



**UNIVERSIDADE DE ÉVORA**

**ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**

DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

**Histofisiologia das Glândulas Sudoríparas  
em Vacas Leiteiras face à Aclimação  
Sazonal**

**Catarina Fernandes Marques de Matos**

Orientação:

Professor Doutor Fernando Capela e Silva

Professor Doutor Alfredo Manuel Franco  
Pereira

**Mestrado em Engenharia Zootécnica**

Dissertação

Évora, 2015



**UNIVERSIDADE DE ÉVORA**

**ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**

DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

**Histofisiologia das Glândulas Sudoríparas  
em Vacas Leiteiras face à Aclimação  
Sazonal**

**Catarina Fernandes Marques de Matos**

Orientação:

Professor Doutor Fernando Capela e Silva

Professor Doutor Alfredo Manuel Franco

Pereira

**Mestrado em Engenharia Zootécnica**

Dissertação

Évora, 2015

***Para ti, guerreira e vencedora Avó Cinda.***



## **Agradecimentos**

É com muita satisfação que expresso aqui o meu mais profundo agradecimento a todos aqueles que tornaram possível a realização deste trabalho.

Gostaria ainda de agradecer ao Professor Doutor Fernando Capela e Silva por ter aceitado ser meu orientador, pelo apoio e disponibilidade demonstrada em todas as fases que levaram à concretização desta etapa.

Ao Professor Doutor Alfredo Pereira por ter sido sempre um símbolo de inspiração e sabedoria.

À Doutora Ana Geraldo por toda a ajuda no campo que deu origem a inúmeros aperfeiçoamentos a nível técnico e por toda a dedicação e preocupação.

À Professora Doutora Cristina Conceição, à Vânia Resende e ao Joaquim Velinho porque sem eles nada disto teria sido possível. Grata pela disponibilização da herdade, dos animais e de todo o apoio disponibilizado.

Ao Dr. João Fragoso pelo apoio prestado relativamente aos animais nas várias fases do ensaio.

À Professora Doutora Sandra Branco, responsável pelo Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital Veterinário da Universidade de Évora, pela disponibilidade na utilização dos recursos deste laboratório.

À Eng<sup>a</sup> Luísa Fialho, do Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital Veterinário da Universidade de Évora, por todo o trabalho prestado no contexto laboratorial.

Ao Professor Doutor Orlando Lopes e à Eng<sup>a</sup> Mónica Lima, do Departamento de Biologia da Universidade de Évora, pela disponibilidade e ajuda prestadas no campo de Imagem e Morfometria.

Ao Flávio, à Liliana e ao Ricardo, pelo espírito de equipa, pela troca de ideias e métodos de trabalho, mas acima de tudo, pela amizade e camaradagem.

À Susana Pequito e ao João Sobral por tornarem tudo mais risonho e pela força que me dão sempre.

Ao Muffin pelas vezes que me desafiava com a bola, achando que já era trabalho a mais.

Ao meu pai, pelo seu feitio especial e pela ajuda que me deu.

À minha mãe, uma salva de palmas pela sua bondade e por tudo o que representa para mim.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho possível.

*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 objetivos, caracterizar a pele e anexos de vacas Holstein Frísia em lactação e avaliar eventuais alterações face à aclimação sazonal. Foram realizados dois períodos de ensaio, de Inverno e de Verão. Em cada período, com a duração de 5 dias, foram recolhidas diariamente, em 10 vacas, às 8, 13 e 18h: a frequência respiratória, a temperatura retal e a taxa de sudação. Os dados meteorológicos foram obtidos antes de cada medição, através da aferição direta dos termómetros de Globo Negro no local das recolhas, localizados ao sol e à sombra. Em cada um dos períodos foram igualmente recolhidas amostras de pele, para avaliação histomorfométrica e expressão de HSP, actina e PCNA, e de pelos para determinação das características morfológicas. Não se observou stresse térmico e os resultados obtidos sugerem que os mecanismos fisiológicos foram ativados a partir dos 25°C e eficientes na dissipação de calor.

**Palavras-chave:** Vacas Holstein, Stresse térmico, pele, epiderme, glândulas sudoríparas, pelos, HSP70, Actina, PCNA

## **Title: Sweat Glands Histophysiology In Dairy Cows Face To Seasonal Acclimation**

### **Abstract**

This study aimed to characterize the skin and appendages of Holstein Friesian dairy cows and evaluate possible changes due to the seasonal acclimatization. There were two test periods, winter and summer. In each period, were collected daily, during five days in 10 cows at 8, 13 and 18h: respiratory rate, rectal temperature and the sweating rate. The meteorological data were obtained before each measurement by direct measurement of the Globe Black thermometers in sites of the collections, located in the sun and in the shade. In each period were also collected skin samples for histomorphometric evaluation and expression of HSP actin and PCNA, and hair samples to determine its morphological characteristics. There was no heat stress and the results suggest that the physiological mechanisms have been activated from the 25°C and they were efficient in heat dissipation.

