



**UNIVERSIDADE DE ÉVORA**

**ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**

DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

**Variações anátomo-fisiológicas face à  
aclimação sazonal - estudo em vacas leiteiras  
com diferente potencial leiteiro**

**Flávio Daniel Gomes da Silva**

Orientação:

Professora Doutora Cristina Maria Conceição Pinheiro

Professor Doutor Alfredo Manuel Franco Pereira

**Mestrado em Engenharia Zootécnica**

Dissertação

Évora, 2015



**UNIVERSIDADE DE ÉVORA**

**ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**

DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

**Variações anatomo-fisiológicas face à  
aclimação sazonal - estudo em vacas leiteiras  
com diferente potencial leiteiro**

**Flávio Daniel Gomes da Silva**

Orientação:

Professora Doutora Cristina Maria Conceição Pinheiro

Professor Doutor Alfredo Manuel Franco Pereira

**Mestrado em Engenharia Zootécnica**

Dissertação

Évora, 2015

*Dedico aos meus Pais pelo apoio  
e à Catarina por ser o meu suporte*

## Agradecimentos

À Prof.<sup>a</sup> Cristina Conceição por me ter não apenas orientado, mas também por me ter acompanhado e apoiado na construção deste documento que me fez crescer.

Ao Prof. Alfredo Pereira pela supervisão, pelos concelhos e por todos os conhecimentos transmitidos.

Ao Prof. Fernando Capela e Silva e à Prof.<sup>a</sup> Elsa Lamy por me terem dedicado o seu tempo e sabedoria.

À Ana Geraldo, *aka* Qui, por toda a ajuda, conhecimentos e dedicação ao longo deste ano.

Ao Prof. Paulo Infante por ser um “guru” da estatística e por se disponibilizar e ajudar mais que aquilo que o tempo permite.

À Vânia e ao Velhinho por nos terem aturado, ajudado, ensinado e tanto alimentado.

À restante equipa da Herdade das Pedras Alvas, especialmente ao Senhor Zé.

Às minhas condiscípulas e grandes amigas, Catarina Matos e Liliana Cachucho, pelo companheirismo, pelos conselhos e por toda a malaqueira necessária à realização do meu mestrado.

Ao Alexandre Pilirito, Bruno Bento e Ricardo Madeira, “Engenheiros” companheiros, pela amizade, força e cumplicidade que fossilizaram na minha vida.

Ao Tomás, que se ausentou só para deixar mais saudade, por ter estado sempre presente e por ser um apoio na vida.

À mãe Miriam e irmã Raquel, que seguiram rumos diferentes, têm sempre um lugar especial reservado.

Ao Emanuel Carreira, Agrônomo e Zootécnico valente, por me ter acompanhado no mestrado e nesta dissertação.

À Cármen pela força que me transferiu.

Ao Apolo e à Kira pela distração e pela calma que de livre vontade me ofereceram.

A toda a minha família e amigos, que sem eles a vida não seria a mesma coisa, especialmente ao Bruno e à Liliana por serem os meus queridos irmãos.

À Mui Nobre e Sempre Leal Cidade de Évora.

Este trabalho foi financiado por Fundos FEDER através do Programa Operacional Factores de Competitividade - COMPETE e por Fundos Nacionais através da FCT - Fundação para a Ciência e a Tecnologia no âmbito dos Projectos Estratégicos PEst-C/AGR/UI0115/2011, PEst-OE/AGR/UI0115/2014 e do Programa Operacional Regional do Alentejo (InAlentejo), Operação ALENT-07-0262-FEDER-001871/ Laboratório de Biotecnologia Aplicada e Tecnologias Agro-ambientais.



## Resumo

O presente estudo teve como objetivo a caracterização de variações anátomo-fisiológicas que decorrem do processo de aclimação sazonal em bovinos leiteiros com alto (Altas) e baixo (Baixas) potencial leiteiro, com vista a selecionar animais que conciliem bons desempenhos produtivos e índices de adaptabilidade que possibilitem a mudança de homeostase face às condições climáticas presentes no clima mediterrânico.

O estudo foi realizado numa herdade comercial, situada no Alentejo, utilizando 13 vacas multíparas (6 Baixas e 7 Altas), durante três períodos: P1 (animais aclimatados ao verão; presença de stresse térmico); P2 (animais aclimatados ao verão; termoneutralidade); P3 (animais aclimatados ao inverno; termoneutralidade).

Em stresse térmico (P1), verificaram-se maiores esforços termolíticos e maiores armazenamentos de calor no grupo das Altas. Observou-se também que a produção de leite das Altas foi afetada pelo stresse térmico, evidenciando uma redução 24-48h após os valores de temperatura retal mais elevados. Nesta situação, as Baixas apresentaram uma variação na produção oposta à das Altas. Em P1, os valores de proteína e de gordura no leite foram significativamente mais baixos que em P3, em ambos os grupos. A ureia no leite foi significativamente mais elevada nas Altas durante o P1, revelando potencial como biomarcador de stresse térmico. Do P1 para o P3 observou-se uma redução gradual do hematócrito, da hemoglobina e da triiodotironina ( $T_3$ ). As Altas apresentaram uma maior redução de triiodotironina ( $T_3$ ) que as Baixas, como consequência de uma maior intensidade de aclimação. Nos pelos não se registaram diferenças entre os períodos, o que contrasta com alguma bibliografia. Porém, a ausência da insolação direta poderá ter sido um fator determinante.

**Palavras-chave:** aclimação sazonal, stresse térmico, bovinos leiteiros, biomarcador, clima Mediterrânico, composição do leite, hemograma, triiodotironina, pelagem.

# **Anatomic and physiologic variations of seasonal acclimatization – study in dairy cows with different milk yield potential**

## **Abstract**

The main objective of the present study was the characterization of anatomical and physiological variations that occur in the seasonal acclimatization process of dairy cows with high (Altas) and low (Baixas) milk yield potential. In this way it should be possible to do a selection of animals with good productive traits and also with adaptability indexes that allow a change in homeostasis to cope with the climatic conditions of the mediterranean climate. Meteorological, clinical, productive, physiological and anatomical data were collected.

The study was conducted in an Alentejo's dairy farm, using 13 multiparous cows (6 with low milk yield and 7 with high milk yield), during three periods: P1 (animals acclimated to summer, in heat stress); P2 (animals acclimated to summer, thermoneutrality); P3 (animals acclimated to winter; thermoneutrality).

In thermal stress (P1), the high milk yield group (Altas) shown greater thermolytic efforts and also higher heat storage. The milk yield in this group was also affected by heat stress, showing a decrease in production when the rectal temperature increased, with a delay of 24-42 hours. In this situation the Baixas group showed an opposite milk production variation. In P1, the protein and fat milk content was lower than in P3, in both groups. Milk urea levels were significantly higher during P1 in the Altas group, revealing potential as an heat stress biomarker. Hematocrit, hemoglobin and triiodothyronine ( $T_3$ ) values gradually decreased from P1 to P3.  $T_3$  values were lower in Altas than in Baixas group, as a consequence of a more intense acclimatization. The hair analysis didn't show the standard seasonal acclimatization process, indicating the absence of direct solar radiation as a determinant factor.

**Keywords:** seasonal acclimatization, heat stress, dairy cows, biomarker, Mediterranean climate, milk composition, hemogram, triiodothyronine, hair coat.



# Índice

Agradecimentos .....	iv
Resumo.....	vii
Abstract .....	viii
Lista de abreviaturas .....	xii
Índice de tabelas .....	xiv
Índice de figuras .....	xv
1. Introdução.....	1
1.2. Objetivos específicos:.....	3
2. Revisão bibliográfica .....	4
2.1. Interações térmicas entre o animal e o ambiente .....	4
2.1.1. Zona de termoneutralidade .....	4
2.1.2. Produção de calor metabólico .....	6
2.1.3. Permuta de calor com o ambiente.....	8
2.1.4. Permuta de calor sensível .....	9
2.1.5. Permuta de calor latente .....	11
2.2. Stresse térmico em vacas de leite.....	13
2.2.1. Respostas ao stresse térmico agudo.....	16
2.2.1.1. Alterações comportamentais.....	16
2.2.1.2. Alterações fisiológicas .....	17
2.2.1.3. Alterações produtivas .....	20
2.2.2. Biomarcadores de stresse térmico.....	31
2.3. Aclimação - resposta ao stresse térmico crónico .....	34
2.3.1. Alterações fisiológicas .....	36
2.3.1.1. Alterações endócrinas.....	36
2.3.1.2. Alterações sanguíneas.....	39
2.3.2. Alterações anatómicas .....	40
2.3.2.1. Glândulas sudoríparas.....	41
2.3.2.2. Pelagem.....	41
3. Metodologia.....	45
3.1. Material.....	45
3.1.1. Locais e laboratórios .....	45
3.1.2. Animais.....	47
3.2. Métodos .....	48

3.2.1.	Delineamento experimental .....	48
1.2.2.	Recolha de dados meteorológicos .....	49
1.2.3.	Recolha de dados anátomo-fisiológicos.....	50
1.2.4.	Análises laboratoriais .....	52
1.2.4.1.	Leite .....	52
1.2.4.2.	Sangue .....	52
1.2.4.3.	Pelos .....	53
1.2.5.	Análise estatística.....	53
4.	Resultados e discussão.....	55
4.1.	Dados meteorológicos (Temperatura do Globo Negro) .....	55
4.1.1.	Período 1 .....	55
4.1.2.	Período 3 .....	57
4.2.	Dados Fisiológicos .....	59
4.2.1.	Frequência Respiratória .....	59
4.2.1.1.	Período 1 .....	59
4.2.1.2.	Período 3 .....	60
4.2.1.3.	Comparação entre períodos.....	61
4.2.2.	Temperatura Retal .....	62
4.2.2.1.	Período 1 .....	62
4.2.2.2.	Período 3 .....	64
4.2.2.3.	Comparação entre períodos.....	66
4.3.	Dados Anatômicos.....	67
4.4.	Dados Produtivos .....	70
4.5.	Dados Fisiológicos .....	71
4.5.1.	Composição do Leite .....	71
4.5.1.1.	Lactose.....	71
4.5.1.2.	Proteína .....	72
4.5.1.3.	Gordura .....	74
4.5.1.4.	Ureia .....	76
4.5.1.5.	$\beta$ -hidroxibutirato .....	77
4.5.1.6.	Contagem de Células Somáticas.....	78
4.5.2.	Sangue.....	79
4.5.2.1.	Hematócrito .....	79
4.5.2.2.	Hemoglobina .....	81

4.5.2.3.	Leucócitos.....	82
4.5.2.4.	Triiodotironina (T <sub>3</sub> ).....	83
5.	Conclusão.....	85
6.	Bibliografia.....	87

## Lista de abreviaturas

% - Percentagem

°C – Graus celsius

ACTH – *Adrenocorticotropic Hormone* (hormona adrenocorticotrófica)

AGV – Ácidos Gordos Voláteis

BHB –  $\beta$ -hidroxibutirato

CCS – Contagem de Células Somáticas

cm - Centímetros

DIM – Covariável *Days In Milk* (dias de lactação)

dL - Decilitro

FR – Frequência Respiratória

GH – *Growth Hormone* (hormona de crescimento)

J – Joules

kg – Quilograma

L - Litro

mL – Mililitro

mmol – Milimol

NEFA – *Non Esterified Fatty Acids* (Ácidos Gordos Não Esterificados)

ng – Nanograma

P1 – Período 1

P2 – Período 2

P3 – Período 3

T<sub>3</sub> – Triiodotironina

T<sub>4</sub> - Tiroxina

TCI - Temperatura Crítica Inferior

TCS – Temperatura Crítica Superior

TR – Temperatura Retal

*vs - versus*

ZTN – Zona de Termoneutralidade

## Índice de tabelas

Tabela 1 – Índice de temperatura-humidade e a intensidade do stresse em bovinos de leite (Adaptado de Atrian e Aghdam Shahryar, 2012). .....	15
Tabela 2 – Composição comum do leite de vaca (Adaptado de Burrington e Agarwal, 2013).....	23
Tabela 3 - Resumo sobre a variação da composição de leite durante as épocas quentes. ....	29
Tabela 4 - Alterações na composição do leite de vacas com mamite (Adaptado de Pyörälä, 2003).....	33
Tabela 5 – Possíveis biomarcadores de stresse térmico presentes em animais de aptidão leiteira.....	35
Tabela 6 – Informação do contraste leiteiro relativa aos animais escolhidos para o ensaio.....	49
Tabela 7 – Calendário das amostras recolhidas durante os três períodos.....	52
Tabela 8 – Análises efetuadas com as amostras recolhidas durante o ensaio.....	53
Tabela 9 – TGNsol e TGNsombra (°C) durante o P1.....	56
Tabela 10 – TGNsol e TGNsombra (°C) médias durante o dia no P1.....	57
Tabela 11 – Valores médios de cada dia das TGNsol e das TGNsombra (°C).....	56
Tabela 12 – TGNsol e TGNsombra (°C) durante o P1.....	58
Tabela 13 - TGNsol e TGNsombra (°C) médias durante o dia no P3. ....	58
Tabela 14 – Valores médios de cada dia das TGNsol e das TGNsombra (°C) durante o P3.....	59
Tabela 15 – Análise descritiva da FR (movimentos por minuto) no P1. ....	59
Tabela 16 – Análise descritiva da FR (movimentos por minuto) no P3. ....	60
Tabela 17 – Comparação da frequência respiratória média (movimentos por minuto) nos dois períodos. ....	61
Tabela 18 – Análise descritiva da TR (°C) no P1. ....	63
Tabela 19 - Análise descritiva da TR (°C) no P3. ....	65
Tabela 20 - Comparação da temperatura retal média (°C) nos dois períodos.....	67
Tabela 21 – Valores médios (cm) do comprimento e do diâmetro dos pelos pretos e dos brancos nos dois períodos analisados (P1 e P3). ....	68
Tabela 22 – Produção de leite (kg) no P1.....	70
Tabela 23 – Produção de leite (kg) no P3.....	70
Tabela 24 – Valores médios do teor em lactose (%). ....	72
Tabela 25 - Valores médios do teor em proteína (%). ....	73
Tabela 26 – Valores médios do teor butiroso (%). ....	75
Tabela 27 – Valores médios da ureia no leite (mg/kg).....	77
Tabela 28 – Valores médios de BHB (mmol/L).....	78
Tabela 29 – Valores médios da CCS ( $\times 10^3$ /mL).....	79
Tabela 30 – Valores médios do hematócrito nos três períodos (%). ....	80
Tabela 31- Valores médios da hemoglobina nos três períodos (g/dL). ....	82
Tabela 32- Valores médios dos leucócitos nos três períodos ( $\times 10^3$ /mm <sup>3</sup> ).....	82
Tabela 33 – Correlação do perfil leucocitário com a CCS.....	83
Tabela 34 - Valores recolhidos de T <sub>3</sub> plasmática (ng/dL). ....	83

## Índice de figuras

Figura 1 - Representação gráfica da produção de calor dos bovinos de leite em função da temperatura do ar, com referência aos seus limites térmicos e respetiva zona de termoneutralidade (Adaptado de Titto, 1998). .....	4
Figura 2 - Variação da zona de termoneutralidade em bovinos (Adaptado de Hahn 1985). .....	5
Figura 3 - Esquematização das permutas de calor envolvidas no binômio animal/ambiente (Lovegrove, 1999, citado por Pereira, 2004). .....	9
Figura 4 - Perda de calor por convecção (•) e por evaporação (o) no trato respiratório de vacas Holstein-Friesian em função da temperatura ambiente (Maia <i>et al.</i> , 2005a). .....	12
Figura 5 - Arrefecimento do encéfalo de um ungulado através da respiração pela via evaporativa (Taylor, 1992 citado por Schmidt-Nielsen, 1997). .....	13
Figura 6 - Relação entre o Índice de Temperatura e Humidade (THI) e a produção de leite diária (Bernabucci <i>et al.</i> , 2010). .....	15
Figura 7 - Vista aérea da das instalações da exploração (Herdade das Pedras Alvas, Montemor-o-Novo, 2015). .....	45
Figura 8 – Sistema de produção da exploração onde decorreu o ensaio. Da esquerda para a direita observa-se: A - Viteleiro individual; B – Viteleiros coletivos; C – Recria no exterior; D – Alojamento coberto para as vacas em lactação. ....	46
Figura 9 – Corredor de alimentação do pavilhão das vacas em lactação. ....	47
Figura 10 – Uma das duas naves do pavilhão das vacas em lactação. ....	47
Figura 11 – Esquema geral do ensaio. ....	49
Figura 12 – Determinação da temperatura retal. ....	50
Figura 13 – Recolha de sangue por venopunção .....	51
Figura 14 – Recolha das amostras de pelo. ....	51
Figura 15 – Variação da TGNsol e da TGNsombra (°C) durante o P1. ....	55
Figura 16 – Variação das TGNsol e das TGNsombra (°C) durante o P3. ....	57
Figura 17 – Variação da FR por hora no P1. ....	60
Figura 18 - Variação da FR por hora no P3. ....	61
Figura 19 – <i>Boxplots</i> da variação entre períodos e do nível de produção da FR (movimentos por minuto) às 13h00. ....	62
Figura 20 – Variação da TR por hora no P1. ....	63
Figura 21 – Variação da TR (°C) por hora no P3. ....	65
Figura 22 – <i>Boxplots</i> da variação entre períodos e do nível de produção da TR (°C) às 13h00. ....	66
Figura 23 - <i>Boxplots</i> da variação do comprimento (cm) do pelo em função da cor e do período. .	67
Figura 24 - <i>Boxplots</i> da variação do diâmetro (cm) do pelo em função da cor e do período. ....	68
Figura 25 – Quantificação do tipo de medula presente nos pelos analisados no P1. ....	69
Figura 26 – Quantificação do tipo de medula presente nos pelos analisados no P3. ....	69
Figura 27 – Gráfico da produção leiteira média (kg) diária relativa aos grupos de produção (Baixas e Altas), correlacionado a TR média diária (°C). Os números (1 a 5) correspondem aos dias do P1 (verão, stresse térmico). ....	71
Figura 28 – <i>Boxplots</i> da variação do teor proteico (%) em função do nível de produção e do período. ....	73
Figura 29 - <i>Boxplots</i> da variação do teor butiroso (%) em função do nível de produção e do período. ....	75

Figura 30 - <i>Boxplots</i> da variação da ureia (mg/kg) em função do nível de produção e do período. .....	76
Figura 31 - <i>Boxplots</i> da variação do hematócrito (%) em função do nível de produção e do período.....	81
Figura 32 - <i>Boxplots</i> da variação da T <sub>3</sub> (ng/dL) em função do nível de produção e do período.....	84



## 1. Introdução

O sector pecuário tem uma enorme importância económica, política, social e cultural (Gaughan *et al.*, 2009), onde o sector leiteiro é considerado um dos mais importantes e com uma intensificação inquestionável nos últimos vinte anos (Cerqueira, 2013). No entanto, uma das maiores ameaças à produção animal são as decorrentes alterações climáticas. Está previsto, para os próximos anos, um aumento da temperatura à superfície da terra com um consequente aumento de períodos de stresse térmico, com verões mais prolongados e mais intensos (Avendaño-Reyes, 2012). Este assunto não é só relevante no clima tropical, mas também, e cada vez mais, no clima mediterrânico (Bernabucci *et al.*, 2015), que possui invernos frios e húmidos e verões quentes e secos que duram entre três a seis meses por ano (Finocchiaro *et al.*, 2005). Está comprovado que as elevadas temperaturas afetam o desempenho do animal, pois provocam sérias alterações nas suas funções biológicas, como a diminuição na ingestão de matéria seca e na sua eficiência de utilização, alterações no metabolismo proteico, energético e da água, no balanço mineral, reações enzimáticas, controlo hormonal e metabolitos do sangue (Marai *et al.*, 2007). Estas alterações, nos bovinos de leite, resultam em problemas de fertilidade, na redução da produção leiteira e qualidade do leite, bem como o aumento da frequência de problemas de saúde, como é o caso das mamites (Avendaño-Reyes, 2012). Segundo Kadzere *et al.* (2002) e Bernabucci *et al.* (2014), a continuação do progresso genético refletir-se-á em animais mais produtivos, uma vez que a seleção, em grande parte, tem vindo a ser efetuada pela quantidade de leite produzida e não pela adaptabilidade às condições ambientais. Assim, as vacas de alta produção converteram-se em animais extremamente sensíveis ao aumento da temperatura (Cerqueira, 2013). Uma das alternativas é a seleção dos animais pela tolerância ao calor (Dikmen *et al.*, 2014), um processo a longo prazo que, atualmente, ainda não é apelativo a grande parte dos produtores de bovinos de leite (Atrian e Aghdam Shahryar, 2012). Logo, são necessários estudos que avaliem e comparem o comportamento dos animais de elevada com os de baixa produção em função da adaptabilidade às condições ambientais, nomeadamente através dos processos de aclimação que os seres homeotérmicos sofrem. Quando expostos a um stresse térmico prolongado, desencadeiam-se processos de aclimação de forma a conduzir o animal a um novo estado fisiológico, mais adaptado às condições daquela situação (Horowitz, 2002). No entanto, a aclimação vem em detrimento da produtividade do animal (Bernabucci *et al.*, 2010). Assim, é importante estudar este processo no clima mediterrânico, como é o caso de Portugal, e com a vaca Holstein-Friesian, reconhecida mundialmente como a raça de maior capacidade de produção leiteira (Avendaño-Reyes, 2012). Existem já muitos estudos com vacas leiteiras que

avaliaram as respostas produtivas dos animais em função de índices térmicos que conjugam a temperatura e a humidade ambiental (Hammami *et al.*, 2015), no entanto, estes não refletem o verdadeiro estado fisiológico do animal. Assim, pretendeu-se com este trabalho avaliar parâmetros anatómicos, como o pelo, e parâmetros fisiológicos, como o leite, o sangue e hormonas, em animais aclimatados ao verão e ao inverno, fazendo uma comparação direta entre animais com baixo e elevado mérito genético para a produção de leite, percebendo de que forma é possível seleccionar animais para determinados caracteres relacionados com a versatilidade fisiológica. Deste modo, é possível ter animais com bons desempenhos produtivos e índices de adaptabilidade que possibilitem a mudança de homeostase.

## 1.2. Objetivos específicos:

- Averiguar o processo de aclimação sazonal, em clima mediterrânico, de vacas Holstein-Friesian com diferente potencial leiteiro (Baixas e Altas produtoras);
- Utilização de dados fisiológicos (como a frequência respiratória e a temperatura retal) para avaliar o comportamento fisiológico de vacas Holstein-Friesian com diferente potencial leiteiro em distintos períodos de aclimação (P1-verão, stresse térmico e P3-inverno, termoneutralidade);
- Avaliar a produção leiteira de vacas Holstein-Friesian com diferente potencial leiteiro na presença de stresse térmico (P1-verão, stresse térmico);
- Avaliar a composição do leite de vacas Holstein-Friesian com diferente potencial leiteiro (Baixas e Altas) em distintos períodos de aclimação (P1-verão, stresse térmico e P3-inverno, termoneutralidade);
- Averiguar a existência de biomarcadores de stresse térmico no leite;
- Avaliar a composição sanguínea de vacas Holstein-Friesian com diferente potencial leiteiro em distintos períodos de aclimação (P1-verão, stresse térmico e P3-inverno, termoneutralidade);
- Observar o mecanismo da tiroide, através da triiodotironina plasmática ( $T_3$ ), de vacas Holstein-Friesian com diferente potencial leiteiro (Baixas e Altas), em distintos períodos de aclimação (P1- verão, stresse térmico; P2- verão, termoneutralidade; P3 – inverno, termoneutralidade);
- Observar algumas características da pelagem de vacas Holstein-Friesian em distintos períodos de aclimação (P1-verão, stresse térmico e P3-inverno, termoneutralidade) em clima mediterrânico.

## 2. Revisão bibliográfica

### 2.1. Interações térmicas entre o animal e o ambiente

Antes de compreender e avaliar de que forma o ambiente condiciona o animal e quais as suas consequências, como no caso do stresse térmico, é importante abordar de que modo o animal interage com o ambiente e de que modo este interage com o primeiro. Alguns ambientes pouco perturbam a fisiologia dos animais, enquanto outros podem ser tão severos que a própria sobrevivência pode estar dependente de uma elevada capacidade de adaptação. Portanto, é necessário ter em conta a existência de uma gama de temperaturas na qual os animais se encontram em conforto térmico e que a energia que flui nos seres vivos provém de fontes alimentares, da radiação solar e do calor emitido pelas superfícies de objetos e corpos circunvizinhos (Pereira, 2004).

#### 2.1.1. Zona de termoneutralidade

Os bovinos, como seres homeotérmicos, exibem o seu máximo potencial genético numa determinada gama de temperaturas conhecida como a zona de termoneutralidade (ZTN) (Figura 1).

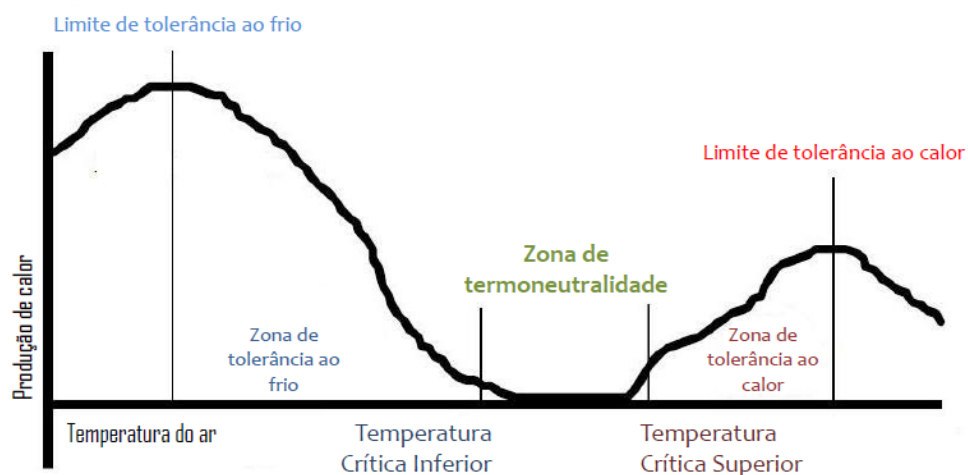


Figura 1 - Representação gráfica da produção de calor dos bovinos de leite em função da temperatura do ar, com referência aos seus limites térmicos e respetiva zona de termoneutralidade (Adaptado de Titto, 1998).

A ZTN compreende uma gama de temperaturas, onde os animais não requerem nenhuma energia adicional, para além da energia de manutenção, para se arrefecerem ou aquecerem, ou

seja, para manterem a homeotermia (Avendaño-Reyes, 2012). Johnson (1987) citado por Kadzere *et al.* (2002) define a ZTN como uma zona em que a produção de calor é mínima e a temperatura rectal se encontra dentro dos valores considerados normais para o animal. Refere também que dentro dos limites da ZTN os animais possuem menos gastos fisiológicos, atingindo valores máximos de produtividade. Por outras palavras, a ZTN é aquela onde o animal pode apresentar a sua taxa metabólica mínima e onde a regulação da homeotermia é efetuada, predominantemente, através da permuta de calor sensível (Bligh e Johnson, 1973). Segundo Webster (1979) citado por Robinson *et al.* (1986), a variação da temperatura ambiental não afeta o nível de produção de calor metabólico, desde que se encontre compreendida na ZTN.

A amplitude da ZTN depende da idade, espécie, raça, disponibilidade e composição da dieta, grau de aclimação, nível de produção, condições de exploração e alojamento, isolamentos tissulares (adiposo e pele) e externo (pelagem), assim como do comportamento do animal (Yousef, 1985), tal como se pode observar pela Figura 2. Desta forma, podemos aferir que a ZTN deve ser entendida como um conceito relativo e individual (Pereira, 2004).

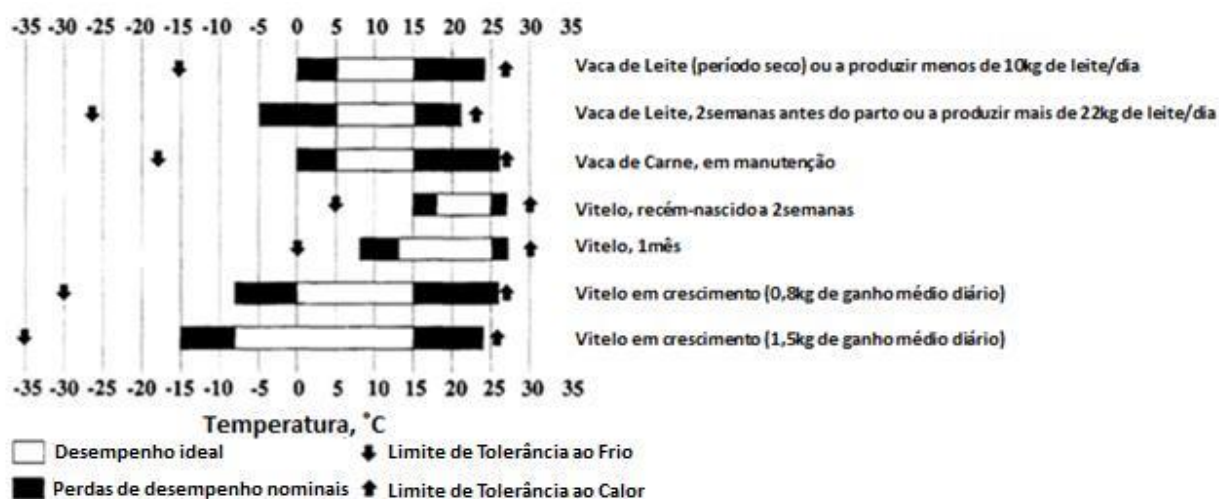


Figura 2 - Variação da zona de termoneutralidade em bovinos (Adaptado de Hahn 1985).

A ZTN é delimitada pelas temperaturas críticas inferior (TCI) e superior (TCS) (Robertshaw, 1981). Abaixo da TCI é indispensável o aumento da termogénese, da mesma forma, acima da TCS é imprescindível o incremento da termólise latente (Yousef, 1985; Eckert *et al.*, 1997). Pode-se afirmar que abaixo da TCI, a taxa de produção de calor metabólico está dependente da temperatura ambiente (Yousef, 1985), ao contrário do que acontece na ZTN. Apesar de ser difícil identificar valores exatos para estes limites (Silanikove, 2000), uma vez que esta resulta da variação da termogénese e da velocidade de dissipação de calor, é possível indicar determinados valores como referencia. A TCI encontra-se entre os -5 (Avendaño-Reyes, 2012) e os -0,5 °C

(Johnson, 1987 citado por West, 2003), sendo o valor mais baixo especificamente referente a raças europeias. A TCS, em vacas leiteiras, estabelece-se nos 25-26 °C, independentemente do grau de aclimatação ou do nível de produção (Berman *et al.*, 1985). Isto contradiz o concluído por Yousef (1985), que refere que a ZTN varia com o estado fisiológico e com as condições ambientais. Johnson (1987) citado por West (2003) aponta um valor de temperatura mais baixo (20 °C). Segundo Roenfeldt (1998) citado por Cerqueira (2013) quando a temperatura da sala de ordenha é superior a 27 °C, as vacas demonstram uma maior frequência de coices, estando isto possivelmente relacionado com o aumento do desconforto provocado pelo stress térmico. Em todo o caso, é importante acompanhar os valores de temperatura ambiental com os valores de humidade relativa. Num determinado ensaio, as produções de leite de vacas de raças Holstein-Friesian, Jersey e Pardo-Suíço foram medidas a uma temperatura ambiental de 29 °C e uma humidade relativa de 40%, verificando-se que as produções foram pouco afetadas (3, 7 e 2%, respetivamente). Os mesmos animais, à mesma temperatura, mas sujeitos a uma humidade relativa de 90%, foram bastante mais afetados, com produções a 69, 75 e 83% do normal (Bianca, 1965 citado por West, 2003). Nääs (1989) citado por Carvalho (2011), no Brasil, em função da humidade relativa e da radiação solar, restringiu a ZTN de 7 a 21 °C.

### **2.1.2. Produção de calor metabólico**

O incremento térmico num organismo homeotérmico processa-se de duas formas: através da produção interna de calor metabólico e do calor adquirido ao ambiente. Para que estes animais mantenham a homeotermia, a quantidade de calor que adquirem, por estas duas vias, deve igualar a quantidade perdida, tal como se observa pela seguinte equação (Schmidt-Nielsen, 1997):

$$(M = K \pm C \pm R \pm E \pm A)$$

(2.1.2.1.)

Nesta equação, M é a produção de calor metabólico; K é o calor permutado por condução; C é o calor permutado por convecção; R é o calor permutado por radiação, E o permutado por evaporação e A o calor armazenado no corpo.

A produção de calor metabólico pode ser definida como uma medida do somatório das transformações energéticas que ocorrem no animal por unidade de tempo (Yousef, 1985). É normalmente resultado de: (i) funções basais (coração, pulmões, fígado), (ii) manutenção, (iii) atividade e (iv) produção (McDowell, 1974 citado por Gaughan *et al.*, 2009). Esta produção de calor é diretamente controlada pelo sistema nervoso (Hammel, 1968 citado por Kadzere *et al.*, 2002), pelo sistema endócrino, pela conseqüente modificação do apetite e de processos

digestivos e indiretamente por alterações da atividade de enzimas relacionadas com a taxa metabólica e a síntese proteica (Yousef, 1985). Existe ainda uma variação tanto ao longo do dia, como ao longo do ano (Pereira, 2004). O calor produzido pela fermentação ruminal, bem como pelos tecidos do fígado e do intestino, representa uma fração considerável no incremento térmico total, associando-se aos processos de ingestão e digestão uma fração de 25-30% (Webster *et al.*, 1976 citado por Kadzere *et al.*, 2002). Fatores externos como a temperatura ambiental, que varia marcadamente ao longo do ano no clima Mediterrânico, também podem influenciar a taxa de produção de calor metabólico, uma vez que afetam os processos atrás descritos (Kadzere *et al.*, 2002). Hormonas relacionadas com a taxa metabólica (como as hormonas da tiroide) estão também intimamente relacionadas com a produção de calor (Kadzere *et al.*, 2002; Pereira *et al.*, 2008).

O objetivo pelo qual os animais de interesse zootécnico são criados são seus produtos (leite, carne, lã, ovos, entre outros). No entanto, estas produções apresentam um certo grau de ineficiência funcional, pelo que geram calor (Berman, 2011). O aumento do nível de produção está associado a um aumento da produção de calor metabólico e a um aumento da ineficiência energética. Por exemplo, a produção de calor de vacas que produzem 18,5 e 31,6 Kg de leite por dia é, respetivamente, 27,3 e 48,5% superior à de vacas no período seco (Purwanto *et al.*, 1990 citado por Zimbelman *et al.*, 2006). Portanto, quanto maior o potencial genético para a produção, menor será a tolerância ao calor e por conseguinte maiores serão as perdas potenciais na produção. Segundo Blackshaw e Blackshaw (1994), dentro dos bovídeos, as vacas de leite em lactação são as mais sensíveis a elevadas temperaturas ambientais, pois produzem muito mais calor que as restantes e apresentam uma baixa velocidade de dissipação desse calor, especialmente no caso das vacas no início da lactação (Johnson, 1987 citado por Koubková *et al.*, 2002).

Fora da ZTN, onde o animal necessita de despende energia para regular a temperatura interna, a produção de calor metabólico aumenta, quer por stresse por frio, uma vez que o animal precisa de aumentar a temperatura corporal para se aquecer (Robinson *et al.*, 1986), quer por stresse por calor, pois é necessário dissipar parte do calor produzido (Curtis, 1983). No segundo caso, os elevados níveis de glucocorticoides presentes no organismo desencadeiam uma maior disponibilidade e utilização da glicose, acentuando uma maior intensidade metabólica. A situação descrita ocorre em casos de stresse agudo, podendo posteriormente manter-se ou aumentar a produção de calor, devido ao efeito de *Arrhenius Van't Hoff* (Pereira, 2004), uma vez que o aumento da temperatura conduz a um consequente aumento da velocidade das reações

químicas, contribuindo para o incremento da taxa metabólica. Em todo o caso, a médio e longo prazo o animal possui respostas adaptativas (via aclimatação) que visam reajuste às novas condições prevalentes (Pereira, 2004).

### **2.1.3. Permuta de calor com o ambiente**

A troca de calor do animal com o ambiente, de uma forma geral, pode ser expressa pela seguinte equação (Silanikove, 2000):

$$(Q = m \times C \times \Delta t)$$

(2.1.3.1.)

Nesta equação, Q é a quantidade de calor permutado (Joules); m é a massa (Kg); C é o calor específico ( $J.Kg^{-1}.\text{°C}^{-1}$ ); e  $\Delta t$  é a variação de temperatura ( $\text{°C}$ ).

Se  $Q > 0$  podemos afirmar que o animal adquiriu calor, uma vez que a temperatura final foi superior à inicial;

Se  $Q < 0$  podemos afirmar que o animal perdeu calor.

A quantidade de calor que o animal adquire do ambiente tem também em conta, entre outros fatores, as instalações de alojamento (coberto ou aberto), a ventilação, a localização do animal e a sua posição hierárquica (Berman *et al.*, 1985). Assim, o comportamento do animal irá influenciar o impacto que o ambiente tem sobre ele, diferindo entre espécies, raças e indivíduos (Silanikove, 2000). A forma como estes animais interagem com o ambiente é afetada também pela seleção efetuada pelo homem no decorrer do tempo (Geraldo, 2013). Na Figura 3 pode-se observar as permutas de calor entre o animal e o ambiente.



