

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE ENGENHARIAS, CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

MARIA RAPHAELA TEIXEIRA PRADELA

QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES ANTIOXIDANTES NAS CÉLULAS
SOMÁTICAS DO LEITE DE BOVINOS DA RAÇA HOLANDESA SUBMETIDOS A
DIETA COM SUPLEMENTAÇÃO DE RAMA DE MANDIOCA (*Manihot esculenta*
Crantz)

PONTA GROSSA

2026

MARIA RAPHAELA TEIXEIRA PRADELA

QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES ANTIOXIDANTES NAS CÉLULAS
SOMÁTICAS DO LEITE DE BOVINOS DA RAÇA HOLANDESA SUBMETIDOS A
DIETA COM SUPLEMENTAÇÃO DE RAMA DE MANDIOCA (*Manihot esculenta*
Crantz)

Dissertação apresentada para obtenção do
título de Mestre em Zootecnia pela
Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Área de produção e melhoramento genético.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari.

Coorientador: Dr. Matheus Azambuja dos
Santos.

PONTA GROSSA

2026

P896

Pradela, Maria Raphaela Teixeira

Quantificação da expressão de genes antioxidantes nas células somáticas do leite de bovinos da raça Holandesa submetidos a dieta com suplementação de rama de mandioca (*Manihot esculenta Crantz*) / Maria Raphaela Teixeira Pradela. Ponta Grossa, 2026.

46 f.

Dissertação (Mestrado em Zootecnia - Área de Concentração: Produção Animal), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari.

Coorientador: Prof. Dr. Matheus Azambuja dos Santos.

1. Bovinos leiteiros - Nutrição. 2. Mandioca - Alimentação animal. 3. Estresse oxidativo em animais. 4. Expressão gênica em animais. 5. Imunidade em bovinos. I. Vicari, Marcelo Ricardo. II. Azambuja dos Santos, Matheus. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Produção Animal. IV.T.

CDD: 636.2412



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
Av. General Carlos Cavalcanti, 4748 - Bairro Uvaranas - CEP 84030-900 - Ponta Grossa - PR - <https://uepg.br>

TERMO

TERMO DE APROVAÇÃO

MARIA RAPHAELA TEIXEIRA PRADELA

“QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES ANTIOXIDANTES NAS CÉLULAS SOMÁTICAS DO LEITE DE BOVINOS DA RAÇA HOLANDESA SUBMETIDOS A DIETA COM SUPLEMENTAÇÃO DE RAMA DE MANDIOCA (*Manihot esculenta*)”

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Zootecnia – Mestrado em Zootecnia, Setor de Ciências Agrárias e Tecnologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Ponta Grossa, 27 de fevereiro de 2026.

Membro da Banca:

Documento assinado digitalmente
MARCELO RICARDO VICARI
Data: 02/03/2026 14:56:49-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari – UEPG
Presidente

Documento assinado digitalmente
ADRIANA DE SOUZA MARTINS
Data: 06/03/2026 15:16:53-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Adriana de Souza Martins – UEPG
Membro Interno

Documento assinado digitalmente
GUILHERME LUIS PEREIRA
Data: 05/03/2026 23:04:14-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. Guilherme Luís Pereira – UNESP Botucatu
Membro Externo

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, pois, é Quem me capacita, me guia, me fortalece e me ilumina. Nada eu seria, sem a sua Graça e o seu Favor sobre a minha vida. Obrigada Senhor, por tudo que tens feito.

Agradeço aos meus pais, Edvaldo Pradela e Marcela M. S. Teixeira, pelo apoio e amor incondicional, que certamente tornou tudo possível. Agradeço ao meu irmão, Matheus F. Teixeira Nappi, que sempre me incentivou e acreditou em mim. A minha irmãzinha, Maria Luiza Teixeira de S. Mello, pelo seu carinho e pela confiança. Agradeço ao meu tio, Luís Antônio Esmerino, que sempre acreditou, me aconselhou e investiu para que meus sonhos se tornassem possíveis. Eu os amo muito.

Agradeço ao meu noivo, Matheus Dutra, que sempre foi meu maior incentivador, sempre torceu por mim e tornou esse trajeto - desde a sua chegada - mais leve. Deus te usou de formas extraordinárias na minha vida. Obrigada por ter confiado em mim, mesmo quando eu mesma achei que não conseguiria e por ter me apoiado com tanto respeito e amor. Eu te amo.

Agradeço ao meu orientador, Marcelo Ricardo Vicari, por aceitar esse desafio e sempre estar me apoiando e auxiliando durante a realização desse estudo. O seu amor pela profissão é admirável, obrigada pelas oportunidades que me proporcionou.

Agradeço também ao meu coorientador, Matheus Azambuja dos Santos, pela paciência, dedicação, cuidado e por sempre estar disponível para me ajudar quando precisei.

Agradeço a todos do Chromosome Biology: Structure and Fuction LAB (CBSF Lab), em especial a Prof^a Dr^a Viviane Nogaroto Vicari e a Dra. Larissa Glugoski, que sempre ofereceram instruções e apoio no conhecimento científico e aprendizado prático.

Agradeço a família Renovo, (aos próximos) que sempre me apoiaram e acreditaram em mim, proferindo palavras de vida e fé ao meu coração.

Agradeço ao corpo docente e funcionários do Departamento de Zootecnia que contribuíram para minha formação e ensinamento. Em especial a Prof^a Dr^a Adriana de Souza Martins, por nos conduzir com muito amor e por sempre nos aconselhar.

*“Confia no Senhor de todo o teu coração; não dependa de seu próprio entendimento.
Busque a vontade dEle em tudo que fizer, e Ele mostrará o caminho que deve
seguir”*

Provérbios 3:5-6

RESUMO

A pecuária leiteira brasileira desempenha papel estratégico na produção de alimentos, destacando a utilização da raça Holandesa por seu elevado potencial produtivo e pela qualidade do leite produzido. No entanto, esse alto desempenho frequentemente está associado ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), o que leva a desequilíbrios no estado redox e consequentes prejuízos à saúde da glândula mamária. A suplementação nutricional com compostos bioativos tem sido explorada como estratégia para mitigar o estresse oxidativo. A rama de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), contém compostos antioxidantes que podem modular a resposta oxidante do organismo. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de diferentes níveis de inclusão de rama de mandioca na dieta sobre a expressão de genes antioxidantes em células somáticas do leite de vacas da raça Holandesa. Foram utilizadas oito vacas (duplo quadrado latino 4x4), distribuídas em quatro tratamentos: 0% (controle), 33%, 66% e 100% de inclusão de rama de mandioca na dieta. Amostras de leite foram coletadas para o isolamento de células somáticas, a extração de RNA total e a síntese de cDNA. A expressão relativa dos genes *SOD1*, *SOD2*, *SOD3*, *GPx1* e *CAT* foi quantificada por RT-qPCR utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, com *GAPDH* como gene de referência. Os dados foram submetidos a testes de normalidade e análise de variância (ANOVA), considerando $p < 0,05$ como nível de significância. Os resultados não evidenciaram diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos em nenhum dos genes avaliados. No entanto, padrões de variação foram observados: redução na expressão nos genes *SOD1*, *SOD3*, *CAT* nos tratamentos com suplementação, enquanto nos genes *SOD2* e *GPx1* observou-se um aumento na expressão. Esses achados sugerem uma possível modulação dose-dependente da expressão gênica antioxidante pela rama de mandioca. A ausência de efeito pode ser atribuída ao tamanho amostral reduzido e à variabilidade biológica entre indivíduos, o que indica a necessidade de estudos complementares com maior número de animais, análises temporais e avaliação de marcadores bioquímicos de estresse oxidativo. De forma geral, a suplementação com rama de mandioca demonstra potencial como estratégia funcional para atenuar o estresse oxidativo em vacas leiteiras, contribuindo para a sustentabilidade da cadeia leiteira.

Palavras-chave: Antioxidantes; Contagem de células somáticas, Estresse oxidativo; Expressão gênica; Imunidade.

ABSTRACT

Brazilian dairy farming plays a strategic role in food production, with the Holstein breed used for its high productive potential and milk quality. However, this high performance is often associated with increased production of reactive oxygen species (ROS), leading to redox imbalance and consequent impairments in mammary gland health. Nutritional supplementation with bioactive compounds has been explored as a strategy to mitigate oxidative stress. Cassava foliage (*Manihot esculenta* Crantz) contains antioxidant compounds that may modulate the organism's oxidative response. The aim of this study was to evaluate the influence of different levels of cassava foliage inclusion in the diet on the expression of antioxidant genes in milk somatic cells of Holstein cows. Eight cows were used in a double 4×4 Latin square design and distributed into four treatments: 0% (control), 33%, 66%, and 100% cassava foliage inclusion in the diet. Milk samples were collected for somatic cell isolation, total RNA extraction, and cDNA synthesis. The relative expression of the genes *SOD1*, *SOD2*, *SOD3*, *GPx1*, and *CAT* was quantified by RT-qPCR using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, with *GAPDH* as the reference gene. Data were subjected to normality tests and analysis of variance (ANOVA), considering $p < 0.05$ as the significance level. The results showed no statistically significant differences among treatments for any of the evaluated genes. However, expression patterns showed reduced *SOD1*, *SOD3*, and *CAT* in supplemented treatments, while *SOD2* and *GPx1* showed increased expression. These findings suggest a possible dose-dependent modulation of antioxidant gene expression by cassava foliage. The absence of significant effects may be attributed to the small sample size and biological variability among individuals, indicating the need for further studies with a larger number of animals, temporal analyses, and evaluation of biochemical markers of oxidative stress. Overall, cassava foliage supplementation demonstrates potential as a functional strategy to mitigate oxidative stress in dairy cows, contributing to the sustainability of the dairy production chain.

Keywords: Antioxidants; Gene expression; Immunity; Oxidative stress; Somatic cell count.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Curvas padrão obtidas para testes de eficiência (eff%) dos primers: (a) *SOD1*; (b) *SOD2*; (c) *SOD3*; (d) *GPX1*; (e) *CAT*; e (f) *GAPDH*.....**36**
- Figura 2** - Curvas de dissociação dos primers, considerando a amostra de cDNA como molde (picos únicos), em comparação com a amostra negativa sem amplificação. (a) *SOD1*: tm do amplificado = 80 °c; (b) *SOD2*: tm do amplificado = 81,239 °c; (c) *SOD3*: tm do amplificado = 84,663 °c; (d) *GPX1*: tm do amplificado = 81,691 °c; (e) *CAT*: tm do amplificado = 81,582 °c; (f) *GAPDH*: tm do amplificado = 84,9 °c.**37**
- Figura 3** - Expressão relativa dos genes *SOD1* (a), *SOD2* (b), *SOD3* (c), *GPX1* (d), e *CAT* (e), nas células somáticas do leite após a suplementação de 0, 33, 66 e 100% de rama de mandioca na dieta das vacas.**38**

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Sequências dos primers e tamanhos dos amplicons esperados para os genes *SOD1*, *SOD2*, *SOD3*, *CAT*, *GPX1* e *GAPDH*.**34**
- Tabela 2** - Valores de *p* obtidos na análise de variância (anova) e no teste de comparações múltiplas de Tukey para a expressão gênica de *SOD1*, *SOD2*, *SOD3*, *GPX1* e *CAT*, avaliadas em animais submetidos a diferentes níveis de suplementação (0%, 33%, 66% e 100%).....**37**

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
CAT	Catalase
CCS	Contagem de células somáticas
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
Ct	<i>Cycle threshold</i>
ΔCt	Delta <i>cycle threshold</i>
$\Delta\Delta$Ct	Delta delta <i>cycle threshold</i>
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GPx1	Glutathione peroxidase 1
mRNA	RNA mensageiro
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RNA	Ácido ribonucleico
RT-qPCR	Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa
SOD	Superóxido dismutase
SOD1	Superóxido dismutase 1
SOD2	Superóxido dismutase 2
SOD3	Superóxido dismutase 3

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA	11
1.1 INTRODUÇÃO	11
1.2 REVISÃO DE LITERATURA	12
1.2.1 Pecuária leiteira	12
1.2.2 Manejo e suplementação	14
1.2.3 Rama da mandioca e seus efeitos na modulação do estresse	15
1.2.4 Células somáticas	16
1.2.5 Estresse oxidativo	17
1.2.6 Genes antioxidantes	18
1.2.6.1 Superóxido dismutase 1, 2 e 3 (SOD 1, 2 e 3)	19
1.2.6.2 Glutathione peroxidase 1 (GPx 1)	19
1.2.6.3 Catalase (CAT)	20
1.2.7 Expressão gênica na glândula mamária	20
1.2.8 Objetivos	21
1.2.8.1 Objetivo Geral	21
1.2.8.2 Objetivos específicos	21
REFERÊNCIAS	22
CAPÍTULO 2 - QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES ANTIOXIDANTES NAS CÉLULAS SOMÁTICAS DO LEITE DE BOVINOS DA RAÇA HOLANDESA SUPLEMENTADOS COM RAMA DE MANDIOCA (<i>Manihot esculenta</i> Crantz) NA DIETA	29
2.1 INTRODUÇÃO	31
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	33
2.2.1 Desenho experimental e coleta das amostras de leite	33
2.2.2 Extração do RNA total e síntese do cDNA	33
2.2.3 Desenho e validação dos primers	34
2.2.4 Ensaios de qRT-PCR para análises de expressão gênica	35
2.2.5 Análise estatística	35
2.3 RESULTADOS	35
2.4 DISCUSSÃO	38
2.5 CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS	43

CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA

1.1 INTRODUÇÃO

A pecuária leiteira desempenha papel central no agronegócio brasileiro, colocando o país entre os maiores produtores mundiais de leite (MAPA, 2022). Os altos níveis de qualidade e produção observados são decorrentes de fatores como a ampla extensão territorial e disponibilidade de diferentes recursos forrageiros e também da adaptação de diferentes raças bovinas aos sistemas de produção nacionais (EMBRAPA 2021; IBGE 2023). A raça Holandesa, destaca-se por sua alta capacidade produtiva e ampla utilização em sistemas intensivos e semi-intensivos de produção (EMBRAPA, 2021). No entanto, vacas Holandesas apresentam elevadas exigências nutricionais, sendo particularmente suscetíveis a distúrbios metabólicos e imunológicos quando submetidas a condições de manejo inadequadas (Gonçalves et al., 2009).