**Keywords:** Holstein cows, Thermal stress, skin, epidermis, sweat glands, hair, HSP70, Actin, PCNA

# Índice

Agradecimentos .....	i
Resumo.....	iii
Abstract .....	iv
Lista de Abreviaturas.....	vii
Índice de tabelas .....	viii
Índice de figuras .....	ix
1. Introdução.....	1
1.1. Importância do conhecimento do grau de adaptabilidade dos animais ao ambiente térmico e o uso de biomarcadores .....	1
1.2. Objetivo Geral .....	2
1.3. Objetivos específicos.....	3
2. Revisão Bibliográfica .....	4
2.1. Influencia das variáveis climáticas nas respostas fisiológicas dos animais.....	4
2.2. Mecanismos Transferência de Calor .....	6
2.3. Conforto térmico.....	9
2.3.1. Termogénese.....	11
2.3.2. Termólise.....	12
2.4. Stresse térmico.....	13
2.4.1. Respostas fisiológicas .....	17
2.4.1.1. Temperatura Retal .....	17
2.4.1.2. Frequência Respiratória .....	18
2.4.1.3. Temperatura da Pele.....	19
2.4.1.4. Sudação .....	20
2.4.1.5. Proteínas de choque térmico .....	22
2.4.2. Termotolerância e Aclimação .....	27
2.5. Histofisiologia da pele e anexos como intermediários dos processos adaptativos e de termorregulação .....	29
2.5.1. A pele.....	29
2.5.2. Anexos da Pele .....	33
3. Materiais e Métodos .....	38
3.1. Ensaio .....	38
3.2. Animais.....	40
3.3. Delineamento Experimental .....	40

3.3.1.	Recolha de dados Meteorológicos: Temperatura do Globo Negro .....	40
3.3.2.	Recolha dos dados Fisiológicos: Frequência Respiratória e Temperatura Rectal	40
3.3.3.	Recolha dos dados Fisiológicos: Taxa de Sudação e Temperatura da Pele.....	41
3.3.4.	Recolha de pelos e de tecido cutâneo .....	42
3.4.	Análises laboratoriais e Biometria .....	43
3.4.1.	Comprimento, Diâmetro e Medulação dos Pelos .....	43
3.4.2.	Histologia.....	44
3.4.3.	Imuno-histoquímica .....	44
3.4.4.	Análise de Imagem e Morfometria .....	46
3.5.	Análise Estatística.....	48
4.	Resultados e Discussão .....	49
4.1.	Temperatura do Globo Negro .....	49
4.2.	Frequência Respiratória, Temperatura Rectal, Taxa de Sudação e Temperatura da Pele	50
4.3.	Características das Glândulas Sudoríparas.....	54
4.4.	Características da Pelagem: Comprimento, Diâmetro e Medulação .....	58
4.5.	Imuno-histoquímica .....	60
5.	Conclusão .....	65
6.	Bibliografia .....	67
7.	ANEXOS .....	77
	Anexo I: Dados recolhidos na Herdade das Pedras Alvas no período de verão.....	78
	Anexo II: Temperaturas do Globo Negro ao sol e à sombra (verão).....	79
	Anexo III: Dados recolhidos na Herdade das Pedras Alvas no período de inverno .....	80
	Anexo IV: Temperaturas do Globo Negro ao Sol e à Sombra (Inverno) .....	81
	Anexo V: Medição da Área e do Perímetro das Glândulas Sudoríparas, da distância ao epitélio e da Espessura da Epiderme (verão e inverno).....	82

## Lista de Abreviaturas

CCS:	Contagem de Células Somáticas
FR:	Frequência Respiratória
IMS	Ingestão de Matéria Seca
HSP:	<i>Heat Shock Proteins</i>
HSR:	<i>Heat Shock Response</i>
HSC:	<i>Heat Shock Cognates</i>
RPM:	Respirações por minuto
PCNA:	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PTEA:	Perda de Água Transepidérmica
TS:	Temperatura Superficial
Tar:	Temperatura do ar
TCI:	Temperatura Crítica Inferior
TCS:	Temperatura Crítica Superior
TCT:	Temperatura de Conforto Térmico
Tgn:	Temperatura do globo negro
TR:	Temperatura Rectal
TS:	Taxa de Sudação
THI:	Índice de Temperatura e Humidade

## Índice de tabelas

<b>Tabela 1.</b> Temperatura Crítica Inferior (TCI), Temperatura de Conforto (TC), Temperatura Crítica Superior (TCS) de algumas espécies.....	10
<b>Tabela 2.</b> Índice Temperatura-Humidade (THI) .....	16
<b>Tabela 3.</b> Sinais fisiológicos de stresse térmico e a sua associação com a diminuição da produtividade.....	17
<b>Tabela 4.</b> Condições que induzem a expressão das HSP .....	23
<b>Tabela 5.</b> Principais grupos de HSP .....	24
<b>Tabela 6.</b> Esquema de um período experimental .....	39
<b>Tabela 7.</b> Esquema do horário estabelecido para os diversos procedimentos diários .....	39
<b>Tabela 8.</b> Referências dos anti-corpos primários utilizados no presente trabalho .....	46
<b>Tabela 9.</b> Valores médios e desvio-padrão das Temperaturas de Globo Negro (°C) obtidos no presente estudo, por período e por medição .....	49
<b>Tabela 10.</b> Valores médios e desvio-padrão dos parâmetros fisiológicos obtidos no presente estudo, por período e por medição .....	51
<b>Tabela 11.</b> Resultados das medições histológicas a partir do programa SigmaScan Pro 5 .....	55
<b>Tabela 12.</b> Expressão do marcador HSP70 nas diferentes estruturas .....	60
<b>Tabela 13.</b> Expressão do marcador PCNA nas diferentes estruturas. ....	61
<b>Tabela 14.</b> Expressão do marcador Actina nas diferentes estruturas. ....	63