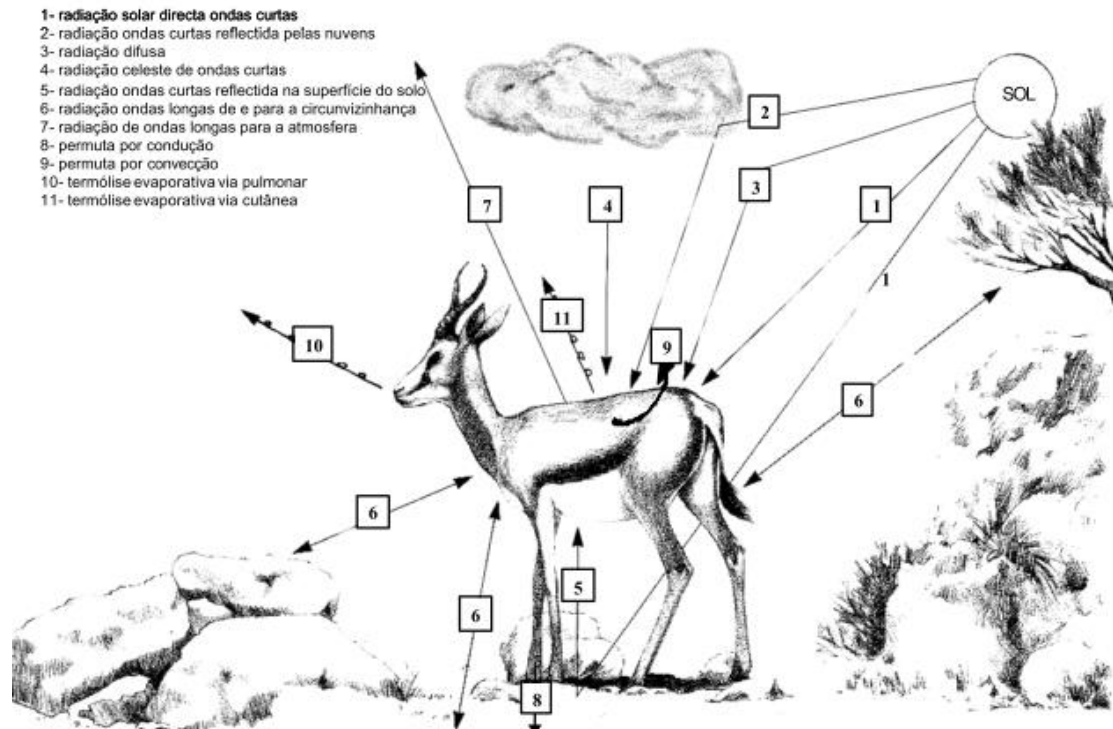


Figura 3 - Esquemática das permutas de calor envolvidas no binômio animal/ambiente (Lovegrove, 1999, citado por Pereira, 2004).

O animal permuta calor com o ambiente através de diversas formas, as quais se podem agregar em dois grandes grupos. A permuta de calor sensível: radiação, condução e convecção e a permuta de calor latente que se realiza através da evaporação (Pereira, 2004). Os processos de calor sensível estão dependentes do gradiente térmico entre o animal e o ambiente e por isso são mais relevantes em ambientes frios. Com o aumento da temperatura estes tornam-se menos eficazes e o animal recorre a mecanismos de evaporação (West, 2003).

#### 2.1.4. Permuta de calor sensível

O calor sensível é a energia requerida para alterar a temperatura de uma determinada substância, sem que ocorra alteração do seu estado físico. De acordo com Pereira (2004) a permuta de calor sensível realiza-se sob a forma de radiação, condução e convecção.

A permuta de calor por **RADIAÇÃO** assenta na transferência de energia térmica entre os corpos, na ausência de contato direto, através de ondas eletromagnéticas (gama de comprimentos de onda de 0,1 a 100  $\mu\text{m}$ , que engloba radiações ultravioleta, visível e infravermelha). No caso dos animais, estes recebem radiação proveniente da atmosfera, do solo e de outros objetos circundantes (Pereira, 2004), podendo ser através de gases, líquidos e sólidos. Na verdade, todos os objetos físicos a uma temperatura acima do zero absoluto emitem radiação

eletromagnética (Schmidt-Nielsen, 1983). A quantidade de calor radiante absorvido por um objeto depende não só da sua temperatura, como também da cor e da textura. Superfícies escuras irradiam e absorvem mais calor que as superfícies claras (Kadzere *et al.*, 2002). Aplicando este princípio aos bovinos, os de pelo escuro absorvem mais calor que os de pelo branco (Cena e Monteith, 1975), o que não é necessariamente uma desvantagem, pois em climas frios pode se tornar num fator crucial de produtividade (Dmi'el *et al.*, 1980). Além disso, apesar das vacas de pelo preto, regra geral, sentirem mais o efeito do calor, também radiam mais calor durante a noite, logo recuperam mais depressa (Atrian e Aghdam Shahryar, 2012).

O calor radiante entre corpos a diferentes temperaturas transfere-se do mais quente para o mais frio (Esmay, 1969). Verifica-se que com o aumento da radiação absorvida pelo animal (que se traduz em calor armazenado), a partir de um certo ponto, este responde diminuindo a produção de calor metabólico, existindo uma grande variação entre raças (Silanikove, 2000). Uma vez que a radiação solar é um fator importante na quantidade de calor absorvido pelo animal, a inclusão de sombras nas explorações torna-se algo essencial em climas quentes (Araujo, 2001; West, 2003).

A permuta de calor por **CONDUÇÃO** consiste na transferência de calor entre dois corpos, ou superfícies envolvidas, em contato direto (Kadzere *et al.*, 2002) permutando invariavelmente de regiões de maior temperatura para regiões de menor temperatura (Pereira, 2004). Ocorre em gases, líquidos e sólidos, sendo os últimos os de maior condutividade e os primeiros os de menor. Esta diferenciação é de extrema importância na quantificação deste processo, uma vez que a transferência de calor por condução está dependente do gradiente térmico (Pereira, 2004), mas também da condutância dos corpos e ainda da área de contato (Schmidt-Nielsen, 1964 citado por Kadzere *et al.*, 2002).

A permuta de calor por este processo ocorre por contato direto entre o animal e superfícies sólidas ou líquidas (Silanikove, 2000), como por exemplo a cama, água do sistema de arrefecimento, solo e dejetos, entre outros. A condutividade dos materiais pode determinar grandes variações nas permutas de calor. Segundo Cummins (1998), camas de calcário em pó apresentam maior condutividade que camas de areia, de aparas de madeira e de borracha, provocando um maior arrefecimento nas vacas ao deitarem-se sobre elas. No entanto, se a superfície sob a qual o animal se deita tiver uma temperatura superior à da pele, o animal irá adquirir calor (Kadzere *et al.*, 2002). De pé a única zona de contato com o solo são os cascos, que apresentam uma reduzida área de contato e com baixa condutividade térmica. Além disso, nas

vacas a distância entre os vasos sanguíneos e a superfície nos cascos é muito maior que na pele (Silanikove, 2000).

A **CONVECÇÃO** é o processo pelo qual um fluido, líquido ou gasoso, absorve energia num determinado local e a transfere para outro, para porções do fluido que estejam mais frias (Ingram e Mount, 1975). Portanto, quando a camada de ar que existe em torno da superfície de um corpo se encontra mais fria que esta existe uma transferência de calor para o ar que aquece e diminui a sua densidade, ascendendo em correntes de convecção natural. Paralelamente, o corpo arrefece, pois cedeu calor ao ar circundante. Se o ar estiver mais quente que a superfície do animal, o movimento do ar irá promover a transferência de calor para o animal, até ambos se encontrarem à mesma temperatura (Silanikove, 2000). A convecção difere da condução porque, embora dependa do gradiente térmico, é influenciada pela forma, dimensão e características da superfície e pela velocidade do ar (Ingram e Mount, 1975).

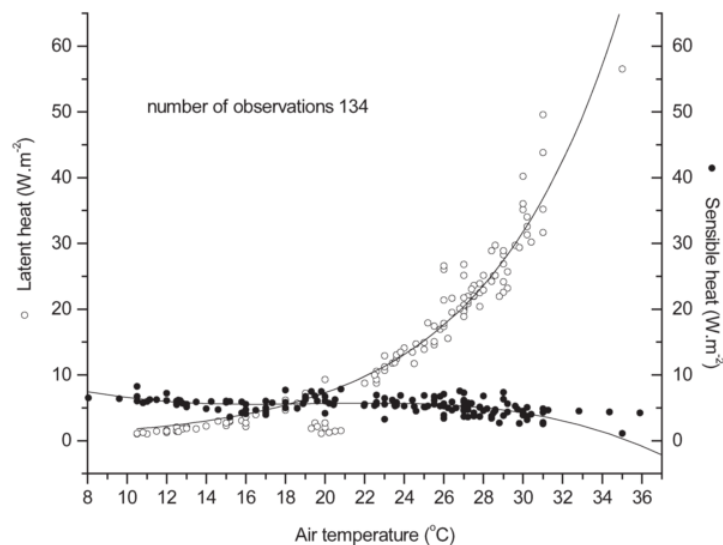
No animal a transferência de calor por convecção ocorre no transporte do sangue para a periferia e devido à passagem de massas de ar ao longo do trato respiratório, onde ocorre permuta calor entre o ar e o animal em função do gradiente térmico (Pereira, 2004). As maiores trocas de calor dão-se no limite periférico do animal, ao nível da superfície da pelagem (Ingram e Mount, 1975; Schmidt-Nielsen, 1997). Por este motivo os animais possuem a tendência de ficar de pé no verão de modo a maximizarem a perda de calor por convecção (Pires *et al.* 1998 citado por Vilela *et al.*, 2013), uma vez que aumentam a área exposta ao ar comparativamente a outras posições. A velocidade do ar também afeta a quantidade de calor permutado por convecção. Esta permuta está dependente do tipo de pelagem, da sua espessura e do tipo de pelos (Silanikove, 2000; Pereira, 2004).

#### **2.1.5. Permuta de calor latente**

O calor latente é a quantidade de calor absorvido ou libertado por uma substância sofrendo uma mudança de estado físico a temperatura e pressão constantes. No processo de termorregulação esta mudança ocorre no suor ou na água, passando do estado líquido para o estado gasoso. Segundo Silanikove (2000) a quantidade de calor necessária para efetuar esta conversão é referida como calor latente de vaporização.

A permuta de calor latente entre o animal e o meio ambiente é um processo bastante recorrente, principalmente em condições de temperaturas elevadas (Pereira, 2004). Os bovídeos perdem água passivamente através do processo respiratório normal e através da difusão cutânea, referida como perspiração insensível (Yousef, 1985). Quando o gradiente térmico entre a

temperatura ambiente e a temperatura nuclear dos animais diminui, a perda de calor pela via sensível torna-se cada vez menos eficaz (Maia *et al.*, 2005a) sendo necessário o recurso à via evaporativa, que é independente do gradiente térmico (Pereira, 2004). A evaporação ocorre através da sudação e da polipneia (Silanikove, 2000; Barnes *et al.*, 2004). Estes processos aumentam de uma forma quase linear com a temperatura ambiente até aos 20°C, acentuando-se a partir dos 25°C, tal como se pode observar pela Figura 4 num ensaio realizado em clima tropical com vacas Holstein-Friesian (Maia *et al.*, 2005a). Segundo Robertshaw (1985) citado por Barnes *et al.* (2004) é através da sudação que os bovinos perdem a maior quantidade de calor, cerca de 80% do total evaporado. A polipneia, um mecanismo acessório à sudação, é de extrema importância e permite manter a eficiência da perda de calor latente, principalmente quando a humidade do ar se encontra elevada, pois esta reduz a capacidade de libertação de vapor de água pela pele (Barnes *et al.*, 2004). Em casos de humidade relativa muito baixa, a evaporação ocorre com maior intensidade, podendo causar irritação cutânea e desidratação (Pereira, 2005 citado por Abreu, 2011).



**Figura 4 - Perda de calor por convecção (●) e por evaporação (○) no trato respiratório de vacas Holstein-Friesian em função da temperatura ambiente (Maia *et al.*, 2005a).**

Segundo Schmidt-Nielsen (1997), no caso dos ungulados, a maior vantagem da polipneia poderá ser o facto de conseguir manter a eutermia do encéfalo, apesar do aumento da temperatura do resto do corpo. Esta situação é conseguida devido à ramificação da artéria carótida externa em centenas de pequenas artérias que são arrefecidas, na zona nasal, por evaporação antes de entrarem no crânio (Figura 5). De acordo com Pereira (2004) esta situação é mais ou menos eficiente consoante o comprimento do trato nasal.

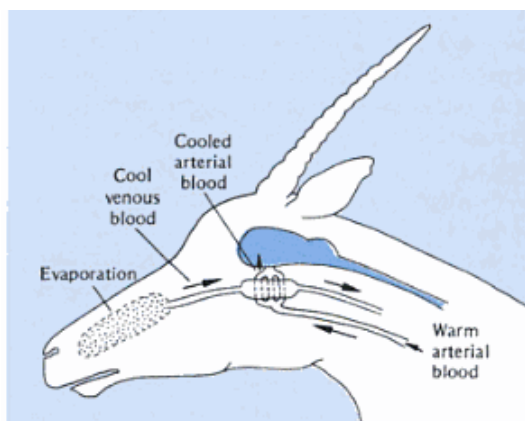


Figura 5 - Arrefecimento do encéfalo de um ungulado através da respiração pela via evaporativa (Taylor, 1992 citado por Schmidt-Nielsen, 1997).

É importante referir que os processos de evaporação e de convecção não são facilmente dissociáveis, uma vez que ambos são influenciados pela velocidade e direção do ar e pela geometria da superfície (McLean, 1974), pelo que o animal consegue perder bastante maior quantidade de calor associando a convecção ao processo evaporativo (Pereira, 2004).

## 2.2. Stresse térmico em vacas de leite

Neste capítulo será abordado principalmente o stresse térmico por calor, pois ocorre com muito maior frequência nos bovinos leiteiros e no clima mediterrânico, comparativamente ao stresse térmico por frio.

O stresse térmico ocorre praticamente todo o ano na maioria das regiões tropicais e subtropicais (Buffington *et al.*, 1981). No clima mediterrânico esta situação pode ocorrer entre três a seis meses por ano. Elevadas temperaturas ambientais, radiação solar, velocidade do vento e a humidade relativa provocam o aumento da temperatura ambiental efetiva acima da ZTN dos animais, ocorrendo stresse térmico (Finocchiaro *et al.*, 2005). Uma vez que a manutenção da homeotermia é uma prioridade para os animais (Martello *et al.*, 2004), o stresse térmico pode afetar a performance e a saúde quer das vacas secas quer das vacas em lactação (Atrian e Aghdam Shahryar, 2012), impedindo-as de atingir o seu potencial genético na produção de leite e na eficiência económica (Buffington *et al.*, 1981). Segundo o NRC (2001) citado por O'Brien *et al.* (2008) as necessidades de manutenção podem aumentar entre 7 a 25% com o stresse térmico, devido aos custos associados à dissipação de calor.

O stresse térmico por calor pode ser definido como a condição fisiológica que ocorre quando a temperatura corporal excede o intervalo específico de atividade normal circadiana, resultando numa termogénese superior à termólise, provocando respostas comportamentais e fisiológicas de

modo a reduzir a tensão (Bernabucci *et al.*, 2010). Estas respostas são mecanismos homeostáticos e incluem o aumento da frequência respiratória, da taxa de sudação e da ingestão de água, bem como a diminuição da ingestão alimentar e da frequência cardíaca. As respostas dos animais ao stresse térmico variam com a intensidade e duração do estímulo stressor. A este tipo de respostas é dado o nome de stresse térmico agudo. O stresse térmico crónico implica a atuação do agente stressor por um período longo. As respostas relacionam-se com o desempenho do animal, como por exemplo a redução da taxa metabólica, diminuindo a ingestão alimentar, afetando assim o crescimento e a reprodução (Nienaber e Hahn, 2007). Primeiramente será abordado o stresse térmico agudo, uma vez que o animal responde ao stresse térmico agudo e só então, caso este passe a crónico, o animal sofre o processo de aclimação.

De modo a caracterizar o conforto e o bem-estar animal face às adversidades ambientais, como o stresse térmico, surgiram índices de conforto térmico, determinados por fatores climáticos (Albright, 1993). Segundo Martello *et al.* (2004) o índice mais utilizado na bioclimatologia animal é o que relaciona a temperatura e a humidade do ar (THI), originalmente desenvolvido por Thom (1958). Existem várias equações para calcular o THI, como por exemplo:

$$\text{THI} = t_{\text{bs}} + 0,36t_{\text{po}} + 41,5 \quad (2.2.1.)$$

Ou

$$\text{THI} = 0,72 \times (t_{\text{bh}} + t_{\text{bs}}) + 40,6 \quad (2.2.2.)$$

Onde:

$t_{\text{bs}}$  = temperatura do bolbo seco, em °C

$t_{\text{po}}$  = temperatura do ponto de orvalho, em °C

$t_{\text{bh}}$  = temperatura do bolbo húmido, em °C

Na Tabela 1 observam-se valores de THI que conjugam a temperatura e a humidade e o grau de stresse térmico que impera nos bovinos de leite.

Tabela 1 – Índice de temperatura-humidade e a intensidade do stresse em bovinos de leite (Adaptado de Atrian e Aghdam Shahryar, 2012).

THI	Intensidade do stresse
<72	Sem stresse
72 – 78	Stresse ténue
79 – 88	Stresse moderado
89 – 98	Stresse severo
>98	Stresse extremo

Em todo o caso a avaliação do stresse térmico utilizando este índice parece estar um pouco desatualizada com as vacas existentes na atualidade. Segundo Zimbelman *et al.* (2009), o limite de stresse térmico deve ser 68 e não 72, pois o THI foi desenvolvido há aproximadamente 50 anos para vacas atualmente reconhecidas como baixas produtoras. Este limite “reformulado” pode ser verificado na Figura 6, onde se observa uma descida acentuada na produção, aproximadamente, a partir do 68.

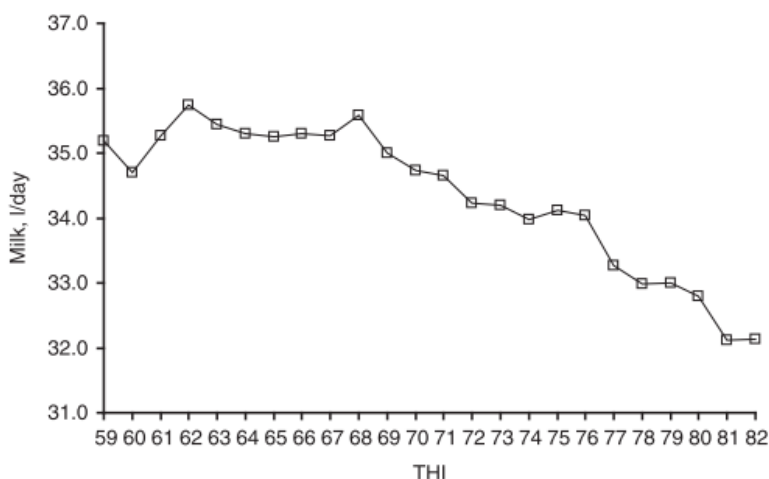


Figura 6 - Relação entre o Índice de Temperatura e Humidade (THI) e a produção de leite diária (Bernabucci *et al.*, 2010).

Um outro índice de conforto térmico é o Índice de globo negro-humidade (BGHI), tão ou mais preciso que o THI, especialmente em situações onde os animais adquirem grande quantidade de calor por radiação solar. Ao contrário do THI que apenas tem em conta a temperatura e a humidade ambiental, o BGHI tem também em consideração a radiação e a movimentação do ar

(Buffington *et al.*, 1981), como tal indicando uma situação mais realista do verdadeiro estado da vaca. O BGHI pode ser expresso pela seguinte equação:

$$\text{BGHI} = t_{\text{bg}} + 0.36 \times t_{\text{dp}} + 41.5 \quad (2.2.3.)$$

Onde:

$t_{\text{bg}}$  = temperatura de globo negro, em °C.

$t_{\text{dp}}$  = temperatura do ponto de orvalho, em °C

Ainda assim, segundo Zimbelman *et al.* (2009) não existem vantagens em substituir o THI pelo BGHI, pois não observam correlações superiores entre o BGHI e parâmetros fisiológicos, como a temperatura retal e frequência respiratória, comparativamente ao THI.

O stresse térmico pode afetar os bovinos de leite de diversas formas (Atrian e Aghdam Shahryar, 2012). Portanto, é importante salientar que além de uma determinada intensidade o stresse térmico tem durações variáveis que condicionam as respostas dos animais (stresse agudo ou stresse crónico) (Geraldo, 2013).

### **2.2.1. Respostas ao stresse térmico agudo**

Alterações adaptativas de curto prazo nas funções comportamentais, fisiológicas e imunológicas são consideradas respostas iniciais a eventos agudos. Estas alterações, com o objetivo de manter a homeotermia, ocorrem pois existem, por todo o corpo, neurónios sensitivos (recetores/aférentes) que respondem a estímulos relacionados com alterações térmicas e que enviam a informação ao hipotálamo, que por sua vez induz alterações fisiológicas e comportamentais (Curtis, 1983 citado por West, 2003).

#### **2.2.1.1. Alterações comportamentais**

As atividades dos animais com o objetivo de melhorar as suas condições ambientais são chamadas de comportamentos adaptativos (Baccari Jr., 2001). A procura por sombra é um destes comportamentos, podendo até provocar disputas entre os animais caso não exista sombra suficiente (Tucker e Schütz, 2009).

Alternativamente à sombra há a possibilidade de disponibilizar água para imersão aos animais, apesar de existirem raças que dão preferência à sombra (Geraldo *et al.*, 2012). Animais sem acesso a áreas sombreadas apresentam outro tipo de comportamentos, como o aumento do



tempo de permanência junto a bebedouros (ou outras fontes de água). Apesar de não estar completamente compreendido, uma das justificações para este comportamento está relacionado com a evaporação da água que ocorre a partir das fontes, criando um microclima mais fresco, comparativamente ao resto das instalações (Tucker e Schütz, 2009). Associado a este comportamento está o aumento da ingestão de água (Atrian e Aghdam Shahryar 2012), que altera uma série de parâmetros fisiológicos e promove um arrefecimento adicional ao animal, que é tanto maior quanto maior o gradiente térmico entre a temperatura do corpo e a água ingerida (Pereira, 2004). Esta serve para colmatar a perda através da sudação, pois ocorrem grandes perdas de fluídos, que por efeito continuado e sem renovação através da ingestão pode atingir um estado crítico, comprometendo assim a termorregulação, bem como todo o funcionamento do organismo (Silanikove, 1994).

A redução da ingestão voluntária de matéria seca é um dos comportamentos mais discutidos (Tucker e Schütz, 2009). Os bovinos tendem a escolher alimentos concentrados (menos calorígenicos) ao invés de alimentos grosseiros, o que pode acarretar distúrbios gastrointestinais. Esta redução ocorre sob influência do calor, pois sob influência do frio normalmente ocorrem aumentos na ingestão (Pereira, 2004).

Outro comportamento adaptativo é o aumento da quantidade de tempo que o animal permanece de pé (Overton *et al.*, 2002). O animal perde maior quantidade de calor por convecção e recebe menos por condução, caso não esteja em solos húmidos ou à sombra.

Em pastoreio os animais alteram os seus horários em função do clima, alimentando-se durante a madrugada e ao anoitecer, quando as temperaturas se encontram baixas, e procuram sombra durante o dia, quando as temperaturas estão elevadas (Fraser, 2004).

#### **2.2.1.2. Alterações fisiológicas**

Tal como os comportamentos adaptativos, as alterações fisiológicas que ocorrem em stresse térmico têm como objetivo regular a temperatura do animal. A primeira destas respostas fisiológicas, que ocorre ainda dentro da ZTN, é a vasodilatação dos vasos sanguíneos da pele e a vasoconstrição dos vasos que nutrem os órgãos internos, redirecionando assim o sangue para a periferia e consequentemente perdendo calor por convecção e por radiação (Barnes *et al.*, 2004; Pereira, 2004). Por este motivo a temperatura da pele aumenta em condições de temperatura ambiental elevada. Nesta situação a perda de água por perspiração insensível pode triplicar o seu valor (Ingram e Mount, 1975).

Em segundo lugar, caso a vasodilatação periférica não seja suficiente, ocorre a sudação (Pereira, 2004). Na verdade, o próprio aumento do fluxo sanguíneo na epiderme desencadeia

uma maior taxa de sudação, pois as glândulas sudoríparas recebem um suprimento adicional de matérias-primas e um estímulo para a acumulação de suor nas células epiteliais, proporcionando uma maior e mais rápida passagem para o lúmen glandular (Schleger e Bean, 1971; Finch, 1986). Apesar do animal perder calor com este mecanismo, também perde uma quantidade significativa de eletrólitos que constituem o suor, como o potássio ( $K^+$ ), o sódio ( $Na^+$ ) e o cloro ( $Cl^-$ ), comprometendo assim o equilíbrio ácido-base (West, 2003; Atrian e Aghdam Shahryar, 2012). Segundo Collier *et al.* (2006), dietas que incluam forragens conseguem minimizar esta situação, o que pode ser contrariado pelo comportamento alimentar dos bovinos em stresse térmico. A sudação está positivamente correlacionada com o aumento da temperatura ambiente, iniciando-se em função da menor ou maior eficiência da via sensível (Pereira, 2004) e estabilizando antes dos 30 °C de temperatura corporal no caso dos *Bos taurus* e aos 40 °C no caso dos *Bos indicus* (Schmidt-Nielsen, 1964 citado por Kadzere *et al.*, 2002). Finch *et al.* (1982) e Finch (1986) identificaram a estabilização da taxa de sudação dos *Bos tauros* apenas aos 40 °C.

Nos bovídeos a polipneia térmica é a primeira evidência exibida na resposta ao calor, embora este mecanismo termolítico seja apenas desencadeado em terceiro lugar (Pereira, 2004), com um intervalo de duas a três horas antes de se iniciar (Barnes *et al.*, 2004). O aumento ou diminuição da frequência respiratória depende da intensidade e duração do stresse térmico (Martello *et al.*, 2004), bem como do grau de aclimação (Robinson *et al.*, 1986). Por exemplo, uma frequência respiratória de 60 movimentos por minuto indicou ausência ou mínimo stresse térmico (Hahn *et al.*, 1997, citados por Matello *et al.*, 2004). De acordo com Garcia *et al.* (2015) os valores de referência encontram-se entre 20-30 movimentos/minutos e considera-se stresse térmico acima dos 60. É necessário ter em consideração que a própria polipneia também requer energia para ocorrer, contribuindo para o aumento da produção de calor metabólico (Pereira, 2004; Atrian e Aghdam Shahryar, 2012).

A polipneia térmica é desencadeada e controlada no hipotálamo através da integração de estímulos provenientes dos termossensores centrais e periféricos (Pereira, 2004). Normalmente os bovinos realizam polipneia de boca fechada, com uma frequência respiratória superior e pouco profunda. Tal alteração provoca perda de calor sem grande alteração da ventilação alveolar (Barnes *et al.*, 2004), uma vez que o menor volume corrente é compensado pela maior frequência respiratória (Malaghini, 1999). Com o agravamento do stresse térmico, a frequência respiratória permanece elevada e aumenta o volume corrente. Desta forma, a perda de calor por evaporação é superior, mas a ventilação alveolar aumenta consideravelmente, até cinco vezes acima do normal (Hales, 1976 e Sparke *et al.*, 2001 citados por Barnes *et al.*, 2004). Este tipo de polipneia é designado por segunda fase da polipneia térmica, realizando-se com a boca aberta e com intensa

sialorreia (Ingram e Mount, 1975). O aumento da ventilação alveolar conduz a uma excessiva expiração de dióxido de carbono, culminando numa alcalose sanguínea (Hales, 1976 e Sparke *et al.*, 2001 citados por Barnes *et al.*, 2004; West, 2003; Pereira, 2004). Porém, é pouco comum os animais atingirem esta fase (Jessen, 2001). Segundo Atrian e Aghdam Shahryar (2012) esta situação pode apresentar-se como um fator de risco principalmente em vacas no peri-parto, uma vez que aumenta a probabilidade da ocorrência de hipocalcemia. Isto ocorre pois a alcalose interfere com a disponibilidade de minerais como o magnésio e o cálcio (Barnes *et al.*, 2004). Em todo o caso, o animal responde à alcalose tentando restabelecer o pH do sangue (Whitehair *et al.*, 1995), podendo assim continuar com a polipneia (Barnes *et al.*, 2004). A compensação é conseguida através da excreção do bicarbonato através da urina (Benjamin, 1981). A excreção leva a uma redução na concentração de bicarbonato no sangue, resultando numa acidose metabólica durante as horas de temperatura do ar mais baixa, normalmente durante a noite (Schneider *et al.*, 1988 citado por West, 2003). Assim, durante o dia, a polipneia conduz a uma alcalose metabólica e durante a noite a excreção do bicarbonato conduz a uma acidose metabólica. Diminui então o poder tampão da saliva, baixando o pH ruminal, o que em conjunto com dietas mais energéticas agrava a situação (West, 2003; Avendaño-Reyes, 2012).

A temperatura retal é a variável dependente com maior relevância na identificação da eficácia das vias termolíticas durante os períodos de stresse térmico. A intensidade com que funcionam as vias de termólise evaporativa é um indicador do grau de incómodo do animal face ao stresse térmico, mas não repercute necessariamente a eficácia do seu funcionamento (Pereira, 2004). Se a termólise for eficaz, a temperatura retal não deverá subir acima dos valores fisiologicamente normais. Os animais adaptados ao calor tendem a apresentar valores de temperatura retal dentro dos limites fisiológicos. Segundo Kolb (1987) citado por Martello *et al.* (2004) e Alzina-López *et al.* (2001) a temperatura retal média para bovinos com mais de um ano de idade é de  $38,5 \pm 1,5$  °C, a qual varia de acordo com um ritmo circadiano e sazonal. De acordo com Pereira (2004), em situação de termoneutralidade a amplitude diária da temperatura retal é de 0,4 °C. Em todo o caso, Garcia *et al.* (2015) referem que os valores de referência encontram-se entre 38,3 e 38,9 °C e consideram stresse térmico acima dos 39,2 °C. Perante condições de radiação solar direta, as amplitudes podem exceder 1,2 °C (Lefcourt e Adams, 1996; Hahn, 1999). Um aumento de 1 °C ou menos é suficiente para reduzir a performance produtiva na maioria das espécies pecuárias (McDowell *et al.*, 1976 citados por Kadzere *et al.*, 2002). Para vacas leiteiras de alta produção em equilíbrio térmico, a temperatura retal é independente da temperatura do ar, mas relaciona-se com o metabolismo energético (Martello *et al.*, 2009). Scott *et al.* (1983) citados por Kadzere *et al.* (2002) concluíram que o arrefecimento natural das vacas durante a noite,

quando a temperatura retal foi mais elevada, foi mais benéfico para a manutenção de valores termoneutros de tiroxina ( $T_4$ ) no sangue. Segundo Baccari Jr. *et al.* (1984) citados por Martello *et al.* (2004) a temperatura retal média da tarde é, em geral, mais elevada que a da manhã. Existe ainda variação entre raças e indivíduos nos valores basais (Finch, 1986).

### **2.2.1.3. Alterações produtivas**

Logicamente as respostas na produção estão intimamente relacionadas com as comportamentais e principalmente com as fisiológicas, pois uma parte da variação na produção deve-se às alterações que ocorrem no organismo em função do ambiente stressante.

Como já foi referido, a produção não é 100% eficiente, produzindo calor como subproduto. Desta forma, é passível de se compreender que os animais apresentem produções diminuídas na presença de stresse térmico por calor, uma vez que a termorregulação (associado a necessidades de manutenção) se sobrepõem às necessidades de produção e o animal tenta minimizar ao máximo o incremento calórico. Assim, segundo Smith (1996), a quebra na produção de leite é a principal consequência económica associada ao stresse térmico.

Em vacas leiteiras, temperaturas ambientais acima dos 25 °C estão associadas a reduções na ingestão de alimento, reduzida taxa metabólica, quebras na produção de leite (Berman, 1968) e diminuição na taxa de concepção (McDowell *et al.*, 1976 citados por Kadzere *et al.*, 2002). Neste trabalho, o foco encontra-se na produção e qualidade do leite, pelo que outras características reprodutivas e produtivas não serão abordadas com tanta ênfase.

De modo a perceber como varia a produção de leite na presença de stresse térmico é pertinente abordar primeiramente a variação na ingestão de água e de matéria seca (Kadzere *et al.*, 2002).

Cerca de 87% do leite é composto por água, pelo que as vacas de aptidão leiteira necessitam de ingerir grandes quantidades desse composto, sobretudo as altas produtoras, de modo a fazer face aos níveis produtivos exigidos (Maltz *et al.*, 1984 citados por Kadzere *et al.*, 2002), podendo ingerir até 200 litros por dia (Atrian e Aghdam Shahryar, 2012). Em stresse térmico esta ingestão aumenta, porque as perdas de água através da termólise latente também aumentam (sudação) (Maltz *et al.*, 1984 citados por Kadzere *et al.*, 2002) e também porque o efeito de ingerir água a uma temperatura inferior à do núcleo do corpo possibilita uma diminuição do armazenamento de calor (Pereira, 2004). Por norma, o consumo de água aumenta com a temperatura ambiental (Kadzere *et al.*, 2002), podendo variar de acordo com a temperatura a que água se encontra

(Anderson, 1985). Silanikove e Tadmor (1989) citados por Kadzere *et al.* (2002) verificaram que a restrição de água em vacas de carne conduziu a uma diminuição do consumo voluntário de alimento, pelo que a abundância de água (fresca) é um fator decisivo nos períodos de elevada temperatura ambiental, podendo limitar todo o desempenho do animal.

O exagerado aumento de ingestão de água também produz alguns efeitos adversos, pois ocupa espaço no rúmen que não poderá ser ocupado posteriormente por alimento (Atrian e Aghdam Shahryar, 2012). A menor atividade dos órgãos internos também contribui para a menor ingestão de alimento, uma vez que retarda os processos digestivos, fazendo com que o alimento permaneça durante mais tempo no rúmen (Atrian e Aghdam Shahryar, 2012). Sendo por um lado benéfico, pois aumenta a degradabilidade e tempo para digerir o alimento, ainda assim não é suficiente para compensar as perdas na ingestão involuntária (Pereira, 2004). O estímulo do aumento da temperatura ambiental é recebido pelo hipotálamo que estimula o centro mediador da fome a inibir o centro lateral do apetite, reduzindo assim a ingestão de alimento (Albright e Alliston, 1972 e Silanikove, 1992 citados por Kadzere *et al.*, 2002). Portanto, são vários os meios pelos quais o animal reduz a ingestão alimentar, diminuindo assim a produção de calor metabólico.

Dependendo da severidade do stresse térmico, a ingestão de alimento pode diminuir 8-12% ou até mais (Atrian e Aghdam Shahryar, 2012). A diminuição começa a temperaturas ambientais de 25-26 °C e acentua-se acima dos 30 °C. Aos 40 °C pode chegar até aos 40% de redução (National Research Council, 1989 citado por Kadzere *et al.*, 2002). A redução da ingestão de alimento, uma vez mais, é maior em vacas de alta produção, pois a sua ingestão, num estado fisiologicamente normal, é de duas a quatro vezes superior à ingestão relacionada apenas com a manutenção (National Research Council, 1989 citado por Kadzere *et al.*, 2002). Em stresse térmico, a redução da ingestão de alimento é o fator principal na diminuição da produção de leite, pois está associado a um balanço energético negativo, independente da fase da lactação (Wheelock *et al.*, 2010). Não obstante, vacas altas produtoras e/ou no pico da lactação são as mais prejudicadas (Avendaño-Reyes, 2012). Segundo Rhoads *et al.* (2009), a diminuição da ingestão de alimento explica 40-50% da quebra na produção de leite, enquanto de acordo com Baumgard e Rhoads (2013) a percentagem associada foi de 35-50%. Existem portanto outros fatores que coadjuvam a diminuição da produtividade, como por exemplo fatores fisiológicos (motilidade do trato gastrointestinal) e fatores endócrinos (balanço das hormonas calorígenicas).

Segundo Silanikove (1992) citado por Kadzere *et al.* (2002), o stresse térmico possui um efeito negativo na função secretora da glândula mamária. De acordo com Baumgard *et al.* (2007) e Wheelock *et al.* (2010), esta necessita de glicose para sintetizar a lactose, que é considerada o principal elemento osmorregulador e por conseguinte determinante na produção de leite. Porém, numa tentativa de gerar menos calor metabólico, o corpo (principalmente o músculo esquelético) aparenta utilizar a glicose a uma velocidade superior. Deste modo, a glândula mamária pode não receber quantidades suficientes de glicose e assim penalizar a produção de leite, podendo este ser o principal mecanismo responsável pela diminuição da produção, que não é explicada pela diminuição da ingestão alimentar.

A produção de leite também pode ser condicionada pelo stresse térmico nas vacas durante o período seco, devido ao efeito direto no menor crescimento do tecido mamário (Adin *et al.*, 2009) e indiretamente por um período mais curto de crescimento da glândula mamária devido a uma gestação mais curta (Collins e Weiner, 1968 citados por Kadzere *et al.*, 2002), tal como também é referido por Tao e Dahl (2013).

Outros motivos pelos quais a produção decresce nos períodos de stresse térmico devem-se provavelmente ao estado de saúde do animal. O stresse térmico tende a aumentar a incidência de doenças do pós-parto, como a retenção da placenta, hipocalcemia, metrites e cetoses, as quais têm um efeito negativo na produção de leite (DuBois e Williams, 1980 e Pavlicek *et al.*, 1989 citados por Kadzere *et al.*, 2002; Atrian e Aghdam Shahryar, 2012).