O manejo adequado do gado leiteiro é necessário para a obtenção da maior produtividade, de forma eficiente e saudável (Gonçalves et al., 2009). Estratégias nutricionais que conciliem eficiência produtiva, sustentabilidade econômica e benefícios funcionais à saúde animal são, portanto, de grande interesse para a cadeia leiteira (Giannone et al., 2023; Barbosa et al., 2024). Visando ganhos em produtividade, é crescente o interesse na adoção de novas tecnologias, que aprimoram os processos de produção, como o manejo nutricional, o melhoramento genético dos rebanhos leiteiros e o correto acompanhamento sanitário dos animais (COOPERATIVAGV, 2018).

Nos últimos anos, tem crescido a atenção ao papel do estresse oxidativo como fator limitante à saúde e à produtividade de vacas leiteiras (Celi, 2010; Khan et al., 2019). O processo oxidativo decorre do desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a capacidade antioxidante do organismo, o que leva a danos celulares que comprometem funções metabólicas e imunológicas (Celi, 2010; Giannone et al., 2023). Durante a lactação, o aumento da demanda energética e metabólica favorece a geração de EROs, aumentando a vulnerabilidade da glândula mamária à ocorrência de processos inflamatórios, como a mastite, e impactando diretamente a qualidade do leite (Khan et al., 2019; Cedeño et al., 2022). Nesse contexto, a suplementação com alimentos ricos em compostos bioativos antioxidantes

tem se mostrado uma alternativa promissora para o combate às EROs no organismo (Mustonen et al., 2009; Azad et al., 2022; Li et al., 2023).

A mandioca (*Manihot esculenta*) é uma cultura de interesse em regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo (Wanapat; Kang et al., 2015). Essa fonte nutricional tem se tornado uma alternativa para produtores familiares na formulação de rações para animais devido ao seu valor nutritivo agregado e ao baixo custo de produção, além do aproveitamento de seus subprodutos, como folhas, rama e raiz (Awwioroko, 2016; Aganbi, 2020; Ojo, 2022). Já foi demonstrado que a rama da mandioca apresenta elevado teor de fenóis, flavonoides e outros compostos com reconhecido potencial antioxidante, capazes de modular a atividade de enzimas como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx) (Azad et al., 2022; Li et al., 2023). Contudo, há negligência tanto no aproveitamento quanto nos estudos sobre a utilização da rama da mandioca na suplementação de animais de produção (Ojo, 2022). Um destes fatores é que a produção de mandioca frequentemente está associada a sistemas de pequena escala, com menor acesso a tecnologias e menor incentivo à pesquisa aplicada, o que contribui para a limitada exploração desse subproduto na nutrição de ruminantes (Howeler et al., 2013; Wanapat; Kang, 2015).

No leite, é encontrada uma população heterogênea de células somáticas (Cedeño et al., 2022; Boutinaud; Jammes, 2002), as quais desempenham importantes funções, como componentes da defesa imunológica da glândula mamária e na síntese e secreção de moléculas presentes no leite, como proteínas, lipídios e oligossacarídeos (Knight et al., 1998).

Análises de transcriptomas demonstraram a alta similaridade dos genes expressos na glândula mamária em comparação às células somáticas do leite (Medrano et al., 2010; Wickramasinghe et al., 2012). Esta análise possibilita que as células somáticas representem uma fonte acessível de material biológico para a análise da expressão gênica, permitindo compreender a resposta celular ao estresse oxidativo e às estratégias nutricionais aplicadas (Cedeño et al., 2022).

1.2 REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1 Pecuária leiteira

A pecuária leiteira é uma atividade econômica de grande importância mundial, sendo uma das principais atividades agropecuárias no Brasil (De Jesus et al., 2024).

O Brasil se destaca no agronegócio do leite, ocupando a quarta posição no *ranking* mundial, com produção superior a 35,3 bilhões de litros (EMBRAPA, 2025). Trata-se de uma atividade presente em todas as regiões do Brasil, destacando-se as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste pela concentração de produtores e do volume de produção (Vilela et al., 2022). O estado de Minas Gerais lidera o *ranking* de produção de leite, com 26,63% da captação nacional, seguido por Paraná com 12,88%, e Rio Grande do Sul com 11,63% (EMBRAPA, 2025). A região Sul é uma das principais áreas produtoras de leite no Brasil, conhecida por seus altos índices de produtividade e de qualidade do leite (CONAB, 2024).

A produção de leite no Brasil emprega mais de 4 milhões de pessoas, tornando-se um setor importante do agronegócio (EMBRAPA, 2025). No Brasil destacam-se as raças Holandesa, Jersey, Girolando e a Gir leiteiro (De Miranda; De Freitas, 2009). A raça Holandesa é predominante nas regiões de clima mais ameno, como o Sul do país, principalmente no estado do Paraná (Samaritano, 2021; Viana, 2021). É conhecida por sua elevada capacidade produtiva em condições adequadas de manejo, nutrição e sanidade, podendo vacas dessa raça apresentar médias produtivas superiores a 30 litros de leite por dia, podendo ultrapassar 40 litros/vaca/dia em sistemas altamente tecnificados (EMBRAPA, 2025; IBGE, 2023).

A pecuária leiteira evoluiu positivamente nos últimos anos em relação à produtividade, inovações e tecnologias, bem como à infraestrutura, à saúde animal e ao desenvolvimento sustentável do setor leiteiro (De Jesus et al., 2024). A integração do sistema de produção, com o uso de pastagem rotacionada e suplementação alimentar, permite aos produtores aumentar a produtividade e a competitividade no mercado (Batista et al., 2023). Além disso, a pecuária leiteira brasileira está cada vez mais orientada a práticas sustentáveis, com foco na produtividade e na redução dos impactos ambientais (Giannone et al., 2023). Algumas dessas práticas incluem: Sistemas Integrados de Produção Agropecuária (SIPA), alimentação sustentável, melhoramento genético, bem-estar animal e redução de emissões de gases de efeito estufa (Giannone et al., 2023; MAPA, 2024). A suplementação com subprodutos agroindustriais, como a rama de mandioca, é um exemplo de prática sustentável, pois permite o aproveitamento de recursos locais e reduz a dependência de grãos (Matte et al., 2021; Barbosa et al., 2024), sendo uma fonte alternativa em sistemas de produção familiar.

1.2.2 Manejo e suplementação

O Brasil possui sistemas de produção diversificados, desde a criação em pasto, como o semiconfinamento e o confinamento, sendo possível a criação de raças europeias, zebuínas e seus híbridos, como bovinos da raça Holandesa, Jersey, Girolando (raça sintética oriunda do cruzamento da raça Holandesa e Gir) e o Guzerá (De Miranda; De Freitas, 2009).

Entre as raças de gado leiteiro, a raça Holandesa (*Bos taurus*) ocupa uma posição de destaque devido à sua elevada capacidade de produção (EMBRAPA, 2021). Animais dessa raça apresentam exigência nutricional elevada, especialmente durante o pico de lactação, o que exige estratégias de manejo eficientes para assegurar não apenas a produtividade, mas também a manutenção da saúde animal (Gonçalves et al., 2009).

O manejo dos animais é um dos aspectos críticos para a produção eficiente e a qualidade do leite, incluindo o cuidado com a alimentação, a saúde e o bem-estar (Giannone et al., 2023). Em sistemas intensivos, as vacas recebem uma dieta balanceada, composta por silagem, concentrados (grãos e farelo) e minerais, visando à alta produção (EMBRAPA, 2011; AGRONEGÓCIO DO LEITE/EMBRAPA, 2021). Já no pasto, a suplementação é utilizada para manter a produção e a saúde das vacas (EMBRAPA, 2011; AGRONEGÓCIO DO LEITE/EMBRAPA, 2021). No Brasil, práticas como a inclusão de fontes alternativas de alimento, como a rama de mandioca, têm sido estudadas para reduzir custos sem comprometer a produção de leite (Oliveira et al., 2010; Barbosa et al., 2024).

No desempenho de ruminantes, há evidências de que a inclusão de produtos secundários da agroindústria (PSA) na ensilagem de gramíneas e forrageiras, incorporada às dietas para ovinos, aumentou a ingestão de matéria seca, proteína bruta e fibra em detergente neutro, em resposta à melhora do processo fermentativo das silagens de gramíneas com a incorporação de PSA (Lustosa et al., 2022). Além disso, o uso de farelo de mandioca melhorou o desempenho de cabras leiteiras confinadas (Oliveira et al., 2010).

Em cabras, os efeitos metabólicos da suplementação com folhagem de mandioca sobre crescimento, imunidade e capacidade antioxidante foram investigados por Li et al. (2023), sendo observado aumento dos níveis de GPx (glutathione peroxidase), SOD (superóxido dismutase) e CAT (catalase) quando foram

fornecidas dietas com 50% de silagem da folhagem de mandioca e 50% de capim-rei (*Cenchrus purpureus*).

Além dos efeitos benéficos ao organismo, a melhora do *status* antioxidante impacta positivamente a saúde da glândula mamária e a qualidade do leite (Paschoal et al., 2003; Vieira, 2018). Evidências demonstram que compostos antioxidantes possuem capacidade de reduzir os danos oxidativos no tecido mamário, modulando respostas inflamatórias e protegendo as células secretoras (Khan et al., 2019; Nasiri et al., 2016).

1.2.3 Rama da mandioca e seus efeitos na modulação do estresse

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma cultura amplamente difundida em regiões tropicais, sendo tradicionalmente explorada pela sua raiz como fonte energética na alimentação animal (Wanapat; Kang, 2015). Contudo, sua parte aérea, composta por folhas e hastes, apresenta elevado potencial nutricional, destacando-se como fonte de proteína bruta, fibras e compostos bioativos (Li et al., 2023).

A rama de mandioca é rica em compostos fenólicos, flavonoides e vitaminas com atividade antioxidante, os quais desempenham papel importante na neutralização de espécies reativas de oxigênio (EROs) e na manutenção do equilíbrio redox celular (Karakaya et al., 2001; Jampa et al., 2022). Esses compostos atuam diretamente na redução do estresse oxidativo, podendo influenciar processos metabólicos e imunológicos em animais de produção (Sordillo, 2016; Celi, 2010).

Além disso, há evidências de que compostos bioativos presentes em alimentos de origem vegetal podem modular a expressão gênica por meio da ativação de vias celulares relacionadas à resposta antioxidante, como aquelas mediadas por fatores de transcrição sensíveis ao estado redox (De Nadal et al., 2011). Nesse contexto, enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) são fundamentais na defesa celular contra danos oxidativos, sendo sua expressão regulada em resposta a alterações no ambiente oxidativo (Fridovich, 1997; Halliwell; Gutteridge, 2000).

A inclusão de derivados da mandioca na alimentação de ruminantes pode promover melhorias na capacidade antioxidante, no sistema imune e no metabolismo ruminal, sugerindo um efeito modulador sobre processos fisiológicos importantes (Li et al., 2023). A integridade das células epiteliais secretoras da glândula mamária pode

ser preservada por mecanismos antioxidantes, o que contribui para menor infiltração de leucócitos, diminuição de processos inflamatórios e, consequentemente, para a redução da contagem de células somáticas (CCS) no leite (Choi et al., 2007; Khan et al., 2019; Wang et al., 2002). Logo, estratégias nutricionais que promovam o equilíbrio redox celular, como a suplementação com flavonoides, vitaminas e compostos fenólicos, favorecem o desempenho produtivo e a saúde da glândula mamária, sendo eficazes na prevenção de doenças como a mastite, diretamente relacionadas ao aumento da CCS (Celi, 2010; Azimi et al., 2020; Li et al., 2023).

1.2.4 Células somáticas

As células somáticas presentes no leite são, em sua maioria, constituídas por leucócitos (neutrófilos, macrófagos e linfócitos) e, em menor proporção, por células epiteliais descamadas da glândula mamária (Oliveira et al., 2015; Khan et al., 2019). A presença dessas células no leite é um fenômeno fisiológico, e sua elevação significativa ocorre em resposta a processos inflamatórios, como a mastite, refletindo a ativação do sistema imunológico mamário (Carneiro; Domingues; Vaz, 2009).

A CCS é utilizada, em muitos casos, como indicador da qualidade do leite e da saúde da glândula mamária (Rehagro, 2022). Os níveis fisiológicos geralmente encontram-se abaixo de 200.000 células/mL; valores superiores podem indicar uma possível infecção subclínica ou o início de um quadro inflamatório (Carneiro; Domingues; Vaz, 2009). A CCS elevada está ligada à redução da produção de leite, alterações da sua composição, especialmente em concentração de lactose e caseína, e ao menor rendimento industrial, resultando em impactos econômicos significativos para o sistema produtivo (Oliveira et al., 2015; Khan et al., 2019).