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Efeitos combinatórios das variáveis climáticas sobre o organismo dos animais.....	4
<b>Figura 2.</b> Trocas térmicas entre o animal e o ambiente .....	8
<b>Figura 3.</b> Esquema simplificado do processo de termorregulação .....	10
<b>Figura 4.</b> Componentes da termogénese e da termólise.....	11
<b>Figura 5.</b> Mecanismo de aumento das HSPs induzidas por stresse .....	25
<b>Figura 6.</b> Estruturas cutâneas.....	30
<b>Figura 7.</b> Representação celular da epiderme .....	31
<b>Figura 8.</b> Representação microscópica das glândulas sudoríparas apócrinas (lado esquerdo) e das glândulas sudoríparas écrinas (lado direito).....	34
<b>Figura 9.</b> Fotografia GPS da Herdade das Pedras Alvas .....	38
<b>Figura 10.</b> Medição da temperatura rectal em tempo real .....	41
<b>Figura 11.</b> VapoMeter (Delfin Technology, Kuopio, Finland).....	41
<b>Figura 12.</b> Medição da taxa de sudação e temperatura da pele em tempo real.....	42
<b>Figura 13.</b> Realização da biópsia em tempo real .....	43
<b>Figura 14.</b> Medição da espessura da epiderme, sendo o valor para cada animal a média de cinco medições .....	46
<b>Figura 15.</b> Medição da distância das glândulas sudoríparas à epiderme, sendo o valor para cada animal a média de dez medições .....	47
<b>Figura 16.</b> Medição do perímetro e da área das secções das glândulas sudoríparas, sendo o valor para cada animal a média de dez medições .....	47
<b>Figura 17.</b> Medição do comprimento dos pelos e utilização da régua micrométrica para medição do diâmetro.....	48
<b>Figura 18.</b> Variação dos valores médios da temperatura da pele (°C) e temperatura rectal (°C) no presente estudo .....	51
<b>Figura 19.</b> Variação dos valores médios da temperatura rectal (°C) e da frequência respiratória (RPM) no presente estudo .....	52
<b>Figura 20.</b> Variação dos valores médios da taxa de sudação nos dois períodos de ensaio.....	53
<b>Figura 21.</b> Utilização das vias de termólise .....	54
<b>Figura 22.</b> Esquema das médias do perímetro das glândulas sudoríparas nos dois períodos de ensaio .....	55
<b>Figura 23.</b> Esquema das médias da área das glândulas sudoríparas nos dois períodos de ensaio .....	56
<b>Figura 24.</b> Esquema das médias da espessura da epiderme nos dois períodos de ensaio.....	57

<b>Figura 25.</b> Representação esquemática das médias da distância das glândulas sudoríparas à epiderme nos dois períodos de ensaio .....	57
<b>Figura 26.</b> Valores médios (%) de pelos não medulados, fragmentados e medulados nos dois períodos do presente estudo .....	60
<b>Figura 27.</b> Expressão da HSP, evidenciada pela cor castanha (25X) .....	61
<b>Figura 28.</b> Expressão do PCNA, evidenciada pela cor castanha (25X) .....	62
<b>Figura 29.</b> Expressão da Actina no músculo erector do pelo (IV), evidenciada pela cor castanha (25X) .....	64

## 1. Introdução

### 1.1. Importância do conhecimento do grau de adaptabilidade dos animais ao ambiente térmico e o uso de biomarcadores

Ao longo dos tempos, as mudanças climáticas têm sido identificadas como uma das maiores ameaças ambientais, sociais e económicas para o planeta e para o Homem. O aumento de eventos climáticos extremos, como secas prolongadas, temperaturas ambientais extremas ou períodos de precipitação intensos têm efeitos sobre os sistemas de produção animal. As culturas e consequentemente a produção de forragem estão comprometidas, o risco de novas doenças aumenta e a produção animal é afetada, nomeadamente, no crescimento, desempenho reprodutivo, metabolismo e eficiência da resposta imune.

A comercialização e a evolução tecnológica no sector leiteiro têm evoluído exponencialmente com a grande procura de leite e produtos lácteos. Através da seleção genética e do cumprimento das normas de sanidade e de bem-estar animal, são cada vez mais os animais de alta produtividade que são suscetíveis ao stresse ambiental. A interação entre a genética de um indivíduo e o meio ambiente é fundamental para a determinação do estado de saúde do animal. Em virtude da realidade económica mundial, numa perspetiva de rentabilidade e de autossustentação, o produtor adota estratégias mais adaptadas e modernas, implicando não somente o melhoramento genético como também a alimentação, visando o máximo conforto para os animais que estão em produção (Perissinotto, 2007). Neste sentido, o desenvolvimento de sistemas de produção animal, em conjunto com a melhoria do conhecimento do impacto ambiental na produção e no bem-estar animal, é crucial para aumentar a inovação, sustentabilidade e produtividade na pecuária.