Em stresse por calor, a produção de leite, diminui quando a temperatura do corpo ultrapassa 38,9 °C e para cada 0,55 °C de acréscimo da temperatura retal, a produção de leite e a ingestão de alimento sofrem um declínio na ordem de 1,8 e 1,4 kg, respetivamente (Johnson, 1985). Ingraham (1979) citado por West (2003) estimou uma redução de 0,32 kg de leite por cada aumento unitário do THI. Segundo Calegari *et al.* (2005) citados por Perissinotto *et al.* (2007) vacas multíparas sofrem maiores perdas na produção que as primíparas (perdem 10,5%/mês no início da lactação e 11,6%/mês no final). Existe uma maior relação destas perdas com o aumento da temperatura mínima diária do que com a temperatura máxima diária, pois o aumento da temperatura mínima reduz a possibilidade das vacas eliminarem, durante a noite e início da manhã, o calor armazenado durante o dia (Calegari *et al.*, 2005 citados por Perissinotto *et al.*, 2007). De acordo com Igono *et al.* (1992) citados por West (2003), um período de 3 a 6 horas com temperaturas iguais ou inferiores a 21 °C minimiza as perdas na produção de leite. Esta situação ocorre pois o stresse térmico agudo desencadeia uma resposta regulatória rápida e de curto prazo, pelo que durante a noite, quando a temperatura desce, o organismo pode recuperar (Avendaño-Reyes, 2012) perdendo calor pela via sensível (Fuquay, 1981). Uma situação

semelhante ocorre em vacarias com sistemas de arrefecimento, onde a diferença na diminuição da produção de leite para uma vacaria sem estes sistemas pode chegar aos 40% (Atrian e Aghdam Shahryar, 2012). Assim, será importante não tentar minimizar a temperatura corporal dos animais apenas nas horas mais quentes, mas também arrefecer nas horas de temperaturas mais baixas (West, 2003).

É importante referir que alguns estudos demonstram que os valores de globo negro e de THI explicam melhor a variação na produção e composição do leite 24-48h depois dos valores registados (Collier *et al.*, 1981; West *et al.*, 2003; Bertocchi *et al.*, 2014). Segundo West *et al.* (2003), a produção de leite de Holstein-Friesians baixou 0,88 kg por cada aumento unitário de THI com o “atraso” de dois dias.

De acordo com Stanisiewski *et al.* (1985) citados por Bertocchi *et al.* (2014) e Geers *et al.* (2014) existe uma correlação positiva entre a produção de leite e o fotoperíodo. Este aumento pode ser na ordem dos 1,2 kg de leite por cada hora a mais de luminosidade durante o dia, mas não compensa as perdas associadas ao aumento da temperatura (Barash *et al.*, 2001).

Existe ainda uma variação na produção de leite afetada pelo stresse térmico entre espécies, verificando-se que as cabras são menos afetadas que as vacas, pois conseguem ser mais eficientes na dissipação de calor (Salama *et al.*, 2014a), e também entre raças (Sevi e Caroprese, 2012), uma vez mais justificado pela diferença na tolerância ao calor entre algumas raças comparativamente a outras (Pereira *et al.*, 2008; Bozkurt e Ozkaya, 2009; Pereira *et al.*, 2014).

O leite tem uma composição única de componentes nutricionais, incluindo proteínas, gorduras, lactose, minerais, bem como outros compostos menores. A Tabela 2 apresenta uma composição comum do leite de vaca num estado fisiologicamente normal.

**Tabela 2 – Composição comum do leite de vaca (Adaptado de Burrington e Agarwal, 2013).**

<b>Constituinte</b>	<b>(%)</b>	<b>Constituinte</b>	<b>(%)</b>
<b>Água</b>	87,4	Proteínas do soro	0,66
<b>Proteína</b>	3,6	α-lactalbumina	0,12
Caseínas	2,97	β-lactoglobulina	0,32
α <sub>s1</sub> -caseína	1,2	Albumina do soro bovina	0,04
α <sub>s2</sub> -caseína	0,3	Imunoglobulinas	0,08
β-caseína	1,0	Peptonas-proteose	0,1
κ-caseína	0,35	<b>Gordura</b>	3,7
γ-caseína	0,12	<b>Hidratos de carbono</b>	4,8
		<b>Cinzas</b>	0,7

Relativamente à alteração na composição do leite de animais em stresse térmico, existe alguma divergência na literatura, especialmente no teor butiroso. Ainda assim, é consensual a alteração da qualidade do leite nos períodos de stresse térmico.

Em stresse térmico agudo existe uma maior inibição da síntese de lactose do que da gordura e da proteína, o que se reflete no aumento da concentração destes dois constituintes, que ainda assim não compensa a diminuição das suas quantidades (Avendaño-Reyes, 2012). A diminuição da lactose e da proteína no leite de animais em stresse térmico encontra-se mais comprovada e em associação que a alteração da gordura (Salama *et al.*, 2014a). A situação da gordura é mais complexa pois é provável que seja afetada pela fase da lactação (em cabras registou-se -12% de gordura no início e -1% no final) (Hamzaoui *et al.*, 2012). Ainda assim, na maioria dos casos, em stresse térmico a quantidade de gordura diminui (Bouraoui *et al.*, 2002; Noro *et al.*, 2006; Renna *et al.*, 2010). Bertocchi *et al.* (2014), ao contrário do referido anteriormente, verificaram uma diminuição da concentração de gordura e de proteína no leite durante a primavera. No entanto, esta situação deveu-se ao aumento da produção de leite provocado pelo aumento do fotoperíodo.

Além da variação na quantidade de gordura total verificaram-se também alterações noutros parâmetros (Sevi e Caroprese, 2012). Numa situação de termoneutralidade, o leite contém uma maior quantidade de ácidos gordos saturados que insaturados e dentro dos insaturados os mono estão largamente em maiores concentrações que os polinsaturados (Månsson, 2008). Independentemente do tipo de saturação, em câmaras climáticas e com novilhas Holstein-Friesian a uma temperatura do ar de 31,5 °C e 72% de humidade relativa, Nardone *et al.* (1997) encontraram um teor superior de ácidos gordos de cadeia longa e inferior de cadeia média e curta no colostro. Outros autores também obtiveram resultados semelhantes (Palmquist *et al.*, 1993 e Piva *et al.*, 1993 citados por Nardone *et al.*, 1997), embora estes tenham atribuído as alterações à incorporação de gordura na alimentação e à mobilização do tecido adiposo, respetivamente. Segundo Nardone *et al.* (1997) estes resultados podem-se dever a três situações: alto teor de gorduras incorporadas na alimentação; elevada mobilização do tecido adiposo que geralmente ocorre num clima quente e redução da síntese de ácidos gordos de cadeia curta e média pela glândula mamária. No entanto, resultados contrários foram encontrados por outros investigadores. O leite de ovelhas expostas a radiação solar em comparação com o de ovelhas com disponibilidade de sombra apresentou maior quantidade de ácidos gordos saturados que insaturados e maior quantidade de ácidos gordos de cadeia curta que de cadeia longa (Sevi *et al.*, 2002 citados por Sevi e Caroprese, 2012). Os ácidos gordos de cadeia longa são sintetizados a



partir das reservas corporais e adquiridos pela alimentação. Assim, o aumento da energia disponibilizada para a termorregulação dificultou a reconstituição das reservas corporais e provavelmente o contributo destas para a gordura do leite. O maior tempo de permanência do alimento no rúmen também contribui para uma superior hidrogenação bacteriana da gordura alimentar e conseqüentemente uma diminuição dos ácidos gordos insaturados (Sevi e Caroprese, 2012) e assim um aumento dos ácidos gordos saturados (ácidos gordos voláteis - AGV). No entanto, Muna e Abdelatif (1992) não encontraram diferenças na concentração de AGV no rúmen de carneiros sombreados e não-sombreados no deserto. As alterações da composição lipídica do leite encontradas são prejudiciais à saúde humana, estando associadas a problemas de hipercolesterolemia (Sevi e Caroprese, 2012). Ainda assim foi comprovado o benefício da substituição de hidratos de carbono fermentescíveis por ácidos gordos saturados na alimentação de vacas leiteiras em stresse térmico, aumentando a produção de leite e a quantidade de gordura, bem como a redução da temperatura retal. Foi fornecida energia necessária para as elevadas necessidades de manutenção e de produção, sem comprometer a flora do rúmen ou aumentar significativamente o calor produzido pela fermentação ruminal (Wang *et al.*, 2010), uma vez que os lípidos produzem menos calor na sua degradação no rúmen. Mais recentemente, Hammami *et al.* (2015), identificaram que o C18:1 cis-9 (ácido oleico) apresentou uma correlação positiva com o THI, bem como outros ácidos insaturados e a própria quantidade de gordura no leite, sugerindo que o C18:1 cis-9 poderá ser um bom biomarcador de stresse térmico no leite de bovinos leiteiros, que expressará, eventualmente, o equilíbrio entre a ingestão de alimento e a mobilização de reservas corporais.

Na verdade, os motivos pelos quais a quantidade de gordura diminui ou aumenta, bem como a variação dos seus constituintes, ainda não se encontram completamente compreendidos. Salama *et al.* (2014a) avaliaram em cabras a expressão de genes das células epiteliais da glândula mamária presentes no leite em situação de stresse térmico e concluíram que houve uma diminuição na expressão dos genes relacionados com a síntese *de novo* de ácidos gordos ( $\alpha$ -acetil-CoA carboxilase e ácido gordo sintase), dessaturação de ácidos gordos ( $\Delta$ -9 desaturase) e com a formação de glóbulos de gordura do leite.

A variação da quantidade de proteína no leite de animais em stresse térmico parece estar bem definida. Contudo, em relação às frações proteicas verifica-se alguma inconsistência nos resultados obtidos, sendo importante identificar estas variações uma vez que afetam o rendimento e qualidade dos queijos elaborados a partir deste leite (Bernabucci *et al.*, 2002).

No verão, a diminuição da quantidade de proteína no leite é frequentemente mais acentuada comparativamente às outras estações (Nardone *et al.*, 1992 citados por Bertocchi *et al.*, 2014; Bernabucci *et al.*, 2002; Noro *et al.*, 2006; Silanikove *et al.*, 2009). Tal situação é espectável, uma vez que 60% dos aminoácidos necessários para a síntese destas proteínas são adquiridos através da ingestão de nutrientes (Patni *et al.*, 2013) e esta diminui com o aumento da temperatura ambiente. Além disso, a maior quantidade de proteína e ureia excretados pela sudação (Joshi *et al.*, 1968 citados por Salama *et al.*, 2014a) também contribui para a menor disponibilidade de compostos azotados para a glândula mamária (Salama *et al.*, 2014a). Bertocchi *et al.* (2014) constataram uma correlação negativa entre o THI e a concentração/quantidade de proteína e de gordura no leite.

A caseína é uma das principais proteínas do leite, representando cerca de 80% da proteína total, sendo a restante percentagem associadas às proteínas do soro (Burrington e Agarwal, 2013). Segundo Patni *et al.* (2013), a caseína pode ser dividida em quatro frações eletroforéticas:  $\alpha_s$ -caseína,  $\kappa$ -caseína,  $\beta$ -caseína, e  $\gamma$ -caseína. Em relação à caseína total existem dados que demonstram a sua diminuição no leite durante os meses de verão, tanto em quantidade como em concentração (Nardone *et al.*, 1997; Bernabucci *et al.*, 2002). Além disso, parecem também existir variações nos fragmentos da caseína (Bernabucci *et al.*, 2002). Estes autores verificaram em Holstein-Friesian uma diminuição da  $\alpha_s$ -caseína e  $\beta$ -caseína e um aumento da  $\kappa$ -caseína nos meses de verão. Salama *et al.* (2014a) verificaram em cabras uma expressão diminuída dos genes intervenientes na síntese de  $\alpha_s$ -caseína e de  $\kappa$ -caseína no leite de cabras em stresse térmico. O mesmo foi verificado com algumas proteínas do soro. É importante salientar que se trata de espécies diferentes e que não deve ser feita uma comparação direta da determinação dos compostos em si com determinações das expressões dos genes que regulam a sua síntese, uma vez que a expressão genética pode não estar totalmente correlacionada com as alterações na síntese dos compostos. Noutro estudo realizado em Queensland, Austrália, num clima subtropical, verificou-se que durante o verão o leite das vacas continha maior quantidade de  $\alpha_{s2}$ - e  $\beta$ -caseína e menos  $\alpha_{s1}$ - e  $\kappa$ -caseína que o leite de inverno, tendo-se observado também a influência da alimentação (Cowley, 2013). Estes resultados contrastam com os de Bernabucci *et al.* (2002), reforçando a necessidade de maior investigação nesta área. Segundo Sevi *et al.* (2001) citados por Nardone *et al.* (2006), a radiação solar tem um maior efeito sobre a caseína e a gordura e um menor efeito na quantidade de leite produzida. Por algum motivo a  $\gamma$ -caseína é muito menos estudada, talvez pela sua baixa presença no leite (Tabela 2), ou por não ser sintetizada na glândula mamária, tal como todas as outras caseínas (Schmidt, 1971). Esta caseína

é formada apenas pela clivagem da  $\beta$ -caseína, especificamente dos fragmentos (29-105), (29-108) e (107-209) (Sgarbieri, 2005).

As proteínas do soro são consideradas moléculas globulares e incluem a  $\alpha$ -lactalbumina, a  $\beta$ -lactoglobulina, imunoglobulinas, a albumina do soro bovino, a lactoferrina bovina, a lactoperoxidase (Madureira *et al.*, 2007) e a fração das peptonas-proteose (cerca de 10% das proteínas do soro), que é composta por uma complexa mistura de glicoproteínas, fosfoproteínas e de péptidos (Innocente *et al.*, 1998). Segundo Bernabucci *et al.* (2002), o conteúdo em proteínas do soro no leite durante o verão foi superior em relação ao inverno, mas não foram encontradas diferenças nas concentrações de  $\alpha$ -lactalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina. Uma vez que a concentração de caseínas diminuiu, faz sentido que a concentração das proteínas do soro aumente, tal como verificado por Hermansen *et al.* (1999) citados por Bernabucci *et al.* (2002).

De acordo com Salama *et al.* (2014a), em cabras em stresse térmico existiu uma regulação positiva para os genes ativadores das catepsinas e das plasminas, proteinases que contribuem para a maior degradação da proteína existente no leite (Bianchi *et al.*, 2004; Sevi e Caroprese, 2012). Silanikove *et al.* (2009) descobriram que, em vacas de leite expostas a stresse térmico agudo, a maior ação das plasminas sob as caseínas conduziu à formação de fragmentos de  $\beta$ -caseína (1-28) que bloqueiam os canais de  $K^+$  das células epiteliais na membrana apical da glândula mamária, levando a uma menor libertação de leite. Uma vez que a  $\gamma$ -caseína é formada pela clivagem da  $\beta$ -caseína (Sgarbieri, 2005), poderá aumentar a sua concentração no leite, devido à ação das proteases. Sevi *et al.* (2004) também verificaram em ovinos uma maior quantidade de plasminas no leite, bem como uma diminuição de cálcio e fósforo, comprometendo a futura qualidade do leite.

As imunoglobulinas (Ig) são moléculas que exercem uma importante função imunológica, sendo transferidas através do colostro para a cria, uma vez que a placenta não permite a passagem de macromoléculas. Existem três classes básicas de Ig: IgG, IgA e IgM (Madureira *et al.*, 2007). Nardone *et al.* (1997) avaliaram o colostro de vacas leiteiras em stresse térmico e observaram uma redução das IgG e IgA, mas não da IgM. Num estudo semelhante, uma redução de IgG nos vitelos foi também observada por Tao *et al.* (2012). Contrariamente, Shearer *et al.* (1992) observaram um aumento de IgG nos meses de verão. Kruse (1970) citado por Nardone *et al.* (1997) não verificou variações na concentração de IgG em função da sazonalidade. Lacetera *et al.* (2001) verificou, em clima Mediterrânico durante o verão e em condições de stresse térmico moderado, que a aquisição de imunidade dos vitelos não foi comprometida.

Durante os meses de verão aumenta a incidência de problemas de saúde do úbere, principalmente infecções clínicas e subclínicas. Um dos grandes motivos desta incidência é o maior número de microrganismos presentes devido à alta temperatura e, em alguns casos, elevada humidade (Sevi e Caroprese, 2012). Na verdade, não basta a referência à elevada humidade relativa do ar típica dos climas tropicais ou subtropicais, pois os mecanismos de arrefecimento evaporativo presentes em algumas explorações podem também criar a humidade necessária para a proliferação de microrganismos patogénicos, caso apresentem um funcionamento inadequado.

A exposição dos animais à radiação solar também tem um efeito prejudicial na higiene e qualidade do leite, contribuindo para o aumento dos microrganismos patogénicos e também do número de neutrófilos (Sevi *et al.*, 2001 citados por Sevi e Caroprese, 2012). Por seu lado, Casamassima *et al.* (2001) verificaram um maior número de contagem de células somáticas (CCS) no leite de ovelhas criadas no interior comparativamente às criadas no exterior. Relacionaram esta situação com a ventilação e com a contaminação fecal das camas. Bertocchi *et al.* (2014), num estudo que envolveu 3727 vacarias em clima Mediterrânico, observaram uma maior CCS nos meses de verão, em relação às restantes estações. Portanto, o aumento da CCS pode-se dever ao efeito negativo das altas temperaturas no sistema imunitário dos animais, tornando-os mais suscetíveis a infeções, bem como ao crescimento e proliferação de patogénicos ambientais e dos seus vetores, como por exemplo as moscas (Bertocchi *et al.*, 2014).

O incremento de leucócitos, em resposta à entrada de bactérias no úbere, pode provocar danos às células epiteliais secretoras (Sevi *et al.*, 1999 citados por Sevi e Caroprese, 2012). Além disso, a flora bacteriana produz enzimas que podem atuar como ativadores do plasminogénio, de prostaglandinas e de citocinas, aumentando a permeabilidade capilar que resulta numa quebra na barreira entre o sangue e o leite, levando à passagem de enzimas lipolíticas e proteolíticas para o leite (Sevi e Caroprese, 2012).

Na Tabela 3 vêm compilados alguns estudos realizados, onde se evidenciam as variações em alguns parâmetros do leite em períodos com temperaturas elevadas.

Tabela 3 - Resumo sobre a variação da composição de leite durante as épocas quentes.

País	Espécie	Raça	Nível produtivo	Fase da lactação (dias)	Período de amostragem	Parâmetro	Variação	Referência
Brasil (Sul)	Bovina	Holstein-Friesian	6961 kg por lactação	Indefinido	2 anos	Sólidos totais	↓	Garcia <i>et al.</i> 2015
EUA (Arizona)	Bovina	Holstein-Friesian		99,8±20,2	21d – câmara experimental	Lactose	↓	Wheelock <i>et al.</i> (2010)
Espanha	Caprina					Lactose	↓	Salama <i>et al.</i> (2014a)
Tunísia (Kairouan)	Bovina	Holstein-Friesian	P-20±3 V-19±4 kg/d	144-150	Primavera (P) e verão (V) 5 anos	Gordura (%)	↓	Bouraoui <i>et al.</i> (2002)
Brasil (Sul)	Bovina			Indefinido	(259 rebanhos)	Gordura (%)	↓	Noro <i>et al.</i> (2006)
Brasil (Sul)	Bovina	Holstein-Friesian	6961 kg por lactação	Indefinido	2 anos	Gordura (%)	↔	Garcia <i>et al.</i> 2015
Itália (Vale de Aosta)	Bovina	Aosta Red Pied		172±60 e 194±39	Entre 2 verões (um atípico)	Gordura (kg)	↓	Renna <i>et al.</i> (2010)
Bélgica (Waloona)	Bovina	Holstein-Friesian		Indefinido; Primíparas	3 anos (862 rebanhos)	Gordura (kg)	↑	Hammami <i>et al.</i> (2015)
Itália (Sul)	Ovina	Comisana		Indefinido	6 meses (Jan-Jul)	AG saturados	↑	Sevi <i>et al.</i> (2002)
Itália (Sul)	Ovina	Comisana		Indefinido	6 meses (Jan-Jul)	AG insaturados	↓	Sevi <i>et al.</i> (2002)
Bélgica (Waloona)	Bovina	Holstein-Friesian		Indefinido; Primíparas	3 anos (862 rebanhos)	AG insaturados (mono e poli)	↑	Hammami <i>et al.</i> (2015)
Itália	Bovina	Holstein-Friesian		Pós-parto (colostro)	21d pré-parto e 36h pós	AG cadeia curta e média	↓	Nardone <i>et al.</i> (1997)
Itália (Sul)	Ovina	Comisana		Indefinido	6 meses (Jan-Jul)	AG cadeia curta e média	↑	Sevi <i>et al.</i> (2002)
Itália (Sul)	Ovina	Comisana		Indefinido	6 meses (Jan-Jul)	AG cadeia longa	↓	Sevi <i>et al.</i> (2002)
Itália	Bovina	Holstein-Friesian		Pós-parto (colostro)	21d pré-parto e 36h pós	AG cadeia curta e média	↑	Nardone <i>et al.</i> (1997)
Brasil (Sul)	Bovina			Indefinido	5 anos (259 rebanhos)	Proteína (%)	↓	Noro <i>et al.</i> (2006)
Itália (centro)	Bovina	Holstein-Friesian		141 ± 67	12 semanas (Mar-Abr e Jun-Ago)	Proteína (%)	↓	Bernabucci <i>et al.</i> (2002)
Israel (Volcani Center)	Bovina	Holstein-Friesian	48-52 kg/d	Indefinido; múltíparas	6 dias (fim de julho)	Proteína (%)	↑	Silanikove <i>et al.</i> (2009)
Israel (Volcani Center)	Bovina	Holstein-Friesian	48-52 kg/d	Indefinido; múltíparas	6 dias (fim de julho)	Proteína (kg)	↓	Silanikove <i>et al.</i> (2009)
Itália	Bovina	Holstein-Friesian		Pós-parto (colostro)	21d pré-parto e 36h pós	Caseína	↓	Nardone <i>et al.</i> (1997)
Itália (centro)	Bovina	Holstein-Friesian		141 ± 67	12 semanas (Mar-Abr e Jun-Ago)	Caseína	↓	Bernabucci <i>et al.</i> (2002)
Itália (centro)	Bovina	Holstein-Friesian		141 ± 67	12 semanas (Mar-Abr e Jun-Ago)	α <sub>s</sub> -caseína	↓	Bernabucci <i>et al.</i> (2002)
Austrália (Queensland)	Bovina	Holstein-Friesian		Indefinido	1 ano	α <sub>s1</sub> -caseína	↓	Cowley (2013)
Austrália (QL.)	Bovina	Holstein-Friesian		Indefinido	1 ano	α <sub>s2</sub> -caseína	↑	Cowley (2013)

**Tabela 3 - Resumo sobre a variação da composição de leite durante as épocas quentes (conclusão).**

Itália (centro)	Bovina	Holstein-Friesian		141 ± 67	12 semanas (Mar-Abr e Jun-Ago)	β-caseína	↓	Bernabucci <i>et al.</i> (2002)
Austrália (QL.)	Bovina	Holstein-Friesian		Indefinido	1 ano	β-caseína	↑	Cowley (2013)
Austrália (QL)	Bovina	Holstein-Friesian		Indefinido	1 ano	κ-caseína	↓	Cowley (2013)
Itália (centro)	Bovina	Holstein-Friesian		141 ± 67	12 semanas (Mar-Abr e Jun-Ago)	κ-caseína	↑	Bernabucci <i>et al.</i> (2002)
Itália (centro)	Bovina	Holstein-Friesian		141 ± 67	12 semanas (Mar-Abr e Jun-Ago)	Proteínas do soro	↑	Bernabucci <i>et al.</i> (2002)
Dinamarca	Bovina	Holstein-Friesian				Proteínas do soro	↑	Hermansen <i>et al.</i> (1999)*
Israel (Volcani Center)	Bovina	Holstein-Friesian	48-52 kg/d	Indefinido; múltiparas	6 dias (fim de julho)	Enzimas proteolíticas	↑	Silanikove <i>et al.</i> (2009)
Itália (Sul)	Ovina	Comisana		Indefinido	6 meses (Jan-Jul)	Enzimas proteolíticas	↑	Sevi <i>et al.</i> (2004)
USA (Florida)	Bovina	Holstein-Friesian		Pós-parto; medido nos vitelos	4 meses (Jul-Nov)	IgG	↓	Tao <i>et al.</i> (2012)
Itália	Bovina	Holstein-Friesian Jersey e raça Danish		Pós-parto (colostro)	21d pré-parto e 36h pós	IgG	↓	Nardone <i>et al.</i> (1997)
Dinamarca	Bovina	Holstein-Friesian		Pós-parto (colostro)	Primavera e Verão	IgG	↔	Kruse (1970)
Clima Mediterrânico	Bovina	Holstein-Friesian		Pós-parto (colostro)	2 anos e 5 meses	IgG	↔	Lacetera <i>et al.</i> (2001)
USA (Florida)	Bovina	Holstein-Friesian		Colostro	21d pré-parto e 36h pós	IgG	↑	Shearer <i>et al.</i> (1992)
Itália	Bovina	Holstein-Friesian		Pós-parto (colostro)	21d pré-parto e 36h pós	IgA	↓	Nardone <i>et al.</i> (1997)
Itália	Bovina	Holstein-Friesian		Pós-parto (colostro)	21d pré-parto e 36h pós	IgM	↔	Nardone <i>et al.</i> (1997)
Dinamarca	Bovina	Holstein-Friesian				Ureia	↑	Hermansen <i>et al.</i> (1999)*
Itália (centro)	Bovina	Holstein-Friesian		141 ± 67	12 semanas (Mar-Abr e Jun-Ago)	CCS	↔	Bernabucci <i>et al.</i> (2002)
Itália (Vale de Aosta)	Bovina	Aosta Red Pied		172±60 e 194±39	Entre 2 Verões (um atípico)	CCS	↔	Renna <i>et al.</i> (2010)
Itália (norte)	Bovina	Holstein-Friesian	9000 kg aos 305 dias	Indefinido	7 anos (3727 quintas)	CCS	↑	Bertocchi <i>et al.</i> (2014)
Brasil (Sul)	Bovina	Holstein-Friesian	6961 kg por lactação	Indefinido	2 anos	CCS	↑	Garcia <i>et al.</i> 2015

Nota: \*Hermansen *et al.* (1999) citados por Bernabucci *et al.* (2002).

### 2.2.2. Biomarcadores de stresse térmico

A identificação de biomarcadores será um passo importante na caracterização e no controle de distúrbios patofisiológicos que ocorrem nos animais (Moore *et al.*, 2007). Nas explorações leiteiras é extremamente fácil a obtenção de amostras de leite. Nos animais sujeitos a stresse térmico existe uma grande variedade de respostas que conduzem a resultados muito diversos na composição do leite. Assim, seria bastante útil encontrar, no leite, um indicador preciso, sensível e específico que identifique o grau de desconforto térmico. Segundo a Biomarkers Definitions Working Group (2001), um biomarcador é um indicador de processos biológicos e de estados patológicos que pode revelar uma grande variedade de traços de saúde e doenças. No caso do stresse térmico, a grande complexidade da interação de fatores que ocorrem no animal torna difícil a obtenção de um biomarcador de stresse térmico. Ainda assim, muito recentemente, alguns investigadores têm obtido algum sucesso na identificação de possíveis biomarcadores de stresse térmico no leite.

Os biomarcadores de stresse térmico que têm sido mais estudados, principalmente no sangue, são as HSP (proteínas de choque térmico) (Kristensen *et al.*, 2004; Patir e Upadhyay, 2007; Mishra *et al.*, 2011; Charoensook *et al.*, 2012). No entanto, em células presentes no leite, como os leucócitos, também foram identificadas HSP (Collier *et al.*, 2008; Eitam *et al.*, 2009; Salama *et al.*, 2012). Contudo, neste momento o objetivo passa também por identificar biomarcadores de fácil acesso para que possam ser utilizados em contexto empresarial pelos produtores (Hailemariam *et al.*, 2014).

A maior parte das alterações na composição do leite que ocorrem no verão são muito semelhantes ao quadro clínico da mamite (Pyörälä, 2003; Leitner *et al.*, 2004; Malek dos Reis *et al.*, 2013), pois o stresse térmico pode reduzir a capacidade de defesa da glândula mamária (Sevi e Caroprese 2012), tornando-a mais suscetível a infeções. Na Tabela 4 pode-se observar que as alterações no leite afetado por mamite são semelhantes às alterações induzidas pelo stresse térmico. Na verdade, alguns autores observaram uma grande incidência de mamites nos meses de verão (Olde Riekerink *et al.*, 2007; Hogan e Smith, 2012), mas esta situação tanto pode-se dever diretamente ao stresse térmico como ao ambiente quente e húmido onde os animais se encontram, propicio à proliferação de diversos organismos patogénicos (Sevi e Caroprese, 2012). Diversas investigações têm sido realizadas com o objetivo de identificar biomarcadores de mamite (Berning e Shook, 1992; Hamann e Zecconi, 1998; Mottram *et al.*, 2000; Eckersall *et al.*, 2001; Åkerstedt *et al.*, 2011; Mansor *et al.*, 2013; Pranayapradhan *et al.*, 2013; Santana *et al.*,

2015). Por exemplo, Sundekilde *et al.* (2013) verificaram o aumento dos metabolitos lactato, butirato, isoleucina, acetato e  $\beta$ -hidroxibutirato (BHB) no leite com elevado número de células somáticas. Por sua vez, Garcia *et al.* (2015) observaram uma redução do lactato com o aumento do THI. Em relação ao stresse térmico, a identificação de biomarcadores no leite é ainda embrionária. Santana *et al.* (2015) fizeram uma análise proteômica à fração das proteínas do soro do leite de búfalos com mamite. Segundo Mavromati *et al.* (2014), a análise proteômica é de grande utilidade na caracterização do estado patofisiológico da glândula mamária ou na presença de stresse e na identificação de novos biomarcadores. Um especial interesse tem surgido na caracterização dos componentes proteicos menores (Bendixen *et al.*, 2011).

**Tabela 4 - Alterações na composição do leite de vacas com mamite (Adaptado de Pyörälä, 2003).**

<b>Diminuição</b>	<b>Grau de diminuição</b>	<b>Aumento</b>	<b>Grau de aumento</b>
Produção de leite do quarto	---	CCS	+++
Matéria seca	-	Proteínas do soro	+++
Lactose	-	Albumina do soro bovino	+
Gordura	-	Imunoglobulinas	+++
AG de cadeia longa	-	$\kappa$ -caseína	++
Caseína total	--	Peptonas-proteose	++
$\alpha_{s1}$ -caseína	--	AG livres	++
B-caseína	---	AG cadeia curta	+
$\alpha$ -lactalbumina	-	Sódio	++
$\beta$ -lactoglobulina	---	Cloro	++
Cálcio	---	Lactate	+++
Magnésio	---	Lipase	++
Fósforo	---	Lisozima	+++
Zinco	-	NAGase	+++
Potássio	-	$\beta$ -glucuronidase	+++
		Plasmina	+++

A identificação de biomarcadores no leite é possível também através do estudo dos seus metabolitos. A metabolômica é uma área de investigação intensamente utilizada para caraterizar alterações metabólicas que ocorrem em situações patológicas (Zheng *et al.*, 2013), logo, poderá ser possível integrar o estudo no stresse térmico, tal como se tem vindo a verificar recentemente (Salama *et al.*, 2014b; Hammami *et al.*, 2015; Tian *et al.*, 2015). Alguns parâmetros do leite (como a ureia e a CCS) têm sido utilizados como biomarcadores do estado nutricional e de saúde. No entanto, estes, por vezes, não são suficientemente precisos. Desta forma, o estudo dos metabolitos poderá ser uma fonte mais viável (Melzer *et al.*, 2013). Para vacas no período de transição pré-parto/pós-parto foi já realizada uma investigação que culminou na criação de um modelo de multimetabolitos que funcionam como biomarcadores para prever doenças do periparto antes do seu desenvolvimento (Hailemariam *et al.*, 2014). Tian *et al.* (2015) identificaram no sangue 13 metabolitos com alta sensibilidade e especificidade ao stresse térmico em vacas Holstein-Friesian. Uma vez que existem muito poucos estudos com estas características



no leite, podem-se retirar algumas ilações por análise comparativa. Segundo estes autores, os metabolitos identificados foram: trimetilamina, glicose, lactato, betaína, creatina, piruvato, acetoacetato, acetona,  $\beta$ -hidroxibutirato, C16-esfingalina, lisofosfatidilcolina (18:0), fosfatidilcolina (16:0/14:0) e o ácido araquidónico (20:4). Quer as vacas em stresse térmico quer as vacas em transição podem encontrar-se em balanço energético negativo e por comparação com um estudo metabolómico em vacas no período de transição, Tian *et al.* (2015) concluíram que o lactato, o piruvato e trimetilamina podem ser específicos do stresse térmico. Neste estudo, as vacas em stresse térmico apresentaram uma diminuição da glicose plasmática e um aumento da concentração do piruvato e do lactato. Paralelamente, a atividade da lactato desidrogenase aumentou, o que indica um aumento da respiração glicolítica e anaeróbica, possivelmente como parte de mecanismo adaptativo dos animais em stresse térmico (Tian *et al.*, 2015). Contrariamente, Garcia *et al.* (2015) observaram redução do lactato e aumento da glicose de vacas em stresse térmico. Tian *et al.* (2015) também observaram uma maior concentração dos aminoácidos glicina e isoleucina nas vacas em stresse térmico, resultados em concordância com Salama *et al.* (2014b), que observaram um aumento destes aminoácidos na urina de Murciano-Granadinas em stresse térmico. O acréscimo na mobilização de aminoácidos também aumentou a formação de ureia nos grupos em stresse térmico (Tian *et al.*, 2015). Segundo Belić *et al.* (2011), o aumento da passagem de ureia pela glândula mamária afeta negativamente as proteínas no leite. Cowley *et al.* (2015) também observaram aumento da ureia no leite em Holstein-Friesians em stresse térmico. Todavia, Garcia *et al.* (2015) não encontraram diferenças nos valores de ureia plasmática de vacas em stresse térmico e em termoneutralidade. Os autores referem ainda que a ureia, apesar de poder ser um bom indicador de desidratação, vê a sua concentração afetada por uma série de fatores não relacionados com o stresse térmico, principalmente nutricionais. Em stresse térmico, verifica-se também um aumento da passagem dos ácidos gordos não esterificados (NEFA) e do BHB para a glândula mamária, devido à menor disponibilidade e consequente absorção de glicose pela glândula (Belić *et al.*, 2011). Salama *et al.* (2014b) e Tian *et al.* (2015) verificaram um aumento do BHB nos animais em stresse térmico, tanto na urina como no sangue. De acordo com Enjalbert *et al.* (2001), os níveis de BHB no sangue são muito próximos dos níveis no leite. No entanto, Garcia *et al.* (2015) não encontraram diferenças no BHB plasmático de vacas em stresse térmico e em termoneutralidade. Relativamente à fração lipídica, Tian *et al.* (2015) encontraram também um aumento dos níveis de ácido oleico plasmático no grupo em stresse térmico, resultados em linha com os observados por Hammami *et al.* (2015) no leite. A comparação dos metabolitos encontrados no sangue com o leite serve apenas como informação complementar, pois ambos têm as suas próprias implicações fisiológicas (Tian *et al.*,

2015). A identificação deste tipo de biomarcadores no leite seria mais vantajosa para aplicação nas explorações leiteiras, devido à facilidade de obtenção do produto a analisar e por ser um método não invasivo. Na Tabela 5 são compilados possíveis biomarcadores de stresse térmico que apresentaram maior coerência entre diferentes estudos e cujas concentrações foram sempre superiores em condições de stresse térmico.

**Tabela 5 – Possíveis biomarcadores de stresse térmico presentes em animais de aptidão leiteira.**

<b>Biomarcador</b>	<b>Fluído</b>	<b>Referência</b>
<b>HSP</b>	Sangue	Patir e Upadhyay, 2007
<b>HSP</b>	Sangue	Mishra et al., 2011
<b>HSP</b>	Leite	Eitam et al., 2009
<b>HSP</b>	Leite	Salama et al., 2012
<b>Glicina e Isoleucina</b>	Sangue	Tien et al., 2015
<b>Glicina e Isoleucina</b>	Urina	Salama et al., 2014b
<b>Ácido oleico</b>	Sangue	Tien et al., 2015
<b>Ácido oleico</b>	Leite	Hammami et al., 2015
<b>BHB</b>	Sangue	Belić et al., 2011
<b>BHB</b>	Sangue	Tien et al., 2015
<b>BHB</b>	Urina	Salama et al., 2014b
<b>Ureia</b>	Sangue	Belić et al., 2011
<b>Ureia</b>	Sangue	Tien et al., 2015
<b>Ureia</b>	Sangue e Leite	Cowley et al., 2015

### **2.3. Acimaatização - resposta ao stresse térmico crónico**

O stresse térmico agudo foi já estudado e revisto por diversos autores, no entanto, são relativamente poucos os estudos que avaliam o efeito do stresse térmico a longo prazo (Beatty *et al.*, 2006, Bernabucci *et al.*, 2010).

As condições ambientais são inconstantes, por isso, a única via de um organismo sobreviver é através da adaptação (Beer, 1972 citado por Udo, 1978). Este mecanismo tem a potencialidade de reduzir o impacto das alterações climáticas (Hulme, 2005). De forma geral, a adaptação é definida como uma mudança que ocorre no organismo com a finalidade de reduzir o esforço fisiológico provocado por componentes stressantes do ambiente. A alteração pode ocorrer durante a vida do organismo (fenotípica) ou ser resultado da seleção genética de uma espécie ou subespécie (genotípica) (Bligh e Johnson 1973; Gaughan *et al.*, 2009; Geraldo, 2013).