A utilização das células somáticas do leite como biomarcadores moleculares tem se destacado na pesquisa científica, ao permitir avaliações indiretas da fisiologia da glândula mamária (Vieira, 2018; Li et al., 2023). Por serem células vivas e metabolicamente ativas, os leucócitos presentes no leite expressam genes relacionados à resposta imune e ao metabolismo oxidativo, oferecendo uma alternativa não invasiva para investigação de processos celulares em ruminantes (Celi, 2010; Li et al., 2023).

Estudos demonstram que a elevação da CCS pode estar acompanhada da ativação da defesa antioxidante, com alterações nos níveis de expressão dos genes

GPx, *SOD* e *CAT*, os quais, quando traduzidos, resultam em enzimas que atuam na neutralização de espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas durante o estresse inflamatório (Celi, 2010; Azimi et al., 2020; Li et al., 2023).

1.2.5 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de EROs e a capacidade antioxidante do organismo de neutralizá-las (Aitken; Roman, 2009; Celi, 2010). As EROs, como o superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($OH^\cdot$), são subprodutos naturais do metabolismo celular, geradas principalmente em mitocôndrias e células fagocitárias durante processos inflamatórios (Azimi et al., 2020; Li et al., 2023). Em condições fisiológicas normais, as EROs desempenham papéis na sinalização celular e na defesa imunológica, e a produção excessiva destas moléculas pode resultar em danos a biomoléculas essenciais, como lipídios, proteínas e o DNA (Aitken; Roman, 2009; Vieira, 2018).

Na bovinocultura leiteira, o estresse oxidativo representa um desafio recorrente em vacas de alta produção, especialmente durante o período de transição e no início da lactação (Sordillo, 2016). Nessa fase, o aumento da atividade metabólica, em conjunto com fatores como o estresse térmico, inflamações subclínicas e dieta inadequada, favorece a geração de EROs e compromete o sistema antioxidante do organismo (Bernabucci et al., 2005; Khan et al., 2019). A glândula mamária é altamente sensível a esses desequilíbrios, o que favorece maior incidência de mastite e, conseqüentemente, a elevação da CCS no leite (Carneiro; Domingues; Vaz, 2009; Oliveira et al., 2015).

Para neutralizar os efeitos das EROs, o organismo dispõe de sistemas antioxidantes, tanto enzimáticos quanto não enzimáticos (Barbosa et al., 2010). Entre os mecanismos enzimáticos, destacam-se as enzimas superóxido dismutases (*SOD*), as glutationalas peroxidases (*GPx*), e a catalase (*CAT*), que agem de forma coordenada na eliminação dos radicais livres (Celi, 2010; Azimi et al., 2020; Li et al., 2023). A atividade dessas enzimas pode ser modulada por fatores nutricionais, sendo influenciada pela ingestão de compostos como selênio, vitamina E, polifenóis e flavonoides (Sordillo, 2016).

Estratégias nutricionais que incluam antioxidantes têm sido amplamente investigadas devido ao seu potencial para mitigar o estresse oxidativo e promover

maior resistência imunológica em vacas leiteiras (Sordillo, 2016; Azimi et al., 2020). A avaliação dessa condição pode ser realizada por meio de marcadores bioquímicos, como níveis de malondialdeído (MDA) ou da atividade antioxidante total, além de análises a nível molecular, como a expressão de genes antioxidantes em células acessíveis, como as células somáticas do leite (Vieira, 2018; Li et al., 2023). A análise da expressão de genes antioxidantes nas células somáticas permite inferir a ativação das vias de defesa endógenas contra o estresse oxidativo, além de avaliar a eficácia de estratégias nutricionais aplicadas à dieta (Celi, 2010; Matte et al., 2021; Li et al., 2023).

1.2.6 Genes antioxidantes

A maquinaria enzimática antioxidante desempenha papel importante no ambiente celular (Choi et al., 2007; Wang et al., 2002), cuja função é evitar danos oxidativos decorrentes da geração de EROs (Nasiri et al., 2016). A linha de defesa significativa contra espécies reativas de oxigênio é composta por enzimas como GPx, CAT e SOD (Karakaya et al., 2001). Também foi demonstrado que a capacidade antioxidante do leite e de produtos lácteos é devida ao aminoácido cisteína, que contém enxofre, às vitaminas A, E e aos carotenoides (Mustonen et al., 2009). Dessa forma, radicais superóxido, hidroxila e peróxido podem ser inibidos pelos sistemas antioxidantes do leite (Khan et al., 2019). É conhecido que a oxidação lipídica é a principal causa da deterioração química de alimentos e de produtos lácteos, levando a alterações indesejáveis no valor nutricional, no sabor e na textura (Erel, 2004).

A expressão de genes com perfil antioxidante no leite pode ser influenciada por diversos fatores, incluindo a dieta das vacas, o estado de saúde dos animais, o manejo da produção de leite e outros fatores ambientais (Jai, 2018). Um estresse oxidativo acentuado, associado à diminuição das propriedades pró-oxidantes no desempenho da lactação de vacas leiteiras, pode ser corrigido pela suplementação com agente antioxidante nas dietas, mitigando o início da peroxidação lipídica (Celi, 2010). Em geral, a suplementação de potenciais agentes antioxidantes, como vitamina C e/ou vitamina E nas dietas, pode proteger lipídios e estruturas lipídicas contra a peroxidação (Saleh et al., 2018; Azimi et al., 2020).

Tian et al. (2019) avaliaram o efeito da dieta sobre o fluido ruminal, o tecido mamário e o plasma de cabras Saanen alimentadas com silagem rica em

antocianinas. Animais alimentados com silagem rica em antocianinas apresentaram valores elevados da enzima SOD no plasma e de SOD2, GPx1 e GPx2 na glândula mamária, indicando que dietas ricas em agentes antioxidantes podem alterar a expressão de genes antioxidantes.

1.2.6.1 *Superóxido dismutase 1, 2 e 3 (SOD 1, 2 e 3)*

De acordo com Halliwell e Gutteridge (2000), a SOD foi a primeira enzima antioxidante a ser descoberta em células eucarióticas aeróbicas. Ela age sobre o ânion superóxido (O_2^-), dismutando o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas, como a CAT e as GPx, que convertem H_2O_2 em H_2O e O_2 (Miorelli, 2006). O acúmulo de peróxido de hidrogênio pode causar danos às biomoléculas, como proteínas, lipídios e ao DNA. Também é conhecido que a SOD pode inibir a peroxidação lipídica (Fang et al., 2002).

A reação de dismutação do ânion superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio é representada da seguinte forma: $2 O_2^- + 2 H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$

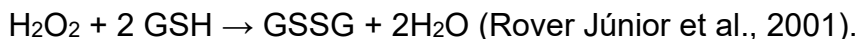
As SOD formam uma família de metaloenzimas, podendo se ligar com cobre e zinco no citosol de células eucarióticas, com magnésio nas mitocôndrias, e com ferro e níquel em bactérias (Schogor, 2012). Sua estrutura tridimensional é importante para a sua função, pois permite que a enzima catalise a reação de dismutação do superóxido de forma eficiente.

Existem diferentes formas de SOD, encontradas em meios extracelular e intracelular (Fridovich, 1997). A SOD1 atua no citosol e no espaço intermembranar das mitocôndrias, a SOD2 atua nas mitocôndrias, enquanto a SOD3 remove superóxido no ambiente extracelular (Fang et al., 2002; Miorelli, 2006).

1.2.6.2 *Glutathione peroxidase 1 (GPx 1)*

As enzimas GPx, atuam no citosol e nas mitocôndrias, reduzindo de forma seletiva o H_2O_2 em água, utilizando-se da glutathione reduzida (GSH) como cofator para sua ação antioxidante (Andrés et al., 2022). As GPx são seleno-enzimas cuja ação é baseada na oxidação da GSH ao dissulfeto correspondente, glutathione oxidada (GSSG) (Vasconcelos et al., 2007).

A equação que determina a reação de redução do peróxido de hidrogênio pela GPx é:



A principal função da GPx é neutralizar os radicais livres e os peróxidos de lipídios, que podem causar danos às células, proteínas e ácidos nucleicos, prevenindo o estresse oxidativo e auxiliando na manutenção da integridade celular (Miorelli, 2006). Na mitocôndria de mamíferos, a GPx é a principal defesa contra o H_2O_2 , já que, de modo geral, estas organelas não possuem CAT e peróxidos orgânicos (ROOH) (Miorelli, 2006).

Em mamíferos, há pelo menos quatro diferentes tipos de GPx, todas elas contendo selenocisteína. A GPx1 é uma enzima abundante na maioria dos tecidos com alta tensão de oxigênio (pulmão, fígado, rins e pâncreas), enquanto a GPx3 é expressa principalmente nos rins (Morelli, 2006). Todas as GPx podem catalisar a redução do H_2O_2 , utilizando GSH como substrato (Nordberg; Arnér, 2001).

1.2.6.3 *Catalase (CAT)*

A catalase é uma ferro-hemoenzima essencial para a sobrevivência de muitos organismos, pois desempenha um papel crítico na decomposição do H_2O_2 , substância tóxica para as células, em água e oxigênio. É encontrada nos peroxissomos e mitocôndrias das células, e também no citosol dos eritrócitos (Ferro et al., 2010). A atividade da catalase é monitorada pela redução da concentração de H_2O_2 ou pela geração de oxigênio (Vasconcelos et al., 2007). Possui função de dismutar o H_2O_2 em H_2O e O_2 , pela reação:



1.2.7 **Expressão gênica na glândula mamária**

A expressão gênica é um processo fundamental no qual a informação contida em um gene é transcrita em uma molécula de RNA. No caso dos RNA mensageiros (RNAm), estes podem ser traduzidos em proteína, de acordo com os processos regulatórios do organismo (Perdew et al., 2006). Esse processo é importante para todos os organismos vivos, uma vez que determina a estrutura e função da célula e, portanto, o fenótipo geral do organismo. Além disso, esse processo será essencial para a regulação das funções celulares e para a manutenção da homeostase em um organismo (Dalton et al., 1999; De Nadal et al., 2011). Dessa forma, a expressão gênica determina quais proteínas ou RNAs estruturais são produzidos, quando são

produzidos e em quais quantidades (De Nadal et al., 2011). O processo de expressão gênica é vital para processos como diferenciação celular, crescimento e resposta a estímulos ambientais (Wilson, 2013).

A glândula mamária é um órgão complexo cuja função é a produção e secreção de leite, essencial para a alimentação dos bezerros, e a produção de laticínios para consumo humano (Rezaei et al., 2016). O desenvolvimento da glândula mamária passa por várias fases, desde a formação inicial no feto até a lactação em vacas adultas (Mukherjee et al., 2023).

Os genes expressos na glândula mamária durante a lactação de vacas leiteiras serão responsáveis pela produção de importantes componentes do leite (German et al., 2002). Dos principais genes expressos na glândula mamária e nas células somáticas do leite estão aqueles que codificam caseínas, proteínas do soro de leite, enzimas envolvidas na síntese da lactose, proteases endógenas, antioxidantes, metabolismo da gordura, entre outros (Wickramasinghe et al., 2012).

Estudos de transcriptoma apontaram um elevado grau de similaridade entre os genes expressos na glândula mamária em comparação aos expressos nas células somáticas do leite, eliminando, assim, a necessidade de biópsia do tecido mamário para estudos de expressão gênica (Cánovas et al., 2014).

1.2.8 Objetivos

1.2.8.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência da suplementação com rama de mandioca na dieta de vacas leiteiras sobre a expressão de genes antioxidantes em células somáticas do leite de vacas da raça Holandesa.

1.2.8.2 Objetivos específicos

- Quantificar a expressão de genes antioxidantes em células somáticas do leite de vacas suplementadas com diferentes concentrações de rama de mandioca.
- Relacionar os resultados obtidos à ação antioxidante e ao equilíbrio redox em vacas leiteiras.
- Discutir a viabilidade da utilização da rama de mandioca como suplemento funcional em dietas de vacas Holandesas.