O baixo desempenho produtivo em vacas leiteiras está intimamente associado a elevadas temperaturas e o conjunto destes acontecimentos tem sido estudado desde há muitos anos, por vários autores (Armstrong, 1994; West, 1999; Collier *et al.*, 2006). A temperatura ambiente quando atinge níveis extremos tem um impacto importante sobre o metabolismo energético. Isto implica que animais que apresentem maior versatilidade fisiológica sejam melhor adaptados, e, portanto, mais produtivos e menos suscetíveis ao stresse térmico.

É necessário obterem-se sistemas de produção que minimizem os efeitos das alterações climáticas com o objetivo de melhorar a capacidade de o animal lidar com o stresse ambiental. Atualmente sabe-se que o bem-estar animal e o conforto térmico influenciam diretamente a produção leiteira. Perante esta realidade, surge a necessidade de perceber as relações existentes entre os elementos climáticos e a fisiologia animal, tendo como objetivo o bom desempenho de acordo com o potencial genético (Titto, 1998).

Existem diversos indicadores para caracterizar o conforto e o bem-estar animal, incluindo a observação criteriosa das respostas comportamentais e fisiológicas ao stresse térmico. A existência de biomarcadores que permitam identificar os níveis de stresse e/ou aclimação térmica são valiosos no processo de seleção dos animais melhor adaptados para cada condição ambiental. Estes devem ser obtidos a partir de amostras de fácil acesso, de preferência não invasivos ou minimamente invasivos, como a saliva, suor, leite, pelos e fezes. Hoje em dia, o fluido mais frequentemente utilizado no estudo dos biomarcadores é o sangue/plasma, no entanto, este tem tendência crescente para ser substituído.

## **1.2. Objetivo Geral**

As adaptações às variações de temperatura estão intimamente associadas com a histofisiologia da pele e dos seus anexos. A circulação sanguínea desempenha um papel fundamental na termorregulação (Kellogg, 2006). Durante as situações de stresse térmico verifica-se vasodilatação cutânea através de combinações de mecanismos neurais e efeitos locais de temperaturas elevadas nos próprios vasos da pele (Kellogg, 2006).

Outro processo importante na perda de calor no controlo da temperatura interna do corpo em ambientes quentes é a evaporação do suor. Aumentos na transpiração podem ser devidos a um aumento na densidade de glândulas sudoríparas ativadas, a um aumento na saída de suor por glândula, ou a uma combinação de ambos os fatores. Para além da densidade e da função das glândulas, a cor da pele, a densidade, a espessura, a cor e o comprimento dos pelos são outros fatores que têm efeito na eficácia da perda de calor por evaporação.

As respostas fisiológicas e morfológicas referidas traduzem adaptações a nível celular que podem incluir fenómenos como proliferação e morte celular e expressão de determinadas proteínas, designadamente as denominadas proteínas de choque térmico (HSP).

No que diz respeito à produção de bovinos e aos aspetos relacionados com a tolerância ao calor, existem poucos estudos publicados para Portugal. Deste modo, e considerando os dados atrás referidos, pretende-se com o presente trabalho apresentar o estado da arte sobre as respostas de animais em produção ao stresse térmico e a sua capacidade de aclimação, mais concretamente avaliar a histofisiologia da pele e seus anexos em vacas leiteiras face à aclimação sazonal.

### **1.3. Objetivos específicos**

#### ***I. Conhecer***

- a. A influência da temperatura nos mecanismos de termorregulação.
- b. Mecanismos de permuta de calor entre o animal e o ambiente.
- c. Respostas fisiológicas e adaptativas ao stresse térmico.

#### ***II. Determinar***

- a. A taxa de sudação de vacas leiteiras com a utilização do vapómetro.
- b. A morfologia das glândulas sudoríparas (Área, Perímetro, Distância à Epiderme) nas diferentes estações do ano (Verão e Inverno).
- c. A expressão de marcadores (HSP, Actina e PCNA) nas diferentes estruturas da pele e que eventualmente possam estar associados aos mecanismos adaptativos referidos.

#### ***III. Compreender***

- a. A atividade das glândulas sudoríparas e o comportamento da pelagem no Inverno e no Verão.
- b. A expressão dos diferentes marcadores estudados no Verão e no Inverno.

#### ***IV. Valorizar***

- a. A utilização de marcadores como ferramentas de seleção dos animais.
- b. A prática de métodos não invasivos ou minimamente invasivos.
- c. Métodos de modificação do ambiente para aumentar as perdas de calor e melhorar a produtividade de grupos de animais que possam estar em condições de stresse térmico.
- d. A transposição de resultados ao nível da experimentação animal para casuísticas biomédicas.