A adaptação genética (ou evolucionaria) é menos importante no âmbito deste trabalho. Envolve alterações evolucionarias (seleção natural) ou propriedades genéticas específicas (seleção efetuada pelo Homem) (Hafez, 1968 citado por Gaughan *et al.*, 2009), não ocorrendo durante o tempo de vida do animal. Ao contrário da fenotípica, não decai quando o stresse é aliviado

(Horowitz, 2001). Por outro lado, a adaptação fisiológica (ou fenotípica), que ocorre durante a vida do animal, pode ser dividida em dois:

- Aclimação: alterações funcionais ou estruturais num determinado animal, que ocorrem num período de dias ou semanas, em resposta a um único fator ambiental, sucedendo apenas em câmaras climáticas (Udo, 1978; Gaughan *et al.*, 2009).
- Aclimatação/aclimatização: alterações funcionais ou estruturais num determinado animal, que ocorrem num período de dias ou semanas, em resposta a um conjunto de fatores ambientais, que podem surgir com alterações climáticas ou sazonais (Udo, 1978; Gaughan *et al.*, 2009).

Segundo Geraldo (2013) é importante diferenciar aclimatação de termotolerância, embora ambos sejam uma forma de adaptação fisiológica. O processo de aclimatação é provocado por repetidas e persistentes alterações da temperatura nuclear, podendo ser mantidas por períodos longos. A termotolerância é considerada uma adaptação celular causada por uma única e severa, mas não letal, exposição ao calor (ou ao frio). Muitas das alterações celulares que conduzem à termotolerância envolvem as HSP (Lepock, 2005). De acordo com Kregel (2002) termotolerância é a “capacidade de uma célula ou organismo se tornar resistente ao stresse térmico”. Frequentemente, a amplitude da termotolerância, na mesma espécie, é diferente no verão e no inverno. No inverno, o animal tolera temperaturas tão baixas que para este mesmo animal, mas aclimatado ao verão, podem ser letais, passando-se o mesmo no inverso (Schmidt-Nielsen, 1983). Segundo Gaughan *et al.* (2009), existe um grande interesse na identificação de biomarcadores ou marcadores moleculares que possam ser usados para verificar a termotolerância dos animais.

Perante a exposição a níveis de stresse térmico prolongado inicia-se o processo designado por aclimatação. Este processo visa sempre colocar o animal em melhores condições para ultrapassar os desafios impostos pelo ambiente. No caso do stresse térmico por calor, visa reduzir a termogénese e aumentar a condutância e a termólise latente (Pereira, 2004). Pelo processo de aclimatação os animais adotam alterações anatómicas, morfológicas, hormonais e metabólicas, (Gaughan *et al.*, 2009; Bernabucci *et al.*, 2010). As alterações hormonais são principalmente caracterizadas por uma diminuição nas hormonas calorigénicas. Nos mecanismos homeorréticos evidenciam-se modificações no metabolismo dos lípidos e das proteínas, no funcionamento do fígado, no sistema imunitário, na ocorrência de stresse oxidativo e ainda uma diminuição nos parâmetros produtivos (Bernabucci *et al.*, 2010). As alterações fisiológicas são as primeiras a ocorrer (Gaughan *et al.*, 2009), sucedidas das morfológicas e anatómicas.

A aclimação é um processo bifásico que se divide em curto-prazo e longo-prazo (Horowitz, 2002 citado por Cincović *et al.*, 2011). Para não existirem confusões com a terminologia, as respostas ao stresse térmico agudo são também chamadas de mecanismos homeostáticos que ocorrem em segundos ou minutos. As respostas ao stresse térmico crónico, que demoram dias ou semanas a ocorrer, envolvem o processo de aclimação e são consideradas mecanismos homeorréticos (Bernabucci *et al.*, 2010).

A aclimação de curto-prazo (a primeira a ocorrer) inicia-se por vias de sinalização celular, levando à alteração da homeostasia das células, que se reprogramam para sobreviver ao novo estado fisiológico. Estas respostas são iniciadas para compensar o efeito do aumento da temperatura ao nível celular antes da aclimação se iniciar (Bernabucci *et al.*, 2010). São exemplo destas o aumento da termólise, principalmente a latente, da ingestão de água e a diminuição da ingestão de alimento e da produção de leite (Collier *et al.*, 2008; Gaughan *et al.*, 2009). Quando a fase inicial do processo de aclimação está completa, a aclimação a longo-prazo ocorre (Horowitz, 2001). Esta é caracterizada por alterações endócrinas e por uma reprogramação da expressão genética e de respostas celulares, levando a um aumento da eficiência das vias de sinalização e de processos metabólicos (Horowitz, 2001), que em grande parte pode ser mediado pelas HSP (Bernabucci *et al.*, 2010).

### **2.3.1. Alterações fisiológicas**

Períodos prolongados de exposição a altas temperaturas causam efeitos nefastos no balanço fisiológico dos bovinos de leite (West *et al.*, 1991 citados por Calamari *et al.*, 2007). De forma a resistir aos efeitos do stresse térmico, o animal visa reduzir o seu metabolismo (Kadzere *et al.*, 2002). O animal, durante o processo de aclimação, recorre a adaptações hormonais e metabólicas. Entre outros, a hipófise, a tiroide e a glândula adrenal possuem um papel importante neste processo adaptativo (Johnson *et al.*, 1988). Verifica-se também a ocorrência de ajustamentos nos parâmetros sanguíneos (Pereira, 2004).

#### **2.3.1.1. Alterações endócrinas**

A adaptação ao stresse crónico por calor acarreta alterações endócrinas que podem ser diferentes daquelas condicionadas pelo stresse agudo (Morais *et al.*, 2008).

De modo a contribuir para o processo de aclimação em curso, o animal reduz os níveis de glucocorticoides abaixo dos valores basais de referência, ao contrário do que acontece no stresse agudo (Pereira, 2004). De acordo com Johnson *et al.* (1988) o stresse térmico agudo aumenta os

níveis de cortisol no sangue, ao contrário do que acontece em stresse térmico crónico, em que se verificam reduções no cortisol plasmático. No entanto, o cortisol apresenta variações que podem não estar relacionadas apenas com o stresse térmico, o que pode induzir em erro as ilações retiradas da experiência (Pereira, 2004). No stresse térmico prolongado, parece existir uma menor resposta do córtex das suprarrenais à presença da hormona adrenocorticotrófica (ACTH) (Berbigier, 1988), favorecendo a redução do cortisol. Os baixos níveis deste podem contribuir para a diminuição da produção de calor metabólico, favorecendo assim o processo de aclimação (Alvarez e Johnson, 1971).

O stresse agudo por calor produz um efeito positivo na concentração da hormona de crescimento (GH) (Johnson *et al.*, 1988), mas em stresse térmico crónico a concentração da GH diminui, com o objetivo de reduzir a produção de calor metabólico (Kadzere *et al.*, 2002), acompanhando o cortisol. Esta situação ocorre pois o eixo hipotálamo-adenohipófise induz a produção e libertação da ACTH que estimula a somatostatina a inibir a GH (Bernabucci *et al.*, 2010). Nas vacas leiteiras, a GH apresenta variação entre as fases da lactação, mesmo durante períodos de stresse térmico. Observam-se valores mais elevados no início da lactação e um aumento mais intenso na concentração de GH quando os animais voltam ao estado de termoneutralidade, durante a fase inicial de lactação (Johnson *et al.*, 1988).

De acordo com Pereira (2004) as alterações metabólicas desencadeadas no processo de aclimação, provêm também das alterações nos níveis hormonais associados à função reprodutora, destacando-se níveis de progesterona mais elevados (Wolfenson *et al.*, 2002) e picos da hormona luteinizante menores e mais circunscritos no tempo (Roman-Ponce *et al.*, 1976). Estas alterações provocam, por exemplo, uma menor exuberância de sinais do estro, menor fecundidade e morte embrionária mais elevada (Roman-Ponce *et al.*, 1978; Bernabucci *et al.*, 2010).

Associado ao baixo desempenho reprodutivo encontram-se elevados níveis de prolactina durante o verão (Roy e Prakash, 2007). Esta hormona, que possui inúmeras funções biológicas, contribui para o processo de aclimação (Alamer, 2011). Segundo Alamer (2011) a prolactina possui um ritmo circanual, atingindo as concentrações máximas em circulação durante o verão e as mínimas no inverno. Como o objetivo do animal é reduzir a produção de leite e com isso a produção de calor metabólico, a elevação dos níveis de prolactina, que promove a galactopoiese, parece contraditória (Bernabucci *et al.*, 2010). No entanto, a prolactina também promove a função das glândulas sudoríparas e assim a perda de calor pela via latente (Beede e Collier, 1986 citados por Bernabucci *et al.*, 2010).

Um aumento da temperatura do corpo também inibe a secreção da hormona libertadora da tiroide (TRH) pelo hipotálamo, conseqüentemente diminuindo a secreção da hormona estimulante da tiroide, ou tirotrófina, (TSH) pela adeno-hipófise (Berman 1968; Muller *et al.*, 1994). A TSH atua principalmente na tiroide, de modo a produzir as hormonas da tiroide, a  $T_4$  e triiodotironina ( $T_3$ ) (Silanikove, 2000). Estas, em sinergia com outras hormonas, promovem o crescimento e desenvolvimento da glândula mamária e manutenção da lactação (Collier *et al.*, 1984 citados por Gueorguiev, 1999). No entanto, os seus níveis podem variar com a idade, estado fisiológico, lactação e com fatores ambientais (Nascimento, 2002). Segundo Smith (1993) as concentrações normais de  $T_3$  variam de 41 a 70  $\mu\text{g dL}^{-1}$  e as de  $T_4$  de 3,6 a 8,9  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Ainda assim, segundo Pereira (2004), as raças de aptidão leiteira tendem a apresentar valores superiores aos das raças de aptidão cárnica, verificando-se também uma maior intensidade metabólica nas vacas de alta produção (Junior *et al.* 2003). De acordo com Gueorguiev (1999) as concentrações de  $T_3$  e  $T_4$  são significativamente mais baixas no início e pico de lactação que no meio (situação de termoneutralidade). Em stresse térmico, Johnson *et al.* (1988) verificaram uma redução de  $T_3$  e  $T_4$  plasmáticas em todas as fases da lactação, bem como uma redução de  $T_3$  no leite durante o início da lactação (apenas mediram a  $T_3$  no leite nessa fase). Em relação à  $T_3$  plasmática, observaram uma redução superior no início da lactação (Johnson *et al.*, 1988), tal como constatado por Yousef (1985) em relação à  $T_3$ , mas também à  $T_4$ . Johnson *et al.* (1988), trabalhando com vacas leiteiras em diferentes fases de lactação e em stresse térmico, obtiveram valores de  $T_3$  de 0,52 a 1,21 ng/mL e de  $T_4$  de 28,3 a 41,7 ng/mL. Valores inferiores aos de Pereira *et al.* (2008), que registaram valores médios de  $T_3$  entre 1,37 e 1,50 ng/mL e valores médios de  $T_4$  entre 55,7 e 64,9 ng/mL. Estas ilações sugerem que os animais com altas produções são mais afetados pelo stresse térmico e como tal têm de possuir respostas de aclimação mais intensas. Segundo Pereira *et al.* (2008) existem estudos que demonstram a existência de valores normais de TSH e simultaneamente valores reduzidos de  $T_3$  e  $T_4$ , o que sugere um efeito direto do aumento da temperatura corporal no metabolismo da tiroide. De acordo com Silanikove (2000) as concentrações de  $T_3$  e  $T_4$  no sangue podem baixar até 25% em stresse térmico. As alterações podem levar vários dias a atingir valor estáveis, ao contrário do cortisol (Kamal e Ibraim, 1969 citados por Silanikove, 2000), o que reforça o facto de contribuir para o processo de aclimação. Portanto, existe uma variação sazonal, em que os valores de verão são inferiores aos de inverno (Pereira, 2004). Segundo Pereira (2004) a  $T_4$  representa melhor as situações de stresse térmico prolongado. As hormonas da tiroide são reconhecidas com um dos principais mecanismos de aclimação (Bernabucci *et al.*, 2010), no entanto podem induzir alterações noutras funções

metabólicas, como uma diminuição da ingestão de alimento, no peso corporal e na produção de leite, principalmente em altas produtoras (Morais *et al.*, 2008).

### **2.3.1.2. Alterações sanguíneas**

O sistema sanguíneo é particularmente sensível às mudanças de temperatura e constitui um importante indicador de respostas fisiológicas (Abreu, 2011). Pode ser usado tanto para avaliar o bem-estar nos bovinos (Amadori *et al.*, 1997 citados por Koubková *et al.*, 2002), como o processo de aclimação, pois durante este período ocorrem ajustamentos nos parâmetros sanguíneos (Pereira, 2004). Estudos recentes comprovam a existência de constituintes no sangue que podem ser usados como biomarcadores de stresse térmico (Garcia *et al.*, 2015; Tian *et al.*, 2015). Em stresse térmico, podem ocorrer alterações quantitativas e morfológicas nas células sanguíneas, variações do hematócrito (proporção do volume da amostra de sangue que é ocupado pelos eritrócitos), do número de leucócitos e de eritrócitos, e no teor em hemoglobina (Abreu, 2011). Normalmente, em stresse térmico, as alterações nos valores do hematócrito refletem desajustamentos no balanço de água ingerida e utilizada (Silanikove, 1992) e permitem estabelecer uma relação entre a termorregulação e o metabolismo hídrico (Pereira, 2004). É frequente encontrarem-se referências que indicam tanto um aumento como uma diminuição do hematócrito (Koubková *et al.*, 2002; Pereira, 2004). Quando se verificam valores de hematócrito elevados, provavelmente devem-se a situações de incapacidade ou restrição hídrica (Schneider *et al.*, 1988). Na situação contrária, valores reduzidos de hematócrito estão normalmente associados a elevadas ingestões de água, conduzindo a uma hemodiluição (Pereira, 2004), mas à medida que decorre o processo de aclimação, existe uma tendência para os valores se aproximarem da normalidade (Silanikove, 2000). Lee *et al.* (1976) constataram a mesma situação no seu estudo, atribuindo-o também a um aumento da hemólise. Pereira *et al.* (2008) e Ikuta *et al.* (2010) também observaram uma redução nos valores do hematócrito durante os períodos de stresse térmico, justificando-a pelos anormais consumos de água e conseqüente hemodiluição. Quando existe água *ad libitum* estes valores são mais comuns de ocorrerem, uma vez que o animal apresenta maiores necessidades hídricas para compensar os gastos com a termólise evaporativa (Pereira, 2004). Existe, claro, um peso genético associado a estes valores, podendo variar entre raças e indivíduos (Berbigier, 1988; Alnaimy *et al.*, 1992). Pereira *et al.* (2008) constataram na raça Holstein-Friesian uma maior diminuição do hematócrito, comparativamente às restantes três raças de aptidão cárnica (Alentejana, Limousine e Mertolenga). Cwynar *et al.* (2014) obtiveram resultados semelhantes, uma diminuição do hematócrito e do número de eritrócitos, também provocados por uma elevada ingestão de água. Koubková *et al.* (2002) obtiveram resultados

contrastantes: um aumento do hematócrito, da concentração da hemoglobina e do número de eritrócitos, no início do período de stresse térmico, evidenciando uma hemoconcentração. Estes animais estavam aclimatados e tinham uma produção média de 27,81 kg de leite por dia. Os animais testemunha deste estudo, submetidos a um sistema de arrefecimento evaporativo e que se encontravam em termoneutralidade, não apresentaram variações nestes parâmetros.

O stresse térmico pode influenciar o sistema imunitário dos animais, alterando assim o perfil leucocitário (Koubková *et al.*, 2002). Wegner *et al.* (1976) encontraram em vacas Holstein-Friesian em stresse térmico e sem mamites, uma correlação positiva entre o número de células somáticas no leite e o número de neutrófilos no sangue. Esta situação suscita a ideia de que o stresse térmico, por si só, afeta a saúde dos animais, podendo desencadear respostas inflamatórias que provocam um aumento da já elevada temperatura corporal. O perfil leucocitário tem sido utilizado como medidor de stresse nos vertebrados (Davis *et al.*, 2008), como por exemplo, para medir o stresse térmico em perus, sendo considerado um bom indicador deste tipo de stresse nas aves (Özkan *et al.*, 2004). Em stresse térmico verifica-se, na maioria dos estudos, uma redução do número de leucócitos (Morrow-Tesch *et al.*, 1996 citados por Hahn, 1999), podendo estes manterem-se baixos durante algum tempo após o retorno à termoneutralidade (Hahn, 1999). Koubková *et al.* (2002) também verificaram uma redução dos níveis de leucócitos no período de stresse térmico e uma subida gradual quando voltaram à termoneutralidade, podendo os níveis baixos serem provocados por uma leucocitopenia (Lee *et al.*, 1976). A variação dentro dos leucócitos não se encontra tão bem definida. Brouček *et al.* (1984) citados por Koubková *et al.* (2002) encontraram uma diminuição de neutrófilos e eosinófilos e um aumento dos linfócitos e dos monócitos. Por outro lado, Calamari *et al.* (2011) observaram, além da diminuição do número de leucócitos, uma diminuição significativa do número de linfócitos com o aumento do THI. Num grupo suplementado com selénio, em stresse térmico, também foi verificada uma redução do número de monócitos (Calamari *et al.*, 2011). Koubková *et al.* (2002) verificaram um aumento do número relativo de neutrófilos e uma diminuição dos linfócitos e dos eosinófilos.

### **2.3.2. Alterações anatómicas**

Diferenças nas características anatómicas explicam, em parte, as diferenças de tolerância ao calor em diferentes espécies e raças. Por exemplo, as Jersey são consideradas com maior tolerância ao calor que as Holstein-Friesian, sendo uma justificação a diferença na superfície específica (Bernabucci *et al.*, 2010). Além deste aspeto, a morfologia e densidade das glândulas



sudoríparas e as características da pele e da pelagem também têm uma grande influência na termotolerância, sofrendo alterações com a aclimação do animal (Berman, 2011).

### **2.3.2.1. Glândulas sudoríparas**

Existem, principalmente, dois tipos de glândulas sudoríparas: écrinas e apócrinas. As écrinas são menores e excretam uma solução salgada para a superfície da pele, sem que ocorra qualquer desintegração da glândula. As apócrinas são associadas aos folículos pilosos e, através destes, libertam um fluido que possui lípidos na sua constituição, à custa de uma desintegração parcial do seu conteúdo celular (Udo, 1978; Wilke *et al.*, 2007; Lu e Fuchs, 2014). Existe ainda um terceiro tipo, a apoécrina (intermédia da apócrina e da écrina), descoberta mais recentemente, existente pelo menos nos humanos (Sato *et al.*, 1987).

Para além da taxa de sudação variar entre espécies e raças e entre diferentes partes do corpo (Schleger e Bean, 1971), segundo Schleger e Turner (1965) citados por Schleger (1971) existe variação sazonal na taxa de sudação, sendo superior nos meses de verão comparativamente aos meses de inverno. A cada pelo está associada uma glândula apócrina, logo, a densidade pilosa condiciona diretamente o número destas glândulas (Udo, 1978; Bernabucci *et al.*, 2010). A fase de crescimento dos pelos tem maior influência na eficiência das glândulas sudoríparas que o próprio tamanho das glândulas, devido ao (maior) grau de vascularização (Schleger e Bean, 1971). De acordo com Udo (1978) a forma das glândulas sudoríparas não se altera com a sazonalidade. Ainda assim, os zebuínos (animais adaptados ao calor) apresentam glândulas sudoríparas mais numerosas e com um maior volume que as glândulas dos taurinos, apresentando também maior número de glândulas (Berman, 2011). Schleger e Bean (1971) também verificaram que no verão os animais tinham três vezes mais folículos ativos na zona da escápula e duas vezes mais na zona do flanco.

### **2.3.2.2. Pelagem**

A pelagem é um aspeto de adaptação fenotípica de alguns mamíferos. Considerada a fronteira entre o animal e a envolvente, reflete as respostas do animal ao ambiente (Udo, 1978). Sucintamente, um pelo é um filamento proteico que cresce a partir de um folículo na pele dos mamíferos, constituído principalmente por queratina, melanina e por quantidades vestigiais de elementos metálicos. Morfologicamente é constituído pela cutícula, pela medula e pelo córtex (FBI, 2005). Nos bovinos, existem três tipos de medula: i) contínua; ii) fragmentada; ou iii) ausente. O número de folículos de um animal é definido à nascença. Nas vacas, cada folículo está associado a uma glândula sudorípara, a uma glândula sebácea e a um músculo eretor do pelo (Udo, 1978).

A pelagem altera-se de acordo com a variação sazonal, sendo afetada pelo fotoperíodo (principalmente), pela temperatura ambiente e pela dieta, passando de uma pelagem comprida e pesada de inverno para uma mais curta e leve de verão (Berman, 2011). Portanto, na pelagem de verão o diâmetro dos pelos é maior, o comprimento é menor, são mais leves e a presença de pelos medulados é também superior (Udo, 1978).

As características morfológicas e a cor da pelagem são fatores importantes nos bovinos, afetando as trocas térmicas de calor sensível (convecção e radiação) e as perdas de calor latente para o ambiente (Maia *et al.*, 2003). O calor metabólico é libertado, pela via sensível, através dos pelos por três formas: i) convecção livre no ar entre os pelos; ii) condução molecular ao longo dos pelos (Davis e Birkebak, 1974 citados por Maia *et al.*, 2009); e iii) radiação entre os pelos e dos pelos para o ambiente (Skuldt *et al.*, 1975). Existe variação na eficiência destes três mecanismos. Na base dos pelos predominam os processos de condução e de radiação, pois os pelos estão muito juntos, existindo assim pouca circulação de ar (Skuldt *et al.*, 1975). Na superfície dos pelos a troca de calor ocorre principalmente por radiação e convecção, dependendo sempre da velocidade do ar e da radiação solar existente.

Nos pelos, a radiação pode ser refletida e absorvida pela pelagem, ou transmitida para a pele (Cena, 1973 citado por Udo, 1978). Segundo Udo (1978) pelos brancos ou beges absorvem menos e refletem mais radiação (médio e longo comprimento de onda) que os escuros. No entanto, de acordo com Louw (1996), a absorção da radiação de ondas longas não é afetada pela cor. No espectro de radiação visível as pelagens claras absorvem menos e refletem mais que as escuras. A radiação infravermelha é transmitida de acordo com emissividade e é independente da cor (Hutchinson e Brown, 1969 citados por Udo, 1978; Pereira, 2004). As pelagens mais escuras absorvem maior quantidade de radiação de ondas curtas, mas as pelagens claras transmitem mais para a pele, pelo que é necessário ter em conta outros fatores para identificar qual a pelagem mais vantajosa na tolerância ao calor.

A pigmentação da pele apresenta-se como um fator decisivo, uma vez que peles escuras possuem maior proteção contra a radiação UV (Silva *et al.*, 2001). Numa adaptação, talvez “menos eficiente”, as Holstein-Friesian apresentam, regra geral, a pele da mesma cor que a pelagem. Logo, vacas com pelagem branca são mais afetadas pela radiação solar, devido à maior transmissividade e à presença de uma pele despigmentada (Silva e Maia, 2011). Como sempre, existem exceções à regra e Silva *et al.* (2001) encontraram uma vaca Holstein-Friesian com pelagem branca e pele escura. Por outro lado, a Jersey é a única raça europeia que apresenta uma pelagem clara com uma pele altamente pigmentada (Silva *et al.*, 2001). Tanto a coloração dos pelos como a da pele dependem da quantidade de melanina existente (Udo, 1978). Portanto, é

devido à maior quantidade de melanina que os pelos/pele escura têm uma maior proteção à radiação solar (Bertipaglia *et al.*, 2008). A melanina é um pigmento que, nos mamíferos, ocorre sob a forma de grânulos, principalmente nos folículos pilosos (extremidade), na pele (camada basal da epiderme) e nos olhos. É formada em células especializadas, chamadas de melanócitos, pela ação da enzima tirosinase (Fawcett, 1981; Silva *et al.*, 2001). A pigmentação da pele é influenciada por: i) número de melanócitos ativos (por exemplo pela taxa de síntese da tirosinase); ii) quantidade de grânulos de melanina nas células da epiderme (melanócitos e células epiteliais); iii) número de células, na derme, que contêm melanina (melanócitos e melanófagos) (Hu, 1968). Na verdade, as diferentes cores são fruto de diferentes tipos de melanina: i) eumelanina, que confere as cores entre o castanho e o preto; e ii) feomelanina, que confere as cores entre o amarelo e o vermelho. Na cor branca a quantidade de melanina existente é quase residual, variando com a espécie (Ozeki *et al.*, 1996). Os albinos não possuem melanina, apesar de possuírem melanócitos, encontrando-se o problema na ausência de uma tirosinase funcional (Wallin, 2002). A atividade da tirosinase é maior durante o período ativo do crescimento do pelo (Schleger e Bean, 1971), afetando diretamente a pigmentação e o crescimento folicular (Berman, 1960 citado por Udo, 1978). De acordo com Breathnach (1971), a pigmentação é controlada hormonalmente (adeno-hipófise, gónadas e hormonas da tiroide). Enquanto a hipófise inibe o crescimento dos pelos, as hormonas da tiroide estimulam-no (Udo, 1978), o que vai de encontro com o tipo de pelagem do inverno e com a de verão (será abordado mais à frente). Existem três tipos principais do crescimento dos pelos: i) sazonal; ii) *wave*; iii) *mosaic*. No sazonal (em gatos, cães, cavalos e vacas) o pelo é mudado uma ou duas vezes por ano (Udo, 1978).

Silva e Maia (2011) referem que nos trópicos, onde a proteção contra a radiação UV é mais importante que a menor aquisição de calor, as vacas com pelagem predominantemente preta têm produções de leite, em média, superiores às predominantemente brancas, pois o excesso de calor pode ser compensado por maiores perdas pela via latente. No entanto, segundo Maia *et al.* (2005b), num sistema coberto com ventoinhas e aspersores, vacas Holstein-Friesian com pelagem predominantemente brancas tendem a possuir produções de leite mais elevadas que as pretas. Para além da cor, com igual importância, as características do pelo, como a densidade, o comprimento, o diâmetro, o ângulo de inclinação e o tipo de medula são também aspetos que variam entre indivíduos e durante o ano (Udo, 1978; Maia *et al.*, 2003).

A morfologia da pelagem foi estudada em várias raças e em vários países, concluindo-se que uma pelagem mais densa, com pelos de menor comprimento, maior diâmetro e medulados favorece as perdas de calor sensível e latente (Maia *et al.*, 2003; Bertipaglia *et al.*, 2008; Bernabucci *et al.*, 2010). Tal como em outras raças, nas Holstein-Friesian, está comprovada a

existência de um gene dominante (*SLICK*) que confere ao animal um pelo muito curto, liso e brilhante (Olson *et al.*, 2002), proporcionando-lhe assim uma superior capacidade de termorregulação (Dikmen *et al.*, 2014).

### 3. Metodologia

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Locais e laboratórios

A primeira fase deste estudo teve lugar na Herdade das Pedras Alvas em Montemor-o-Novo, Évora ( $38^{\circ} 41' 10.6362''\text{N}$ ,  $8^{\circ} 8' 17.631''\text{W}$ ), propriedade da Sociedade Nacional Rústica, Lda. (Figura 7). Foi este o local onde foram recolhidas todas as amostras do ensaio. As amostras dos pelos foram posteriormente analisadas na Universidade de Évora, no Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas (ICAAM), especificamente no Laboratório de Fisiologia Animal Aplicada. As alíquotas de leite e as amostras do sangue foram enviadas para o laboratório ALIP (Associação Interprofissional de Leite e Lacticínios) e para o laboratório DNAtch., respetivamente.



Figura 7 - Vista aérea da das instalações da exploração (Herdade das Pedras Alvas, Montemor-o-Novo, 2015).

Nesta exploração a recria é efetuada em viteiros individuais até ao primeiro mês de idade (Figura 8-A), sendo transferidos os animais de seguida para viteiros coletivos até aos três meses

(Figura 8-B). Após esta data permanecem numa área de pastagem semeada (Figura 8-C) até dois meses antes do parto, momento em que são deslocados para um parque de pré-parto. Após o parto, passam toda a lactação num pavilhão totalmente sombreado com orientação norte-sul, numa estabulação livre em cubículos (Figura 8-D; parque das vacas lactantes).



Figura 8 – Sistema de produção da exploração onde decorreu o ensaio. Da esquerda para a direita observa-se: A - Viteleiro individual; B – Viteleiros coletivos; C – Recria no exterior; D – Alojamento coberto para as vacas em lactação.

O pavilhão é composto por duas naves separadas por um corredor de alimentação. Como se pode observar pelas Figuras 9 e 10, é aberto em todas as fachadas e ainda com uma abertura na cumeeira. Nas horas mais quentes do dia é apenas efetuado o arrefecimento do telhado do pavilhão por aspersão de água sobre o mesmo. A sala de ordenha é da Alfa-Laval, em espinha de peixe com 2X9 postos de ordenha, com um sistema de recolha de leite com vasos medidores.





Figura 9 – Corredor de alimentação do pavilhão das vacas em lactação.



Figura 10 – Uma das duas naves do pavilhão das vacas em lactação.

### 3.1.2. Animais

De um grupo de cerca de 150 fêmeas de raça Holstein-Friesian, foram selecionadas 13 (6 de baixa produção (Baixas) e 7 de alta produção (Altas) – Baixas < 9000 kg ≤ Altas), com base nas lactações corrigidas aos 305 dias, e de acordo com critérios de homogeneidade entre grupos, nomeadamente: idade, número de lactações e dias de lactação (Tabela 6). No início do ensaio, os animais encontravam-se no segundo terço da lactação.

Tabela 6 – Informação do contraste leiteiro relativa aos animais escolhidos para o ensaio.

Baixas						Altas					
Dias lactação	NºLactação	TB 305d	TP 305d	Produção 305d	Nº da vaca	Produção 305d	TP 305d	TB 305d	NºLactação	Dias lactação	
157	3	3,69	3,59	8476	1	9	12805	3,32	3,56	2	147
117	2	3,2	2,96	8962	4	10	11987	3,04	3,61	2	123
132	3	3,7	3,46	7310	5	13	11706	3,17	3,29	3	136
50	2	4,62	3,7	7650	6	15	10131	3,12	3,58	2	34
57	2	3,46	3,21	7460	7	16	10191	3,35	3,84	2	68
169	2	3,21	3,06	8156	8	14	11921	2,98	3,34	2	166
						11	10828	2,98	2,98	2	110

**Nota:** TB 305d – Teor butiroso aos 305 dias de lactação (%); TP 305d – Teor proteico aos 305 dias de lactação (%); Produção 305d – Produção leiteira aos 305 dias de lactação (kg).

A alimentação consistia numa dieta completa composta por feno de erva, silagem de milho e um concentrado energético. À disposição dos animais estava sempre disponível água e blocos minerais.

## 3.2. Métodos

### 3.2.1. Delineamento experimental

O ensaio decorreu entre 31 de agosto de 2014 e 6 de fevereiro de 2015, dividindo-se em 3 períodos (P1, P2 e P3) com duração de 6 dias no primeiro (D1 a D6), 2 dias no segundo (D7 e D8) e 5 dias no terceiro (D9 a D13). Os períodos foram escolhidos em função das seguintes hipóteses:

**P1 - Animais aclimatados ao calor em stresse térmico:** realizada entre 31 de agosto e 5 de setembro (verão, com temperatura ambiental elevada);

**P2 - Animais aclimatados ao calor em termoneutralidade:** realizada entre 15 e 16 de outubro (outono, com temperatura ambiental amena);

**P3 - Animais aclimatados ao frio em termoneutralidade:** realizada entre 2 a 6 de fevereiro (inverno, com temperatura ambiental reduzida).

A Figura 11 apresenta, de forma sucinta, a metodologia usada neste ensaio, os grupos, os dados recolhidos e a frequência de recolha.



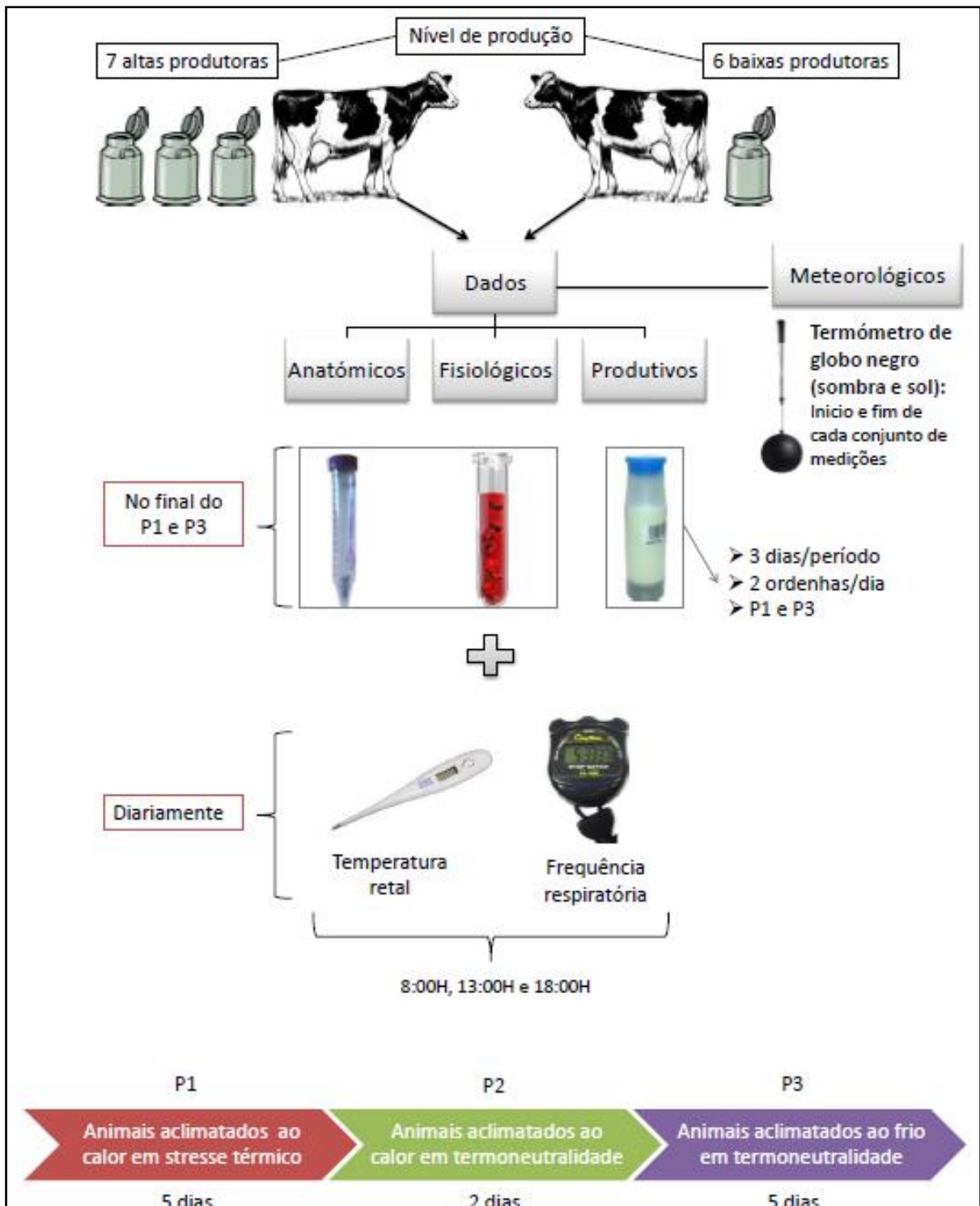


Figura 11 – Esquema geral do ensaio.

### 1.2.2. Recolha de dados meteorológicos

De modo a registar os dados meteorológicos, no decorrer do ensaio, mediu-se a temperatura do globo negro (TGN) ao sol (TGNsol) e à sombra (TGNsombra) 3 vezes por dia às 08h00, 13h00 e

18h00. Estes valores foram registados com o recurso a um termómetro de globo negro, colocado segundo Buffington *et al.* (1981), a uma altura correspondente ao centro de massa dos animais. Um dos termómetros foi colocado ao sol, na fachada sul do pavilhão das vacas lactantes, sendo deslocado ao final da tarde para a fachada Oeste, de modo a acompanhar o movimento do sol. O segundo termómetro foi colocado à sombra, dentro do pavilhão das vacas lactantes.

### 1.2.3. Recolha de dados anátomo-fisiológicos

De modo a avaliar o estado dos animais face à variação térmica ambiental, bem como a eficácia das vias termolíticas, em P1 e P3, registou-se, de todos os animais, a frequência respiratória (FR) e a temperatura rectal (TR) às 08:00h (depois da ordenha da manhã), às 13:00h e às 18:00h (depois da ordenha da tarde).

A frequência respiratória foi obtida por observação direta do movimento da região das costelas durante 15 segundos, com o auxílio de um cronómetro *Anytime XL-010*. Foi repetida a medição sempre que o valor fosse muito afastado da média. A temperatura retal foi obtida através de um termómetro clínico digital *Taue Elane Medicare*, com sinalização sonora após a estabilização da temperatura máxima (Figura 12).



Figura 12 – Determinação da temperatura retal.

Durante o ensaio foram acompanhadas as duas ordenhas praticadas na exploração (às 04h00 e às 15h30), recolhendo alíquotas de leite das vacas em estudo para posterior análise da sua composição. Registaram-se também as suas produções, bem como outras observações pertinentes sobre o estado geral dos animais. Na recolha das amostras de leite procedeu-se da seguinte forma:

- 1 – Visualização e registo da quantidade de leite no vaso, excluindo a espuma;
- 2 – Acionamento da bomba de vácuo e homogeneização do leite no interior do vaso;
- 3 – Recolha do leite para um recipiente apropriado e congelação a -4 °C.