REFERÊNCIAS

- AGANBI, E.; ANIGBORO, A. A.; TONUKARI, N. J. Changes in glucose, amylase and soluble proteins levels in solid-state fermented yam (*Dioscorea* sp.) peels by *Rhizopus oligosporus*. **Nigerian Journal of Science and Environment**, v. 18, p. 161–167, 2020.
- AGÊNCIA DE EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – AGRONEGÓCIO DO LEITE. Alimentação e manejo de novilhas. Brasília, DF: Embrapa Gado de Leite, 2021. Disponível em: <https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/LeiteRecriadeNovilhas/alimentacao.htm>. Acesso em: 17 fev. 2025.
- AITKEN, R. J.; ROMAN, S. D. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 1, n. 1, p. 15–24, 2009. DOI: <https://doi.org/10.4161/oxim.1.1.5831>.
- ANDRÉS, C. M. C.; PÉREZ DE LA LASTRA, J. M.; JUAN, C. A.; PLOU, F. J.; PÉREZ-LEBEÑA, E. Chemistry of hydrogen peroxide formation and elimination in mammalian cells, and its role in various pathologies. **Stresses**, v. 2, n. 3, p. 256-274, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/stresses2030019>.
- AVWIOROKO, O. J.; ANIGBORO, A. A.; TONUKARI, N. J. Biotechnological application of cassava-degrading fungal (CDF) amylase in broiler feed formulation. **British Biotechnology Journal**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2016. DOI: <https://doi.org/10.9734/BBJ/2016/20614>.
- AZAD, M. A. K.; JIANG, H.; LIU, Y.; HUANG, P.; FANG, J.; KONG, X. Diets partially replaced with cassava residue modulate antioxidant capacity, lipid metabolism, and gut barrier function of Huanjiang Mini-Pigs. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 9, p. 902328, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.902328>.
- AZIMI, V.; MIRAKZEHI, M. T.; SALEH, H. Hydroalcoholic extract of *Withania somnifera* leaf and α -tocopherol acetate in diets containing oxidised oil: effects on growth performance, immune response, and oxidative status in broiler chickens. **Italian Journal of Animal Science**, v. 19, n. 1, p. 917-928, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1080/1828051X.2020.1799153>.
- BARBOSA, C. R.; COSTA, C.; MEIRELLES, P. R. L.; TORRES, R. D. N. S. Sustentabilidade na produção de ruminantes: o papel dos produtos secundários agroindustriais na ensilagem de gramíneas forrageiras. **Agricultural Innovations: Techniques and Knowledge in the Field**, p. 76, 2024. DOI: <https://doi.org/10.54751/edfoco.978-65-83117-05-2>.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, p. 629-643, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>.
- BATISTA, G. S. Alfafa (*Medicago sativa*). INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO RIO GRANDE DO SUL (IFRS), 2023. Disponível em: <https://dspace.ifrs.edu.br/handle/123456789/1289>. Acesso em: 30 jun. 2025.
- BERNABUCCI, U. RONCHI, B. LACETERA, N. NARDONE, A. Influence of body condition score on relationships between metabolic status and oxidative stress in

periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 6, p. 2017-2026, 2005. DOI: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72878-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72878-2).

BOUTINAUD, M.; JAMMES, H. Potential uses of milk epithelial cells: a review. **Reproduction Nutrition Development**, v. 42, p.133-147, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1051/rnd:2002013>.

CÁNOVAS, A.; RINCÓN, G.; BEVILACQUA, C.; ISLAS-TREJO, A.; BRENAUT, P.; HOVEY, R. C.; BOUTINAUD, M.; MORGENTHALER, C.; VANKLOMPENBERG, M.; MARTIN, P.; MEDRANO, J. Comparison of five different RNA sources to examine the lactating bovine mammary gland transcriptome using RNA-Sequencing. **Scientific Reports** v. 4, p. 5297, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep05297>.

CARNEIRO, D. M. V. F.; DOMINGUES, P. F.; VAZ, A. K. Imunidade inata da glândula mamaria bovina: resposta à infecção. **Ciência Rural**, v. 39, p. 1934-1943, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782009005000106>.

CASTRO, P. M. Produção bovina leiteira no Brasil: revisão bibliográfica. **Universidade Estadual Paulista**, 2023. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/entities/publication/70cdf9a-0237-484a-8563-e90e620ebffe>. Acesso em: 17 fev. 2025.

CEDEÑO, C. B.; DOMÍNGUEZ, R. L.; ORDOÑEZ, V. V.; CARRANZA, B. V.; VÁZQUEZ, A. G. Importance of somatic cell count in determining udder health and milk quality. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 5, n. 1, p. 104–123, 2022. DOI: <https://doi.org/10.34188/bjaerv5n1-009>.

CELI, P. The role of oxidative stress in small ruminants' health and production. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 348–363, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982010001300038>.

CHOI, W.J.; BANERJEE, J.; FALCONE, T.; BENA, J.; AGARWAL, A.; SHARMA, R.K. Oxidative stress and tumor necrosis factor- α -induced alterations in metaphase II mouse oocyte spindle structure. **Fertility and Sterility**, v. 88, p. 1220–1231, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.02.067>.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Análise mensal do leite – janeiro 2024: Rio Grande do Sul. Brasília, DF: Conab, 2024. Disponível em: <https://repositorio.cgu.gov.br/handle/1/93917>. Acesso em: 21 fev. 2025.

COOPERATIVAGV. A importância econômica da produção leiteira para o Brasil. **Cooperativagv**, 2018. Disponível em: <https://cooperativa.coop.br/a-importancia-economica-da-producao-leiteira-para-o-brasil/>. Acesso em: 21 out. 2024.

DALTON, T. P.; SHERTZER, H. G.; PUGA, A. Regulation of gene expression by reactive oxygen. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 39, n. 1, p. 67-101, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.39.1.67>.

DE JESUS, L. R., VIEIRA, P. R. P., PEREIRA, S. G., OLIVEIRA, N. M. Produção de leite no Brasil, Minas Gerais e mesorregião do Alto Paranaíba: Uma breve revisão narrativa de literatura. **Scientia Generalis**, v. 5, n. 2, p. 500-507, 2024. DOI: <https://doi.org/10.22289/sq.V5N2A53>.

DE MIRANDA, J. E. C., DE FREITAS, A. F. Raças e tipos de cruzamentos para produção de leite. Brasília, DF: **EMBRAPA**, 2009. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/737102>. Acesso em: 21 out. 2024.

DE NADAL, E.; AMMERER, G.; POSAS, F. Controlling gene expression in response to stress. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, n. 12, p. 833-845, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrg3055>.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Brasil em 50 Alimentos – 2023: leite de vaca no Brasil. Disponível em: <https://sustennutri.com.br/leite-de-vaca-no-brasil/>. Acesso em: 28 out. 2024.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Manual prático para formulação de ração para vacas leiteiras. Coleção Documentos, n. 145. Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia, 2011. 50 p. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/934384>. Acesso em: 28 out. 2024.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Anuário Leite 2025: produção, mercado e perspectivas. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2025. Disponível em: <https://www.embrapa.br/gado-de-leite>. Acesso em: 10 jan. 2026.

EREL, Ö. A novel automated method to measure total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. **Clinical Biochemistry**, v. 7, p. 277–285, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2003.10.014>.

FERRO, C. O., CHAGAS, V. L. A., OLIVEIRA, M. F., OLIVEIRA, P. L., SCHANAIDER, A. Atividade da catalase no pulmão, rim e intestino delgado não isquemiado de ratos após reperfusão intestinal. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgias**, v.37, n1, p.31-38, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-69912010000100008>.

FRIDOVICH, I. Superoxide anion radical, superoxide dismutases, and related matters. **The Journal of Biological Chemistry**, v.272, n.30, p.18515-18517, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.272.30.18515>.

FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. **Journal of Experimental Biology**, v.201, p.1203-1209, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1242/jeb.201.8.1203>.

GERMAN, J. B.; DILLARD, C. J.; WARD, R. E. Bioactive components in milk. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 5, n. 6, p. 653-658, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1097/00075197-200211000-00007>.

GONÇALVES, L. C.; BORGES, I.; FERREIRA, P. D. S. Alimentação do gado de leite. **FEPMVZ**, p. 412, 2009. Disponível em: <https://vet.ufmg.br/ARQUIVOS/FCK/file/Livro%20-%20Alimenta%C3%A7%C3%A3o%20de%20Gado%20de%20Leite.pdf>. Acesso em: 21 out. 2024.

GIANNONE, C., BOVO, M., CECCARELLI, M., TORREGGIANI, D., TASSINARI, P. Review of the heat stress-induced responses in dairy cattle. **Animals**, 13, n 22: 3451, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/ani13223451>.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radical in Biology and Medicine. New York: Oxford University Press, 2000.

HOWELER, R. H., LUTALADIO, N., THOMAS, G. Save and grow: cassava: a guide to sustainable production intensification. Rome: **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Produção da Pecuária Municipal 2022. Rio de Janeiro: **IBGE**, 2022. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br>. Acesso em: 21 out. 2024.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Indicadores IBGE: estatística da produção pecuária. **IBGE**, p. 25-26, 2023. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br>. Acesso em: 21 out. 2024.

JAI - JORNADA ACADÊMICA INTEGRADA. Jornada Acadêmica Integrada: compilação de artigos de 2016 [31ª Jornada Acadêmica Integrada]. Santa Maria: **FACOS-UFSM**, 2018. Disponível em: https://www.ufsm.br/app/uploads/sites/681/2020/07/ebook_2016-2.pdf. Acesso em: 29 ago. 2025.

KARAKAYA, S.; EL, S.N.; TAS, A.A. Antioxidant activity of some foods containing phenolic compounds. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 52, p. 501–508, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1080/09637480020027000-6-6>.

KHAN, I. T.; NADEEM, M.; IMRAN, M.; ULLAH, R.; AJMAL, U.; JASPAL, M. H. Antioxidant properties of Milk and dairy products: a comprehensive review of the current knowledge. **Lipids in Health and Disease**, v. 18, p. 1-13, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12944-019-0969-8>.

KNIGHT, C.; PEAKER, M.; WILDE, C. Local control of mammary development and function. **Reviews of Reproduction**, v. 3, p.104-112, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1530/revreprod/3.2.104>.

LI, M.; ZI, X.; ZHOU, H.; LV, R.; TANG, J.; CAI, Y. Silage fermentation and ruminal degradation of cassava foliage prepared with microbial additive. **Amb Express**, v. 9, p. 1-6, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0906-2>.

LI, M.; ZI, X.; LV, R.; ZHANG, L.; OU, W.; CHEN, S.; HOU, G.; ZHOU, H. Cassava Foliage Effects on Antioxidant Capacity, Growth, Immunity, and Ruminal Microbial Metabolism in Hainan Black Goats. **Microorganisms**, v. 11, n. 9, p. 2320, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11092320>.

LINDMARK-MÅNSSON, H.; BRÄNNING, C.; ALDÉN, G.; PAULSSON, M. Relationship between somatic cell count, individual leukocyte populations and milk components in bovine udder quarter milk. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 717-727, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.07.003>.

LUSTOSA, T. N. M. VARGAS, J. A. C.; LUSTOSA, J. L.; DA SILVA, B. P.; SOARES, A. S.; SANTOS, V. F. S.; GOMES, D. I.; ALVES, K. S.; OLIVEIRA, L. R. S.; MACIEL, R. P.; MEZZOMO, R. Açaí seed as an additive in *Panicum maximum* cv. Mombasa ensiling for ruminant nutrition: An alternative to reduce environmental pollutants. **Cleaner Waste Systems**, v. 3, 100035, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clwas.2022.100035>.

MATTE, W. D.; DA SILVA, H. M.; ZEGERINO, C. P. Subprodutos da mandioca como alimento alternativo para frangos de corte. **Pubvet**, v. 15, p. 176, 2021. DOI: <https://doi.org/10.31533/pubvet.v15n08a895.1-11>.

MEDRANO, J.F.; RINCON, G.; ISLAS-TREJO, A. Comparative analysis of bovine milk and mammary gland transcriptome using RNA-Seq. **9th World Congress on Genetics applied to Livestock Production**; p. 85, 2010.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA (MAPA). Mapa do Leite: Políticas Públicas e Privadas para o leite. Brasília, DF, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/producao-animal/mapa-do-leite>.

MIORELLI, S. T. Efeitos biológicos do composto organoselenado ebselen em células eucarióticas. **ULBRA**, p. 20-22, 2006. Disponível em: https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/59549/Resumo_20050485.pdf?sequencia=1. Acesso em: 30 jun. 2025.

MUKHERJEE, J.; DAS, P. K.; BANERJEE, D. Lactation Physiology. In: Textbook of Veterinary Physiology. Singapore: **Springer Nature Singapore**, 2023. p. 639-674. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-981-19-9410-4>.

MUSTONEN, E.A.; TUORI, M.; SASTAMOINEN, I.; TAPONEN, J.; WAHALA, K.; SALONIEMI, H.; VANHATALO, A. Equol in milk of dairy cows is derived from forage legumes such as red clover. **British Journal of Nutrition**, v. 102, p. 1552–1556, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0007114509990857>.

NASIRI, N.; MOINI, A.; EFTEKHARI-YAZDI, P.; KARIMIAN, L.; SALMAN-YAZDI, R.; ARABIPOOR, A. Oxidative stress statues in serum and follicular fluid of women with endometriosis. **Cell Journal**, v. 18, p. 582–587, 2016. DOI: <https://doi.org/10.22074/cellj.2016.4724>.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**, v.31, p.1287-1312, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00724-9](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00724-9).

PASCHOAL, J. J.; ZANETTI, M. A.; CUNHA, J. A. Efeito da suplementação de selênio e vitamina E sobre a incidência de mastite clínica em vacas da raça holandesa. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 3, p. 249-255, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-09352003000300001>.

PERDEW, G. H.; VANDEN HEUVEL, J. P.; PETERS, J. M. (Ed.). Transcriptional Regulation of Gene Expression. Regulation of gene expression: molecular mechanisms. Totowa, NJ: **Humana Press**, 2006. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-59745-228-1_4.

OJO, I.; APIAMU, A.; EGBUNE, E. O.; TONUARI, N. J. Biochemical characterization of solid-state fermented cassava stem (*Manihot esculenta* Crantz-MEC) and its application in poultry feed formulation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 194, n. 6, p. 2620-2631, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12010-022-03871-2>.

OLIVEIRA, J. B.; PIRES, A. J. V.; CARVALHO, G. G. P.; RIBEIRO, L. S. O.; CRUZ, J. F.; SILVA, F. F. Subprodutos industriais na ensilagem de capim-elefante para cabras leiteiras: consumo, digestibilidade de nutrientes e produção de leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 411-418, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982010000200026>.