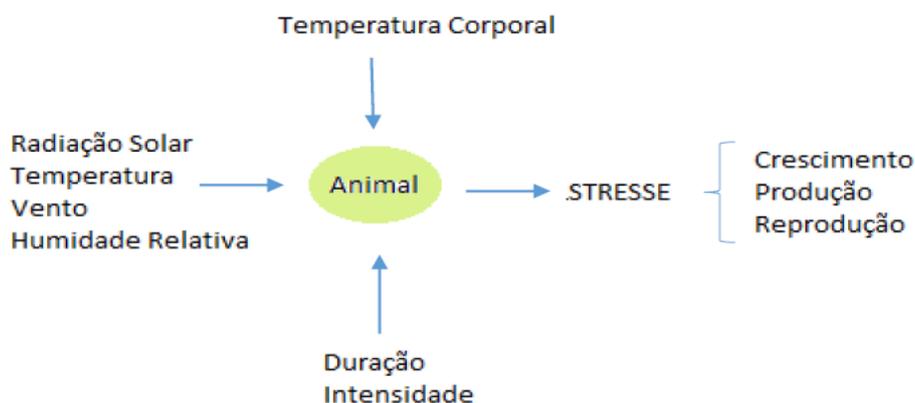
## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1. Influência das variáveis climáticas nas respostas fisiológicas dos animais

Acredita-se que a expansão das atividades industriais nas últimas décadas tenha contribuído significativamente para a alteração do clima da Terra. O aumento das concentrações dos gases dióxido de carbono, metano e óxido nitroso na atmosfera, é um dos fatores responsáveis pela ocorrência de eventos climáticos extremos, aumento da temperatura global, do nível dos oceanos e intensificação da variabilidade espacial e da magnitude dos valores de precipitação. Com base no relatório do Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) as alterações da concentração de CO<sub>2</sub> devem ser atribuídas ao uso de combustíveis fósseis, enquanto as concentrações de metano e de óxido nitroso estão relacionadas com expansão das atividades agropecuárias (IPCC, 2007).

O clima tem uma grande influência nas características do solo, na produção, na diversidade e qualidade das gramíneas e leguminosas, e conseqüentemente, no desempenho produtivo dos animais. A produção de leite é um dos setores mais sensíveis às variações do clima, desempenhando grande importância, na medida em que é uma atividade de movimentação de capital e de geração de empregos (Damasceno *et al.*, 2010).

O ambiente térmico a que um animal pode estar sujeito é muito variável. As variáveis climáticas constituem um conjunto de fenômenos que afetam, direta ou indiretamente, o organismo animal e dependendo da intensidade, do tempo em que atuam e das interações que estabelecem entre si podem originar diversas reações metabólicas (Vilela, 2008). Desta forma, o crescimento, reprodução e níveis produtivos podem ser influenciados por um conjunto de fatores extrínsecos e intrínsecos ao animal (Figura 1).



**Figura 1.** Efeitos combinatórios das variáveis climáticas sobre o organismo dos animais (Adaptado de Vilela, 2008)

A radiação é a principal fonte de calor no meio ambiente e constitui uma energia eletromagnética de várias origens, estando intimamente relacionada com a temperatura ambiente e por este motivo, é imprescindível e crucial para a determinação do conforto térmico. Está diretamente relacionada com a temperatura radiante medida pelo globo negro que discrimina a sensação térmica percebida pelos animais, influenciando igualmente o comportamento e o metabolismo. O aumento do armazenamento do calor corporal, associado a temperaturas elevadas e à radiação solar direta, promove o aumento dos batimentos cardíacos, da frequência respiratória, da taxa de sudação e da temperatura retal. A mudança destas características fisiológicas tem o objetivo de dissipar o calor metabólico e promover a refrigeração do organismo, mantendo a temperatura corporal em níveis toleráveis (Muller, 1989).

A radiação solar, dependendo da intensidade e duração em que os animais estejam submetidos, pode desencadear respostas fisiológicas e comportamentais relevantes, designadamente no aumento da temperatura corporal, frequência respiratória, batimentos cardíacos, taxa de sudação e procura de sombra. Essa energia radiante ao atingir o animal é convertida em energia calorífica que tende a promover o aumento da temperatura corporal. A capacidade em manter estável a temperatura corporal, ou seja, a tolerância ao calor está dependente de certas características anatómicas como o tipo de pelagem e a cor da pele. Quando não são fornecidos meios de proteção ambiental tal como o sombreamento de pastagens e/ou fontes de água para o banho, verificam-se maiores reduções ao nível do potencial produtivo (Damasceno *et al.*, 2010).

A direção e a velocidade do vento também podem ter influência nas temperaturas observadas ao nível experimental, no sentido em que este tem uma importante ação na perda de calor por convecção, desde que a temperatura do ar seja menor que a temperatura superficial do animal. Quando a humidade é elevada o vento promove um aumento da velocidade da evaporação do suor na pele, aumentando a perda de calor por evaporação. Desta forma, a sensação térmica percebida pelo animal está diretamente relacionada com o vento, a humidade e a radiação (Almeida, 2010).

A identificação de ambientes térmicos desfavoráveis pressupõe a existência de uma gama de temperaturas mais adequadas à sobrevivência e ao bem-estar dos animais. As alterações na temperatura retal e na frequência respiratória têm sido os dois parâmetros mais utilizados na avaliação do conforto animal e adaptabilidade a ambientes adversos, ou como medida da eficácia de modificações ambientais. O aumento da humidade relativa ou da radiação solar direta, determinam o aumento da frequência respiratória. Em bovinos de climas temperados sujeitos a temperaturas ambientais entre 15 e 20°C, verifica-se que a 15°C a

frequência respiratória aumenta em 3 mov./min por cada aumento de 1°C, enquanto a 25°C o aumento é de 6 mov./min (Pereira, 2004).