Como se pode observar pela Tabela 7, foram também recolhidas, nos três períodos, amostras de sangue e de pelo (proveniente das manchas negras e brancas, quando ambas foram consideradas representativas no corpo do animal).

**Tabela 7 – Calendário das amostras recolhidas durante os três períodos.**

	P1						P2		P3				
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10	Dia 11	Dia 12	Dia 13
TGN (1)	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo					Amarelo	Amarelo	Amarelo		Amarelo
FR (1)	Laranja	Laranja	Laranja	Laranja					Laranja	Laranja	Laranja		Laranja
TR (1)	Verde	Verde	Verde	Verde					Verde	Verde	Verde		Verde
Produção de leite (2)	Azul escuro	Azul escuro	Azul escuro	Azul escuro	Azul escuro					Azul escuro	Azul escuro		Azul escuro
Qualidade do leite (2)	Azul claro		Azul claro		Azul claro					Azul claro	Azul claro		Azul claro
Sangue (3)						Vermelho	Vermelho					Vermelho	
Pelos (4)						Preto						Preto	

- (1) 08h00, 13h00 e 18h00;
- (2) 04h00 e 15h30;
- (3) 06h30;
- (4) 07h30.

Nota: TGN – Temperatura do globo negro;  
FR – Frequência respiratória;  
TR – Temperatura rectal.

O sangue foi recolhido através de venopunção da veia coccígea (Figura 13). De cada um dos animais recolheram-se dois tubos de sangue, um destinado ao hemograma e leucograma e outro para análise da T<sub>3</sub> (triiodotirosina). Para o hemograma e para a hormona usaram-se tubos com ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA). Para obter as amostras de pelo utilizou-se uma pinça adaptada, tal como ilustrado na Figura 12, para posterior análise relativamente ao comprimento, diâmetro e tipo de medula.



**Figura 13 – Recolha de sangue por venopunção**



**Figura 14 – Recolha das amostras de pelo.**

Os animais foram manuseados o mais calmamente possível e com a mínima interferência do seu manejo habitual.

#### 1.2.4. Análises laboratoriais

Na Tabela 8 estão representadas as análises efetuadas com as amostras recolhidas.

Tabela 8 – Análises efetuadas com as amostras recolhidas durante o ensaio.

Componente	Amostras			
Leite	Produção	Lactose	Proteína	Gordura
	Ureia	BHB	CCS	
Sangue	Hemograma	Leucograma	T <sub>3</sub>	
Pelos	Comprimento	Diâmetro	Tipo de medula	

Notas: BHB –  $\beta$ -hidroxibutirato; CCS – Contagem de Células Somáticas; T<sub>3</sub> – Triiodotirosina.

##### 1.2.4.1. Leite

As amostras de leite foram enviadas para o laboratório ALIP para análise dos seguintes componentes:

- Lactose (%)
- Proteína (%)
- Gordura (%)
- Ureia (ppm)
- $\beta$ -hidroxibutirato (mM/L; BHB)
- Contagem de células somáticas (cel/ml\*1000; CCS)

Para a determinação da composição (lactose, proteína e gordura), da ureia e do BHB foi utilizado o equipamento MilkoScan FT6500 da FOSS, através do método FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) (Bertocchi *et al.*, 2014). A CCS foi determinada por citometria de fluxo, com um Fossomatic FC da FOSS (Garcia *et al.*, 2015).

##### 1.2.4.2. Sangue

As amostras de leite foram enviadas para o laboratório DNAtch. para análise do hemograma, do leucograma e da hormona triiodotironina. Do hemograma procedeu-se à análise do hema-

tócrito e da hemoglobina. Do leucograma analisou-se a variação dos leucócitos, bem como a variação dos neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos.

Para a análise do hemograma e do leucograma utilizou-se um contador hematológico MS4-5 (Melet Schloesing, Osny, França). A contagem das células foi efetuada por impedância, e o doseamento da hemoglobina e a determinação das subpopulações leucocitárias por colorimetria (Chmielowiec-Korzeniowska et al., 2012). A medição da triiodotironina foi efetuada por uma técnica de quimioluminescência competitiva (imuno-enzimática) (Zucchelli *et al.*, 1990).

#### **1.2.4.3. Pelos**

De modo a medir o comprimento dos pelos, escolheu-se de forma aleatória uma amostra de dez pelos de cada vaca e de cada cor (sempre que possível). Efetuou-se o *scan* da amostra e com o *software* SigmaScan Pro 5 mediu-se o comprimento em centímetros.

O tipo de medula foi identificado através do método descrito por Udo (1978). Primeiro, separou-se uma amostra de dez pelos, tal como para o comprimento, a qual foi mergulhada em éter de petróleo por dez minutos. Os pelos pretos, depois do éter de petróleo, ficaram submersos por 18h em peróxido de hidrogénio 30%. Depois de secos, os pelos foram montados transversalmente em laminas, com o auxílio de um meio de montagem. Foram posteriormente observados a um microscópio ótico com uma objetiva de 40x, para se observar o tipo de medula e ainda o diâmetro do pelo (na zona medial).

#### **1.2.5. Análise estatística**

Efetuuou-se uma análise descritiva para os dados meteorológicos e para os dados fisiológicos, nomeadamente a TR e a FR. Ainda para a TR e FR, bem como para as variáveis dependentes relacionadas com o leite, o sangue e os pelos, realizou-se uma análise de variância recorrendo ao programa estatístico R Software Project (3.2.1.). Os dados são apresentados com os valores médios e desvio padrão.

Testaram-se os pressupostos da homocedasticidade (graficamente), independência e normalidade (teste de Shapiro-Wilk, D'Agostino e Ascombe-Glynn), recorrendo a transformações dos dados e à remoção de *outliers* quando necessário.

Para os parâmetros do leite recorreu-se a um modelo linear misto com o Período (P1, P2 e P3) e o Nível de Produção (Altas e Baixas) como fatores fixos e com os Animais como fator aleatório, quando este apresentava uma influência superior a 5% da variação total. Neste modelo foram

incluídos os dias de lactação, representados pela covariável DIM, para testar se as diferenças entre períodos foram influenciadas pela fase da lactação. Para a análise dos parâmetros do sangue utilizou-se também um modelo linear misto com os mesmos fatores do modelo do leite. Nos parâmetros da TR e da FR recorreu-se a um modelo linear simples. Para o comprimento dos pelos aplicou-se um modelo misto com os animais como efeito aleatório e a cor dentro do animal. Para o diâmetro aplicou-se um teste t para amostras emparelhadas. O tipo de medula foi analisado quantitativamente e representado por gráficos circulares.

## 4. Resultados e discussão

### 4.1. Dados meteorológicos (Temperatura do Globo Negro)

#### 4.1.1. Período 1

A Figura 15 representa a TGNsol e a TGNsombra média registadas às 08h00, às 13h00 e às 18h00 durante o P1.

A TGNsombra acompanhou a variação da TGNsol durante os quatro dias de recolha do P1, verificando-se valores ao sol sempre superiores aos da sombra. Pode-se observar também que os períodos mais quentes do dia foram registados na medição das 13h00, tanto ao sol como à sombra. As TGNsol mais elevadas ocorreram no D1 e D2. As TGNsombra mais elevadas ocorreram no D2 e no D3. O D4 apresentou a TGN mais baixa, ao sol e à sombra.

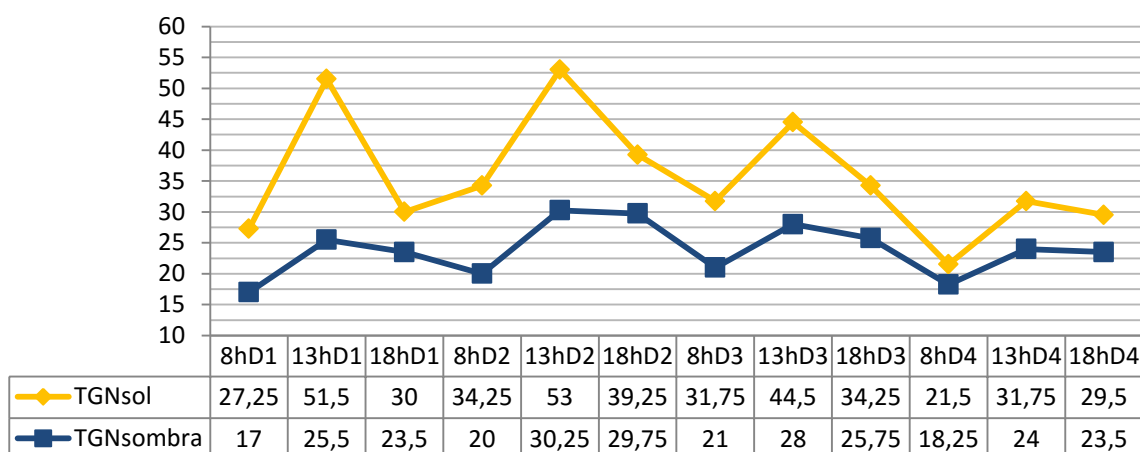


Figura 15 – Variação da TGNsol e da TGNsombra (°C) durante o P1.

Ao sol registou-se uma média de  $35,71 \pm 9,62$  °C, um valor largamente superior ao registado à sombra ( $23,88 \pm 4,27$  °C), onde os animais do ensaio se encontravam. O valor máximo atingido foi de 53,00 °C e foi medido ao sol, o mais baixo foi à sombra, com 17,00 °C (Tabela 9).

Tabela 9 – TGNsol e TGNsombra (°C) durante o P1.

TGN do P1 (°C)	Sol	Sombra
Média	$35,71 \pm 9,62$	$23,88 \pm 4,27$
Máximo	53,00	30,25
Mínimo	21,50	17,00

Pela Figura 15 e Tabela 10 observa-se que as temperaturas mais baixas foram registadas às 08h00 e as mais altas às 13h00. No entanto, os valores à sombra entre as 13h00 e as 18h00 foram muito semelhantes (26,94±2,76 e 25,63±2,95, respetivamente).

**Tabela 10 – TGNsol e TGNsombra (°C) médias durante o dia no P1.**

	<b>08h00</b>	<b>13h00</b>	<b>18h00</b>
<b>Sol</b>	28,69±5,60	45,19±9,69	33,25±4,53
<b>Sombra</b>	19,06±1,78	26,94±2,76	25,63±2,95

Numa análise mais detalhada, isto é, observando-se cada dia individualmente (Tabela 11), confirma-se que os três primeiros dias apresentaram as temperaturas mais elevadas. Apesar de o D1 e o D2 possuírem uma temperatura máxima ao sol superior ao D3 e D4, à sombra o D2 e D3 apresentaram valores superiores. Estes valores acabam por ser mais importantes, pois refletem com mais exatidão a sensação térmica que os animais sofreram. Verificamos também que no D2 e D3 os valores de temperatura mínima (sol e sombra) foram superiores aos restantes dois dias (ver Figura 15). Este pode ser um fator mais importante que o das temperaturas máximas, pois valores de temperatura mínima elevados indicam que os animais não conseguem ter um período para se arrefecerem, efetuando uma permuta térmica com o ambiente menos eficiente (Calegari *et al.*, 2005). Ainda assim, através das temperaturas registadas ao início e ao final do dia, pressupõem-se que durante a noite a temperatura baixou ao ponto de os animais conseguirem arrefecer e recuperar do calor armazenado durante o dia, uma vez que basta um período de 3 a 6h com temperaturas iguais ou inferiores a 21 °C para minimizar os efeitos do stresse térmico (Igono *et al.*, 1992). O D2 foi claramente o dia que induziu uma sensação térmica mais elevada, apesar da diferença de 1°C na TGNsombra mínima com o D3.

**Tabela 11 – Valores médios de cada dia das TGNsol e das TGNsombra (°C).**

	<b>D1</b>	<b>D2</b>	<b>D3</b>	<b>D4</b>
<b>Sol</b>	36,25±13,28	42,17±9,71	36,83±6,76	27,58±5,39
<b>Sombra</b>	22,00±4,44	26,67±5,78	24,92±3,57	21,92±3,19

De modo a testar se a TGNsombra explicou melhor o estado fisiológico do animal, efetuou-se uma correlação de *Spearman* entre a TR e a TGNsombra e entre a TR e a TGNsol. Verificou-se que a TGNsombra (0,86) estava mais correlacionada com a TR que a TGNsol (0,76).



### 4.1.2. Período 3

Neste período (P3), a variação da TGNsombra acompanhou a da TGNsol (Figura 16), tal como no P1, verificando-se que em algumas situações, a temperatura ao sol esteve muito perto da temperatura à sombra. Apenas às 13h00 se verificou uma grande diferença entre os termómetros, com exceção do D9. Na verdade, no D9 a diferença da TGN entre o sol e a sombra foi muito reduzida, verificando-se até um valor ligeiramente superior na TGNsombra, às 08h00, que provavelmente se deve ao calor produzido pelos animais dentro do estábulo. Nos restantes dias verificaram-se TGNsol superiores a 30 °C, no entanto, não foi essa a sensação térmica sentida pelos animais, pois onde os animais se encontravam, a TGN foi bastante inferior.

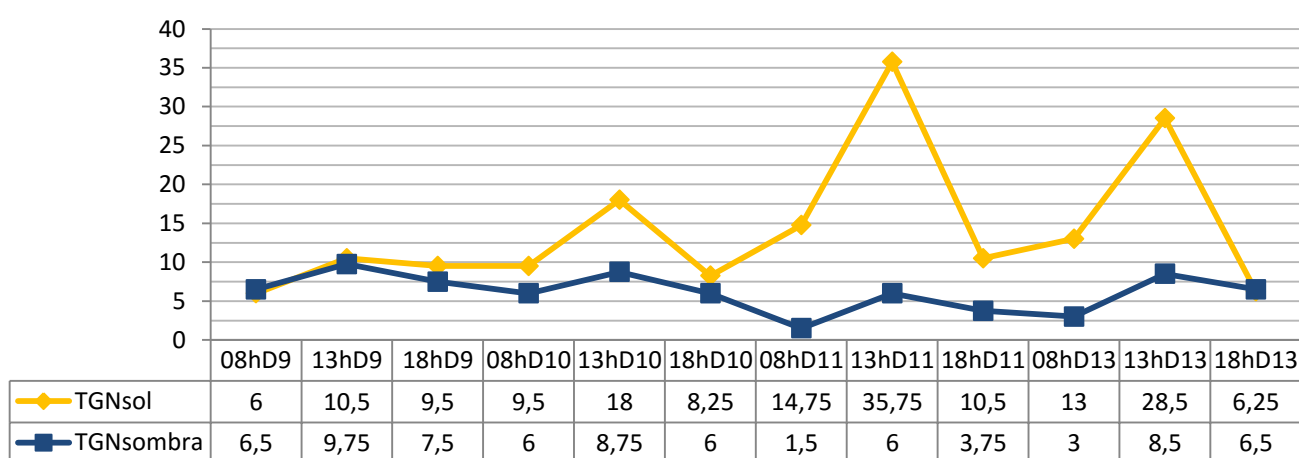


Figura 16 – Variação das TGNsol e das TGNsombra (°C) durante o P3.

No P3 as TGN tiveram uma amplitude semelhante à do P1, registando-se uma média de TGN ao sol de  $14,21 \pm 9,16$  °C e de  $6,15 \pm 2,42$  °C à sombra. O máximo registado foi ao sol com 35,75 °C e o mínimo, à sombra, com 1,50 °C. A amplitude ao sol foi largamente superior à da sombra, pois a última apenas oscilou entre os 1,5 e os 9,75 °C (Tabela 12).

Tabela 12 – TGNsol e TGNsombra (°C) durante o P1.

	Sol	Sombra
<b>Média</b>	14,21±9,16	6,15±2,42
<b>Máximo</b>	35,75	9,75
<b>Mínimo</b>	6,00	1,50

Em relação à variação durante o dia, a maior discrepância entre a TGN ao sol e à sombra verificou-se às 13h00, tal como no P1, devido à maior incidência de radiação solar (Figura 16 e Tabela 13). É importante também notar que neste período, ao contrário do que se passou no P1, às 18h00 a existência de radiação solar era praticamente nula. A média das TGNsombra às 08h00

e às 18h00, segundo alguns autores (Nääs, 1989; Carvalho, 2011), encontra-se já fora da zona de termoneutralidade para vacas de alta produção. No entanto, é importante salientar que estes autores realizaram os ensaios no Brasil, um clima diferente do clima mediterrânico.

**Tabela 13 - TGNsol e TGNsombra (°C) médias durante o dia no P3.**

	<b>08h00</b>	<b>13h00</b>	<b>18h00</b>
<b>Sol</b>	10,81±3,88	23,19±11,16	8,63±1,83
<b>Sombra</b>	4,25±2,40	8,25±1,59	5,94±1,59

O D9 apresentou uma variação térmica entre os globos negros menor, comparativamente aos restantes dias deste período (Tabela 14), bem como entre as temperaturas mínimas e máximas (Figura 16). Curiosamente, apesar da TGNsol, no D9, ter sido inferior aos restantes três dias, a temperatura à sombra foi superior. Isto pode indicar que, face à menor presença de calor por radiação solar, os animais aumentaram a produção de calor endógena de modo a atingirem temperaturas mais confortáveis. Este resultado poderá evidenciar que neste dia alguns (ou todos) animais saíram fora da ZTN, uma vez que, segundo Yousef (1985), abaixo da TCI, a taxa de produção de calor metabólico está dependente da temperatura ambiente. Outro fator a influenciar a TGNsol no D9 e D10, foi a ocorrência de precipitação entre as 13h00 e as 14h00, conduzindo a menores valores de temperatura. O D11 foi o dia que induziu uma sensação térmica mais baixa nos animais, porque apesar de ter apresentado os valores de TGNsol mais elevados do período, apresentou os mais baixos à sombra, com uma média de 3,75±2,25 °C e um valor mínimo de 1,50 °C.

**Tabela 14 – Valores médios de cada dia das TGNsol e das TGNsombra (°C) durante o P3.**

	<b>D9</b>	<b>D10</b>	<b>D11</b>	<b>D13</b>
<b>Sol</b>	8,66±2,36	11,92±5,31	20,33±13,52	15,92±11,41
<b>Sombra</b>	7,92±1,66	6,92±1,59	3,75±2,25	6,00±2,78

## 4.2. Dados Fisiológicos

### 4.2.1. Frequência Respiratória

#### 4.2.1.1. Período 1

Os valores de FR (em movimentos por minuto) médios mais elevados verificaram-se às 13h00 (71,48±12,32 nas Baixas e 68,86±13,30 nas Altas) e os valores médios mais baixos às 08h00 (53,17±8,46 nas Baixas e 54,57±7,87 nas Altas). Os valores de FR mínimos ocorreram na medição das 08h00 (36,00 nas Baixas e 40,00 nas Altas) e os máximos na medição das 13h00 e das 18h00 (104,00 nas Baixas e 92,00 nas Altas). No total do período, os valores médios entre as Baixas e as Altas produtoras foram bastante semelhantes, como se pode observar na Tabela 15. Estes valores sugerem que ambos os grupos de produção tiveram períodos de stresse térmico durante o P1, uma vez que, segundo Garcia *et al.* (2015), uma frequência respiratória acima de 60 movimentos por minuto pode indicar stresse térmico. Ainda assim, observou-se que o stresse ocorreu principalmente durante a medição das 13h00 e das 18h00, coincidindo com os valores mais elevados de TGN registados.

Tabela 15 – Análise descritiva da FR (movimentos por minuto) no P1.

	Baixas				Altas			
	08h00	13h00	18h00	Total	08h00	13h00	18h00	Total
<b>Hora</b>	08h00	13h00	18h00	Total	08h00	13h00	18h00	Total
<b>Média</b>	53,17±8,46	71,48±12,32	68,67±11,23	64,34±13,67	54,57±7,87	68,86±13,30	68,43±9,64	63,95±12,35
<b>Max.</b>	68,00	104,00	104,00	104,00	68,00	92,00	92,00	92,00
<b>Min.</b>	36,00	52,00	52,00	36,00	40,00	44,00	52,00	40,00

Comparando a FR das Altas com as Baixas observa-se o seguinte (Figura 17):

- Às 08h00, as Altas apresentaram uma FR superior às Baixas no D2 e no D3. A esta hora os valores de TGNsombra mais elevados também foram registados no D2 e no D3.
- Às 13h00, a FR da Altas foi superior apenas no D3 (segundo dia de maior TGNsombra).
- Às 18h00, as Altas registaram valores apenas ligeiramente superiores no D3 e no D4.

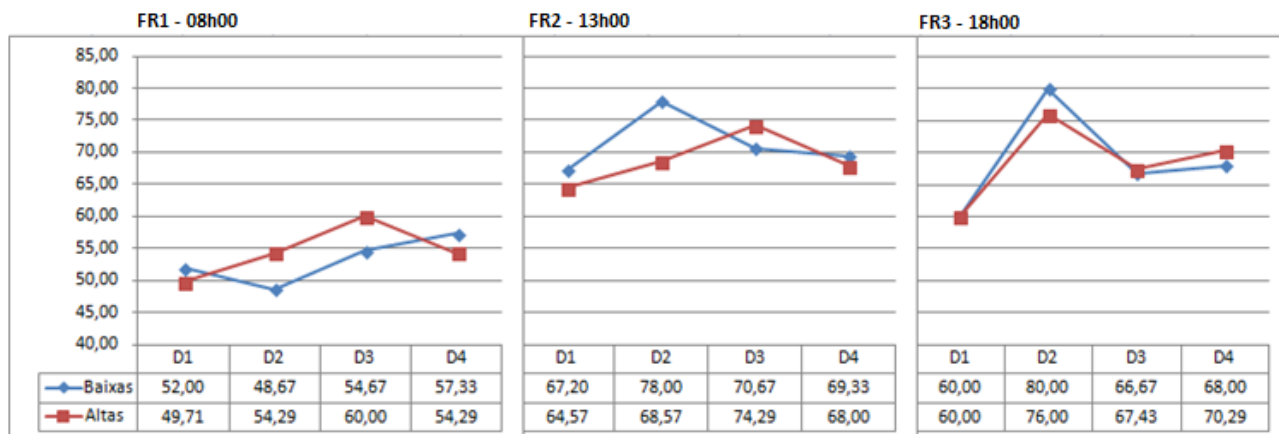


Figura 17 – Variação da FR por hora no P1.

A medição das 18h00 foi a única que revelou uma distribuição semelhante entre os grupos de produção. Nas restantes medições houve uma maior flutuação entre os grupos. Na fase de maior TGN do P1 (D2 às 13h00 e às 18h00) as Baixas apresentaram valores de FR mais elevados que as Altas, indicando, possivelmente, uma maior capacidade de resposta ao incremento térmico sofrido.

#### 4.2.1.2. Período 3

Tal como ocorreu no P1, os valores de FR foram muito semelhantes entre as Baixas e as Altas (Tabela 16). Ao longo dos dias a FR média mais elevada foi registada na medição das 18h (37,50±8,25 nas Baixas e 37,67±10,21 nas Altas), ainda assim a diferença ao longo do dia foi muito pequena. Os máximos registados ocorreram na medição das 8h (52,00 nas Baixas e 56,00 nas Altas) e das 18h (52,00 nas Baixas e 60,00 nas Altas), ao contrário do que aconteceu no P1 (os máximos ocorreram na medição das 13h). A FR mais baixa foi verificada também às 8h, quer nas Baixas (24,00) quer nas Altas (24,00). Em todo o caso estes valores são todos considerados fisiologicamente normais.

Tabela 16 – Análise descritiva da FR (movimentos por minuto) no P3.

	Baixas				Altas			
	08h00	13h00	18h00	Total	08h00	13h00	18h00	Total
<b>Hora</b>	08h00	13h00	18h00	Total	08h00	13h00	18h00	Total
<b>Média</b>	32,75±7,33	35,75±5,16	37,50±8,25	35,33±7,16	36,00±7,73	36,33±5,65	37,67±10,21	36,67±8,00
<b>Max.</b>	52,00	44,00	52,00	52,00	56,00	48,00	60,00	60,00
<b>Min.</b>	24,00	28,00	28,00	24,00	24,00	28,00	28,00	24,00

Neste período apenas a medição das 13h00 apresentou valores muito semelhantes entre as Baixas e as Altas (Figura 18). Na medição das 08h00 as Altas registaram os valores mais elevados,

com exceção do D9. Ao longo do período e ao longo do dia, as Baixas apresentaram valores mais constantes, em comparação com as Altas que apresentaram uma oscilação superior.

Existiu uma tendência, no geral, para uma diminuição da FR ao longo do período, destacando-se o D11 e o D13 com os valores mais baixos. Estes dias, pela análise da TGN, apesar de terem apresentado os valores mais elevados de TGNsol, também apresentaram os valores mais baixos de TGNsombra, pelo que, as FR mais baixas poderão estar relacionadas com as TGNsombra inferiores.

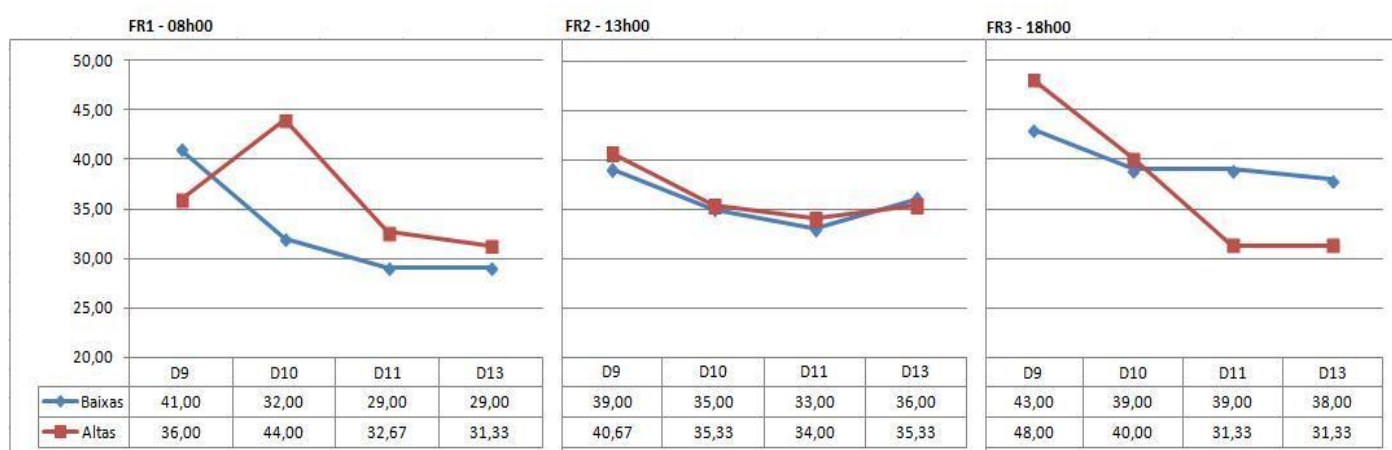


Figura 18 - Variação da FR por hora no P3.

#### 4.2.1.3. Comparação entre períodos

Através da análise de variância efetuada verificou-se uma diferença significativa entre períodos em todas as medições de FR ( $P < 0,0001$ ). No P1 os valores de FR médios foram sempre mais elevados que no P3, tal como se pode observar pela Tabela 17. Não foram observadas diferenças significativas ( $P = 0,2$ ) entre os grupos de produção em nenhuma das medições.

Tabela 17 – Comparação da frequência respiratória média (movimentos por minuto) nos dois períodos.

	08h00	13h00	18h00
<b>P1</b>	53,92±8,10 <sup>a</sup>	70,42±12,81 <sup>a</sup>	67,84±10,30 <sup>a</sup>
<b>P3</b>	34,70±7,65 <sup>b</sup>	36,10±5,40 <sup>b</sup>	36,42±9,36 <sup>b</sup>

Índices superiores minúsculos diferentes nas células indicam diferenças significativas ( $P < 0,0001$ ) entre os períodos.

Na Figura 19 pode-se observar graficamente a diferença entre períodos referida para a variável às 13h00, a que das três apresentou uma estatística de teste mais elevada ( $F = 485,011$ ;  $P < 0,0001$ ).

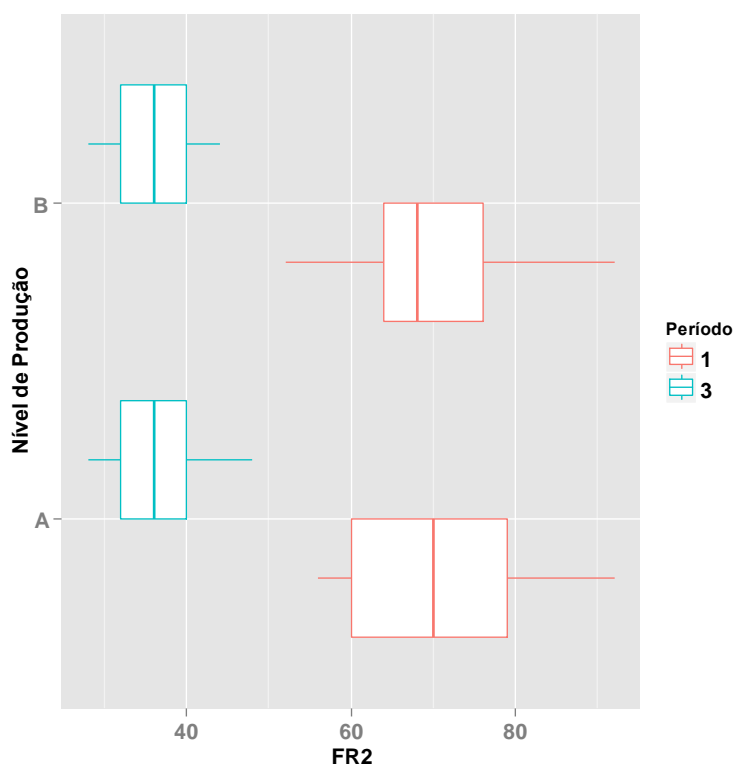


Figura 19 – Boxplots da variação entre períodos e do nível de produção da FR (movimentos por minuto) às 13h00.

Nota: A –Altas; B – Baixas; 1 – P1; 3 – P3; FR2 – Medição da FR às 13h00

## 4.2.2. Temperatura Retal

### 4.2.2.1. Período 1

No P1, as Baixas tiveram uma TR média de  $38,76 \pm 0,63$  °C, nas Altas o valor médio foi de  $38,87 \pm 0,72$  °C (Tabela 18). Os valores de TR máximo e mínimo registados ocorreram no grupo das Altas, com uma TR de 42,00 e 37,00 °C, respetivamente. As TR médias, máximas e mínimas foram mais elevadas na medição das 18h, quer nas Baixas quer nas Altas. Em média, as Baixas e as Altas não diferiram muito, mas as Altas atingiram TR máximas mais elevadas, o que indica que existiram algumas vacas deste grupo que possuíram mecanismos de termólise menos eficientes, aumentando assim a temperatura interna. Em todo o caso registaram-se em ambos os grupos animais com valores que indicam uma situação de stresse térmico, uma vez que atingiram valores superiores a 39,2 °C (Garcia *et al.*, 2015).

Tabela 18 – Análise descritiva da TR (°C) no P1.

Hora	Baixas				Altas			
	08h00	13h00	18h00	Total	08h00	13h00	18h00	Total
Média	38,30±0,49	38,82±0,49	39,17±0,56	38,76±0,63	38,36±0,55	38,91±0,48	39,34±0,76	38,87±0,72
Max.	39,40	39,60	40,50	40,50	39,40	40,00	42,00	42,00
Min.	37,10	37,70	38,30	37,10	37,00	37,70	38,30	37,00

Pela análise gráfica (Figura 20) observamos que ao longo do período e do dia as Altas, na maior parte dos casos, possuíram uma TR superior às Baixas. Apesar de a diferença ser pequena, segundo Johnson (1985), quando a temperatura do corpo ultrapassa os 38,9°C a produção de leite diminui. Em situação de termoneutralidade a amplitude diária da temperatura retal é de 0,4 °C (Pereira, 2004). Um aumento de 1 °C ou menos é suficiente para reduzir a performance produtiva na maioria das espécies pecuárias (McDowell *et al.*, 1976 citado por Kadzere *et al.*, 2002). Pela Figura 20, observa-se que no D1 e no D2, a variação da TR ao longo do dia excedeu o 1 °C, nas Baixas e nas Altas. No D1 às 18h as Altas apresentam um valor exacerbado, mas na verdade este deve-se somente a uma vaca que registou uma TR de 42 °C. Ainda assim, a média sem esta vaca (39,15 °C) é suficiente para se verificar a variação diária superior a 1 °C. Apesar de o D3 ter apresentado valores superiores ao D1 de TGN à sombra, faz sentido que tenha possuído uma menor variação diária, pois os animais começaram o dia com valores de TR elevados, devido ao dia anterior (D2) ter sido muito quente, como já foi referido.

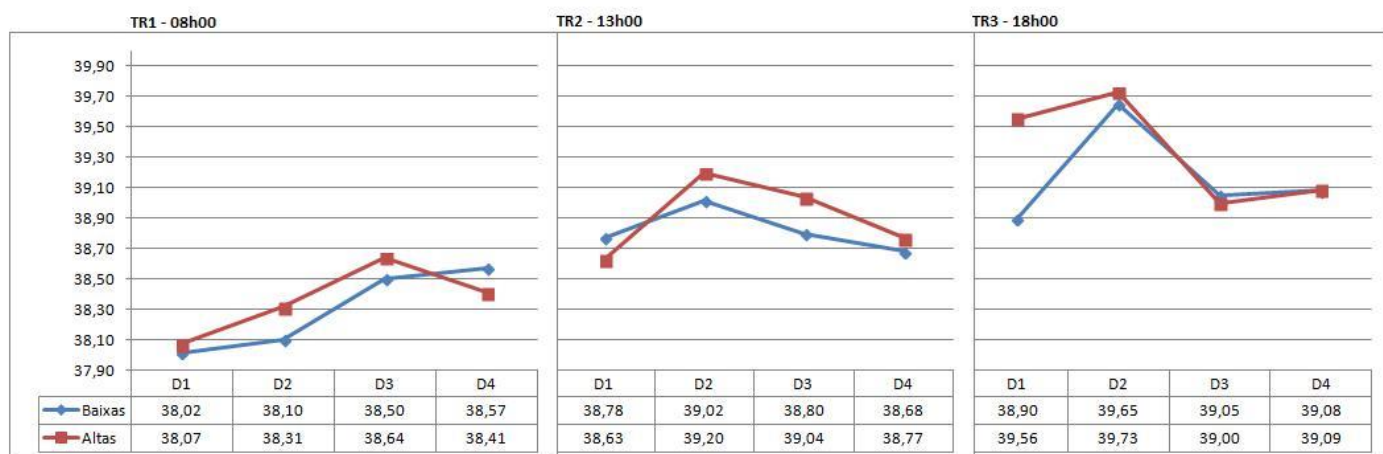


Figura 20 – Variação da TR por hora no P1.

O calor armazenado durante o dia reflete-se no final do mesmo (medição das 18h00), principalmente nos animais menos termotolerantes, apresentando os valores mais elevados de TR, tal como verificado neste ensaio. A redução da temperatura ambiente durante a noite permitiu aos animais dissiparem parte do calor armazenado, facto comprovando pelas TR registadas às 08h00, sempre inferiores a 38,65 °C. Os dias que apresentaram os valores mais

elevados de TR (Baixas e Altas) às 08h00 foram o D3 e o D4, devido aos dias anteriores, D2 e D3, considerados, pela análise da TGN, os dias mais críticos para os animais.

Da comparação da FR com a TR podem-se retirar as seguintes ilações:

Na medição das 08h00 o comportamento das Baixas foi semelhante ao das Altas em todo o P1, com a diferença das Baixas terem apresentado uma FR inferior às Altas ( $53,17 \pm 8,46$  vs  $54,57 \pm 7,87$  movimentos por minuto, respetivamente) e ainda assim terem uma TR inferior ( $38,30 \pm 0,49$  vs  $38,36 \pm 0,55$  °C, respetivamente). Isto deve-se provavelmente a uma maior capacidade de arrefecimento durante a noite das Baixas, começando o dia com uma temperatura interna inferior às Altas.

Na medição das 13h00 as Baixas tiveram, em média, uma FR superior às Altas ( $71,48 \pm 12,32$  vs  $68,86 \pm 13,30$ ). No entanto, o aumento deste mecanismo de termólise permitiu às Baixas obter uma TR inferior à das Altas ( $38,82 \pm 0,49$  vs  $38,91 \pm 0,48$  °C, respetivamente). O pico da FR nas Altas apenas ocorreu no D3, e não no D2 como aconteceu com as Baixas. Ainda assim não foi suficiente para apresentar valores de TR inferiores aos das Baixas, que diminuíram bastante a FR neste dia, comparativamente ao D2.

Às 18h00 verificou-se uma maior proximidade dos valores de TR entre os grupos de produção, com exceção do já explicado pico no D1. A esta hora ocorreram os maiores valores de TR em ambos os grupos, sugerindo que apesar de durante o dia as Baixas terem conseguido manter uma maior estabilidade na temperatura corporal através de uma maior FR, ao final do dia o calor armazenado resultou numa temperatura corporal semelhante em ambos os grupos.

Portanto, apesar de no final do dia a TR ser elevada em ambos os grupos de produção, durante o resto do dia as Baixas conseguem, através de uma maior FR, manter uma temperatura corporal mais estável que as Altas.

#### **4.2.2.2. Período 3**

No P3 a amplitude de TR foi bastante menor que no P1, tendo-se registado um mínimo de  $36,20$  °C às 13h00 nas Baixas e um máximo de  $39,90$  °C também às 13h00, mas nas Altas (Tabela 19). A média deste período nas Baixas foi de  $37,98 \pm 0,42$  °C e de  $38,10 \pm 0,58$  °C nas Altas. Nas Baixas os valores médios e mínimos mais baixos foram registados às 13h00, nas Altas foram registados às 08h00.



