*. 22(1): 122. DOI: 10.1186/s12864-021-07421-8.
- Eldawy MH, Lashe MES, Farouk HM, Badr M, 2021. Milk production potential and reproductive performance of Egyptian buffalo cows. *Trop Anim Health Prod*. 53, 282. DOI.org/10.1007/s11250-021-02722-2.
- Eicher SD, Sartin JL, Schwartz DD, Lay Jr DC, Cheng H, 2004. Receptores Toll-like 2 (TLR2) e 4 (TLR4) de leucócitos de sangue suíno durante o estresse térmico [absreact]. *Simpósio Internacional de Imunologia Veterinária*. 240pp.
- Evangelista C, Bernabucci U, Basiricò L, 2022. Effect of Antioxidant Supplementation on Milk Yield and Quality in Italian Mediterranean Lactating Buffaloes. *Animals*. 12(15): 1903. <https://doi.org/10.3390/ani12151903>.

- Farooq U, Samad HA, Shehzad F, Qayyum A, 2010. Physiological responses of cattle to heat stress. *World Applied Sciences Journal* 8, 38–43. ID: 46583866.
- Freitas AC, 2014. Polimorfismos nos genes *dgat-1* e *a2m* e suas associações com produção e qualidade do leite de búfalas da raça Murrah. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. 49 pp.
- Garcia AR, Silva LKX, Barros DV, Junior JNL, Martorano LG, Lisboa LSS, Silva JAR, Sousa JS, Silva AOA, 2013. key points for the thermal comfort of water buffaloes in eastern amazon. *Animal production cienc. rural.* 53(1). e20210544. DOI.org/10.1590/0103-8478cr20210544.
- García SMF, Castellote MA, Feingold SE, Corva PM, 2017. Characterization of a deletion in the *Hsp70* cluster in the bovine reference genome. *Anim Genet.* 48(4): 377-385. DOI: 10.1111/age.12561.
- Gao ST, Guo J, Quan SY, Fernandez MV, Bu DP, 2017. The effects of heat stress on protein metabolism in lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science.* 100(6): 5040-5049. DOI.org/10.3168/jds.2016-11913.
- Gross JJ, van Dorland HA, Wellnitz O, Bruckmaier RM, 2014. Glucose transport and milk secretion during manipulated plasma insulin and glucose concentrations and during LPS-induced mastitis in dairy cows. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl).* 99(4): 747-56. DOI: 10.1111/jpn.12259.
- Hall LW, Dunshea FR, Allen JD, Rungruang S, Collier JL, Long NM, Collier RJ, 2016. Evaluation of dietary betaine in lactating Holstein cows subjected to heat stress. *J Dairy Sci.* 99(12): 9745-9753. DOI: 10.3168/jds.2015-10514.
- Hariyono DNH, Prihandini PW, 2020. Association of selected gene polymorphisms with thermotolerance traits in cattle - A review. *Anim Biosci.* 35(11): 1635-1648. DOI: 10.5713/ab.22.0055.
- Hassan FU, Nawaz A, Rehman MS, Ali MA, Dilshad SMR, Yang C, 2019. Prospects of HSP70 as a genetic marker for thermo-tolerance and immuno-modulation in animals under climate change scenario. *Anim Nutr.* 5(4):340-350. DOI: 10.1016/j.aninu.2019.06.005.
- Hicks TA, McGlone JJ, Whisnant CS, Kattesh HG and Norman RL, 1998. Behavioral, endocrine, immune, and performance measures for pigs exposed to acute stress. *Journal of Animal Science* 76(2): 474–483. DOI: 10.2527/1998.762474x.

Ju XH, Xu HJ, Yong YH, An LL, Jiao PR, M. Liao M, 2014. Heat stress upregulation of Tolllike receptors 2/4 and acute inflammatory cytokines in peripheral blood mononuclear cell (PBMC) of Bama miniature pigs: an in vivo and in vitro study. *Animal*. 8(9): 1462-1468. DOI.org/10.1017/S1751731114001268.

Kapila N, Sharma A, Kishore A, Sodhi M, Tripathi PK, Mohanty AK, Mukesh M, 2016. Impact of Heat Stress on Cellular and Transcriptional Adaptation of Mammary Epithelial Cells in Riverine Buffalo (*Bubalus Bubalis*). *PLoS One*. 28;11(9): e0157237. DOI: 10.1371/journal.pone.0157237.