OLIVEIRA, V. M.; MENDONÇA, L. C.; MIRANDA, J. E. C.; DINIZ, F. H.; REIS, E. S. dos; GUIMARÃES, A. S.; MAGALHÃES, V. M. A. de. *Como identificar a vaca com mastite em sua propriedade: Cartilha elaborada conforme a metodologia e-Rural*. Brasília, DF: Embrapa Gado de Leite, 2015. 40 p. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1055198>. Acesso em: 27 fev. 2025.

REZAEI, R.; WU, Z.; HOU, Y.; BAZER, F. W.; WU, G. Amino acids and mammary gland development: nutritional implications for milk production and neonatal growth. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 7, p. 1-22, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40104-016-0078-8>.

REHAGRO. *Contagem de células somáticas do leite: definição, importância e como reduzir*. [S.l.], 2022 (ou ano aproximado da publicação). Disponível em: <https://rehagro.com.br/blog/contagem-de-celulas-somaticas-do-leite-definicao-importancia-e-como-reduzir/>. Acesso em: 21 fev. 2025.

ROVER JÚNIOR, L.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P.; KUBOTA, L. T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v.24, p.112-119, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422001000100019>.

SALEH, H.; GOLIAN, A.; KERMANSHAHI, H.; MIRAKZEHI, M. T. Antioxidant status and thigh meat quality of broiler chickens fed diet supplemented with α -tocopherolacetate, pomegranate pomace and pomegranate pomace extract. **Italian Journal of Animal Science**, v.17(2), p. 386–395, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1080/1828051X.2017.1362966>.

SAMARITANO, J. Conheça as principais raças de vacas-leiteiras do Brasil. A Pecuária de Precisão, 2021. Disponível em: <https://apecuariadeprecisao.com.br/blog/racas-de-vacas-leiteiras/>. Acesso em: 21 fev. 2025.

SCHOGOR, A. L. B. Perfil oxidativo e metabolismo ruminal de vacas leiteiras alimentados com farelo de linhaça. **UEM**, p. 4-5, 2012. Disponível em: <http://repositorio.uem.br:8080/jspui/handle/1/1597>. Acesso em: 30 jun. 2025.

SORDILLO, L. M. Nutritional strategies to optimize dairy cattle immunity. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 6, p. 4967–4982, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10354>.

TIAN, X. Z.; XIN, H.; PAENGKOUM, P.; PAENGKOUM, S.; BAN, C.; SORASAK, T. Effects of anthocyanin-rich purple corn (*Zea mays* L.) stover silage on nutrient utilization, rumen fermentation, plasma antioxidant capacity, and mammary gland gene expression in dairy goats. **Journal of Animal Science**, v. 97(3), p. 1384–1397, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1093/jas/sky477>.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v.30, p. 1323-1338, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000500046>.

VIANA, E. Principais raças de vacas leiteira utilizadas no Brasil. **ESTEIO – Gestão Agropecuária**, 2021. Disponível em: <https://blog.esteiogestao.com.br/principais-racas-de-vacas-leiteiras-utilizadas-no-brasil/>. Acesso em: 20 out 2024.

VIEIRA, A. P. B. Avaliação da capacidade antioxidante do colostro de puérperas internadas em uma maternidade de alto risco. Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Maceió, 2018. Disponível em: <https://repositorio.ufal.br/handle/riufal/3273>. Acesso em: 01 jul. 2025.

VILELA, D.; ANDRADE, R. G.; LEITE, J. L. B.; MAGALHAES JUNIOR, W. C. P. Produção de Leite no Cerrado: conjuntura e análises. In: HOTT, M. C.; ANDRADE, R. G.; MAGALHAES JUNIOR, W. C. P. de (org.). **Geotecnologias: aplicações na cadeia produtiva do leite**, p. 77-81, 2022. DOI: <https://doi.org/10.22533/at.ed.400221901>.

WANAPAT, M.; KANG, S. Cassava chip (*Manihot esculenta* Crantz) as an energy source for ruminant feeding. **Animal Nutrition**, v.1, n. 4, p. 266-270, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2015.12.001>.

WANG, X.; FALCONE, T.; ATTARAN, M.; GOLDBERG, J.M.; AGARWAL, A.; SHARMA, R.K. Vitamin C and vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. **Fertility and Sterility**, v. 78, p. 1272–1277, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(02\)04236-X](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(02)04236-X).

WICKRAMASINGHE, S.; RINCON, G.; ISLAS-TREJO, A.; MEDRANO, J.F. Transcriptional profiling of bovine milk using RNA sequencing. **BMC Genomics**, v.13, p.1-14, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-45>.

WILSON, D. F. Regulation of cellular metabolism: programming and maintaining metabolic homeostasis. **Journal of Applied Physiology**, v. 115, n. 11, p. 1583-1588, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00894.2013>.

CAPÍTULO 2 - QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES ANTIOXIDANTES NAS CÉLULAS SOMÁTICAS DO LEITE DE BOVINOS DA RAÇA HOLANDESA SUPLEMENTADOS COM RAMA DE MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz) NA DIETA

RESUMO

A busca por estratégias nutricionais que minimizem as perdas de produtividade associadas a eventos de estresse oxidativo tem ganhado destaque na pecuária leiteira. A utilização de subprodutos agroindustriais, como a rama de mandioca (*Manihot esculenta*), surge como uma alternativa promissora devido ao seu potencial antioxidante e à sua viabilidade como ingrediente alimentar. Contudo, as informações sobre a modulação da expressão gênica decorrente da adição de rama de mandioca à dieta de bovinos de leite são precárias. Assim, esse estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da suplementação com rama de mandioca na dieta de vacas leiteiras sobre a expressão de genes antioxidantes. Oitos animais da raça Holandesa foram utilizados em duplo quadrado latino (4X4), com quatro tratamentos e quatro períodos experimentais. Os tratamentos foram: T1 (0%), T2 (33%), T3 (66%) e T4 (100%) de suplementação com rama de mandioca. Amostras de leite foram coletadas e centrifugadas, e o RNA total foi extraído das células somáticas. A análise da expressão relativa dos genes antioxidantes *SOD1*, *SOD2*, *SOD3*, *GPx1* e *CAT* foi realizada por meio de ensaios de qRT-PCR. Os resultados da quantificação dos níveis de mRNA não revelaram diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos. Embora não significativos, os resultados demonstraram que a dieta com rama de mandioca apresentou uma tendência de diminuição da expressão dos genes *SOD1*, *SOD3*, e *CAT*, enquanto *SOD2* e *GPx1* tiveram tendência de aumento de expressão em suplementações intermediárias. Os dados foram discutidos com base em múltiplas variáveis que podem interferir no metabolismo da glândula mamária, bem como no local de atuação das enzimas expressas por esses genes. Os resultados sugerem que a suplementação com rama de mandioca exerce efeitos sutis e dependentes da dose sobre o sistema antioxidante das células somáticas do leite, com provável atuação na redução da formação de espécies reativas de oxigênio.

Palavras-chave: EROS; Estresse Oxidativo; Nutrição; Quantificação de mRNA.

ABSTRACT

The search for nutritional strategies to minimize productivity losses associated with oxidative stress has gained prominence in dairy production. The use of agro-industrial by-products, such as cassava foliage (*Manihot esculenta*), has emerged as a promising alternative due to its antioxidant potential and its feasibility as a feed ingredient. However, information on the modulation of gene expression resulting from the inclusion of cassava foliage in dairy cattle diets remains limited. Thus, this study aimed to evaluate the effects of supplementing the diet of dairy cows with cassava foliage on the expression of antioxidant genes. Eight Holstein cows were used in a double 4×4 Latin square design, with four treatments and four experimental periods. The treatments were: T1 (0%), T2 (33%), T3 (66%), and T4 (100%) cassava foliage inclusion. Milk samples were collected, centrifuged, and total RNA was extracted from milk somatic cells. The relative expression of the antioxidant genes SOD1, SOD2, SOD3, GPx1, and CAT was analyzed by RT-qPCR. The mRNA quantification results showed no statistically significant differences among treatments. Although not significant, the results indicated a tendency for decreased expression of SOD1, SOD3, and CAT, while SOD2 and GPx1 showed a tendency toward increased expression at intermediate supplementation levels. The data were discussed in light of multiple variables that may influence mammary gland metabolism, as well as the sites of action of the enzymes encoded by these genes. The results suggest that cassava foliage supplementation exerts subtle, dose-dependent effects on the antioxidant system of milk somatic cells, with a potential role in reducing reactive oxygen species formation.

Keywords: mRNA quantification; Nutrition; Oxidative stress; Reactive oxygen species.

2.1 INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa posição de destaque na produção de leite, em razão da diversidade de sistemas produtivos e da adaptação de diferentes raças bovinas às condições tropicais (EMBRAPA, 2021; IBGE, 2023). Entre as raças bovinas produtoras de leite, a raça Holandesa destaca-se no país, possuindo um grande número de rebanhos e alta produtividade e qualidade do leite (Giannone et al., 2023). No entanto, o elevado potencial produtivo das vacas implica maiores exigências nutricionais, além de maior suscetibilidade a distúrbios metabólicos e imunológicos, especialmente em sistemas de produção intensivos (Sordillo, 2016; Ingvarsen; Moyes, 2013).

O processo de lactação está associado à intensa atividade do metabolismo energético e oxidativo, demandando maiores taxas de respiração celular e maior aporte de nutrientes, o que favorece a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) no organismo (Celi; Gabai, 2015; Turk et al., 2017). O acúmulo de EROs no ambiente celular pode resultar em estresse oxidativo, um processo caracterizado pelo desequilíbrio entre a geração de radicais livres e a capacidade antioxidante do organismo de removê-los (Sies, 1997; Celi, 2011; Giannone et al., 2023). Sabe-se que a produção de radicais livres em grandes quantidades pode causar danos às macromoléculas biológicas, levando à formação de compostos primários e secundários capazes de amplificar a geração de radicais livres e comprometer o funcionamento dos sistemas celulares e de suas atividades metabólicas (Halliwell; Gutteridge, 2015; Sies et al., 2017).

Os tecidos e as células são protegidos contra a ação dos radicais livres por mecanismos de defesa eficazes, conhecidos como sistemas antioxidantes, que compreendem componentes exógenos e endógenos (Ponnampalam et al., 2022). Os antioxidantes exógenos são aqueles obtidos pela dieta, presentes em alimentos de origem vegetal e animal. Por sua vez, os antioxidantes endógenos incluem enzimas, como as superóxido dismutases (SOD), catalase (CAT), e as glutathione peroxidases (GPxs), além de outros componentes não enzimáticos (Sies, 1997; Celi, 2011; Halliwell; Gutteridge, 2015; Nordberg; Arnér, 2001; Nasiri et al., 2016). As atividades enzimáticas podem ser moduladas por fatores fisiológicos, ambientais e nutricionais (Celi, 2011; Giannone et al., 2023). Os antioxidantes dietéticos podem melhorar o desempenho e a produtividade dos animais em sistemas de produção na fazenda,

além de contribuir para a melhoria das propriedades funcionais e da estabilidade oxidativa da carne e do leite durante o processamento e a conservação pós-produção (Castillo et al., 2013; Salami et al., 2016).

Estratégias de suplementação alimentar surgem como alternativas para mitigar os efeitos do estresse oxidativo em vacas leiteiras de alta produção (Spears; Weiss, 2008; Sordillo, 2013). Compostos bioativos, como polifenóis, flavonoides e carotenoides, frequentemente presentes em subprodutos vegetais, têm demonstrado potencial antioxidante capaz de modular a expressão gênica e a atividade de enzimas antioxidantes endógenas (Azad et al., 2022; Li et al., 2023). Neste contexto, a utilização da rama de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) apresenta-se como alternativa promissora, ao aliar viabilidade econômica e benefícios funcionais decorrentes de sua composição rica em compostos fenólicos e antioxidantes naturais (Tinini, 2018; Tian et al., 2019). Dietas enriquecidas em derivados da mandioca podem aumentar a atividade de enzimas como SOD, CAT e GPx, contribuindo para a redução de danos oxidativos e para o fortalecimento da resposta imune (Li et al., 2023).

As células somáticas no leite, resultantes da descamação do epitélio mamário, considerado um fenômeno fisiológico normal, são transcricionalmente ativas e responsáveis pela síntese e secreção de diversos componentes (Wickramasinghe et al. 2012; Alhussien Mn; Dang, 2018). Entre os principais grupos de genes expressos nessas células destacam-se aqueles que codificam proteínas antioxidantes (Wickramasinghe et al., 2012). A suplementação da dieta de vacas leiteiras com subprodutos vegetais tem se tornado cada vez mais comum nos sistemas produtivos. No entanto, os efeitos destes nutrientes na expressão gênica e, consequentemente, na qualidade do leite ainda são pouco estudados. Dessa forma, o objetivo do estudo foi avaliar os efeitos da suplementação na dieta de vacas Holandesas com diferentes concentrações de rama de mandioca, sobre a expressão de genes antioxidantes nas células somáticas do leite.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Desenho experimental e coleta das amostras de leite

Oito vacas Holandesas presentes na Estação Experimental Antônio Carlos dos Santos Pessoa da UNIOESTE foram suplementadas com dietas contendo rama de mandioca durante o período de agosto a outubro de 2023. O desenho experimental utilizado foi o quadrado latino duplo (4X4), com quatro tratamentos e quatro períodos experimentais. Em cada tratamento, os animais foram suplementados com diferentes níveis de inclusão de rama de mandioca: tratamento 1 = 0% (dieta sem rama de mandioca); tratamento 2 = 33% (dieta com 33% de rama de mandioca); tratamento 3 = 66% (dieta com 66% de rama de mandioca); e tratamento 4 = 100% (dieta com 100% de rama de mandioca). As vacas apresentaram, em média, 184,75 dias em lactação (DEL), produção de leite de 17,95 kg/dia e produção de leite corrigida para 3,5% de gordura (PLCG) de 18,56 kg/dia, caracterizando um rebanho em estágio intermediário de lactação e com desempenho produtivo compatível com sistemas de produção leiteira.