O conceito de zona de termoneutralidade reúne um conjunto de condições climáticas ótimas para um eficiente desempenho produtivo, no entanto, utiliza apenas a temperatura do ar como variável de referência. Com o desenvolvimento tecnológico da bioclimatologia alguns índices são considerados na definição dos limites das condições ambientais ideais e são calculados incorporando outros fatores climáticos como a humidade do ar, radiação, ventos, etc.; o Índice de Temperatura do Globo e Humidade, a Carga Térmica de Radiação e Índice de Temperatura e Humidade. Estes índices têm o principal objetivo de avaliar os impactos das mudanças climáticas no bem-estar animal ainda que sejam precisos estudos mais detalhados acerca da fiabilidade deste tipo de avaliação, principalmente, no que respeita à precisão dos valores da humidade relativa do ar. Silva & Maia (2011) propõem a utilização de um modelo estatístico com consistência física que possibilite o conhecimento das possíveis mudanças climáticas sobre os valores normais da humidade relativa do ar.

A produção leiteira pode ser afetada direta e indiretamente pelas mudanças climáticas. Os fatores indiretos estão associados à redução da disponibilidade e ao aumento dos preços dos alimentos; às alterações na distribuição de pragas e doenças e à diminuição da produção e qualidade de plantas forrageiras (Sirohi & Michaelowa, 2007). Por outro lado, as mudanças climáticas podem intensificar o stress térmico decorrente de alterações no balanço de energia térmica entre o animal e o ambiente, influenciado por fatores ambientais (radiação, temperatura, humidade relativa e velocidade do vento) e mecanismos de termorregulação (condução, radiação, convecção e evaporação). Qualquer alteração destes fatores pode modificar a zona de termoneutralidade e provocar desconforto no animal (Sirohi & Michaelowa, 2007).

## 2.2. Mecanismos Transferência de Calor

Existem quatro mecanismos primários de transferência de calor: radiação, convecção, condução e evaporação. A quantidade de calor armazenado em bovinos leiteiros apresentará a seguinte fórmula:

$$M - P = (\pm) R (\pm) Cd (\pm) Cv + E \text{ (McConaghy, 1996)}$$

Onde:

M= Calor metabólico produzido (J/L);

P= Produção (L);

R= Troca de calor por radiação (J);

Cd= Troca de calor por condução (J);

$C_v$  = Troca de calor por convecção (J);

$E$  = Perda de calor por Evaporação (J).

A troca de calor entre superfícies que estão em contacto direto é feita através da condução. O gradiente de energia entre corpos dependerá da diferença de temperatura dos mesmos. Este mecanismo, através do contacto direto dos tecidos, permite a passagem de calor do núcleo central do organismo (coração) até à superfície corporal (epiderme) sendo responsável pela passagem de calor da superfície da pele para o meio (Silva, 2000). Uma forma de permuta de calor que pode desempenhar um papel importante no balanço térmico do animal é a transferência de massa que ocorre quando o animal ingere alimento ou água. Vários autores confirmaram perdas apreciáveis de calor quando os animais ingerem uma determinada massa de alimento ou de água a uma temperatura suficientemente afastada da respetiva temperatura nuclear (Pereira, 2004).

A transferência de calor por convecção é um mecanismo de troca de calor entre fluidos como resultado de uma mistura de partículas com diferentes temperaturas. O ar, que possui um baixo calor específico, entra em contacto com a epiderme e é aquecido rapidamente. Como o ar quente é menos denso, sobe e é substituído por ar mais frio, causando pequenas correntes convectivas próximas da superfície da pele, mantendo um gradiente de temperatura entre a pele e o ar (Hardy, 1981).

A radiação constitui uma forma sensível de troca de calor através de ondas eletromagnéticas entre dois corpos que se encontram sob diferentes temperaturas (Nããs, 1989). A quantidade de radiação emitida depende da natureza do material, da emissividade do corpo, da constituição física e da temperatura absoluta da superfície emissora. O balanço térmico entre o animal e o meio ambiente depende dos tipos de exposição do animal à radiação, que pode chegar ao animal através de duas formas: radiação solar direta, através da pelagem (50% a 70% num ambiente aberto) e radiação solar difusa, por retransmissão do calor radiante (Silva, 2000).

A quantificação das trocas térmicas radiantes não é simples e com as modificações sucessivas na carga radiante, surgem limitações relativamente ao modelo matemático a usar. Além do espectro solar de energia que o corpo do animal intercepta, existe uma percentagem de energia difusa que atinge o animal, provindo da atmosfera. Também o vapor de água, CO<sub>2</sub> e o ozono absorvem energia solar sob forma de radiação e emitem-na para a superfície terrestre e conseqüentemente para o animal exposto. A magnitude dessa carga vai depender da área exposta, época do dia ou do ano, cor da pelagem e refletividade do solo. As pelagens claras vão refletir mais energia solar relativamente às pelagens escuras, no entanto, uma parcela de energia é transmitida para o extrato córneo, localizado na epiderme, penetrando nas camadas

mais profundas das pelagens mais claras. Por sua vez parte desse calor será novamente transmitido para o ambiente, visto que parte do espectro de ondas é constituído por ondas longas, que são independentes da cor. Algumas perdas por convecção que acontecem na própria pelagem e a diferença entre o calor absorvido e transmitido por convecção e radiação para o ambiente constituem larga influência na termorregulação e consequentemente na produção animal (Nããs, 1989).