Khandia R, Munjal AK, Iqbal HMN, Dhama K, 2017. Heat Shock Proteins: Therapeutic Perspectives in Inflammatory Disorders. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*. 10(2): 94-104. doi: 10.2174/1872213X10666161213163301.

Kovács L, Kézér FL, Ruff F, Szenci O, Bakony M, Jurkovich V, 2019. Effect of artificial shade on saliva cortisol concentrations of heat-stressed dairy calves. *Domestic Animal Endocrinology*. 66: 43-47. DOI.org/10.1016/j.domaniend.2018.09.001.

Kumar B, Sahoo AK, Dayal S, Das AK, Tarapheder S, Batabyal S, Ray PK, Kumari R, 2019. Genetic profiling of Hsp70 gene in Murrah buffalo (*Bubalus bubalis*) under sub-tropical climate of India. *Cell Stress and Chaperones*. 24: 1187–1195. DOI.org/10.1007/s12192-019-01042-7.

Khan MZ, Ma Y, Ma J, Xiao J, Liu Y, Liu S, Khan A, Khan IM, Cao Z, 2021. Association of DGAT1 With Cattle, Buffalo, Goat, and Sheep Milk and Meat Production Traits. *Front Vet Sci*. 8: 712470. DOI: 10.3389/fvets.2021.712470.

Lan Q, Cao Z, Yang X, Gu Z, 2022. Physiological and Proteomic Responses of Dairy Buffalo to Heat Stress Induced by Different Altitudes. *Metabolites*. 12(10): 909. DOI: 10.3390/metabo12100909.

Li M, Liang X, Tang Z, Hassan F.-u, Li L, Guo Y, Peng K, Liang X, Yang C, 2021. Thermal Comfort Index for Lactating Water Buffaloes under Hot and Humid Climate. *Animals* 11(7): 2067. DOI.org/10.3390/ani11072067.

Lima JM, Serafim PVP, Silva IDCG, Forones NM, 2006. Estudo do polimorfismo genético no gene p53 (códono 72) em câncer colorretal. *Arq. Gastroenterol*. 43(1). DOI.org/10.1590/S0004-28032006000100005.

Manjari R, Yadav M, Ramesh K, 2015. HSP70 as a marker of heat and humidity stress in Tarai buffalo. *Trop Anim Health Prod* 47, 111–116. DOI.org/10.1007/s11250-014-0692-4.

Mayer MP, Bukau B, 2005. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci.* 62(6): 670-684. DOI: 10.1007/s00018-004-4464-6.

Marai, IFM, Haebe AAM, 2010. Buffalo's biological functions as affected by heat stress - A review. *Livestock Science.* 127(2): 89-109. DOI:10.1016/j.livsci.2009.08.001.

Mishra SR, 2021. Thermoregulatory responses in riverine buffaloes against heat stress: An updated review. *Journal of Thermal Biology.* 96: 102844. DOI.org/10.1016/j.jtherbio.2021.102844.

Mishra A, Hooda OK, Singh G, Meur SK, 2011. Influence of induced heat stress on HSP70 in buffalo lymphocytes. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 95(4): 540-544. DOI.org/10.1111/j.1439-0396.2010.01082.x.

Muller T, Rempel C, 2021. Quality of bovine milk produced in Brazil – physical-chemical and microbiological parameters: an integrative review. *Vigilância Sanitária em Debate.* 9(3): 122-129. DOI: org/10.22239/2317-269X.01738.

Nasr M, 2016. The impact of crossbreeding Egyptian and Italian buffalo on milk yield and composition under subtropical environmental conditions. *Journal of Dairy Research*, 83(2):196-201. DOI: 10.1017/S0022029916000194.

Palma G, Fátima C, 2020. padrão de contagem de células somáticas para avaliação da saúde da glândula mamária em bubalinos: revisão da literatura. Artigo de conclusão de curso. *Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos – Uniceplac.* 17pp.

Pramod S, Sahib L, Becha BB, Venkatachalapathy RT, 2021. Analysis of the effects of thermal stress on milk production in a humid tropical climate using linear and non-linear models. *Trop Anim Health Prod.* 53(66). DOI.org/10.1007/s11250-020-02525-x.