Cada período experimental durou 25 dias, composto por 20 dias de adaptação à dieta e 5 dias de coleta de dados e amostras biológicas. Amostras de leite de cada animal foram coletadas de forma automatizada durante a ordenha da manhã (6h). De cada animal, foram coletados 300 a 500 mL de leite, armazenados em garrafas estéreis e imediatamente acondicionados em gelo.

2.2.2 Extração do RNA total e síntese do cDNA

A obtenção das células somáticas do leite foi realizada conforme o protocolo descrito por Nogaroto et al. (2026, *in press*). As células somáticas foram centrifugadas a 2.700 g por 15 minutos a 4 °C para a obtenção do botão de células. A camada de gordura do leite foi removida e o sobrenadante foi descartado. As células foram então submetidas a três ciclos de lavagem com 5 mL de tampão PBS 1X / 0,05 mM EDTA gelado (pH = 7,2), centrifugadas a 6000 g por 15 minutos a 4 °C e sobrenadante descartado. Por fim, o botão de células foi ressuspenso em 250 µL de PBS 1X e armazenado a -80 °C.

O RNA total das células somáticas das amostras foi extraído com o reagente Trizol (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. A concentração e a pureza das amostras de RNA foram verificadas em espectrofotômetro UV-Vis por meio das razões de absorbância. Apenas amostras com valores de absorbância $A_{260/280}$ entre 1,8 e 2,1

foram utilizadas na síntese de cDNA (complementar de DNA) com o kit *GoScript™ Reverse Transcription System* (Promega), de acordo com as instruções do fabricante.

2.2.3 Desenho e validação dos primers

A partir de dados disponibilizados do transcriptoma (RNA seq) de *Bos taurus*, presente na base *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), e utilizando a ferramenta primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) foram desenhados *primers* para os seguintes genes para os ensaios de qRT-PCR: *Superóxido dismutase 1 - SOD1* (GenBank accession: NM_174615.2); *Superóxido dismutase 2 - SOD2* (GenBank accession: NM_201527.2); *Superóxido dismutase 3 - SOD3* (GenBank accession: NM_001082610); *Catalase - CAT* (GenBank accession: NM_001035386.2); *Glutathione peroxidase 1 - GPx1* (GenBank accession: NM_174076.3); e *Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase - GAPDH* (GenBank accession: NM_001034034.2) (Tabela 1).

Tabela 1 - Sequências dos primers e tamanho dos amplicons esperados para os genes *SOD1*, *SOD2*, *SOD3*, *CAT*, *GPX1* e *GAPDH*.

Gene	Primer Forward (5' → 3')	Primer Reverse (5' → 3')	Amplicon (em pb)
<i>SOD1</i>	TGTTGCCATCGTGGATATTGTAG	CCCAAGTCATCTGGTTTTTCATG	102
<i>SOD2</i>	TCAATAAGGAGCAGGGACGC	GCAGGGGGATAAGACCTGTTG	84
<i>SOD3</i>	GAAGAGCTGGAAAGGGCCTG	TCACGGTTTGGGTACCACTG	108
<i>CAT</i>	CTATGGCCTCCGCGATCTTT	CGTGAGGCCAAACCTTGGTA	140
<i>GPx1</i>	TTCCCCTGCAACCAGTTTGG	TCGGACGTA CTTCAGGCAAT	75
<i>GAPDH</i>	GAAGGTCGGAGTGAACGGATTC	AAGGGGTCATTGATGGCGAC	99

Após a síntese, os *primers* e amostras de cDNA foram utilizados em reações em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR) para avaliação da amplificação e especificidade. A PCR consistiu em: 20 ng de cDNA, 0,1 mM de *primers forward* e *reverse*, 0,2 mM dNTPs, 3,75 mM MgCl₂, tampão de reação 1× (Tris 200 mM, pH 8,4, KCl 500 mM), 1 U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen®). Os microtubos contendo as misturas de PCR foram transferidos para o termociclador Mastercycler Nexus Gradient (Eppendorf) conforme a seguinte ciclagem: desnaturação inicial por 4 minutos à 94 °C, seguido de 35 ciclos de 1 min à 94 °C, anelamento por 30 segundos à 60 °C, e extensão por 20 segundos à 72 °C, e extensão final por 5 min à 72 °C. Os produtos da PCR foram

verificados em gel de agarose a 1,5% quanto aos tamanhos dos amplicons e à ausência de bandas inespecíficas.

2.2.4 Ensaios de qRT-PCR para análises de expressão gênica

Todas as reações de qRT-PCR para análise da expressão gênica de *SOD1*, *SOD2*, *SOD3*, *GPx1* e *CAT* nas células somáticas foram realizadas em duplicata no equipamento AriaMx Real-time PCR System (Agilent). O gene *GAPDH* foi utilizado como gene de referência. Inicialmente, a taxa de eficiência dos *primers* foi calculada a partir de uma curva padrão, após reações de RT-PCR, utilizando-se como molde amostras de cDNA diluídas em série (1x, 0,1x, 0,01x, 0,001x e 0,0001x) e os valores de C_t (*Cycle Threshold*) foram obtidos (Lobo; Lobo, 2014). Para as reações de qRT-PCR foi utilizado o kit GoTaq qPCR Master Mix (Promega). Cada reação continha 2x *Go Taq qPCR Master mix*, 0,1 μ M de *primer forward* e *reverse*, 40 ng de cDNA e água q.s.p. 10 μ L. O programa de amplificação incluía uma desnaturação inicial a 95 °C por 2 min, seguida de 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 30 s, e de uma curva de dissociação (0,01 °C/s).

2.2.5 Análise estatística

Os valores médios de C_t para cada amostra e gene analisado foram obtidos e a expressão relativa foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak; Schmittgen, 2001). O valor médio das amostras do tratamento sem suplementação com rama de mandioca (0%) foi normalizado em 1, e os níveis de expressão relativa dos demais tratamentos foram comparados entre si. A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk ($p < 0,05$), e a diferença entre os grupos foi avaliada por meio de ANOVA de uma via e de comparação múltipla pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), no software GraphPad Prism 8. Ao menos 5 amostras de cada grupo foram consideradas nas análises. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (*Standard Error of the Mean – SEM*).

2.3 RESULTADOS

Os *primers* desenhados para as análises de expressão dos genes *SOD1*, *SOD2*, *SOD3*, *GPx1*, *CAT* e *GAPDH* apresentaram amplicons únicos nas PCRs convencionais, e eficiência que variou de 99,984 à 106,827%, sendo: 103.551% (*slope* = -3,24) para

SOD1 (Figura 1a), 105.844% (*slope* = -3,189) para *SOD2* (Figura 1b), 103.15% (*slope* = -3,249) para *SOD3* (Figura 1c), 106.827% (*slope* = -3,16) para *GPx1* (Figura 1d), 99.984% (*slope* = -3,32) para *CAT* (Figura 1e), e 102.895% (*slope* = -3.254) para o *GAPDH* (Figura 1g).

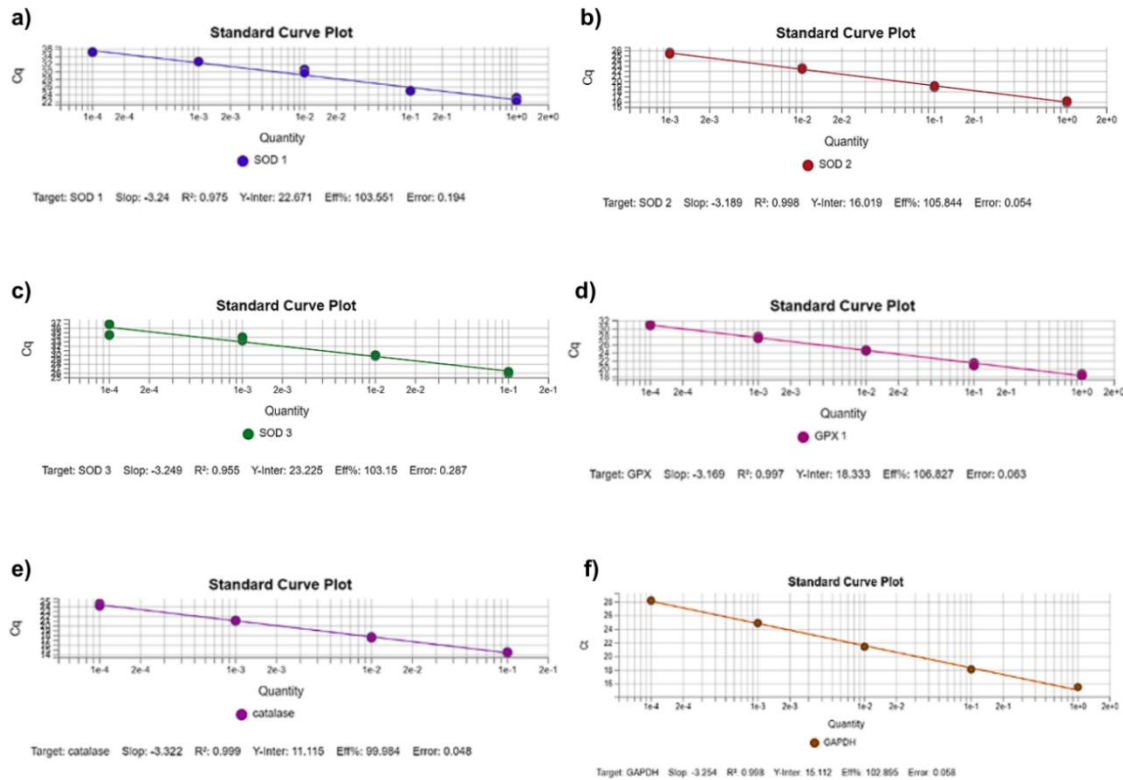


Figura 1 - Curvas-padrão obtidas para testes de eficiência (eff%) dos primers: (a) *SOD1*; (b) *SOD2*; (c) *SOD3*; (d) *GPX1*; (e) *CAT*; e (f) *GAPDH*.

As análises das curvas de dissociação evidenciaram picos únicos para os genes *SOD1*, *SOD2*, *SOD3*, *GPx1*, *CAT* e *GAPDH* (Figura 2 a-f), enquanto no controle negativo não foram observados picos de amplificação, ou, quando presentes (Figure 2 c, e), estes foram distintos do pico do produto de interesse.

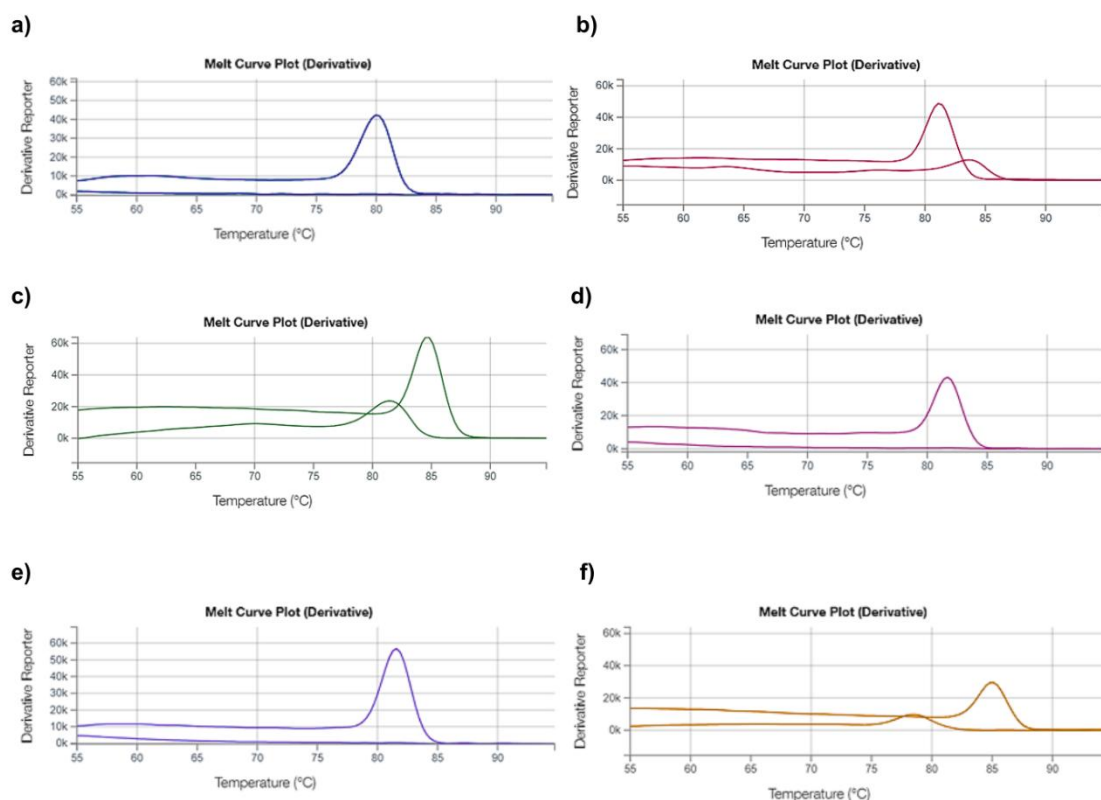


Figura 2 - Curvas de dissociação dos primers, considerando-se a amostra de cdna como molde (picos únicos) versus a amostra negativa sem amplificação. (a) *SOD1*: tm do amplificado = 80 °C; (b) *SOD2*: tm do amplificado = 81,239 °C; (c) *SOD3*: tm do amplificado = 84,663 °C; (d) *GPX1*: tm do amplificado = 81,691 °C; (e) *CAT*: tm do amplificado = 81,582 °C; (f) *GAPDH*: tm do amplificado = 84,9 °C.