A Figura 2 apresenta os mecanismos que envolvem os fluxos de calor entre o animal e o meio ambiente.

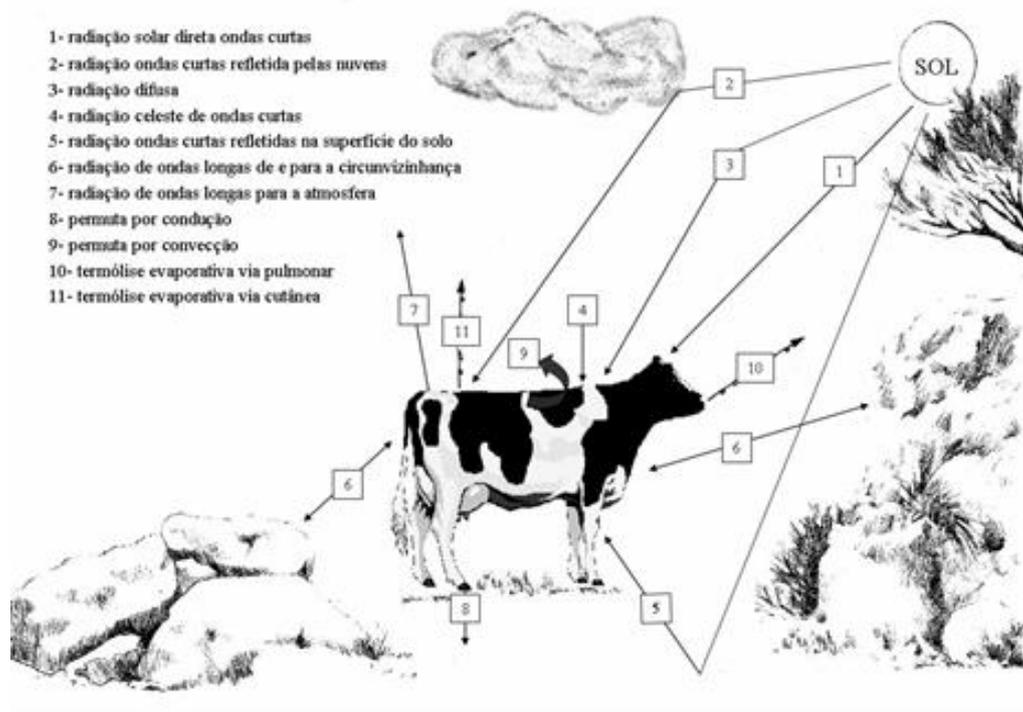


Figura 2. Trocas térmicas entre o animal e o ambiente (Adaptado de Pereira, 2004)

O aumento da temperatura ambiente dificulta a dissipação de calor na forma sensível, sendo necessária a ativação de outros mecanismos na forma latente, como o aumento da sudação e da frequência respiratória.

Silva (2000) assegura que a superfície externa do corpo representa a principal fronteira entre organismo e ambiente, sendo a outra parte constituída pelos tecidos pulmonares e respiratórios. A energia térmica procedente do interior do corpo pode ser transferida através da superfície corporal dos animais através de (Collier *et al.*, 2006):

- Condução, através dos tecidos superficiais, dérmicos e epidérmicos;
- Condução ao longo das estruturas da camada externa (pelos, lã ou penas);
- Condução através do ar e do vapor que permeiam os espaços entre as estruturas da camada externa;

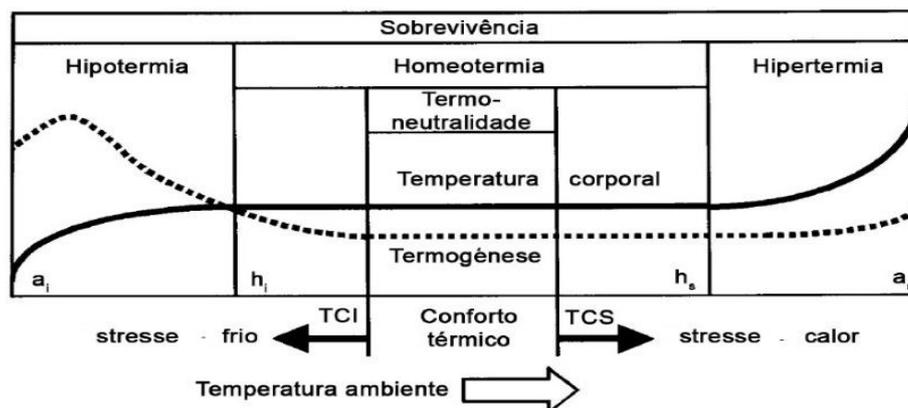
- Convecção natural ou forçada;
- Evaporação da humidade cutânea;
- Radiação.