Pawar HN, Kumar R, Narang R, 2014. Effect of Heat Stress on Milk Production and Composition in Murrah Buffaloes. *Journal of Buffalo Science.* 2(2): 98-102. DOI:10.6000/1927-520X.2013.02.02.8.

Pegolo S, Giannuzzi D, Bisutti V, Tessari R, Gelain ME, Gallo L, Schiavon S, Tagliapietra F, Trevisi E, Marsan PA, et al, 2021. Associations between differential somatic cell count and

milk yield, quality, and technological characteristics in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*. 104(4): 4822-4836. DOI.org/10.3168/jds.2021-19084.

Peeva T.Z, 1997. Composition of buffalo milk. I. Correlation between components and effect of some factors on them. In: *WORLD BUFFALO CONGRESS*. 5, Caserta, Italia. Proceedings...Caserta, 1997. 217-220

Pereira AMF, Vilela RA, Titto CG, Leme-Dos-Santos TMC, Geraldo ACM, Balieiro JCC, Calviello RF, Birgel Junior EH, Titto EAL, 2020. Thermoregulatory Responses of Heat Acclimatized Buffaloes to Simulated Heat Waves. *Animals (Basel)*. 26;10(5):756. DOI: 10.3390/ani10050756.

Raza SHA, Hassanin AA, Dhshan AIM, Abdelnour AS, Khan R, Mei C, Zan L, 2021. In silico genomic and proteomic analyses of three heat shock proteins (HSP70, HSP90- α , and HSP90- β) in even-toed ungulates. *Electronic Journal of Biotechnology*. 53: 61-70, 2021. DOI.org/10.1016/j.ejbt.2021.07.002.

Safari A, Shadparvar AA, Zadeh AAS, Arpanahi RA, 2019. Economic values and selection indices for production and reproduction traits of Iranian buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Trop Anim Health Prod*. 51: 1209–1214 (2019). DOI.org/10.1007/s11250-019-01811-7.

Santa RRMS, 2011. Iogurte de leite de búfala adicionado de polpa de frutas da Amazônia: parâmetros de qualidade. Tese de doutorado. Universidade Federal Fluminense, Niterói, 85pp.

Soares AD, Rangel AHN, Novaes LP, Júnior DML, Bezerra KC, 2013. Composição do leite de búfala em diferentes ordens de parto. *Agropecuária Científica no Semiárido*. 9(4): 53-60. DOI: <http://dx.doi.org/10.30969/acsa.v9i4.416>.

Selvaggi M, Dario C, Normanno G, Celano G, Dario M, 2009. Genetic polymorphism of STAT5A protein: Relationships with production traits and milk composition in Italian Brown cattle. *Journal of Dairy Research*, 76(4): 441-445. DOI:10.1017/S0022029909990070.

Sutherland MA, Niekamp SR, Rodriguez-Zas SL, Johnson JLS, 2006. Impacts of chronic stress and social status on various physiological and performance measures in pigs of different breeds. *Journal of Animal Science*. 84(3): 588-596. DOI: 10.2527/2006.843588x.

Sgorlon S., Fanzago M, Guiatti D, Gabai G, Stradaioli, Stefanon B, 2015. Factors affecting milk cortisol in mid lactating dairy cows. *BMC Vet Res*. 11(259). DOI.org/10.1186/s12917-015-0572-9.