Tabela 19 - Análise descritiva da TR (°C) no P3.

	Baixas				Altas			
Hora	08h00	13h00	18h00	Total	08h00	13h00	18h00	Total
Média	38,03±0,33	37,84±0,56	38,08±0,31	37,98±0,42	37,95±0,53	38,17±0,54	38,19±0,65	38,10±0,58
Max.	38,50	38,70	38,60	38,70	38,90	39,90	39,40	39,90
Min.	37,10	36,20	37,70	36,20	36,70	37,30	36,90	36,70

Pela análise da Figura 21, observa-se que em ambos os grupos ocorreu um pico no D10 na medição das 08h00 e na das 13h. Em todo o caso as TR médias encontraram-se sempre dentro de valores considerados normais. Ainda assim registaram-se valores mínimos inferiores ao considerado normal por Kolb (1987) e Alzina-López *et al.* (2001), que indicam que a temperatura retal média para bovinos com mais de um ano de idade é de  $38,5 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$ .

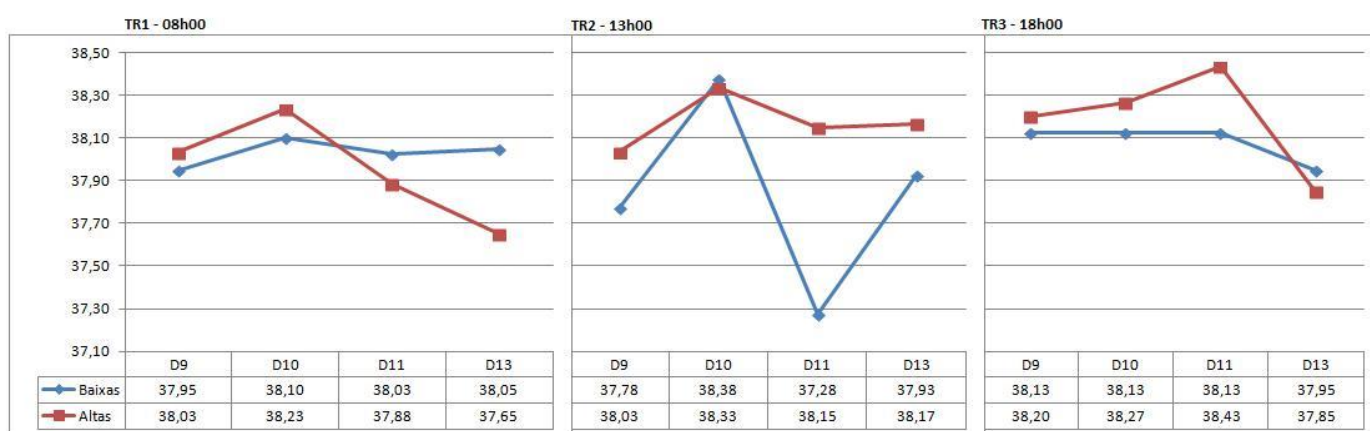


Figura 21 – Variação da TR (°C) por hora no P3.

Comparando as Baixas com as Altas, retira-se o seguinte:

Com exceção dos já referidos picos no D10 e no D11 às 13h00, as Baixas apresentaram uma TR bastante constante ao longo do período. No D11 às 13h00 as Baixas atingiram a TR média mais baixa do ensaio ( $37,28^{\circ}\text{C}$ ), provavelmente devido à sensação térmica provocada pelas baixas temperaturas ambientais atingidas nessa manhã, também as mais reduzidas em todo o ensaio. Como já tínhamos percebido pelo P1, a variação da TR reflete, em grande parte, a condição térmica do animal algumas horas antes. Curiosamente, as Altas pouco baixaram a TR nesse dia, aliás, a TR média mais elevada ( $38,43^{\circ}\text{C}$ ) ocorreu neste dia (D11) às 18h00 no grupo das Altas. Este valor talvez não se deva a um efeito ambiental, pois as vacas 10, 11 e 13 adoeceram neste período, o que poderia ter provocado um aumento da TR, em caso de piroxia. Em relação às Baixas, na medição das 18h00 apresentaram uma TR mais estável ( $\approx 38^{\circ}\text{C}$ ). As Altas nos dias mais frios (D11 e D13) tiveram um comportamento diferente das Baixas, apresentando uma resposta imediata às baixas TGN nas medições das 08h00, com uma diminuição da TR abaixo dos  $38^{\circ}\text{C}$ . Às 13h00 conseguiam recuperar em conjunto com o aumento da TGN.

Ambos os grupos baixaram a TR no D13 na medição das 18h00, talvez devido à diminuição da TGNsol para valores perto dos valores da TGNsombra ( $\approx 6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Pois foi a única variação ambiental registada que justifique esta resposta.

#### 4.2.2.3. Comparação entre períodos

Através da análise de variância efetuada verificou-se uma diferença significativa entre períodos em todas as medições de TR (08h00 -  $P = 0,0012$ ; 13h00 e 18h00 -  $P < 0,0001$ ). No P1 os valores de TR médios foram sempre mais elevados que no P3, tal como se pode observar pela Tabela 20. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos de produção ( $P > 0,1$ ) na medição das 08h00 e das 18h00. Na medição das 13h00, ainda que não se tenha observado diferenças significativas a 5%, verificou-se que existiram diferenças a 10% ( $P = 0,08$ ;  $F = 3,16$ ) entre as Baixas e as Altas. Na Figura 22 pode-se observar que esta diferença ocorreu principalmente no P3.

Tabela 20 - Comparação da temperatura retal média ( $^{\circ}\text{C}$ ) nos dois períodos.

	08h00	13h00	18h00
<b>P1</b>	$38,33 \pm 0,52^a$	$38,87 \pm 0,48^a$	$39,21 \pm 0,68^a$
<b>P3</b>	$37,98 \pm 0,45^b$	$38,04 \pm 0,57^b$	$38,15 \pm 0,54^b$

Índices superiores minúsculos diferentes nas células indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os períodos.

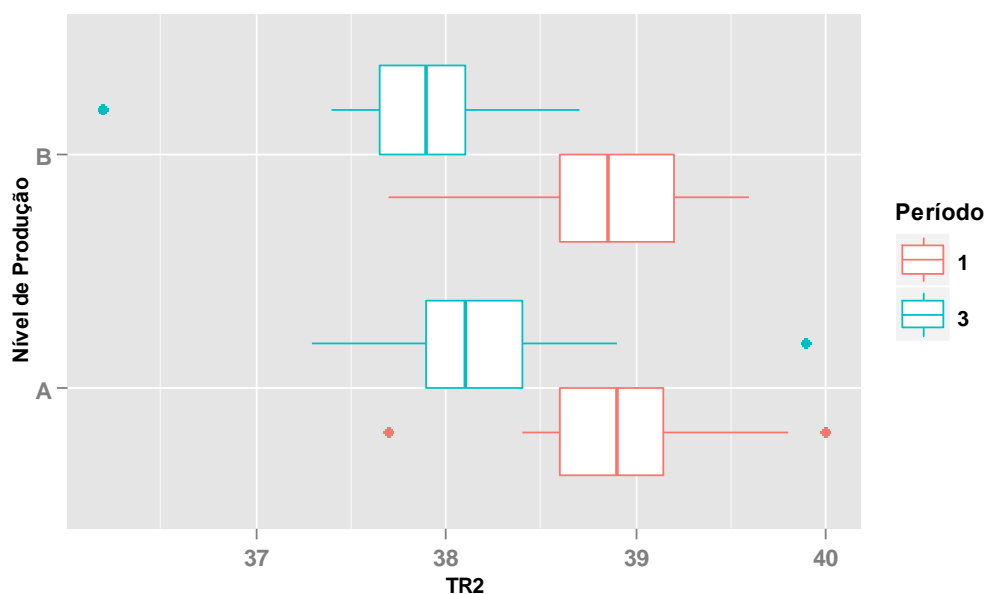


Figura 22 – Boxplots da variação entre períodos e do nível de produção da TR ( $^{\circ}\text{C}$ ) às 13h00. Nota: A – Altas; B – Baixas; 1 – P1; 3 – P3; TR2 – Medição da TR às 13h00.

### 4.3. Dados Anatômicos

Neste ponto são discutidos os resultados da pelagem, nomeadamente em relação à cor, comprimento, diâmetro e tipo de medula.

Encontraram-se diferenças significativas entre períodos em relação ao comprimento do pelo ( $F = 11,76$ ;  $P < 0,001$ ), verificando-se que no P3 os pelos, em média, foram mais curtos que no P1 (1,172 e 1,179 cm, respetivamente). Diferenciado os pelos pela cor, apenas se verificaram diferenças marginalmente significativas ( $F = 3,65$ ;  $P = 0,089$ ), sendo os brancos, em média, mais curtos que os pretos (1,114 e 1,218 cm, respetivamente; Figura 23).

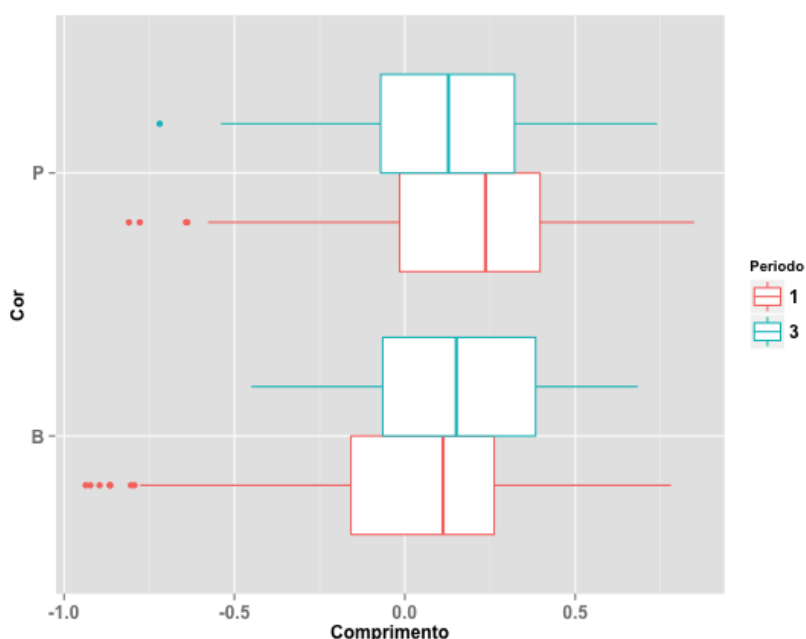


Figura 23 - *Boxplots* da variação do comprimento (cm) do pelo em função da cor e do período. Nota: P – Preto; B – Branco; 1 – P1; 3 – P3.

Em relação ao diâmetro dos pelos não se verificaram diferenças significativas entre os períodos ( $t = -0,52$ ;  $P = 0,616$ ). Por problemas na recolha de amostras apenas foi possível analisar o diâmetro em função da cor no P1. Verificou-se que o diâmetro médio dos pelos pretos (0,033 cm) foi marginalmente superior ao dos pelos brancos (0,027 cm) ( $t = -1,88$ ;  $P = 0,093$ ), como ilustrado na Figura 24.

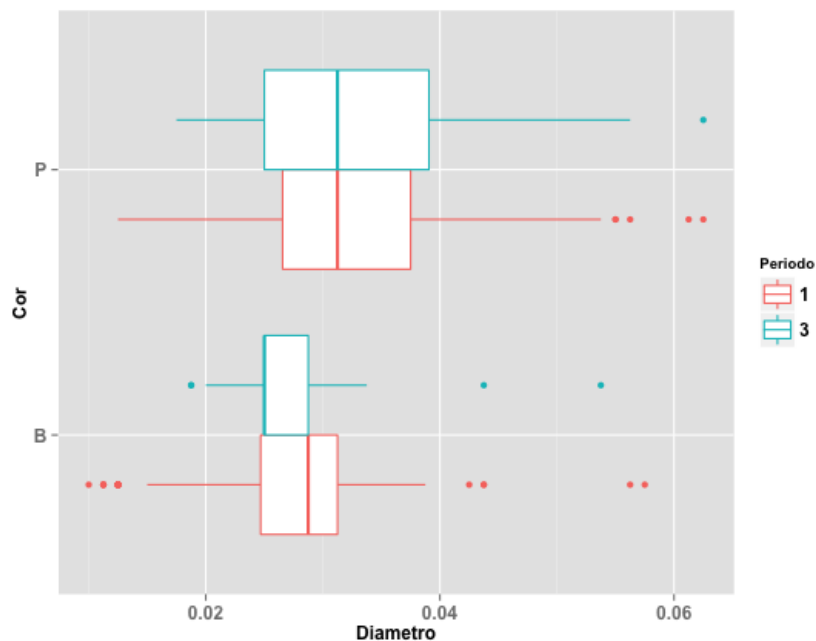


Figura 24 - Boxplots da variação do diâmetro (cm) do pelo em função da cor e do período. Nota: P – Preto; B – Branco; 1 – P1; 3 – P3.

Na Tabela 21 estão apresentados os valores médios do comprimento e diâmetro dos pelos pretos e dos brancos nos dois períodos (P1 e P3).

Tabela 21 – Valores médios (cm) do comprimento e do diâmetro dos pelos pretos e dos brancos nos dois períodos analisados (P1 e P3).

	P1		P3	
	Pretos	Branco	Pretos	Branco
<b>Comprimento</b>	1,255	1,080	1,158	1,201
<b>Diâmetro</b>	0,033	0,028	0,032	0,027

Relativamente ao tipo de medula concluiu-se que as percentagens referentes a cada tipo (não medulado, medula fragmentada e medulado) foram extremamente semelhantes entre períodos, como se pode observar pelas Figuras 25 e 26. A maior percentagem de pelos apresentou uma medula continua no verão (P1) e no inverno (P1), demonstrando pouca ou nenhuma variação sazonal relativamente a este parâmetro, contrariamente ao referido por Udo (1978).

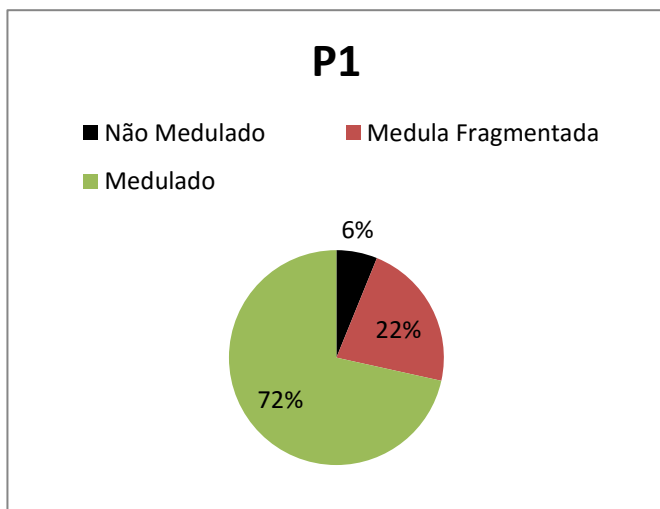


Figura 25 – Quantificação do tipo de medula presente nos pelos analisados no P1.

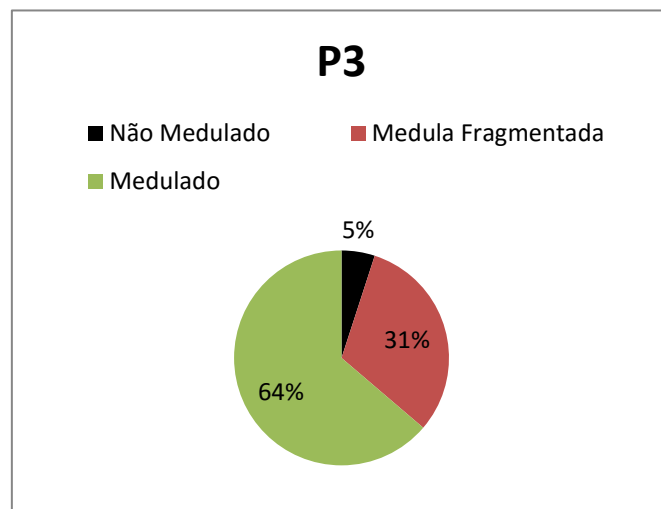


Figura 26 – Quantificação do tipo de medula presente nos pelos analisados no P3.

Portanto, no P1 os pelos foram mais compridos que no P3 e sem diferenças significativas em relação ao diâmetro e ao tipo de medula. Estes resultados contrariam, parcialmente, a literatura, onde os animais aclimatados ao verão possuem pelos curtos, grossos e medulados, ao passo que no inverno os pelos são mais compridos, finos e sem medula. Esta mudança ocorre de modo a favorecer a termorregulação (Maia *et al.*, 2003; Bertipaglia *et al.*, 2008; Bernabucci *et al.*, 2010).

Os resultados obtidos sugerem que o processo de aclimação não decorreu nos animais em estudo. Segundo Berman (2011), a mudança do pelo é afetada pelo fotoperíodo (principalmente), pela temperatura ambiente e pela dieta alimentar, passando de uma pelagem comprida e pesada de inverno para uma mais curta e leve de verão. Em todo o caso a radiação solar é vista como um fator preponderante na aquisição de calor pelo animal, stresse térmico, alterações anatómo-fisiológicas e consequente aclimação (Udo, 1978; Lefcourt e Adams, 1996; Hahn, 1999; Sevi *et al.*, 2001; Sevi e Caroprese, 2012). Portanto, uma possível explicação para estes resultados poderá passar pelo facto destes animais estarem alojados e sem contacto com a radiação solar direta. Assim, os restantes fatores ambientais que contribuem para o processo de aclimação podem não ter sido suficientes para estimular os animais a sofrer este processo. Ainda assim, somente a avaliação da pelagem não é suficiente para auferir se os animais estavam aclimatados ou não, pelo que também foram avaliadas características fisiológicas (ver capítulo 4.5. Dados fisiológicos).

No presente ensaio, os pelos pretos foram em média mais curtos e grossos que os pelos brancos, uma pelagem que favorece as perdas de calor sensível e latente (Bertipaglia *et al.*, 2008). Uma vez que as pelagens pretas promovem uma maior aquisição de calor pela via sensível (Udo, 1978), faz sentido que a seleção destes animais pelas características produtivas tenha selecionado

aqueles cujo tipo de pelo compense a sua cor, do ponto de vista termorregulatório e consequentemente produtivo.

#### 4.4. Dados Produtivos

Em ambos os períodos as Altas tiveram, em média, uma produção superior às Baixas, tal como se pode observar pelas tabelas 22 e 23. No P1 as Altas tiveram uma produção leiteira média 17,90% superior às Baixas. No P3, o grupo das Altas produziu em média 22,30% a mais que o grupo das Baixas, evidenciado-se assim uma menor diferença na produção leiteira entre os grupos no P1. Este resultado sugere a hipótese do stresse térmico ter afetado negativamente o grupo das Altas, tal como é referido noutros trabalhos (Berman, 1968; West, 2002; Avendaño-Reyes, 2012). Ainda assim, para uma melhor conclusão seriam necessários mais dias de ensaio ou então colocar outros dois grupos (Baixas e Altas) num ambiente de termoneutralidade.

Tabela 22 – Produção de leite (kg) no P1.

	Baixas	Altas
<b>Média</b>	34,62±5,92	40,81±4,41
<b>Max.</b>	46,40	48,80
<b>Min.</b>	26,20	33,00

Tabela 23 – Produção de leite (kg) no P3.

	Baixas	Altas
<b>Média</b>	24,52±3,08	29,98±5,88
<b>Max.</b>	28,00	40,60
<b>Min.</b>	18,70	19,40

Foi observada uma diferença significativa entre a produção de leite nos P1 e P3 ( $P < 0,0001$ ). Como seria de esperar, esta diferença foi influenciada pela fase de lactação (DIM) ( $P = 0,0518$ ), pois no P1 os animais encontravam-se numa fase inicial da lactação. Englobando os dois períodos estudados, verificou-se que a produção média das Altas foi significativamente superior à das Baixas (35,38 e 30,58 kg de leite, respetivamente) ( $P = 0,0013$ ).

Através das produções médias diárias do P1 elaborou-se um gráfico (Figura 27), no qual se pode observar que a produção de leite nas Altas decresceu entre o D2 e o D4. Pode-se associar esta situação ao facto do D2 ter sido, como já foi referido, o dia de maior desconforto térmico

para os animais, tal como demonstra a TR média no gráfico. Assim verifica-se a diminuição da produção, não no próprio dia, mas sim 24-48h depois, como constatado em West *et al.* (2003). A variação da produção das Baixas foi oposta à das Altas, tal como demonstra a Figura 27, indicando uma variação produtiva em condições de desconforto térmico diferente entre os grupos de produção.

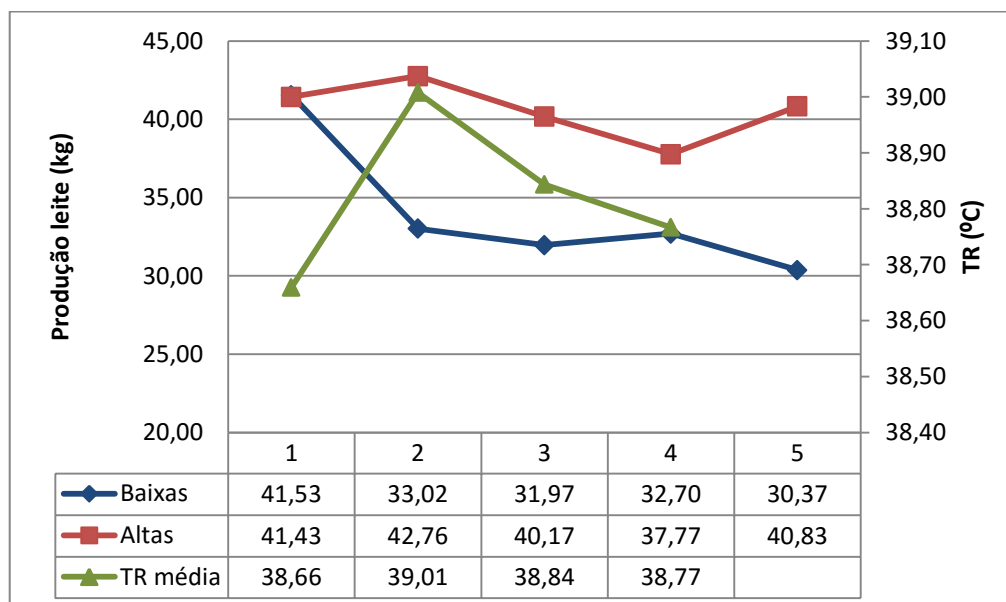


Figura 25 – Gráfico da produção leiteira média (kg) diária relativa aos grupos de produção (Baixas e Altas), correlacionado a TR média diária (°C). Os números (1 a 5) correspondem aos dias do P1 (verão, stresse térmico).

## 4.5. Dados Fisiológicos

### 4.5.1. Composição do Leite

Neste capítulo discute-se a variação das análises ao leite efetuadas em função da fase da lactação, do P1 (verão) e P3 (inverno) e em função do nível de produção (Baixas e Altas).

#### 4.5.1.1. Lactose

Verificou-se que os dias de lactação influenciaram as diferenças obtidas para esta variável apenas a um nível de significância de 10% (DIM - P = 0,0699). As diferenças observadas no teor

em lactose médio foram apenas relativas ao fator Período ( $P = 0,0002$ ;  $F = 16,673$ ). Durante o P1 o teor em lactose médio foi superior ao P3 (P1 – 4,95 e P3 – 4,88 %). Ainda que não se tenham observado diferenças entre Altas e as Baixas ( $P = 0,9017$ ;  $F = 0,016$ ), como se pode observar pela Tabela 24, as Baixas diminuíram mais neste componente do P1 para o P3, do que as Altas.

**Tabela 24 – Valores médios do teor em lactose (%).**

	<b>P1</b>	<b>P3</b>	<b>Média</b>
<b>Altas</b>	4,94±0,12	4,90±0,65	4,93±0,47
<b>Baixas</b>	4,95±0,17	4,86±0,20	4,92±0,18
<b>Média</b>	4,95±0,14 <sup>a</sup>	4,88±0,52 <sup>b</sup>	

Índices superiores minúsculos diferentes nas células indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os períodos.

Em stress térmico agudo é comum verificar-se uma inibição da síntese da lactose (Avenida-Reyes, 2012), mas os valores obtidos não confirmam esta situação. O facto da covariável DIM ter sido significativa a 10%, pode justificar os resultados obtidos. Com o decorrer da lactação a produção vai diminuindo, tal como se verificou na análise da produção leiteira (página 68), onde a covariável DIM foi também significativa a 10% ( $P = 0,0518$ ).

#### **4.5.1.2. Proteína**

Testou-se o teor proteico do leite durante o P1 e o P3. Verificou-se que a covariável DIM não foi significativa ( $P = 0,2590$ ) pelo que se efetuou o modelo sem a mesma. Ou seja, as diferenças verificadas não são provocadas pela diferença nos dias de lactação.

Encontraram-se diferenças significativas entre o teor proteico médio analisado nos dois períodos ( $P < 0,0001$ ;  $F = 402,5244$ ). Durante o P1 o teor proteico médio do leite foi superior ao do P3 (P1 – 2,97 e P3 – 3,69%), como se pode observar pela Figura 28. Não se verificaram diferenças significativas entre as Altas e as Baixas ( $P = 0,7050$ ;  $F = 0,1510$ ).



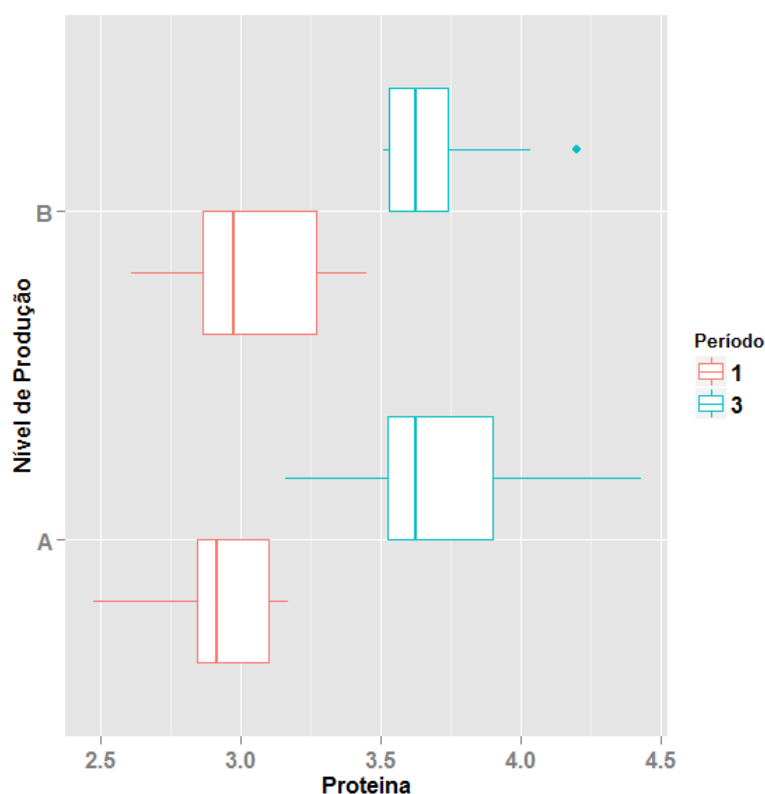


Figura 26 – *Boxplots* da variação do teor proteico (%) em função do nível de produção e do período. Nota: A – Altas; B – Baixas; 1 – P1; 3 – P3.

No modelo estatístico efetuado verificou-se que 77% da variância total dos efeitos aleatórios é atribuído ao efeito dos animais, pelo que os fatores fixos (período e nível) representam uma pequena percentagem de variação do teor proteico. Este valor deve-se, provavelmente, ao facto da percentagem de proteína variar pouco por efeitos ambientais e depender em grande parte de efeitos genéticos. Na Tabela 25 estão representados os valores médios obtidos.

Tabela 25 - Valores médios do teor em proteína (%).

	P1	P3	Média
<b>Altas</b>	2,93±0,19	3,68±0,34	3,25±0,46
<b>Baixas</b>	3,02±0,26	3,71±0,24	3,30±0,42
<b>Média</b>	2,97±0,23 <sup>a</sup>	3,69±0,29 <sup>b</sup>	

Índices superiores minúsculos diferentes nas células indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os períodos.

O menor teor proteico no verão é um resultado recorrente na literatura (Bernabucci *et al.*, 2002; Noro *et al.*, 2006; Bertocchi *et al.*, 2014), uma vez que a ingestão de alimento diminui e há uma grande quantidade de proteína e ureia excretada através da sudação (Joshi *et al.*, 1968), contribuindo para uma menor disponibilidade de aminoácidos para a glândula mamária (Salama *et al.*, 2014a). Bertocchi *et al.* (2014) concluíram que existe uma correlação negativa entre o THI e

a concentração de proteína e de gordura no leite, tal como acontece com a quantidade. No presente ensaio efetuou-se uma correlação de Spearman da concentração proteica com a TR média máxima. Os resultados obtidos demonstram uma correlação negativa moderada, com um coeficiente de -0,67.

Ao contrário do que aconteceu no P3, no P1 os valores de proteína registados foram inferiores ao valor considerado normal por Burrington e Agarwal (2013), de 3,6%. As Baixas tiveram em média 3,03% e as Altas 2,94%, valores coincidentes com os de Noro *et al.* (2006) nos meses de verão do Brasil (3,02-3,10%) e com os de Bernabucci *et al.* (2002) em Itália (3,01%). Berticchi *et al.* (2014) registaram um valor um pouco superior (3,32%) também em Itália e no verão. Ainda assim e segundo Silanikove *et al.* (2009), seria de esperar uma percentagem maior, pois a diminuição na produção leiteira provocaria o aumento da concentração dos sólidos, o que não foi verificado neste estudo. Apenas o teor em proteína não é suficiente para avaliar os efeitos do stresse térmico neste nutriente, pois de acordo com Bernabucci *et al.* (2015) as maiores alterações ocorrem no teor em caseína, que traz grandes repercussões na qualidade do leite.

#### **4.5.1.3. Gordura**

Apesar de a gordura ser um dos componentes do leite mais afetado pela fase de lactação (Salama *et al.*, 2014a), no presente ensaio, as diferenças observadas na percentagem de gordura não se deveram aos dias de lactação ( $P = 0,9796$ ), mas sim aos fatores em estudo. Assim, as diferenças no teor butiroso médio analisado entre os dois períodos foram altamente significativas ( $P < 0,0001$ ;  $F = 48,9406$ ). Durante o P3 a percentagem de gordura média do leite foi superior à do P1 (P1 – 2,52 e P3 – 3,80%), como é ilustrado na Figura 29. A literatura refere que é comum a diminuição na quantidade de gordura durante o verão, mas que a concentração pode aumentar devido à depressão da lactose (Bouraoui *et al.*, 2002; Noro *et al.*, 2006; Renna *et al.*, 2010). Neste caso, a concentração de gordura não aumentou no P1, fazendo sentido pelo simples facto de a concentração de lactose ter aumentado neste período (ver: 4.5.1.1. Lactose).

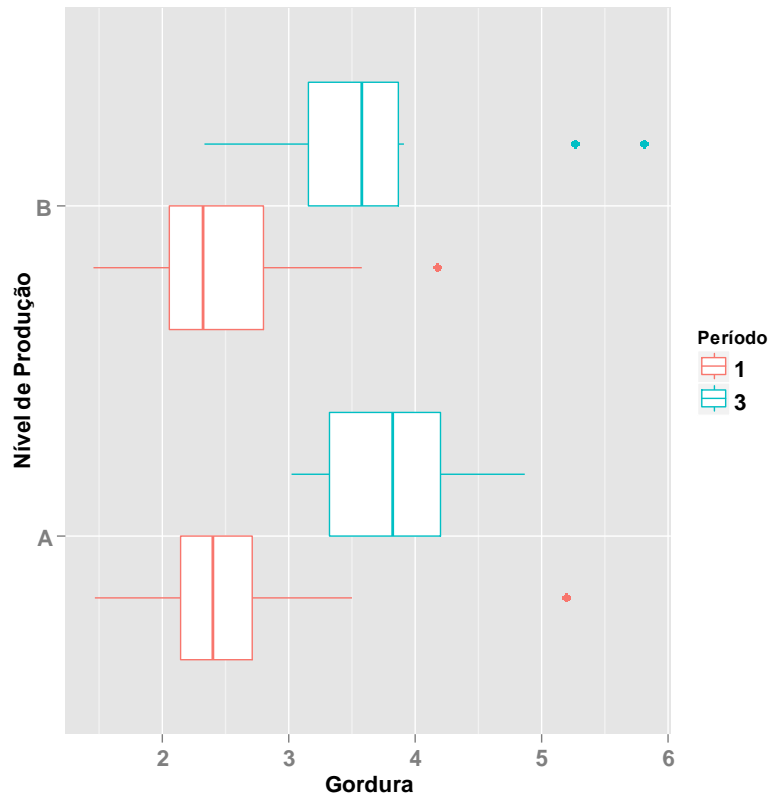


Figura 27 - *Boxplots* da variação do teor butírico (%) em função do nível de produção e do período. Nota: A – Altas; B – Baixas; 1 – P1; 3 – P3.

Relativamente aos grupos de produção não se verificaram diferenças significativas ( $P = 0,5382$ ;  $F = 0,1914$ ). Os valores médios obtidos estão representados na Tabela 26.

Tabela 26 – Valores médios do teor butírico (%).

	P1	P3	Média
<b>Altas</b>	2,54±0,81	3,830,58	3,10±0,96
<b>Baixas</b>	2,50±0,70	3,74±0,95	3,00±1,00
<b>Média</b>	2,52±0,75 <sup>a</sup>	3,80±0,75 <sup>b</sup>	

Os valores registados no P1 foram inferiores aos desejáveis 3,7% na produção leiteira atual (Burrington e Agarwal, 2013). Estes valores são também inferiores aos registados por Noro *et al.* (2006) nos meses de verão (3,40-3,45%). Bertocchi *et al.* (2014) durante todo o ano registaram valores entre 3,75% (verão) e 4,01% (inverno). De forma semelhante Garcia *et al.* (2015) não registaram alterações na percentagem de gordura em vários níveis de stresse térmico, mas observaram valores superiores aos verificados no P1 (entre 3,4 a 3,5%). No presente ensaio, apesar não existirem diferenças significativas entre Baixas e Altas, os valores registados são bastante inferiores aos da literatura. Tendo em consideração que, em médias, os animais tinham

110 ou mais dias de lactação e que a alimentação estava adequada, estes valores sugerem que animais aclimatados ao calor, em stress térmico, podem apresentar valores de gordura no leite bastante baixos. Uma possível explicação passa pelo comportamento alimentar. Os animais em stress térmico evitam os alimentos mais calorigênicos, como os alimentos grosseiros, e consomem mais os alimentos concentrados, desencadeando uma redução do pH ruminal o que conduz a um menor teor butíroso no leite.

#### 4.5.1.4. Ureia

Devido à existência de interação entre fatores (como se pode observar na Figura 30) realizou-se uma análise individual para cada um dos dois períodos testando o nível de produção.

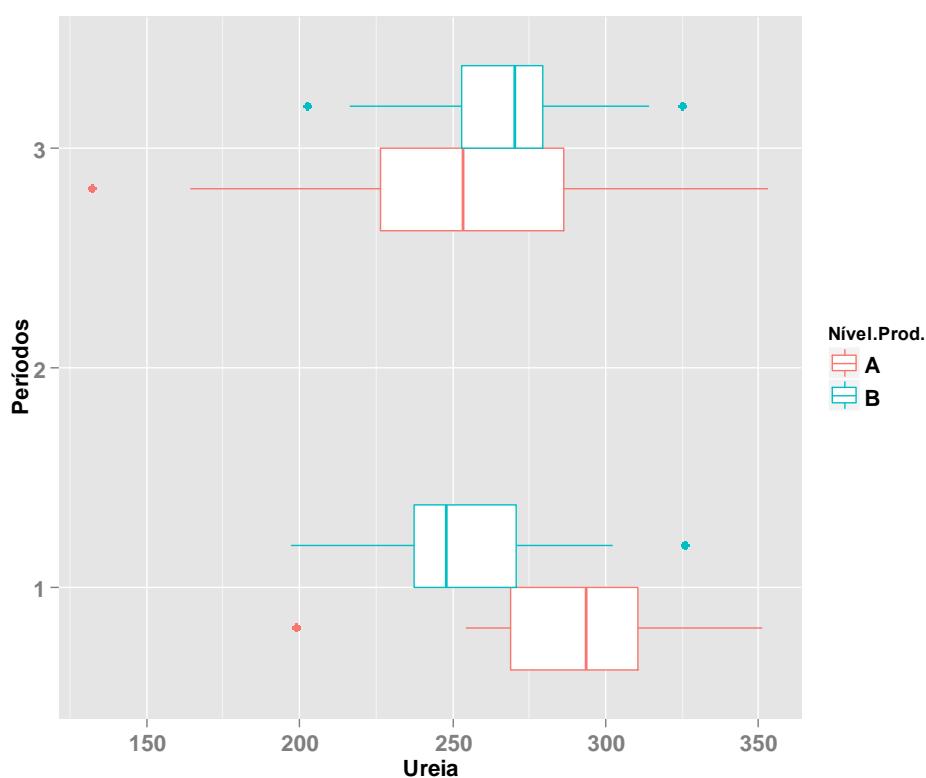


Figura 28 - Boxplots da variação da ureia (mg/kg) em função do nível de produção e do período. Nota: A – Altas; B – Baixas; 1 – P1; 3 – P3.