Os dados apresentaram distribuição normal ($p < 0,05$) e as análises de expressão gênica relativa não mostraram diferenças estatisticamente significativas entre os animais alimentados com dieta suplementada com rama de mandioca e os que não receberam suplementação (Tabela 2, Figura 3).

Tabela 2 - Valores de p obtidos na análise de variância (anova) e no teste de comparações múltiplas de Tukey para a expressão gênica de *SOD1*, *SOD2*, *SOD3*, *GPX1* e *CAT*, avaliadas em animais submetidos a diferentes níveis de suplementação (0%, 33%, 66% e 100%).

Gene	ANOVA (p)	0% vs 33%	0% vs 66%	0% vs 100%	33% vs 66%	33% vs 100%	66% vs 100%
<i>SOD1</i>	0,1891	0,1908	0,5068	0,2477	0,9236	0,9982	0,9666
<i>SOD2</i>	0,2667	0,9880	0,3953	0,9713	0,2501	0,8719	0,6446
<i>SOD3</i>	0,2936	0,5841	0,5026	0,2395	0,9990	0,9159	0,9581
<i>GPX1</i>	0,2236	0,5761	0,9906	0,8977	0,4443	0,1958	0,9856
<i>CAT</i>	0,3591	0,7464	0,2979	0,6357	0,7809	0,9971	0,8678

Apesar da ausência de diferenças estatisticamente significativas, observou-se diminuição nos níveis de expressão de *SOD1*, *SOD3* e *CAT* nos animais que receberam

dieta suplementada com rama de mandioca (Figura 3a, c, e). Com relação à expressão de *SOD2* e *GPX1*, observou-se aumento de sua expressão nos animais que receberam dieta suplementada com 33% de rama de mandioca, enquanto em animais que receberam dietas com 60% e 100% de suplementação, os níveis de expressão de *SOD2* e *GPX1* foram menores (Figura 3b, d).

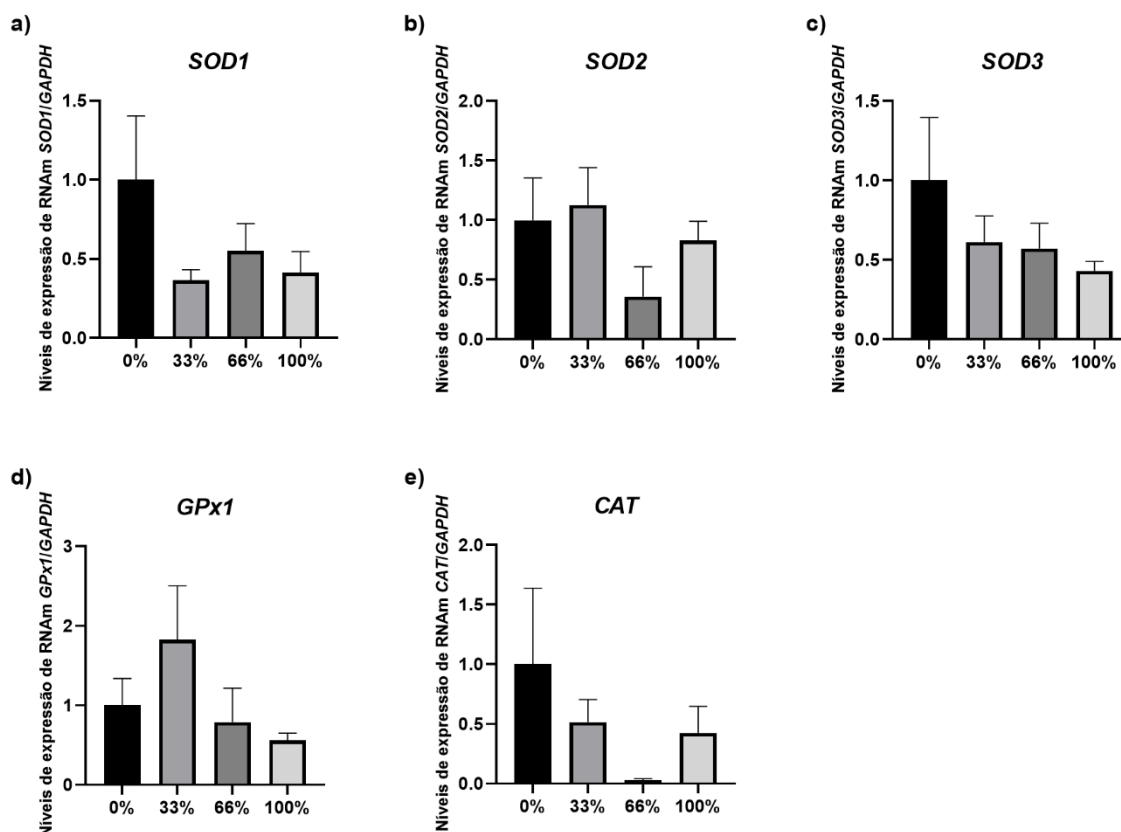


Figura 3 - Expressão relativa dos genes *SOD1* (a), *SOD2* (b), *SOD3* (c), *GPX1* (d), e *CAT* (e), nas células somáticas do leite após a suplementação de 0, 33, 66 e 100% de rama de mandioca na dieta das vacas.

2.4 DISCUSSÃO

Entre a vasta gama de biomoléculas que contribuem para restringir os efeitos deletérios das EROs, as ações das SOD, da CAT e da GPx são melhor compreendidas na manutenção da homeostase redox (Ngo; Duennwald, 2022; Romero-Durán et al., 2024). Os dados do presente estudo demonstraram que a expressão gênica nas células somáticas do leite de bovinos da raça Holandesa que receberam suplementação da dieta com rama de mandioca não promoveu alterações

estatisticamente significativas nos níveis relativos de transcrição dos genes antioxidantes avaliados, embora tenha sido possível identificar tendências de modulação dependentes do tipo e do nível de suplementação.

A ausência de significância estatística pode estar relacionada à elevada variabilidade biológica inerente a parâmetros fisiológicos em ruminantes, especialmente os associados à resposta oxidativa, que é fortemente influenciada por fatores como o estágio de lactação, o metabolismo energético, estresse térmico e demais condições ambientais (Castilho et al., 2005; Sordillo; Aitken, 2009; Beck et al., 2022; Zhao et al., 2025). Outro aspecto relevante diz respeito à degradação ruminal dos compostos bioativos presentes na dieta, que pode comprometer sua estabilidade química e biodisponibilidade sistêmica, reduzindo o alcance de seus efeitos biológicos, incluindo a modulação da expressão gênica em tecidos periféricos (Li et al., 2023).

Outros estudos reforçaram a ideia de que essa oscilação é intensificada pelo elevado desafio metabólico do período de transição e por variações individuais na adaptação a estressores ambientais (Abd Ellah, 2016; Putman et al., 2018; Zhang et al., 2025). Ainda, em estudos de expressão gênica em células somáticas do leite, a ausência de significância é frequentemente relatada devido à heterogeneidade e à rápida mudança das populações celulares (células de defesa vs. células epiteliais), bem como à variação individual, diante da resposta ao estresse oxidativo nos diferentes tratamentos (Alhussien; Dang, 2018). Soma-se a isso o tamanho amostral frequentemente reduzido, o que acaba por limitar o poder do teste, aumentando a probabilidade de não detectar efeitos biologicamente relevantes (Cohen, 2013).

De acordo com Alhussien e Dang (2018), a alteração da proporção de tipos celulares nas células somáticas das vacas leva a uma ampla variação na expressão gênica total, elevando o desvio padrão e, consequentemente, reduzindo o poder estatístico para detectar diferenças reais entre grupos. Deste modo, devido à impossibilidade de grupos homogêneos de vacas na constituição do experimento, a variação da composição das células somáticas entre os animais e os diferentes mecanismos de resposta energética e antioxidante podem ter afetado a significância dos resultados. Ainda assim, tendências de redução na expressão de *SOD1*, *SOD3* e *CAT*, bem como de aumento na expressão de *SOD2* e *GPx1*, em concentrações específicas de suplementação, foram observadas e discutidas isoladamente.

A inclusão da rama de mandioca na dieta pode modular o ambiente ruminal e o estado redox sistêmico por meio de diferentes mecanismos (Li et al., 2023). Compostos fenólicos, flavonoides e outros metabólitos bioativos presentes na planta, com atividade antioxidante, podem alterar a fermentação ruminal, a composição microbiana e o perfil de metabólitos produzidos (Li et al., 2023). Além dos efeitos diretos, como a neutralização de radicais livres, os polifenóis presentes na rama de mandioca podem exercer efeitos indiretos por meio da modulação da microbiota ruminal. Essa modulação pode reduzir a produção de metabólitos pró-oxidantes e favorecer um ambiente menos propenso à formação de EROs, contribuindo, assim, para o equilíbrio redox sistêmico (Beck et al., 2022; Li et al., 2023). Além disso, a ação desses compostos sobre a microbiota ruminal pode influenciar o metabolismo lipídico, alterando processos como a biohidrogenação de ácidos graxos, o que repercute na disponibilidade de nutrientes e no metabolismo energético do animal (Toral et al., 2018; Bionaz et al., 2020), processos intimamente relacionados ao equilíbrio redox (Beck et al., 2022). Com base nesses mecanismos, a suplementação com a rama de mandioca pode ter contribuído para atenuar o desafio oxidativo observado nos animais.

Essa hipótese é sustentada pela tendência de menor expressão de *SOD1*, *SOD3* e *CAT* nos animais suplementados, o que pode refletir menor necessidade de ativação dos sistemas antioxidantes endógenos, possivelmente em decorrência da ação direta e indireta dos compostos bioativos presentes na planta. Tal efeito é compatível com um ambiente celular caracterizado por menor pressão oxidativa, embora não permita inferir, isoladamente, uma redução absoluta na produção de EROs. Corroborar esse fato o fato de que outros estudos demonstraram que o menor desafio oxidativo pode estar associado à presença de compostos bioativos na rama de mandioca, como fenólicos, flavonoides e carotenoides, amplamente reconhecidos por sua capacidade antioxidante e de modulação do estresse oxidativo (Montagnac et al., 2009; Ayemele et al., 2021).

Vale ressaltar que os genes avaliados codificam enzimas com ações em diferentes compartimentos celulares (Nordberg; Arnér, 2001). Enquanto *SOD1* atua no citosol, *SOD3* no espaço extracelular e a *CAT* nos peroxissomos, a *SOD2* atua na mitocôndria e a *GPx1* é uma selenoenzima que reduz peróxidos no citosol e nas mitocôndrias (Nordberg; Arnér, 2001). Essa diferença espacial ajuda a compreender

os dados que demonstraram tendência de aumento na expressão de *SOD2* e *GPx1* nos grupos suplementados com 33% e 66% de rama de mandioca.

Em contraste com a hipótese de atenuação do estresse oxidativo via redução direta das EROs induzida pela suplementação com rama de mandioca, o aumento na expressão de *SOD2* e *GPx1* sugere a atuação de um mecanismo de regulação em nível transcricional. Nesse cenário, é plausível postular que compostos bioativos presentes na rama de mandioca atuem como moduladores da via de sinalização mediada pelo *fator nuclear (derivado de eritroide 2)-like 2 (Nrf2)*, promovendo sua ativação e subsequente translocação nuclear. Uma vez no núcleo, NRF2 interage com elementos de resposta antioxidante (ARE) localizados nas regiões promotoras de genes citoprotetores, induzindo a transcrição de enzimas-chave do sistema antioxidante. Embora a via Nrf2-ARE seja amplamente reconhecida como um eixo central na manutenção da homeostase redox, sua eficácia na mitigação do estresse térmico em células epiteliais mamárias ainda permanece parcialmente elucidada (Jin et al., 2016).