- Skrzypek R, Wójtowski J, Fahr RD, 2004. Factors affecting somatic cell count in cow bulk tank milk - A case study from Poland. *Journal of Veterinary Medicine Serries A: Physiology Pathology Clinical Medicine*. 51(3): 127-131. DOI: 10.1111/j.1439-0442.2004.00611.x.
- Tanamati F, Stafuzza NB, Gimenez DFJ, Stella AAS, Santos DJA, Ferro MIT, Albuquerque LG, Gasparino E, Tonhati H, 2019. Differential expression of immune response genes associated with subclinical mastitis in dairy buffaloes. *Animal*. 13(8): 651-1657, 2019. DOI.org/10.1017/S1751731118003324.
- Tajkarimi M, Faghieh MA, Poursoltani H, Nejad AS, Motallebi AA, Mahdavi H, 2008. Lead residue levels in raw milk from different regions of Iran. *Food Control*. 19(5): 495-498. DOI.org/10.1016/j.foodcont.2007.05.015.
- Takeda K, Akira S, 2003. Toll receptors and pathogen resistance. *Cellular microbiology*. 5(3): 143-1553. DOI.org/10.1046/j.1462-5822.2003.00264.x.
- Thinh NC, Yoshida C, Long ST, Yusuf M, Nakao T, 2011. Adrenocortical Response in Cows after Intramuscular Injection of Long-Acting Adrenocorticotropic Hormone (Tetracosactide Acetate Zinc Suspension). *Reproduction in Domestic Animals*. 46(2): 296-300. DOI.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01666.x.
- Vinicio M, Faria ACF, Cadima GP, Moraes GF, Santos RM, 2021. avaliação do desempenho produtivo/reprodutivo de vacas leiteiras mestiças antes e depois do manejo no sistema “Compost barn”. *Ciência Animal*. 31(4): 47–55, 2021.
- Willis C, Jørgensen F, Aird H, Elviss N, Fox A, Jenkins C, Fenelon D, Sadler-Reeves L, McLauchlin J, 2018. An assessment of the microbiological quality and safety of raw drinking milk on retail sale in England. *J Appl Microbiol*. 124(2): 535-546. DOI: 10.1111/jam.13660.
- Wu X, Guo L, Huang G, Tang W, Zhao S, Wang J, Zhang, Y, 2022. Effects of Dietary Natural Mycotoxins Exposure on Performance, Biochemical Parameters and Milk Small Molecule Metabolic Pathways of Lactating Cows. *Agriculture*. 46(2): 296-300. DOI.org/10.3390/agriculture12030420.
- Yadav R, Mohan K, Kumar V, Sarkar M, Nitu K, Meyer HHD, Prakash BS, 2013. Development and validation of a sensitive enzyme immunoassay (EIA) for blood plasma cortisol in female cattle, buffaloes, and goats. *Domestic Animal Endocrinology*. 45(2): 72-78. DOI.org/10.1016/j.domaniend.2013.05.003.

Yan X, Xiu F, An H, Wang X, Wang J, Cao X, 2007. Fever range temperature promotes TLR4 expression and signaling in dendritic cells. *Life Sciences*. 80(4): 307-313. DOI.org/10.1016/j.lfs.2006.09.022.

Zhang XX, An Z, Niu K, Chen C, Ye T, Shaukat A, Yang L, 2022. Evaluation of type traits in relation to production, and their importance in early selection for milk performance in dairy buffaloes, *Animal*. 16(11): 100653. DOI.org/10.1016/j.animal.2022.100653.

Anexo 1: Certificado de aprovação do CEUA.



Comissão de Ética no
Uso de Animais CEUA/UFRA



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Identificação e validação in vitro de marcadores moleculares de termotolerância em populações bubalinas de leite (*Bubalus bubalis*) na Amazônia", protocolada sob o CEUA nº 2820150222 (ID 000479), sob a responsabilidade de **Priscila Di Paula Bessa Santana** e equipe; *Elem Cristina Macêdo Barra de Sousa* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural da Amazônia (CEUA/UFRA) na reunião de 25/05/2022.

We certify that the proposal "In vitro identification and validation of molecular markers of thermotolerance in dairy buffaloes (*Bubalus bubalis*) in the Amazon", utilizing 85 Buffaloes (85 females), protocol number CEUA 2820150222 (ID 000479), under the responsibility of **Priscila Di Paula Bessa Santana** and team; *Elem Cristina Macêdo Barra de Sousa* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal Rural University of Amazonia (CEUA/UFRA) in the meeting of 05/25/2022.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [05/2022](#) a [12/2023](#) Área: [Biotecnologia Animal](#)

Origem: [Animais de proprietários](#)

Espécie: [Bubalinos](#) sexo: [Fêmeas](#) idade: [1 a 5 anos](#) N: [85](#)

Linhagem: [Bubalus bubalis](#) Peso: [500 a 2000 kg](#)

Local do experimento: Fazenda Experimental da Bubrás no município de Bujaru, Pará - Coleta do material biológico. Laboratório de Sorologia e Biologia Molecular da Ufra/ISPA - Análise Molecular. Laboratório de Fertilização In Vitro do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) - Cultura de Células.

Belém, 05 de julho de 2022

Profa. Dra. Natalia Guarino Souza Barbosa
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal Rural da Amazônia

Profa. Dra. Ernestina Ribeiro dos Santos Neta
Vice-Cordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal Rural da Amazônia