Apenas se verificaram diferenças significativas quanto ao nível de produção no P1 ( $F = 6,3413$ ;  $P = 0,0286$ ). Neste período as Altas (293,62 mg/kg) tiveram um valor médio de ureia superior às Baixas (253,69 mg/kg). No P3 não se verificaram diferenças significativas ( $F = 0,19918$ ;  $P = 0,6672$ ). Na Tabela 27 encontram-se os valores médios encontrados. A fase de lactação não influenciou estes valores ( $P = 0,2779$ ).

Tabela 27 – Valores médios da ureia no leite (mg/kg).

	P1	P3	Média
<b>Altas</b>	293,62±35,97 <sup>A</sup>	254,21±57,94	275,99±50,45
<b>Baixas</b>	253,69±33,81 <sup>B</sup>	266,21±35,87	258,70±34,60
<b>Média</b>	275,19±39,99	259,17±49,60	

Índices superiores minúsculos diferentes nas células indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) quanto ao nível de produção.

Estes valores encontram-se dentro do desejável na produção leiteira (100-300 mg/kg; Yanez e Rodríguez, 2006), o que indica um adequado rácio energia/proteína. Note-se que as Altas no P1, em média, estiveram muito perto do limite máximo recomendado. Em todo o caso, o foco está nos maiores valores de ureia do leite das Altas em stresse térmico comparativamente às Baixas. Estes resultados estão de acordo com os de Cowley *et al.* (2015) que registaram o aumento da ureia no leite em vacas em stresse térmico e com os de Tian *et al.* (2015) no sangue. Não confirmam os de Garcia *et al.* (2015) que não encontraram diferenças no sangue. No entanto, estes autores não diferenciaram os animais em função do nível de produção. O aumento da ureia em stresse térmico pode ser explicado pelo acréscimo na mobilização de aminoácidos (Tian *et al.* 2015). A mobilização de aminoácidos pode ser superior devido à menor aquisição através da ingestão, uma vez que esta é diminuída em stresse térmico, principalmente nas altas produtoras. Estes resultados fortalecem a ideia da utilização da ureia como um biomarcador de stresse térmico, no leite, em animais onde não exista um desequilíbrio nutricional entre o nível energético e proteico.

#### 4.5.1.5. *β*-hidroxibutirato

Devido à grande dispersão dos dados desta variável, foi necessário agrupa-los num valor por vaca em cada período, fazendo-se a média dos valores registados nos vários dias. Retirou-se também o valor da Vaca 11 no dia 10 por ser considerado um *outlier* severo, ainda que o valor não se deva a nenhum erro, mas sim por doença do animal. Por fim, efetuou-se a transformação da variável dependente na raiz quadrada.

No presente estudo não se verificaram diferenças no BHB do leite entre os períodos ( $P = 0,2081$ ), nem entre os grupos de produção ( $P = 0,1816$ ) (Tabela 28). Em todo o caso, o efeito aleatório participou em 44% da variação total do modelo elaborado. Garcia *et al.* (2015) também não encontraram diferenças significativas no BHB sanguíneo de animais em stresse térmico. Resultados diferentes foram encontrados por Salama *et al.* (2014b) e Tian *et al.* (2015) que verificaram um aumento do BHB nos animais em stresse térmico (urina e sangue,

respetivamente). Apesar dos níveis de BHB no sangue serem próximos dos níveis no leite (Enjalbert *et al.*, 2001) e deste ser uma via muito mais fácil de se obter uma amostra nos bovinos leiteiros, existe muito pouca informação sobre o stresse térmico e o BHB no leite.

**Tabela 28 – Valores médios de BHB (mmol/L).**

	<b>P1</b>	<b>P3</b>	<b>Média</b>
<b>Altas</b>	0,0052±0,010	0,0111±0,087	0,0079±0,060
<b>Baixas</b>	0,0008±0,002	0,0013±0,003	0,0010±0,069
<b>Média</b>	0,0032±0,008	0,0072±0,069	

A maior parte dos animais teve um valor nulo de BHB, daí estes valores tão baixos. O valor mais elevado no P1, em média, foi de 0,07 mmol/L, no D3, na vaca 16, que também apresentou valores superiores a zero nos restantes dois dias do período. Durante a ordenha da manhã desse dia o valor foi de zero, mas na ordenha da tarde o valor no leite foi de 0,14 mmol/L, em conjunto com um valor de gordura exagerado e completamente destoado da média (7,07%). De facto, no P1, a maior ocorrência de vacas com BHB no leite superior a zero foi no D3, mas com valores médios diários sempre inferiores a 0,10 mmol/L, valor a partir do qual se considera que o animal apresenta um risco moderado de cetose (ANABLE, 2016). Estes resultados indicam que nos animais estudados o stresse térmico não desencadeou o surgimento de cetoses, normalmente associadas a um balanço energético negativo, que segundo Wheelock *et al.* (2010) pode surgir na presença de stresse térmico, independentemente da fase da lactação. Neste ensaio não foi validada a utilização do BHB como biomarcador de stresse térmico, pois os animais podem encontrar-se em stresse térmico e não apresentar um balanço energético negativo, normalmente provocado pela redução na ingestão alimentar.

#### **4.5.1.6. Contagem de Células Somáticas**

Retiraram-se deste modelo as vacas que se encontraram com mamite (uma do grupo das Altas no P1 e três do grupo das Altas no P3), de modo a testar apenas os fatores em questão (período e nível). Não foram verificadas diferenças significativas entre períodos ( $P = 0,7875$ ;  $F = 0,07360$ ), nem entre Altas e Baixas ( $P = 0,4014$ ;  $F = 0,76791$ ). Os efeitos aleatórios representaram 63% da variação total. Os valores médios obtidos encontram-se na Tabela 29.

**Tabela 29 – Valores médios da CCS ( $\times 10^3$ /mL).**

	<b>P1</b>	<b>P3</b>	<b>Média</b>
<b>Altas</b>	145,25±278,81	75,39±33,62	110,32±228,70
<b>Baixas</b>	203,81±193,30	195,29±156,50	199,55±176,66
<b>Média</b>	174,53±238,30	135,34±132,74	

Em comparação com Bertocchi *et al.* (2014) e Garcia *et al.* (2015), estes valores são mais baixos. Estes autores confirmaram o aumento da CCS na presença de stresse térmico ( $310 \times 10^3$ /mL nos meses de verão e  $594 \times 10^3$ /mL em stresse moderado, respetivamente). Bernabucci *et al.* (2002) e Renna *et al.* (2010) não verificaram aumento da CCS com o stresse térmico e obtiveram valores inferiores ao deste ensaio. O stresse térmico pode ter um efeito negativo no sistema imunitário dos animais, tornando os animais mais suscetíveis a infeções e ao crescimento e proliferação de agentes patogénicos ambientais (Bertocchi *et al.*, 2014). Como se sabe, os animais com maior produção têm uma maior predisposição para o desenvolvimento de desordens metabólicas e de inflamações (no úbere e no útero principalmente), pelo que se esperava observar uma maior influência do stresse térmico nestes animais, no entanto, não se verificaram diferenças significativas entre os grupos de produção.

#### **4.5.2. Sangue**

Aqui serão descritos e discutidos os resultados obtidos a partir das amostras de sangue recolhidas nos três períodos. Primeiramente será elaborada a caracterização dos componentes principais do hemograma referentes ao estudo, com ênfase no hematócrito, na hemoglobina e nos leucócitos, uma vez que são os parâmetros mais referidos na revisão bibliográfica. Por último serão discutidos os dados da hormona  $T_3$ , comumente utilizada como indicador do estado metabólico do animal.

##### **4.5.2.1. Hematócrito**

Verificou-se um aumento significativo dos valores do hematócrito ao longo dos três períodos ( $P < 0,0001$ ), como se pode observar na Tabela 30. No entanto, não se verificaram diferenças significativas entre as Altas e as Baixas ( $P = 0,2504$ ;  $F = 1,4722$ ).

Para uma melhor compreensão, os valores de hematócrito, nos bovinos, devem compreender-se entre os 26 e os 42% (DNAtech., 2015).

**Tabela 30 – Valores médios do hematócrito nos três períodos (%).**

	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>	<b>Média</b>
<b>Altas</b>	22,92±9,37	27,42±2,40	30,80±6,34	27,07±8,65
<b>Baixas</b>	25,27±10,49	28,23±3,27	30,56±1,48	28,27±8,57
<b>Média</b>	23,80±9,39 <sup>a</sup>	27,74±2,63 <sup>b</sup>	30,70±5,00 <sup>c</sup>	

Índices superiores minúsculos diferentes nas células indicam diferenças significativas (P<0,05) entre os períodos.

Estes resultados evidenciam que neste ensaio as vacas, Baixas e Altas, na presença de stress térmico (P1) apresentaram, em média, uma redução no número de eritrócitos no sangue abaixo do mínimo fisiológico (26%). Esta situação é, provavelmente, devida a elevadas ingestões de água, conduzindo a uma hemodiluição. O maior volume de água, presente tanto nos vasos sanguíneos quanto no espaço intersticial, é utilizado preferencialmente para aumentar os níveis de termólise evaporativa, revelando uma reação adaptativa dos animais face ao stress térmico (Pereira, 2004). Deste modo, elaborou-se uma correlação de Spearman entre a taxa de sudação (Matos, *dados não publicados*) e o hematócrito. O coeficiente obtido foi de -0,79, o que revela uma correlação negativa relativamente forte entre as duas variáveis, justificando, em grande parte, os baixos valores de hematócrito verificados.

A tendência dos valores observados está de acordo com os resultados de Pereira *et al.* (2008) e Ikuta *et al.* (2010). Apesar de Pereira *et al.* (2008) terem também registado uma diminuição do hematócrito na presença de uma situação termicamente stressante, os valores que registaram são bastante superiores aos do P1 deste ensaio. Na verdade são semelhantes aos valores registados em P3 (aproximadamente 30,00%). Koubková *et al.* (2002) observaram resultados opostos aos deste ensaio, mas com valores foram semelhantes aos de Pereira *et al.* (2008), registando uma variação de 32,48, no início do período stressante, para 41,61%. As diferenças de valores para este ensaio podem indicar o seguinte: (1) fatores genéticos diferentes (Pereira, 2004), pois o efeito animal nesta análise representou 72% da variação total; (2) o período de stress térmico foi mais severo que dos outros dois trabalhos e como tal ingeriram mais água; ou (3) os animais deste ensaio não estavam aclimatados, pois segundo Silanikove (2000) à medida que o processo de aclimação ocorre os valores do hematócrito tendem a aproximarem-se da normalidade. Os animais em Koubková *et al.* (2002) estavam aclimatados e eram consideradas baixas produtoras, o que reforça a hipótese (3). Em todo o caso, os resultados obtidos com a análise da T<sub>3</sub> (capítulo 4.5.2.4.) indicam que os animais estavam aclimatados ao verão, pelo que a hipótese (1) surge como a mais provável. Em P2, os valores pouco acima do limite mínimo sugerem que as necessidades de termólise evaporativa diminuíram pouco tempo (cerca de um mês) depois dos eventos de stress térmico agudo ocorridos em P1. Em P3, os valores normais



revelam o conforto térmico dos animais na presença das temperaturas moderadamente baixas que ocorrem no inverno da região onde decorreu o ensaio.

Na Figura 31 está representada a variação do hematócrito das Baixas e das Altas ao longo dos três períodos. Embora não se tenham verificado diferenças significativas entre os grupos de produção, observa-se que no P1 as Altas apresentaram um maior afastamento do limite mínimo fisiológico em comparação com as Baixas, sugerindo uma maior necessidade de termólise evaporativa e consequente gasto energético com a termorregulação.

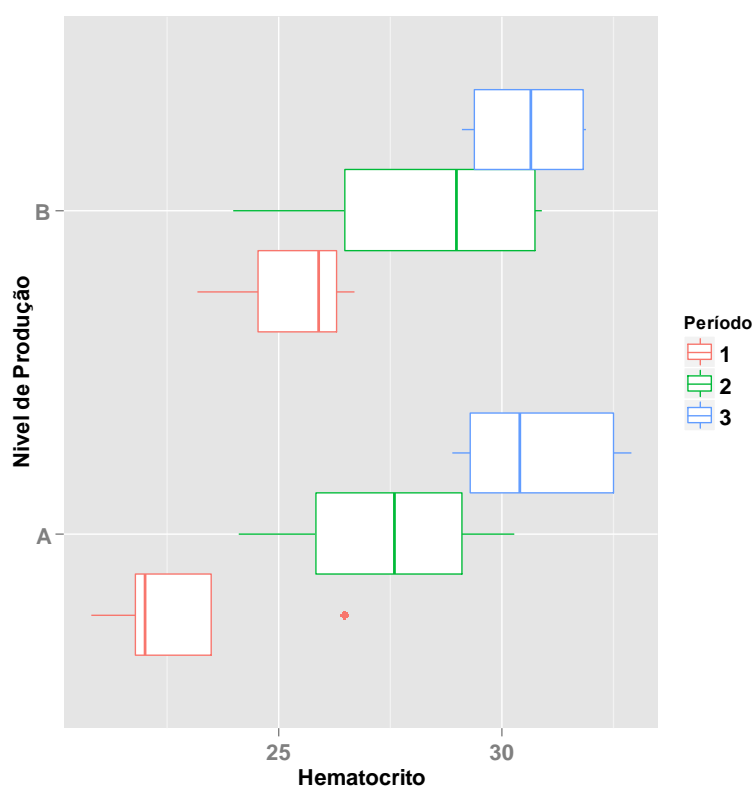


Figura 29 - *Boxplots* da variação do hematócrito (%) em função do nível de produção e do período. Nota: A – Altas; B – Baixas; 1 – P1; 3 – P3.

#### 4.5.2.2. Hemoglobina

A variação da hemoglobina seguiu o mesmo padrão que a variação hematócrito, sem diferenças entre os grupos e com um aumento significativo dos valores ao longo dos três períodos ( $P < 0,0001$ ) (Tabela 31), sugerindo a influência do stresse térmico na redução dos valores de hemoglobina. Lee *et al.* (1976) também verificaram uma redução, em stresse térmico, no hematócrito e na hemoglobina. Koubková *et al.* (2003) encontraram resultados opostos, sugerindo uma hemoconcentração. No presente ensaio, os menores valores de hemoglobina fazem sentido devido à hemodiluição já referida. Ainda assim, os valores não diminuíram abaixo do mínimo fisiológico normal (8 g/dL; DNAtch., 2015), sugerindo que, uma vez que o número de

eritrócitos diminuiu e os valores de hemoglobina mantiveram-se estáveis, a quantidade de hemoglobina por eritrócito teve de aumentar.

Não foram encontradas diferenças significativas entre Altas e Baixas.

**Tabela 31- Valores médios da hemoglobina nos três períodos (g/dL).**

	P1	P2	P3	Média
<b>Altas</b>	9,33±0,93	10,37±0,91	11,04±0,71	10,20±1,08
<b>Baixas</b>	9,68±1,16	10,58±0,90	11,25±0,61	10,44±1,10
<b>Média</b>	9,49±1,00 <sup>a</sup>	10,45±0,86 <sup>b</sup>	11,13±0,63 <sup>c</sup>	

Índices superiores minúsculos diferentes nas células indicam diferenças significativas (P <0,0001) entre os períodos.

#### 4.5.2.3. *Leucócitos*

A literatura indica que o stresse térmico pode afetar o perfil leucocitário dos animais (Hahn, 1999; Koubková *et al.*, 2002; Calamari *et al.*, 2011). No entanto, neste ensaio não foram verificadas diferenças significativas entre P1 (verão, stresse térmico) e P2 (verão, termoneutralidade). Apenas se verificaram diferenças significativas entre o P3 (inverno) e os restantes dois períodos (P1 – P = 0,0158; P2 – P = 0,0202), como se pode observar na Tabela 32. Ao contrário do que aconteceu com o hematócrito e com a hemoglobina, o stresse térmico não influenciou o perfil leucocitário. As diferenças verificadas são fruto dos diferentes estados de aclimação (verão e inverno). Segundo Hanh (1999) o número de leucócitos pode manter-se baixo durante algum tempo após o retorno à termoneutralidade, o que pode explicar o facto de não existirem diferenças entre P1 e P2. Em todo o caso, uma grande percentagem da variação total é devida à variação individual (72%). Deve-se salientar que as Altas apresentaram os valores mais elevados, contribuindo largamente para o perfil leucocitário mais elevado no P3, principalmente devido a duas vacas que tiveram valores acima do normal fisiológico. Ainda que P1 e P2 tenham apresentado valores significativamente mais baixos, estes encontraram-se dentro de um intervalo de valores fisiologicamente normais. Para este parâmetro sanguíneo também não se verificaram diferenças significativas entre Altas e Baixas.

**Tabela 32 - Valores médios dos leucócitos nos três períodos ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ ).**

	P1	P2	P3	Média
<b>Altas</b>	8,98±1,75	8,43±1,55	11,28±3,99	9,46±2,69
<b>Baixas</b>	7,70±0,83	7,98±1,82	9,33±1,18	8,28±1,39
<b>Média</b>	8,40±1,50 <sup>a</sup>	8,25±1,58 <sup>a</sup>	10,41±3,09 <sup>b</sup>	

Índices superiores minúsculos diferentes nas células indicam diferenças significativas (P<0,05) entre os períodos.

Wegner *et al.* (1976) encontraram com vacas Holstein-Friesian em stresse térmico uma correlação positiva entre o número de células somáticas no leite e número de neutrófilos no sangue. No presente trabalho foi efetuada uma correlação entre a CCS e o perfil leucocitário. As correlações foram positivas mas com um coeficiente de correlação baixo. Os coeficientes

encontram-se na Tabela 33. O coeficiente de correlação entre os neutrófilos e a CCS foi apenas de 0,23. A maior correlação verificada foi de 0,54 entre o número de linfócitos e a CCS.

**Tabela 33 – Correlação do perfil leucocitário com a CCS.**

Variável	Coeficiente
Linfócitos	0,54
Leucócitos	0,46
Eosinófilos	0,34
Neutrófilos	0,23
Basófilos	0,20
Monocitos	0,16

#### 4.5.2.4. Triiodotironina ( $T_3$ )

Como se pode observar pela Tabela 34, as Baixas apresentaram valores de  $T_3$  circulante sempre inferiores aos das Altas, ao longo dos três períodos. Note-se também que os valores desta hormona foram aumentando também com o decorrer dos meses. Tendo-se verificados os valores mais altos no P3, período em que os animais estavam aclimatados ao inverno, e os mais baixos no P1, animais aclimatados ao verão mas em stresse térmico.

**Tabela 34 - Valores recolhidos de  $T_3$  plasmática (ng/dL).**

	P1	P2	P3	Média
<b>Altas</b>	133,33±8,14 <sup>A</sup>	146,50±7,64 <sup>A</sup>	160,32±13,18 <sup>A</sup>	146,72±14,59
<b>Baixas</b>	152,40±11,97 <sup>B</sup>	170,40±12,29 <sup>B</sup>	186,25±13,72 <sup>A</sup>	168,50±19,17
<b>Média</b>	142,00±13,77 <sup>a</sup>	157,36±10,72 <sup>b</sup>	170,69±17,78 <sup>c</sup>	

Índices superiores minúsculos diferentes nas células indicam diferenças significativas ( $P < 0,0001$ ) entre os períodos.  
Índices superiores maiúsculos diferentes nas células indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) quanto ao nível de produção.

Verificaram-se diferenças significativas entre os períodos ( $F = 52,22$ ;  $P < 0,0001$ ). Aplicando as comparações múltiplas (teste de Tukey) conclui-se que os valores médios de  $T_3$  são maiores no P3 que nos restantes períodos e que os obtidos no P2 são também significativamente maiores que os obtidos no P1 (todas estas comparações para  $P < 0,0001$ ). Verificaram-se ainda diferenças significativas entre as Baixas e as Altas no P1 e no P2. No P1, as Baixas, em média, apresentaram mais 19,07 ng/dL (14,30%) desta hormona, na corrente sanguínea, que as Altas (Baixas – 152,40 ng/dL; Altas – 133,33 ng/dL). No P2, quando os animais já não se encontravam sob stresse térmico mas ainda no verão, nota-se o aumento dos valores de  $T_3$  no sangue (Baixas – 170,40 ng/dL; Altas – 146,50 ng/dL), ainda com diferenças significativas entre os grupos de produção. No P3, apesar de numericamente as Baixas terem continuado a apresentar, em média, um valor de  $T_3$

mais elevado, não foram verificadas diferenças significativas entre grupos de produção. O facto das Altas produzirem mais que as Baixas pode ser contraditório visto que estes resultados evidenciam um menor metabolismo nas Altas que nas Baixas. No entanto pode-se atribuir os valores de P1 e de P2 a uma aclimação mais intensa nas Altas que nas Baixas, uma vez que são mais afetadas pelas altas temperaturas. No entanto, em P3, uma vez que não se verificou stresse térmico seria de esperar maiores valores de  $T_3$  nas Altas, pois possuem um metabolismo mais elevado, de modo a fazer face à maior quantidade de leite produzido. Em todo o caso, em P3 os animais encontravam-se numa fase final da lactação. A Figura 32 ilustra a variação da  $T_3$ .

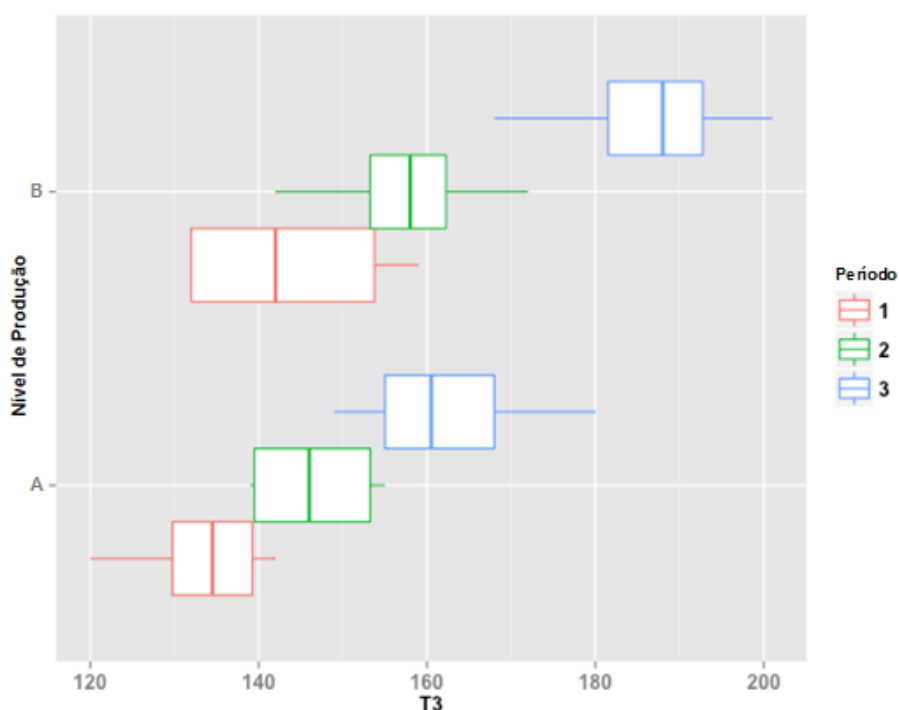


Figura 30 - Boxplots da variação da  $T_3$  (ng/dL) em função do nível de produção e do período. Nota: A – Altas; B – Baixas; 1 – P1; 2 – P2; 3 – P3.

Pela comparação do P1 com o P2, uma vez que distam apenas um mês entre si, pode-se atribuir os valores mais baixos de  $T_3$  às elevadas temperaturas e ao concomitante stresse térmico. Esta situação está de acordo com o referido na literatura, que em stresse térmico existe uma redução das hormonas da tiroide no sangue (Silanikove, 2000; Pereira, 2004). Esta diferença pode indicar que os animais no P1 estavam aclimatados ao verão, temperaturas elevadas, pois tiveram necessidade de reduzir o metabolismo como via para a aclimação. Ainda assim, quer em termoneutralidade (Gueorguiev, 1999), quer em stresse térmico (Johnson *et al.*, 1988), a redução nos valores de  $T_3$  é maior no início da lactação.

## 5. Conclusão

Face às alterações anatomo-fisiológicas observadas podemos sugerir o seguinte cenário relativamente ao processo de aclimação dos animais em estudo. Verificou-se através da variação dos parâmetros fisiológicos, nomeadamente da triiodotironina ( $T_3$ ) e do hemograma, que ocorreu a aclimação nos animais do verão (P1) para o inverno (P3). Contudo, os parâmetros morfológicos não evidenciam uma variação correspondente. Assim, poderemos deduzir que o facto dos animais se encontrarem protegidos da ação direta de fatores climáticos severos (como a radiação solar direta, a chuva e o vento) terá determinado um estímulo ambiental insuficiente para provocar a mudança da pelagem.

Quanto aos valores de  $T_3$ , verificou-se que as altas produtoras apresentaram em todos os períodos (P1, P2 e P3) valores inferiores às baixas produtoras. Tais resultados tendem a contrariar uma boa parte da bibliografia. No P3, uma vez que os animais se encontraram em termoneutralidade, o esperado seria observar valores de  $T_3$  superiores nas altas produtoras, o que não ocorreu neste ensaio. É possível que a influência de outras hormonas, como a  $T_4$ , a GH, a prolactina e a somatomedina, possa ter contribuído para estes resultados. Eram esperados valores inferiores nas altas produtoras apenas no P1 e no P2, revelando uma maior intensidade na aclimação dos animais mais produtivos e, conseqüentemente, maiores perdas na produção.

Os dados fisiológicos (frequência respiratória e temperatura retal) revelaram que durante o P1 ocorreram períodos de stresse térmico, especialmente nas vacas de alta produção, onde se observaram relevantes esforços termolíticos e significativos armazenamentos de calor. Durante o P3 verificou-se que os animais encontravam-se em termoneutralidade. A análise efetuada à composição do leite evidenciou que, em P1, a qualidade do leite foi afetada através dos decréscimos nos níveis de gordura e proteína. Porém, não se verificaram diferenças significativas em relação ao nível de produção. O  $\beta$ -hidroxibutirato (BHB) e a ureia foram testados pela sua utilidade como biomarcadores de stresse térmico. O BHB não apresentou diferenças significativas, contudo os valores de ureia foram mais elevados no P1 e nas vacas do grupo das altas produtoras, revelando um potencial para utilização como biomarcador. Relativamente à produção de leite, foi difícil concluir se foi influenciada pela temperatura. O número de medições em cada período não foi suficientemente elevado. Ainda assim, nas altas produtoras, parece ocorrer uma diminuição na produção 24-48h após o período em que a temperatura de globo negro foi mais elevada.

O hemograma permitiu identificar de que forma o metabolismo do animal se altera para superar as adversidades do ambiente térmico. Observaram-se valores reduzidos de hematócrito no

P1, com uma tendência para aumentar ao longo dos períodos em ambos os grupos de produção. Os valores de hematócrito encontraram-se abaixo do normal no P1 devido a uma hemodiluição provocada pela maior ingestão de água, necessária para fazer face à termólise latente. O mesmo se passou com a hemoglobina, embora se tenha mantido em níveis fisiologicamente normais. Foi também observado que o número de leucócitos foi significativamente superior no inverno relativamente ao verão ( $P3 > P1$  e  $P2$ ). Ainda assim, os valores observados encontram-se dentro de valores fisiologicamente normais. Considerando a contagem de células somáticas dentro dos valores normais não se depreende que estivesse a ocorrer um défice do sistema imunitário, tanto nas vacas de alta como de baixa produção. Não se verificaram diferenças significativas deste parâmetro em relação ao período e ao nível de produção.

Contrariamente ao referido frequentemente na literatura, a análise dos pelos revelaram uma uniformidade nas características entre P1 e P3. Assim, parece que o processo de aclimação não desencadeou respostas morfológicas relevantes. Em relação ao diâmetro e ao tipo de medula não foram encontradas diferenças entre períodos. Verificou-se uma maior percentagem de pelos medulados nos dois períodos. Os pelos pretos foram mais curtos e grossos que os pelos brancos. Ademais, os pelos mais curtos ocorreram durante o P3, reforçando a ideia de que outros fatores terão contribuído para os balanços térmicos, nomeadamente, a relação entre espessuras das pelagens, relação entre pelos brancos e pretos e eventuais diferenças na absorvidade e na transmissividade (não calculada).

Face aos resultados obtidos, propunha para trabalhos futuros, estudos mais detalhados e com mais animais, de forma a possibilitar uma melhor compreensão do processo de aclimação das vacas leiteiras. Dada a tendência do aumento de eventos extremos e da alteração climática, a capacidade de aclimação rápida é uma característica desejável que se pretende atingir de forma mais facilitada através de biomarcadores, que neste estudo preliminar parece ter sido a ureia.

## 6. Bibliografia

- Abreu, A. S. (2011) *Indicadores do estresse térmico em bovinos*. Seminário apresentado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rio Grande do Sul, Brasil. 11 pp.
- Adin, G., Gelman, A., Solomon, R., Flamenbaum, I., Nikbachat, M., Yosef, E., Zenou, A., Shamay, A., Feuermann, Y., Mabweesh, S. J., Miron, J. (2009) Effects of cooling dry cows under heat load conditions on mammary gland enzymatic activity, intake of food and water, and performance during the dry period and after parturition. *Livestock Science*, 124, 189-195.
- Åkerstedt, M., Forsbäck, L., Larsen, T. e Svennersten-Sjaunja, K. (2011) Natural variation in biomarkers indicating mastitis in healthy cows. *Journal of Dairy Research*, 78 (1), 88-96.
- Alamer, M. (2011) The role of prolactin in thermoregulation and water balance during heat stress in domestic ruminants. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 6 (12), 1153–1169.
- Albright, J. L. (1993) Feeding behavior of dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 76, 485-491.
- Alnaimy, A., Habbeeb, M., Fayaz, M., Marai, M. e Kamal, T. H. (1992) Heat Stress. In: Phillips, C. e Piggins, D. (eds.), *Farm Animals and the Environment*. Oxon, CAB International. pp. 27-47.
- Alvarez, M. B. e Johnson, H. D. (1971). Environmental heat exposure on cattle plasma catecholamine and glucocorticoids. *Journal of Dairy Science*, 56, 189-201.
- Alzina-López, A., Farfán-Escalante, J. C., Valencia-Heredia, E. R. e Yokoyama- Kano, J. (2001) Condición ambiental y su efecto en la temperatura rectal y frecuencia respiratoria en bovinos cruzados ( *Bos taurus* x *Bos indicus* ) del estado de. *Revista Biomedica*, 12 (2), 112–121.
- ANABLE (2015) *Bovinform* [Online] Disponível em: <https://www.bovinform.pt/Bovinform/bovinform.php> [Consultado em 14 de maio de 2016].
- Anderson, M. (1985) Effects of drinking water temperature on water intake and milk yield of tied up dairy cows. *Livestock Production Science*, 12, 329–338.
- Araujo, A. P. (2001) *Estudo comparativo de diferentes sistemas de instalações para produção de leite tipo B, com ênfase nos índices de conforto térmico e na caracterização econômica*. Tese de Mestrado em Zootecnia. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo. Pirassununga, Brasil. 94 pp.
- Atrian, P. e Aghdam Shahryar, H. (2012) Heat stress in dairy cows (a review). *Research in Zoology*, 2 (4), 31–37.
- Avendaño-Reyes, L. (2012) Heat stress management for milk production in arid zones. In: Chaiyabutr, N. (ed.) *Milk production – An up-to-date overview of animal nutrition, management and health body*. Capítulo 9. Baja California, México: InTech, pp. 165–184.
- Baccari Jr., F. (2001) *Manejo ambiental da vaca leiteira em climas quentes*, UEL Brasil, Londrina pp. 11-41, 85-99.
- Barash, H., Silanikove, N., Shamay, A., e Ezra, E. (2001). Interrelationships among ambient temperature, day length, and milk yield in dairy cows under a mediterranean climate. *Journal of Dairy Science*, 84, 2314-2320.
- Barnes, A., Beaty, D., Taylor, E., Stockman, C., Maloney, S. e McCarthy, M. (2004) Physiology of heat stress in cattle and sheep. [Online], *Australia, Live Export*. Disponível em: <http://www.livecorp.com.au/LC/files/dc/dcff517-e032-4d6e-8dc5-5be26b9ba845.pdf/> [Acedido em 12 de Junho de 2015].
- Baumgard, L. H., Rhoads, R. P. (2013) Effects of heat stress on postabsorptive metabolism and energetics. *Annual Review of Animal Bioscience*, 1, 311–337.
- Baumgard, L. H., Wheelock, J. B., O'Brien, M., Shwartz, G., Zimelman, R. B., Sanders, S. R., VanBaale, M. J., Collier, R. J., Rhoads, M. L. e Rhoads, R. P. (2007) The differential effects of heat stress vs. underfeeding on production and

- post-absorptive nutrient partitioning. In: *22nd Annual Southwest Nutrition e Management Conference*. Tempe, Arizona, pp. 116–124.
- Beatty, D. T., Barnes, A., Taylor, E., Pethick, D., McCarthy, M. e Maloney, S. K. (2006) Physiological responses of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle to prolonged , continuous heat and humidity. *Journal of Animal Science*, 84, 972–985.
- Belić, B., Cincović, M. R., Popović-Vranješ, A., Pejanović, R. e Krajinović, M. (2011) Metabolic changes and mammary uptake of metabolites in milk in heat stressed cows. *Dairy*, 61 (4), 309–318.
- Bendixen, E., Danielsen, M., Hollung, K., Gianazza, E. e Miller, I. (2011) Farm animal proteomics - a review. *Journal of Proteomics*, 74 (3), 282–293.
- Benjamin, M. M. (1981) Fluid and electrolytes. In: Benjamin, M. M. (ed.) *Outline of Veterinary Clinical Pathology*. Ames, Iowa State University Press.
- Berbigier, P. (1988) *Bioclimatologie des Ruminants Domestiques en Zone Tropicale*, 1ª edição, Paris, INRA.
- Berman, A. (1968) Nychthemeral and seasonal patterns of thermoregulation in cattle. *Australian Journal of Agricultural Research*, 19, 181-189.
- Berman, A. (2011) Invited review: Are adaptations present to support dairy cattle productivity in warm climates? *Journal of Dairy Science*, 94 (5), 2147–2158.
- Berman, A., Folman, Y., Kaim, M., Mamen, M., Herz, Z., Wolfenson, D., Arieli, A. e Graber, Y. (1985) Upper critical temperatures and forced ventilation effects for high-yielding dairy cows in a subtropical climate. *Journal of Dairy Science*, 68 (6), 1488–1495.
- Bernabucci, U., Basiricò, L., Morera, P., Dipasquale, D., Vitali, A., Piccioli Cappelli, F., Calamari, L. (2015) Effect of summer season on milk protein fractions in Holstein-Friesian cows. *American Dairy Science Association*, 98, 1815–1827.
- Bernabucci, U., Biffani, S., Buggiotti, L., Vitali, A., Lacetera, N., Nardone, A. (2014) The effects of heat stress in Italian Holstein-Friesian dairy cattle. *American Dairy Science Association*, 97, 471-486.
- Bernabucci, U., Lacetera, N., Baumgard, L. H., Rhoads, R. P., Ronchi, B. e Nardone, A. (2010) Metabolic and hormonal acclimation to heat stress in domesticated ruminants. *Animal*, 4 (7), pp.1167–1183.
- Bernabucci, U., Lacetera, N., Ronchi, B. e Nardone, A. (2002) Effects of the hot season on milk protein fractions in Holstein-Friesian cows. *Animal Research*, 51, 25–33.
- Berning, L. M. e Shook, G. E. (1992) Prediction of mastitis using milk somatic cell count, N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase, and lactose. *Journal of Dairy Science*, 75, 1840–1848.
- Bertipaglia, E. C. A., Silva, R. G., Cardoso, V. e Fries, L. A. (2008) Desempenho reprodutivo, características do pelame e taxa de sudação em vacas da raça Braford. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 37 (9), 1573–1583.
- Bertocchi, L., Vitali, A., Lacetera, N., Nardone, A., Varisco, G. e Bernabucci, U. 2014. Seasonal variations in the composition of Holstein-Friesian cow's milk and temperature-humidity index relationship. *Animal*, 8 (4), 1–8.
- Bianchi, L., Casoli, C., Pauselli, M., Budelli, E., Caroli, A., Bolla, A. e Duranti, E. (2004) Effect of somatic cell count and lactation stage on sheep milk quality. *Italian Journal of Animal Science*, 3, 147–156.
- Biomarkers Working Group. (2001) Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology e Therapeutics*, 69 (3), 89–95.
- Blackshaw J. K. e Blackshaw A. W. (1994) Heat stress in cattle and the effect of shade on production and behaviour. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 34, 285–295.