A modulação da expressão de *Nrf2* pode, portanto, explicar o aumento significativo de *SOD2* e *GPx1* observado no nível intermediário de suplementação (33%), enquanto a atenuação dessa resposta em níveis mais elevados (66% e 100%) sugere a existência de um efeito hormético. Esse padrão dose-dependente indica que a ativação do sistema antioxidante pode ser maximizada em concentrações moderadas, enquanto doses mais elevadas podem desencadear mecanismos de retroalimentação negativa ou de limitação metabólica. Adicionalmente, considerando a localização mitocondrial da *SOD2*, os dados reforçam a hipótese de que a resposta antioxidante observada esteja, ao menos em parte, associada à regulação da homeostase redox mitocondrial, destacando esse compartimento como alvo sensível à modulação dietética. A *SOD2* desempenha papel central na detoxificação de EROs gerados durante a fosforilação oxidativa, enquanto a *GPX1* atua na redução de peróxidos, utilizando glutatona reduzida como cofator (Halliwell; Gutteridge, 2015). Assim, o aumento inicial dessas enzimas em níveis moderados de suplementação pode indicar uma ativação compensatória diante de alterações metabólicas induzidas pela dieta, enquanto a redução em níveis mais elevados de inclusão pode refletir um estado redox mais estável ou mecanismos de regulação transcricional associados a menor pressão oxidativa (Sies et al., 2017). Além disso, fatores ambientais, como o estresse térmico, podem influenciar a eficiência da fosforilação oxidativa e a geração

mitocondrial de EROs (Marquez-Acevedo et al., 2023; Zeng et al., 2023), devendo ser considerados na interpretação desses resultados.

Dessa forma, embora não tenham sido identificadas diferenças significativas, as tendências de alteração na expressão gênica do sistema antioxidante observadas nesse estudo corroboram a proposição de que a rama de mandioca atua como ingrediente funcional em dietas para vacas leiteiras. Estudos com grupos compostos por um número maior de animais, em uma perspectiva de maior homogeneidade possível, e em ambiente controlado, bem como análises complementares da atividade enzimática e medições temporais da expressão gênica, poderão contribuir para um melhor entendimento dos efeitos antioxidantes desse subproduto e de sua influência na saúde da glândula mamária.

2.5 CONCLUSÃO

Em conjunto, esses resultados sugerem que a suplementação com rama de mandioca pode exercer efeitos sutis e não lineares sobre a regulação do sistema antioxidante nas células somáticas do leite, modulando de forma distinta enzimas citosólicas, mitocondriais e extracelulares. Tais respostas reforçam a hipótese de que ingredientes alternativos de origem vegetal, ricos em compostos antioxidantes, podem influenciar a homeostase redox de forma complexa e de forma dependente da dose, mesmo quando não são detectadas alterações estatisticamente significativas em análises pontuais de expressão gênica. Esses resultados reforçam o interesse da rama de mandioca como alternativa nutricional funcional, ainda que estudos com maior número de animais e análises complementares sejam necessários para confirmar seu papel antioxidante e sua aplicabilidade na produção leiteira.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Processos n. 403.555/2021-3 e 313566/2023-2), e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Finance code 001).

REFERÊNCIAS

- ABD ELLAH, M. R. Oxidant and antioxidants during the transition period in dairy cows. **Journal of Advanced Veterinary Research**, v. 6, n. 4, p. 130–133, 2016. DOI: <https://doi.org/10.5281/zenodo.8224852>.
- ALHUSSIEN, M.N.; DANG, A.K. Milk somatic cells, factors influencing their release, future prospects, and practical utility in dairy animals: An overview. **Veterinary World**, v. 11, n. 5, p. 562-577, 2018. DOI: <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.562-577>.
- AYEMELE, A.G.; TILAHUN, M.; LINGLING, S.; ELSAADAWY, S.A.; GUO, Z.; ZHAO, G.; XU, J.; BU, D. Oxidative Stress in Dairy Cows: Insights into the Mechanistic Mode of Actions and Mitigating Strategies. **Antioxidants**, v. 10, n. 12, p. 1918, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox10121918>
- AZAD, M. A. K.; JIANG, H.; LIU, Y.; HUANG, P.; FANG, J.; KONG, X. Diets partially replaced with cassava residue modulate antioxidant capacity, lipid metabolism, and gut barrier function of huanjiang mini-pigs. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 9, p. 902328, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.902328>.
- BECK, M. R.; GARRETT, K.; FLEMING, A. E., MAXWELL, T. M. R., GREER, A. W., BUNT, C., OLEJAR, K., JONKER, A., DYNES, R., GREGORINI, P. Effects of *Lactobacillus* fermented plant products on dairy cow health, production, and environmental impact. **Animal Feed Science and Technology**, v. 294, p. 115514, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2022.115514>.
- BIONAZ, M.; VARGAS-BELLO-PÉREZ, E.; BUSATO, S. Advances in fatty acids nutrition in dairy cows: from gut to cells and effects on performance. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 110, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40104-020-00512-8>.
- CASTILLO, C.; HERNANDEZ, J.; BRAVO, A.; LOPEZ-ALONSO, M.; PEREIRA, V.; BENEDITO, J.L. Oxidative status during late pregnancy and early lactation in dairy cows. **The Veterinary Journal**, v. 169, n. 2, p. 286-292, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2004.02.001>.
- CASTILLO, C.; PEREIRA, V.; ABUELO, Á.; HERNÁNDEZ, J. Effect of supplementation with antioxidants on the quality of bovine milk and meat production. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 616098, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1155/2013/616098>.
- CELI, P. Oxidative stress in ruminants. In: **Studies on Veterinary Medicine**. Totowa, NJ: Humana Press, 2011. p. 191-231. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vas.2021.10016>.
- CELI, P.; GABAI, G. Oxidant/antioxidant balance in animal nutrition and health: the role of protein oxidation. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 2, p. 48, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3389/fvets.2015.00048>.
- COHEN, J. **Statistical power analysis for the behavioral sciences**. New York: Routledge, 2013.
- EMBRAPA. *Projeções do agronegócio: Brasil 2021/22 a 2030/31*. Brasília, DF: MAPA/EMBRAPA, 2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de->

[publicacoes/-/publicacao/1149841/aprendizado-de-maquina-e-imagens-sinteticas-para-mapeamento-da-textura-superficial-dos-solos](#). Acesso em: 01 jul. 2025.

GIANNONE, C.; BOVO, M.; CECCARELLI, M.; TORREGGIANI, D.; TASSINARI, P. Review of the heat stress-induced responses in dairy cattle. **Animals**, v. 13, n. 22, p. 3451, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/ani13223451>.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. MC. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford University Press, 2015.

IBGE. *Pesquisa da pecuária municipal – PPM 2022*. Rio de Janeiro: IBGE, 2023. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html>. Acesso em: 01 jul. 2025.

INGVARTSEN, K. L.; MOYES, K. Nutrition, immune function and health of dairy cattle. **Animal**, v. 7, n. s1, p. 112-122, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1017/S175173111200170X>.

JIN, X. L., WANG, K., LIU, L., LIU, H. Y., ZHAO, F. Q., LIU, J. X. Nuclear factor-like factor 2-antioxidant response element signaling activation by tert-butylhydroquinone attenuates acute heat stress in bovine mammary epithelial cells. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n.11, p. 9094-9103. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11031>

LI, M.; ZI, X.; LV, R.; ZHANG, L.; OU, W.; CHEN, S.; HOU, G.; ZHOU, H. Cassava foliage effects on antioxidant capacity, growth, immunity, and ruminal Microbial metabolism in Hainan black goats. **Microorganisms**, v. 11, n. 9, p. 2320, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11092320>.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.

LOBO, R. B.; LOBO, A. M. B. Aplicações da genética molecular na seleção de animais superiores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 38, n. 2, p. 141–146, 2014.

MARQUEZ-ACEVEDO, A.S.; HOOD, W.R.; COLLIER, R.J.; SKIBIEL, A.L. Graduate Student Literature Review: Mitochondrial response to heat stress and its implications on dairy cattle bioenergetics, metabolism, and production. **Journal of Dairy Science**, v. 106, n. 10, p. 7295-7309, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2023-23340>.

MONTAGNAC, J. A.; DAVIS, C. R.; TANUMIHARDJO, S. A. Nutritional value of cassava for use as a staple food and recent advances for improvement. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 8, p. 181-188, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2009.00077.x>.

NASIRI, N.; MOINI, A.; EFTEKHARI-YAZDI, P.; KARIMIAN, L.; SALMAN-YAZDI, R.; ARABIPOOR, A. Oxidative stress statues in serum and follicular fluid of women with endometriosis. **Cell Journal**, v. 18, p. 582–587, 2016. DOI: <https://doi.org/10.22074/cellj.2016.4724>.

NGO, V.; DUENNWALD, L.M. Nrf2 and oxidative stress: a general overview of mechanisms and implications in human disease. **Antioxidants**, n. 11, p. 2345, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox11122345>.

NOGAROTO, V.; VICARI, M.R.; PRADELA, M.R.T.; KOSLOSKI, V.; GLUGOSKI, L.; MARTINS, A.S.; AZAMBUJA, M. Impact of somatic cell count on lipogenic and antioxidant gene expression in Holstein cattle. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, *in press*.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**, v.31, p.1287-1312, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00724-9](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00724-9).

PONNAMPALAM, E.N.; KIANI, A.; SANTHIRAVEL, S.; HOLMAN, B.W.B.; LAURIDSEN, C; DUNSHEA, F.R. The importance of dietary antioxidants on oxidative stress, meat and milk production, and their preservative aspects in farm animals: antioxidant action, animal health, and product quality—Invited review. **Animals**, v. 12, n. 23, p. 3279, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/ani12233279>.

PUTMAN, A.K.; BROWN, J.L.; GANDY, J.C.; WISNIESKI, L.; SORDILLO, L.M. Changes in biomarkers of nutrient metabolism, inflammation, and oxidative stress in dairy cows during the transition into the early dry period. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 10, p. 9350-9359, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14591>.

ROMERO-DURÁN, M.A.; SILVA-GARCÍA, O.; PEREZ-AGUILAR, J.M.; BAIZABAL-AGUIRRE, V.M. Mechanisms of Keap1/Nrf2 modulation in bacterial infections: implications in persistence and clearance. **Frontiers in Immunology**, v. 15, p. 1508787, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1508787>.

SALAMI, S.A.; GUINGUINA, A.; AGBOOLA, J.O.; OMEDE, A.A.; AGBONLAHOR, E.M.; TAYYAB, U. Review: in vivo and postmortem effects of feed antioxidants in livestock: A review of the implications on authorization of antioxidant feed additives. **Animal**, v. 10, p. 1375–1390, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1017/S1751731115002967>.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology: Translation and Integration**, v. 82, n. 2, p. 291-295, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1997.sp004024>.

SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D. P. Oxidative Stress. **Annual Review of Biochemistry**, v. 86, p. 715–748, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045037>.

SORDILLO, L. M. Nutritional strategies to optimize dairy cattle immunity. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 6, p. 4967-4982, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10354>.

SORDILLO, L. M. Selenium-dependent regulation of oxidative stress and immunity in periparturient dairy cattle. **Veterinary Medicine International**, v. 2013, n. 1, p. 154045, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1155/2013/154045>.

SORDILLO, L. M.; AITKEN, S. L. Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 1-3, p. 104-109, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.10.305>.

SPEARS, J. W.; WEISS, W. P. Role of antioxidants and trace elements in health and immunity of transition dairy cows. **The Veterinary Journal**, v. 176, n. 1, p. 70-76, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.12.015>.

TIAN, X. Z.; XIN, H.; PAENGKOU, P.; PAENGKOU, S.; BAN, C.; SORASAK, T. Effects of anthocyanin-rich purple corn (*Zea mays* L.) stover silage on nutrient utilization, rumen fermentation, plasma antioxidant capacity, and mammary gland gene expression in dairy goats. **Journal of Animal Science**, v. 97(3), p. 1384–1397, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1093/jas/sky477>.

TININI, R. C.R. Parte aérea da mandioca como um alimento alternativo na dieta de vacas em lactação. 2018. 132 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - **Universidade Estadual do Oeste do Paraná**, Marechal Cândido Rondon, 2018.

TORAL, P. G., MONAHAN, F. J., HERVÁS, G., FRUTOS, P., MOLONEY, A. P. MODULATING. Modulating ruminal lipid metabolism to improve the fatty acid composition of meat and milk. Challenges and opportunities. **Animal**, v. 12, n. s2, p. s272-s281, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1017/S1751731118001994>.

TURK, R.; KOLEDIĆ, M.; MAĆEŠIĆ, N.; BENIĆ, M.; DOBRANIĆ, V.; ĐURIČIĆ, D.; CVETNIĆ, L.; SAMARDŽIJA, M. The role of oxidative stress and inflammatory response in the pathogenesis of mastitis in dairy cows. **Mljekarstvo: časopis za unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka**, v. 67, n. 2, p. 91-101, 2017. DOI: <https://doi.org/10.15567/mljekarstvo.2017.0201>.

WICKRAMASINGHE, S.; RINCON, G.; ISLAS-TREJO, A.; MEDRANO, J.F. Transcriptional profiling of bovine milk using RNA sequencing. **BMC Genomics**, v. 13, p. 1-14, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-45>.

ZENG, J.; CAI, J.; WANG, D.; LIU, H.; SUN, H.; LIU, J. Heat stress affects dairy cow health status through blood oxygen availability. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 14, p. 112, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40104-023-00915-3>.

ZHANG, M.Q.; HEIRBAUT, S.; HERTOOGS, K.; GIRMA, M.; GEERINCKX, K.; STEVENS, E.; AERNOUTS, B.; DE NEVE, N.; FIEVEZ, V. Periparturient oxidative and inflammatory status and their relation to energy metabolism and performance in transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 108, n. 12, p. 13872-13889, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2025-26798>.

ZHAO, Y.; WANG, F.; WANG, Y.; TAN, J.; NIU, H.; GUO, G.; FANG, L.; JIANG, L. Heat stress compromises nutritional quality and flavor of bovine raw milk: Evidence from multi-omics analyses. **Food Chemistry: X**, v. 32, p. 103361, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2025.103361>.