- Bligh, J. e Johnson, K. G. (1973) Glossary of terms for thermal physiology. *Journal of Applied Physiology*, 35 (6), 941-961.
- Bouraoui, R., Lahmar, M., Majdoub, A., Djemali, M. e Belyea, R. (2002) The relationship of temperature-humidity index with milk production of dairy cows in a Mediterranean climate. *Animal Research*, 51 (6), 479–491.
- Bozkurt, Y. e Ozkaya, S. (2009) Heat stress response of some local and European breeds of feedlot beef cattle grown under the Mediterranean climate conditions. In: *60th Annual Meeting of the European Federation of Animal Science*. Barcelona, Spain, EAAP. 7 pp.
- Breathnach, A. S. (1971) *Melanin Pigmentation of the skin*. London, Oxford University Press.
- Buffington, D. E., Collazo-Arocho, A., Canton, G. H., Pitt, D., Thatcher, W. W. e Collier, R. J. (1981) Black Globe-Humidity Index (BGHI) as comfort equation for dairy cows. *Transactions of the ASAE*, 24 (3), 711–714.
- Burrington, K. J. e Agarwal, S. (2013) Milk fractionation technology and emerging milk protein opportunities milk fractionation techniques - a technical report. *Dairy Export Council*, 8 pp.
- Calamari, L., Abeni, F., Calegari, F. e Stefanini, L. (2007) Metabolic conditions of lactating Friesian cows during the hot season in the Po valley. 2. Blood minerals and acid-base chemistry. *International Journal of Biometeorology*, 52, 97-107
- Calamari, L., Petrera, F., Abeni, F. e Bertin, G. (2011) Metabolic and hematological profiles in heat stressed lactating dairy cows fed diets supplemented with different selenium sources and doses. *Livestock Science*, 142 (1-3), 128–137.
- Calegari, F., Frazzi, E. e Calamari, L. (2005) Productive response of dairy cows raised in a cooling barn located in the Po Valley (Italy). In: *Proceedings of the Seventh International Symposium*. Beijing, China, 18-20 May 2005, American Society of Agricultural Engineers. pp. 115-121.
- Carvalho, N. (2011) *Ambiência e conforto térmico em bovinos de leite*. [Online] Disponível em <http://www.nftalliance.com.br/artigos/bovinos-de-leite/ambienca-e-conforto-termico-em-bovinos-de-leite/> [Consultado em 14 Agosto de 2015].
- Casamassima, D., Sevi, A., Palazzo, M., Ramacciato, R., Colella, G. E. e Bellitti, A. (2001) Effects of two different housing systems on behavior, physiology and milk yield of Comisana ewes. *Small Ruminant Research*, 41, 151–161.
- Cena, K. e Monteith, K. (1975) Transfer processes in animal coats. 1. Radiative transfer. *Proceedings of the Royal Society of London, B Biological Sciences*, 188 (1), 377-393.
- Cerqueira, J. (2013) *Avaliação de bem-estar animal em bovinos de leite na região Norte de Portugal*. Tese de Doutoramento em Ciências Veterinárias. Universidade do Porto, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Porto, Portugal. 343 pp.
- Charoensook, R., Gatphayak, K., Sharifi, A. R., Chaisongkram, C., Brenig, B. e Knorr, C. (2012) Polymorphisms in the bovine HSP90AB1 gene are associated with heat tolerance in Thai indigenous cattle. *Tropical Animal Health and Production*, 44 (4), 921–928.
- Chmielowiec-Korzeniowska, A., Tymczyna, L e Babicz, M. (2012) Assessment of selected parameters of biochemistry, hematology, immunology and production of pigs fattened in different seasons. *Archiv Tierzucht/Archives Animal Breeding*, 55 (5), 469-479.
- Cincović, M. R., Belić, B., Toholj, B., Potkonjak, A., Stevančević, M., Lako, B. e Radović, I. (2011) Metabolic acclimation to heat stress in farm housed Holstein cows with different body condition scores. *African Journal of Biotechnology*, 11 (50), 10293-10303.
- Collier, R. J., Collier, J. L., Rhoads, R. P. e Baumgard, L. H. (2008) Gene involved in the bovine heat stress response. *Journal of Dairy Science*, 91, 445-454.

- Collier, R. J., Dahl, G. E. e VanBaale, M.J. (2006) Major advances associated with environmental effects on dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 89 (4), 1244–1253.
- Collier, R. J., Eley, R. M., Sharma, A. K., Pereira, R. M. e Buffington, D. E. (1981) Shade management in subtropical environment for milk yield and composition in Holstein-Friesian and Jersey cows. *Journal of Dairy Science*, 64, 844–849.
- Cowley, F. C. (2013) *Nutrition and heat stress as sources of variation in bovine milk protein and casein composition*. Tese de Doutorado. Universidade de Queensland, Australia. 279 pp.
- Cowley, F. C., Barber, D. G., Houlihan, A. V., Poppi, D. P. (2015) Immediate and residual effects of heat stress and restricted intake on milk protein and casein composition and energy metabolism. *Journal of Dairy Science*, 98 (4), 2356-2368.
- Cummins, K. (1998) Bedding plays role in heat abatement. *Dairy Herd Manage*, 35, 6–20.
- Curtis, S. E. (1983). *Environmental management in animal agriculture*. Ames, The Iowa State University Press.
- Cwynar, P., Kolacz, R. e Czerski, A. (2014) Effect of heat stress on physiological parameters and blood composition in Polish Merino rams. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 6, 177–182.
- Davis, A. K., Maney, D. L. e Maerz, J. C. (2008) The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Functional Ecology*, 22 (5), 760–772.
- Dikmen, S., Khan, F. A., Huson, H. J., Sonstegard, T. S., Moss, J. I., Dahl, G. E. e Hansen, P. J. (2014) The SLICK hair locus derived from Senepol cattle confers thermotolerance to intensively managed lactating Holstein-Friesian cows. *Journal of Dairy Science*, 97 (9), 5508–5520.
- Dmi'el, R., Prevolutzky, A. e Shkolnik, A. (1980) Is the black coat in the desert a means of saving metabolic energy. *Nature*, 283, 761–762.
- DNAtech. (2015) Resultado de amostra sanguínea – hemograma. *Laboratório de análises clínicas*.
- DuBois, P.R. e Williams, D.J. (1980) Increased incidence of retained placenta associated with heat stress in dairy cows. *Theriogenology*, 13, 115-121.
- Eckersall, P., Young, F. J., Mc Comb, C., Hogarth, C. J., Safi, S., Weber, A., McDonald, T., Nolan, A. M. e Fitzpatrick, J. L. (2001) Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis, *Veterinary Record*, 148, 35–41.
- Eckert, Randall, D., Burggren, W., and French, K. (1997) *Eckert Animal Physiology - Mechanisms and Adaptation*, 4ª edição, New York, Freeman and Company
- Eitam, H., Brosh, A., Orlov, A., Izhaki, I. e Shabtay, A. (2009) Caloric stress alters fat characteristics and Hsp70 expression in milk somatic cells of lactating beef cows. *Cell Stress and Chaperones*, 14 (2), 173–182.
- Enjalbert, F., Nicot, M. C., Bayourthe, C. e Moncoulon, R. (2001) Ketone bodies in milk and blood of dairy cows: Relationship between concentrations and utilization for detection of subclinical ketosis. *Journal of Dairy Science* 84, 583–589.
- Esmay, M. L. (1969) *Principles of Animal Environment*. New York, AVI Publishing. pp. 319.
- FBI ( 2005) Basic structure of hair. University of South Carolina. [Online]. Disponível em: [http://www.chem.sc.edu/analytical/chem107/lab4\\_032205.pdf](http://www.chem.sc.edu/analytical/chem107/lab4_032205.pdf) [Consultado em 20 de maio de 2015]. 11 pp.
- Fawcett, D. W. (1981) Melanin Pigment. In: Fawcett, D. W. (ed.) *The Cell*. 2ª edição. United States of America, W. B. Saunders Company. pp. 537–550.

- Finch, V. A. (1986) Body temperature in beef cattle: its control and relevance to production in the tropics. *Journal of Animal Science*, 62, 531-542.
- Finch, V. A., Bennett, I. L., and Holmes, C. R. (1982). Sweating response in cattle and its relation to rectal temperature, tolerance of sun and metabolic rate. *Journal of Agricultural Science*, 99, 479-487.
- Finocchiaro, R., van Kaam, J. B. C. H. M., Sardina, M. T. e Misztal, I. (2005) Effect of heat stress on milk production in dairy cows. *Italian Journal of Animal Science*, 4 (2), 70-72.
- Fraser, D. A. (2004) *Factors influencing livestock behaviour and performance*, Victoria, British Columbia, Rangeland Health Brochure 8.
- Fuquay, J. W. (1981) Heat stress as it affects animal production. *Journal of Animal Science*, 52 (1), 164-174.
- Garcia, A. B., Angeli, N., Machado, L., Cardoso, F. C. e Gonzalez, F. (2015) Relationships between heat stress and metabolic and milk parameters in dairy cows in southern Brazil. *Tropical Animal Health and Production*, 47 (5), 889-894.
- Gaughan, J., Lacetera, N., Valtorta, S. E., Khalifa, H. H., Hahn, L. e Mader, T. (2009) Response of domestic animals to climate challenges. In: Ebi, K. L., Burton, I. e McGregor, G. (eds.) *Biometeorology for adaptation to climate variability and change*. Springer Science + Business Media. pp. 131-170.
- Geers, R., Vermeulen, L., Snoeks, M. e Permentier, L. (2014) Do dairy cattle need protection against weather in a temperate climate? A review. *Journal of Agricultural Science*, 6 (12), 9-21.
- Geraldo, A. C. A. P. M. (2013) *Termotolerância em fêmeas bovinas: abordagens celular e fisiológica*. Tese de Doutorado em Ciências. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo, Pirassununga, Brasil. 92 pp.
- Geraldo, A.C.A.P.M., Pereira, A. M. F., Titto, C. G. e Titto, E. A. L. (2012) What do cattle prefer in a tropical climate: water immersion or artificial shade? *Journal of Life Sciences*, 6, 1356-1362.
- Gueorguiev, I. P. (1999) Thyroxine and triiodothyronine concentrations during lactation in dairy cows. *Annales de Zootechnie*. 48 (6), 477-480.
- Hahn, G. L. (1985) Management and housing of farm animals in hot environments. In: Yousef, M. (ed.) *Stress Physiology in Livestock*, vol. 2, Boca Raton, Flórida, CRC Press. pp 151-174.
- Hahn, G. L. (1999) Dynamic responses of cattle to thermal heat loads. *Journal of Animal Science*, 77 (2), 10-20.
- Hailemariam, D., Mandal, R., Saleem, F., Dunn, S. M., Wishart, D. S. e Ametaj, B. N. (2014) Identification of predictive biomarkers of disease state in transition dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 97 (5), 2680-2693.
- Hamann, J. e Zecconi, A. (1998) Evaluation of the electrical conductivity of milk as a mastitis indicator, in: *IDF bulletin 334, International Dairy Federation*, Brussels, Belgium, 1998.
- Hammami, H., Vandenplas, J., Vanrobays, M. L., Rekik, B., Bastin, C. e Gengler, N. (2015) Genetic analysis of heat stress effects on yield traits, udder health, and fatty acids of Walloon Holstein-Friesian cows. *Journal of Dairy Science*, 98 (7), 4956-4968.
- Hamzaoui, S., Salama, A. A. K., Caja, G., Albanell, E., Flores, C. e Such, X. (2012) Milk production losses in early lactating dairy goats under heat stress. *Journal of Dairy Science*, 95 (2), 672-673.
- Herdade das Pedras Alvas, Montemor-o-novo (2015). Google Maps. Google. [Online] Disponível em: <https://www.google.pt/maps/place/38%C2%B041'10.6%22N+8%C2%B008'17.6%22W/@38.6862878,-8.1382308,17z/data=!3m1!4b1!4m2!3m1!1s0x0:0x0> [Consultado em 12 de Setembro de 2015].

- Hogan, J. e Smith, K. L. (2012) Managing environmental mastitis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 28, 217–224.
- Horowitz, M. (2001) Heat acclimation: phenotypic plasticity and cues to the underlying molecular mechanisms. *Journal of Thermal Biology*, 26 (4-5), 357–363.
- Hu, F. (1968) Melanocytes and Melanin Pigmentation. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, 19, 565–580.
- Hulme, P. H. (2005) Adapting to climate change: is there scope for ecological management in the face of a global threat. *Journal of Applied Ecology*, 42, 784–794.
- Igono, M. O., Bjotvedt, G. e Sanford-Crane, H. T. (1992) Environmental profile and critical temperature effects on milk production of Holstein-Friesian cows in desert climate. *International Journal of Biometeorology*, 36, 77–87.
- Ikuta, K., Okada, K., Sato, S. e Yasuda, J. (2010) Effects of heat stress on blood chemistry and hematological profiles in lactating dairy cows. *Japanese Journal of Large Animal Clinics*, 1 (4), 190–196.
- Ingram, D. L. e Mount, L. E. (1975) *Man and Animals in Hot Environments*. 1ª edição. New York, Springer-Verlag.
- Innocente, N., Corradini, C., Blecker, C. e Paquot, M. (1998) Dynamic surface properties of the proteose-peptone fraction of bovine milk. *Journal of Dairy Science*, 81 (7), 1833–1839.
- Jessen, C. (2001) *Temperature Regulation in Humans and Others Mammals*, 1ª edição, Berlin, Springer.
- Johnson, H. D. (1985) Physiological responses and productivity of cattle, in: Yousef M. K. (ed.), *Stress physiology in livestock. Basic principles, vol. 1*, Boca Raton, Florida, CRC Press. pp. 4-19.
- Johnson, H. D., Kalti, P. S., Hahn, L. e Shanklin, M. D. (1988) Short-term heat acclimation effects on hormonal profile of lactating cows. In: *Environmental Physiology and Shelter Engineering With Special Reference to Domestic Animals*. Columbia, Missouri, University of Missouri, pp. 1–15.
- Joshi, B. C., McDowell, R. E. e Sadhu, D. P. (1968) Effect of drugs on sweating rates in Harijana cattle. *Journal of Dairy Science*, 51, 905–909.
- Junior, I. A., Arcaro, J. R. P., Pozzi, C. R., Fagundes, H., Matarazzo, S. V. e Oliveira, C. (2003) Teores plasmáticos de hormônios, produção e composição do leite em sala de espera climatizada. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 7 (2), 350–354.
- Kadzere, C. T., Murphy, M. R., Silanikove, N. e Maltz, E. (2002) Heat stress in lactating dairy cows: a review. *Livestock Production Science*, 77, 59–91.
- Koubková, M., Knížková, I., Kunc, P., Härtlová, H., Flusser, J. e Doležal, O. (2002) Influence of high environmental temperatures and evaporative cooling on some physiological, hematological and biochemical parameters in high-yielding dairy cows. *Czech Journal of Animal Science*, 47 (8), 309–318.
- Kregel, K. C. (2002) Invited review: heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *Journal of Applied Physiology*, 92, 2177–2186.
- Kristensen, T. N., Løvendahl, P., Berg, P. e Loeschcke, V. (2004) Hsp72 is present in plasma from Holstein-Friesian dairy cattle, and the concentration level is repeatable across days and age classes. *Cell stress e chaperones*, 9 (2), 143–149.
- Kruse, V. (1970) Yield of colostrum and immunoglobulin in cattle at the first milking after parturition. *Animal Production*, 12 (4), 619-626.
- Lacetera, N., Bernabucci, U., Ronchi, B., Scalia, D. e Nardone, A. (2002) Moderate summer heat stress does not modify immunological parameters of Holstein-Friesian dairy cows. *International Journal of Biometeorology*, 46 (1), 33-37.

- Lee, J. A., Roussel, J. D. e Beatty, J. F. (1976) Effect of temperature – season on adrenal cortical function, blood cell profile and milk production. *Journal of Dairy Science*, 59, 104–108.
- Lefcourt, A. M. e Adams, W. R. (1996) Radiotelemetry measurement of body temperatures of feedlot steers during summer. *Journal of Animal Science*, 74, 2633-2640.
- Leitner, G., Merin, U. e Silanikove, N. (2004) Changes in milk composition as affected by subclinical mastitis in goats. *Journal of Dairy Science*, 87 (6), 1719–1726.
- Lepock, J. R. (2005) How do cells respond to their thermal environment? *International Journal of Hyperthermia*, 21 (8), 681–687.
- Louw, G. (1996) Temperature and thermoregulation. In: Longman Scientific e Technical (ed.) *Physiological Animal Ecology*. Capítulo 1. Prentice Hall. pp. 17–32.
- Lu, C. e Fuchs, E. (2014) Sweat gland progenitors in development, homeostasis, and wound repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 4 (2), pp.1–18.
- Madureira, A. R., Cláudia, I. P., Gomes, A. M. P., Pintado, M. E., Malcata, F. X. (2007) Bovine whey proteins - Overview on their main biological properties. *Food Research International*, 40 (10), 1197–1211.
- Maia, A. S. C., Silva, R. G., Bertipaglia, E. C. A. e Muñoz, M. C. (2005b) Genetic variation of the hair coat properties and the milk yield of Holstein-Friesian cows managed under shade in a tropical environment. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 43(3), pp.180–187.
- Maia, A. S. C., Silva, R. G. e Bertipaglia, E. C. A. (2003) Haircoat traits in Holstein-Friesian cows in tropical environments: A genetic and adaptative study. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 32 (4), 843–853.
- Maia, A. S. C., Silva, R. G., Junior, J. B. F. S., Silva, R. B. e Domingos, H. G. T. (2009) Effective thermal conductivity of the hair coat of Holstein-Friesian cows in a tropical. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 38 (11), 2218-2223.
- Maia, A. S. C., da Silva, R. G. e Loureiro, C. M. B. (2005a) Respiratory heat loss of Holstein-Friesian cows in a tropical environment. *International Journal of Biometeorology*, 49 (5), 332–336.
- Malaghini, M. C. (1999) *Sistema respiratório - Volumes e capacidades pulmonares*. [Online] Disponível em: <http://www.oocities.org/~malaghini/resp2.html> [Consultado em 3 de maio de 2015].
- Malek dos Reis, C.B., Barreiro, J. R., Mestieri, L., Porcionato, M. A. F. e Santos, M. V. (2013) Effect of somatic cell count and mastitis pathogens on milk composition in Gyr cows. *BMC Veterinary Research*, 9 (1), 67.
- Månsson, H. L. (2008) Fatty acids in bovine milk fat. *Food e Nutrition Research*, 52, 1–3.
- Mansor, R., Mullen, W., Albalat, A., Zerefos, P., Mischak, H., Barrett, D. C., Biggs, A. e Eckersall, P. D. (2013) A peptidomic approach to biomarker discovery for bovine mastitis. *Journal of Proteomics*, 85, 89–98.
- Marai, I. F. M., El-Darawany, A. A., Fadiel, A. e Abdel-Hafez, M. A. M. (2007) Physiological traits as affected by heat stress in sheep—A review. *Small Ruminant Research*, 71, 1-12.
- Martello, L. S., Junior, H. S., Silva, S. L., Cesar J. C. e Balieiro, J. C. C. (2009) Alternative body sites for heat stress measurement in milking cows under tropical conditions and their relationship to the thermal discomfort of the animals. *International Journal of Biometeorology*, 54, 647-652.
- Martello, L. S., Júnior, H. S., Silva, S. L. e Titto, E. A. L. (2004) Respostas fisiológicas e produtivas de vacas holandesas em lactação submetidas a diferentes ambientes. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 33 (1), 181–191.
- Mavromati, J., Cash, P., Restelli, L. e Soler, L. (2014) Proteomics and protein analyses of ovine and caprine body fluids: current studies and future promises. *Current Protein e Peptide Science*, 15 (1), 45–55.

- McLean, J. A. (1974) Loss of heat by evaporation. In: Monteith, J. L. e Mount, L. E. (eds.) *Heat Loss from Animals and Man*, London, Butterworths. pp. 19-31.
- Melzer, N., Wittenburg, D., Hartwig, S., Jakubowski, S., Kesting, U., Willmitzer, L., Lisec, J., Reinsch, N. e Repsilber, D. (2013) Investigating associations between milk metabolite profiles and milk traits of Holstein-Friesian cows. *Journal of Dairy Science*, 96 (3), 1521–1534.
- Mishra, A., Hooda, O. K., Singh, G. e Meur, S. K. (2011) Influence of induced heat stress on HSP70 in buffalo lymphocytes. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 95 (4), 540–544.
- Moore, R. E., Kirwan, J., Doherty, M. K. e Whitfield, P. D. (2007) Biomarker discovery in animal health and disease: The application of post-genomic technologies. *Biomarker Insights*, 2, 185–196.
- Morais, D.A.E.F., Maia, A. S. C., Silva, R. G., Vasconcelos, A. M., Lima, P. O. e Guilhermino, M. M. (2008) Variação anual de hormônios tireoideanos e características termorreguladoras de vacas leiteiras em ambiente quente. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 37 (84), 538–545.
- Mottram, T., Hart, J. e Pemberton R. (2000) Biosensing techniques for detecting abnormal and contaminated milk. In: *Symposium on Robotic Milking*, Lelystad, Netherlands, 17–19 August, 2000. pp. 108–113.
- Muller, C. J. C., Botha, J. A., Coetzer, W. A. e Smith, W. A. (1994) Effect of shade on various parameters of Friesian cows in a Mediterranean climate in South Africa. II. Physiological responses. *South African Journal of Animal Science*, 24, 56-60.
- Muna, M. M. A. e Abdelatif, A. M. (1992) Utilization of nutrients by sheep as affected by diet composition and solar radiation. *Small Ruminant Research*, 9, 37–45.
- Nääs, I. A. (1989) *Princípios de conforto térmico na produção animal*. São Paulo, Ícone 183 pp.
- Nardone, A., Lacetera, N., Bernabucci, U. e Ronchi, B. (1997) Composition of colostrum from dairy heifers exposed to high air temperatures during late pregnancy and the early postpartum period. *Journal of Dairy Science*, 80 (5), 838–844.
- Nardone, A., Ronchi, B., Lacetera, N. e Bernabucci, U. (2006) Climatic effects on productive traits in livestock. *Livestock Veterinary Research Communications*, 30 (1), 75–81.
- Nascimento, M. R. B. M. (2002) *Níveis séricos de tiroxina (T4) e 3,5,3' triiodotironina (T3) relacionados ao efeito do mês, da ordem e do estágio de lactação em vacas das raças Holandesa e Guzerá*. Tese de Doutorado em Zootecnia. Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista. 43 pp.
- Nienaber, J. A. e Hahn, G. L. (2007) Livestock production system management responses to thermal challenges. *International Journal of Biometeorology*, 52 (2) 149–157.
- Noro, G., González, F. H. D., Campos, R. e Dürr, J. W. (2006) Fatores ambientais que afetam a produção e a composição do leite em rebanhos assistidos por cooperativas no Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 35 (3), 1129–1135.
- Olde Riekerink, R. G., Barkema, H. W. e Stryhn, H. (2007) The effect of season on somatic cell count and the incidence of clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 90, 1704–1715.
- Olson, T. A., Avila-Chytil, M., Chase Jr., C. C., Hansen, P. J. e Coleman, S. W. (2002) Impact of hair coat differences on rectal temperature, skin temperature, and respiration rate of Holstein-Friesian X Senepol crosses in Florida. In: *Senepol Symposium*. St. Croix, pp. 1568–1577.
- Overton, M. W., Sischo, W. M., Temple, G. D. e Moore, D. A. (2002) Using time-lapse video photography to assess dairy cattle lying behavior in a free-stall barn. *Journal of Dairy Science*, 85, 2407-2413.

- Ozeki, H., Ito, S., Wakamatsu, K. e Thody, A. J. (1996) Spectrophotometric characterization of eumelanin and pheomelanin in hair. *Pigment Cell Research*, 9 (5), 265–270.
- Özkan, S., Çabuk, M. e Konca, Y. (2004) Leukocyte responses to acute heat stress in turkey toms either fed restricted or ad libitum during growth period. In: *XXII World's Poultry Congress*. İstanbul, 4 pp.
- O'Brien, M. D., Wheelock, J. B., Baumgard, L. H., Rhoads, M. L., Duff, G. C., Bilby, T. R., Collier, R. J. e Rhoads, R. P. (2008) The effects of heat stress on production , metabolism and energetics of lactating and growing cattle. In: *Florida Ruminant Nutrition Symposium*. Gainesville, Florida, 12 pp.
- Patir, H. e Upadhyay, R.C. (2007) Interrelationship between heat shock protein 70 (HSP70) and lymphocyte proliferation in thermal exposed buffalo heifers. *Italian Journal of Animal Science*, 6 (2), 1344–1346.
- Patni, N., Tripathi, N. e Bosmia, S. (2013) Casein extraction from various milk samples and its role as a viable substitute for conventional plastics. *International Journal of Applied Engineering Research*, 4 pp.
- Pereira, A. M. F. (2004) *Adaptação ao ambiente geofísico mediterrânico de bovinos nativos e exóticos – tolerância ao calor*. Tese de Doutoramento em Ciência Agrárias. Faculdade de Ciências e Tecnologia - Universidade de Évora, Évora, Portugal. 171 pp.
- Pereira, A. M. F., Baccari, F., Titto, E. A. L. e Almeida, J. A. A. (2008) Effect of thermal stress on physiological parameters, feed intake and plasma thyroid hormones concentration in Alentejana, Mertolenga, Frisian and Limousine cattle breeds. *International Journal of Biometeorology*, 52 (3), 199–208.
- Pereira, A. M. F., Titto, E. A. L., Infante, P., Titto, C. G., Geraldo, A. M., Alves, A., Leme, T. M., Baccari, F. e Almeida, J. A. (2014) Evaporative heat loss in *Bos taurus*: Do different cattle breeds cope with heat stress in the same way? *Journal of Thermal Biology*, 45, 87–95.
- Perissinotto, M., Cruz, V. F., Pereira, A. e Moura, D. J. (2007) Effect of environment conditions on milk production in Mitra cow house. *Revista de Ciências Agrárias*, 30 (1, )143-149
- Pranayapradhan, Gopinath, S. M., Krishankumar e Joshi, R. R. (2013) Biomarker based detection of subclinical mastitis by liquid phase blocking elisa. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 4 (1), 776–786.
- Pyörälä, S. (2003) Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Veterinary Research*, 34 (5), 565–578.
- R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <http://www.R-project.org/>.
- Renna, M., Lussiana, C., Malfatto, V., Mimosi, A. e Battaglini, L. C. (2010) Effect of exposure to heat stress conditions on milk yield and quality of dairy cows grazing on Alpine pasture. In: *9th European IFSA Symposium*. Vienna, Austria, pp. 1338–1348.
- Rhoads, M.L., Rhoads, R.P., VanBaale, M.J., Collier, R.J., Sanders, S.R., Weber, W.J., Crooker, B. A., Baumgard, L. H. (2009) Effects of heat stress and plane of nutrition on lactating Holstein-Friesian cows: I. Production, metabolism, and aspects of circulating somatotropin. *Journal of Dairy Science*, 92 (5), 1986–1997.
- Robertshaw, D. (1981) The environmental physiology of animal production. In: Clark, J. A. (ed.), *Environmental Aspects of Housing for Animal Production*. London, Butterworth. pp. 3–17.
- Robinson, J.B., Ames, D.R. e Milliken, G.A. (1986) Heat production of cattle acclimated to cold , thermoneutrality and Heat when exposed to thermoneutrality and heat stress. *Journal of Animal Science*, 62, 1434–1440.
- Roenfeldt, S. (1998) You can't afford to ignore heat stress. *Dairy Manage*, 35 (5), 6-12.
- Roman-Ponce, H., Thatcher, W. W., Buffington, D. E., Wilcox, C. J. e Van Horn, H. H. (1976) Physiological and production responses of dairy cattle to a shade structure in a subtropical environment. *Journal of Dairy Science*, 60, 424-430.

- Roman-Ponce, H., Thatcher, W. W., Gatton, D., Barron, D. H. e Wilcox, G. J. (1978) Thermal stress effects on uterine blood flow in dairy cows. *Journal of Animal Science* 46, 175-180.
- Roy, K. S. e Prakash, B. S. (2007) Seasonal variation and circadian rhythmicity of the prolactin profile during the summer months in repeat-breeding Murrah buffalo heifers. *Reproduction Fertility and Development*, 19, 569–575.
- Salama, A. A. K., Caja, G., Hamzaoui, S., Badaoui, B., Castro-Costa, A., Façanha, D. A. E., Guilhermino, M. M., Bozzi, R. (2014a) Different levels of response to heat stress in dairy goats. *Small Ruminant Research*, 121 (1), 73–79.
- Salama, A. A. K., Hamzaoui, S., Badaoui, B., Zidi, A. e Caja, G. (2012) Transcriptome analysis of blood in heat-stressed dairy goats. *Journal of Dairy Science*, 95 (2), 188. Sanchez-Alavez,
- Salama, A., Nayan, N., Contreras-Jodar, A., Hamzaoui, S. e Caja, G. (2014b) Urine metabolomics of heat-stressed dairy goats supplemented with soybean oil. *Journal of Animal Science*, 92 (2), 291–291.
- Santana, A. M., Silva, D. G., Thomas, F., Burchmore, R. J. S., Fagliari, J. J. e Eckersall, P. D. (2015) Proteomic analysis of differentially expressed proteins in Jafarabadi buffalo (*Bubalus bubalis*) milk whey during mastitis. In: *Proceedings of the Second Dairy Care Conference*. 3-4 Março, 2015, Córdoba, COST.
- Sato, K., Leidal, R. e Sato, F. (1987) Morphology and development of an apoeccrine sweat gland in human axillae. *The American Journal of Physiology*, 252 (1 Pt 2), R166–R180.
- Schleger, A. V. e Bean, K.G. (1971) Factor determining sweating competence of cattle skin. *Australian Journal of Biological Sciences*, 24, 1291–1300.
- Schleger, A. V. e Turner, H. G. (1965) Sweating rates of cattle in the field and their reaction to diurnal and seasonal changes. *Australian Journal of Agricultural Research*, 16, 92-106
- Schmidt, G. H. (1971). *Biology of lactation*. W. H. Freeman and Company. United States.
- Schmidt-Nielsen, K. (1983) *Animal physiology – Adaptation and environment*, 3ª edição, primeira em 1975, Australia, Press Syndicate of the University of Cambridge.
- Schmidt-Nielsen, K. (1997) *Animal physiology - Adaptation and environment*. 5ª edição, Cambridge, Cambridge University Press. 607pp
- Schneider, P. L., Beede, D. K. e Wilcox, C. J. (1988) Nycterohemeral patterns of acid–base status, mineral concentrations and digestive function of lactating cows in natural or chamber heat stress environments. *Journal of Animal Science*, 66, 112–125.
- Sevi, A. e Caroprese, M. (2012) Impact of heat stress on milk production, immunity and udder health in sheep: acritical review. *Small Ruminant Research*, 107 (1), 1–7.
- Sevi, A., Albenzio, M., Marino, R., Santillo, A. e Muscio, A. (2004) Effects of lambing season and stage of lactation on ewe milk quality. *Small Ruminant Research*, 51 (3), 251–259.
- Sevi, A., Massa, S., Annicchiarico, G., Dell’Aquila, S. e Muscio, A. (1999) Effect of stocking density on ewes milk yield, udder health and micro- environment. *Journal of Dairy Research*, 66, 489–499.
- Sgarbieri, V.C. (2005) Review: structural and physicochemical properties of milk proteins. *Brazilian Journal of Food Technology*, 8 (1), 43–56.
- Shearer, J., Mohammed, H. O., Brenneman, J. S. e Tran. T. Q. (1992) Factors associated with concentrations of immunoglobulins in colostrum at the first milking post-calving. *Preventive Veterinary Medicine*, 14, 143-154.
- Silanikove, N. (1992) Effects of water scarcity and hot environment on appetite and digestion in ruminants: a review. *Livestock Production Science*, 30, 175–194.



- Silanikove, N. (1994) The struggle to maintain hydration and osmoregulation in animals experiencing severe dehydration and rapid rehydration: the story of ruminants. *Experimental Physiology*, 79, 281–300.
- Silanikove, N. (2000) Effects of heat stress on the welfare of extensively managed - a review. *Livestock Production Science*, 67, 1–18.
- Silanikove, N., Shapiro, F. e Shinder, D. (2009) Acute heat stress brings down milk secretion in dairy cows by up-regulating the activity of the milk-borne negative feedback regulatory system. *BMC Physiology*, 9 (1), 13.
- Silva, R. G. e Maia, A. S. C. (2011) Evaporative cooling and cutaneous surface temperature of Holstein-Friesian cows in tropical conditions. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 40 (5), 1143–1147.
- Silva, R. G., La Scala Jr., N. e Pocay, P. L. B. (2001) Transmission of ultraviolet radiation through the haircoat and the skin of cattle. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 30 (6), 1939–1947.
- Skuldt, D. J., Beckman, W. A., Mitchell, J. W. e Porter, W. P. (1975) Conduction and radiation in artificial fur. In: Gates, D. M. e Schmerl, R. B. (eds.) *Perspectives in biophysical ecology*, Berlin, Springer-Verlag. pp. 549-558.
- Smith, B. P. (1993) *Tratado de medicina veterinária interna de grandes animais*. 1ª edição, São Paulo, Manole Ed. Ltda.
- Smith, J. F. (1996) Why is milk production depressed in the summer? *K-State Research and Extension and Oklahoma State University. Dairy Lines*, 2 (7).
- Sundekilde, U. K., Poulsen, N. A., Larsen, L. B. e Bertram, H. C. (2013) Nuclear magnetic resonance metabolomics reveals strong association between milk metabolites and somatic cell count in bovine milk. *Journal of Dairy Science*, 96 (1), 290–299.
- Tao, S., Monteiro, A. P. A., Thompson, I. M., Hayen, M. J e Dahl, G. E. (2012) Effect of late-gestation maternal heat stress on growth and immune function of dairy calves. *Journal of Dairy Science*, 95 (12), 7128–7136.
- Thom, E. C. (1958) Cooling degree days - air conditioning, heating, and ventilating. *Transactions of the ASAE*, 55, (7), 65-72.
- Tian, H., Wang, W., Zheng, N., Cheng, J., Li, S., Zhang, Y. e Wang, J. (2015) Identification of diagnostic biomarkers and metabolic pathway shifts of heat-stressed lactating dairy cows. *Journal of Proteomics*, 125, 17–28.
- Titto, E. L. (1998) Clima: influência na produção de leite. In: Silva, I. J. O. (ed.) *Atas do I Simpósio Brasileiro de ambiência na produção de leite*. FEALQ, Piracicaba, São Paulo. pp. 10-23.
- Tucker, C. e Schütz, K. (2009) Behavioral responses to heat stress: dairy cows tell the story. In: *Western Dairy Nutrition Conference*. Tempe, Arizona, pp. 13–21.
- Udo, H. M. J. (1978) *Hair coat characteristics in Friesian heifers in the Netherlands and in Kenya*. Wageningen, Holanda, H. Veenman e Zonen B.V.
- Vermunt, J. J. e Tranter, B. P. (2011) Heat stress in dairy cattle - A review , and some of the potential risks associated with the nutritional management of this condition. In: *Annual Conference of the Australian Veterinary Association - Queensland Division*. Townsville, Queensland, Australia. 212–221.
- Vilela, R. A., Leme, T. M. C., Titto, C. G., Neto, P. F., Pereira, A. M. F., Balieiro, J. C. C. e Titto, E. A. L. (2013) Respostas fisiológicas e comportamentais de vacas Holandesas mantidas em sistema adiabático evaporativo. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 33 (11), 1379-1384.
- Wallin, M. (2002) Nature's palette - How humans and other animals produce colours. *Bioscience Explained*, 1 (2), 1–12.
- Wang, J. P., Bu, D. P., Wang, J. Q., Huo, X. K., Guo, T. J., Wei, H. Y., Zhou, L. Y., Rastani, R. R., Baumgard, L. H. e Li, F. D. (2010) Effect of saturated fatty acid supplementation on production and metabolism indices in heat-stressed mid-lactation dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 93 (9), 4121–4127.

- Webster, A. J. E. (1979) Energy metabolism and requirements. In: Church, D. C. (ed.) *Digestive Physiology and Nutrition of Ruminants*. Portland, Oregon, Oxford Press. pp 218-220
- Wegner, T. N., Schuh, J. D., Nelson, F. E. e Stott, G. H. (1976) Effect of stress on blood leucocyte and milk somatic cell counts in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 59 (5), 949-956.
- West, J. W. (2003) Effects of heat-stress on production in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 86 (6), 2131–2144.
- West, J. W., Mullinix, B. G. e Bernard, J. K. (2003) Effects of hot, humid weather on milk temperature, dry Matter intake, and milk yield of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 86 (1), 232–242.
- Wheelock, J. B., Rhoads, R. P., VanBaale, M. J., Sanders, S. R. e Baumgard, L. H. (2010) Effect of heat stress on energetic metabolism in lactating Holstein-Friesian cows. *Journal of Dairy Science*, 93 (2), 644-655.
- Whitehair, K. J., Haskins, S. C., Whitehair, J. G. e Pascoe, P. J. (1995) Clinical applications of quantitative acid-base chemistry. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 9, 1-11.
- Wilke, K., Martin, A., Terstegen, L. e Biel, S. S. (2007) A short history of sweat gland biology. *International Journal of Cosmetic Science*, 29 (3), 169–179.
- Wolfenson, D., Sonogo, H., Bloch, A., Shaham-Albalancy, A., Kaim, M., Folman, Y. e Meidan, R. (2002) Seasonal differences in progesterone production by luteinized bovine thecal and granulosa cells. *Domestic Animal Endocrinology*, 22 (2), 81–90.
- Yáñez, O. P. V. e Rodríguez, A. G. (2006) Use of milk urea test as indicator of feeding dairy cows. *AFRIGA*, 65, 5pp
- Yousef, M. K. (1985) Basic Principles. *Stress Physiology in Livestock, Vol. 1*. Boca Raton, Flórida, CRC Press.
- Zheng, P., Wang, Y., Chen, L., Yang, D., Meng, H., Zhou, D., Zhong, J., Lei, Y., Melgiri, N. D. e Xie, P. (2013) Identification and validation of urinary metabolite biomarkers for major depressive disorder. *Molecular e Cellular Proteomics*, 12 (1), 207–214.
- Zimbelman, R. B., Rhoads, R. P., Rhoads, M. L., Duff, G. C., Baumgard, L. H. e Collier, R. J. (2009) A re-evaluation of the impact of temperature humidity index (THI) and black globe humidity index (BGHI) on milk production in high producing dairy cows. In: *Proceedings of the Southwest Nutrition Conference*. Tempe, Arizona. pp. 158–169.
- Zucchelli, G. C., Pilo, A., Masini, S., Chiesa, M. R. e Prontera, C. (1990) A new chemiluminescence immunoassay for triiodothyronine and thyroxine: evaluation using quality control sera assayed in an interlaboratory survey. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, 28 (4), 193-197.