A energia térmica produzida pelas reações metabólicas aquece os tecidos internos a uma temperatura, geralmente estimada pela temperatura retal. Essa energia tende a passar para a superfície da epiderme por condução através dos tecidos e do sangue que irriga a superfície. Ao atingir a epiderme, essa energia é reduzida e obtém-se a temperatura da superfície cutânea. Quando uma superfície está húmida, a energia térmica nela existente é utilizada para a evaporação da água, que ocorre à temperatura da superfície e consequentemente, há uma diminuição desta temperatura. Este fenómeno é denominado de calor latente. A eficiência dessa transferência de energia depende da temperatura da superfície, temperatura do ar e quantidade de vapor de água na atmosfera. Quanto mais alta a temperatura do ar, maior a quantidade de vapor de água que esta pode absorver. Por outro lado, quanto mais elevada for a temperatura da superfície, maior será a quantidade de vapor produzida e maior a eliminação de calor latente, porém está sempre dependente da percentagem de humidade do ar. Portanto, considerando que a transferência térmica por evaporação não depende do gradiente térmico, mas da temperatura da superfície e da humidade da atmosfera, esta torna-se o mecanismo mais eficiente de eliminação de calor corporal em condições de elevada temperatura. Os mecanismos de convecção, condução e radiação dependem do gradiente de temperatura entre a superfície e a atmosfera. Quando a temperatura ambiente é elevada e mais próxima da temperatura corporal a eliminação de calor sensível é cada vez menor até atribuir o valor zero (Souza *et al.*, 2010).

### **2.3. Conforto térmico**

Os bovinos são animais homeotérmicos, ou seja, apresentam temperatura corporal constante dentro de certos limites independentemente da temperatura do meio ambiente (Takahashi *et al.*, 2009). A zona de termoneutralidade, também conhecida como conforto térmico, é determinada pela faixa de temperatura efetiva ambiental, onde o animal mantém constante a sua temperatura corporal sem acionar mecanismos de termorregulação que originem gasto de energia. Nestas condições, desde que a alimentação esteja adequada às suas necessidades, o animal tem condições para apresentar o seu máximo desempenho produtivo de acordo com o seu potencial genético (Baêta & Souza, 1997).

A temperatura é considerada um fator limitante na vida dos organismos na medida em que condiciona a sua sobrevivência e a identificação de ambientes desfavoráveis sugere que esta só é garantida dentro de determinados valores (Figura 3).



**Figura 3.** Esquema simplificado do processo de termorregulação (Adaptado de Silva, 2000)

Na literatura, existe grande variação no que respeita às temperaturas que delimitam a zona de termoneutralidade. Na verdade, o conforto térmico deve ser encarado como um conceito individual e relativo porque vai estar sempre dependente da fase de crescimento do animal, da sua condição corporal, da disponibilidade e qualidade da dieta, nível produtivo, condições de alojamento e grau de aclimação (Jessen, 2001).

Os bovinos apresentam determinadas funções fisiológicas (frequência respiratória e taxa de sudação), destinadas a manter a temperatura corporal constante. A zona de termoneutralidade tem como limites a Temperatura Crítica Inferior (TCI) e a Temperatura Crítica Superior (TCS). Abaixo da Temperatura Crítica Inferior, o animal entra em stresse pelo frio e torna-se indispensável o aumento da termogênese e acima da Temperatura Crítica Superior (TCS), o animal sofre stresse pelo calor e a termólise toma a sua importância. Em ambas as situações, será utilizada a energia de manutenção para gerar ou dissipar calor interno, diminuindo a energia que seria utilizada para a produção e/ou reprodução (Yousef, 1985).

Na tabela 1, são apresentados alguns valores de temperatura crítica inferior, superior e de conforto térmico para algumas espécies.

**Tabela 1.** Temperatura Crítica Inferior (TCI), Temperatura de Conforto (TC), Temperatura Crítica Superior (TCS) de algumas espécies (Adaptado de Hafez, 1973)

Animal Adulto	TCI (°C)	TC (°C)	TCS (°C)
Ovelha	-20	[15 – 30]	35
Galinha	15	[18 – 28]	32
Vaca Holstein Frísia	-10	[-1 – 16]	27
Bovino Indiano	0	[10 – 27]	35
Coelho	10	[15 – 25]	30
Caprino	-20	[20 – 30]	34

Trabalhos realizados em várias partes do mundo constataram que a zona de conforto térmico dos bovinos leiteiros da raça Holstein Frísia se encontra em temperaturas ambiente que variam de 0°C a 20°C. Em determinadas condições, em torno de 21°C, podem desencadear stress fisiológico e em torno de 27°C, passam a utilizar as vias respiratórias e temperatura retal para eliminar o excesso de calor (Guimarães *et al.*, 2001).

Dentro da zona de termoneutralidade o animal realiza apenas pequenos reajustes na sua condutância com vista a variar a velocidade do fluxo centrífugo de calor e a equilibrar a termogénese e a termólise. Como já referido, estes mecanismos de manutenção do balanço térmico podem ser divididos em duas categorias: sensível ou latente. A permuta de calor sensível ocorre através da radiação, convecção e condução onde existe um gradiente térmico entre o animal e o meio ambiente. Quanto maior o gradiente térmico entre a superfície do animal e o meio, maior é a capacidade de dissipação de calor do animal. À medida que esse gradiente diminui ocorre uma redução na perda de calor da forma sensível e aumenta através da forma latente (Souza & Marinho, 2003). A permuta de calor latente inclui a perda de calor por evaporação de água através das vias respiratórias e da sudação. Para dissipar ou reter calor o animal utiliza mecanismos fisiológicos e comportamentais que contribuem para a manutenção da homeotermia (Figura 4).

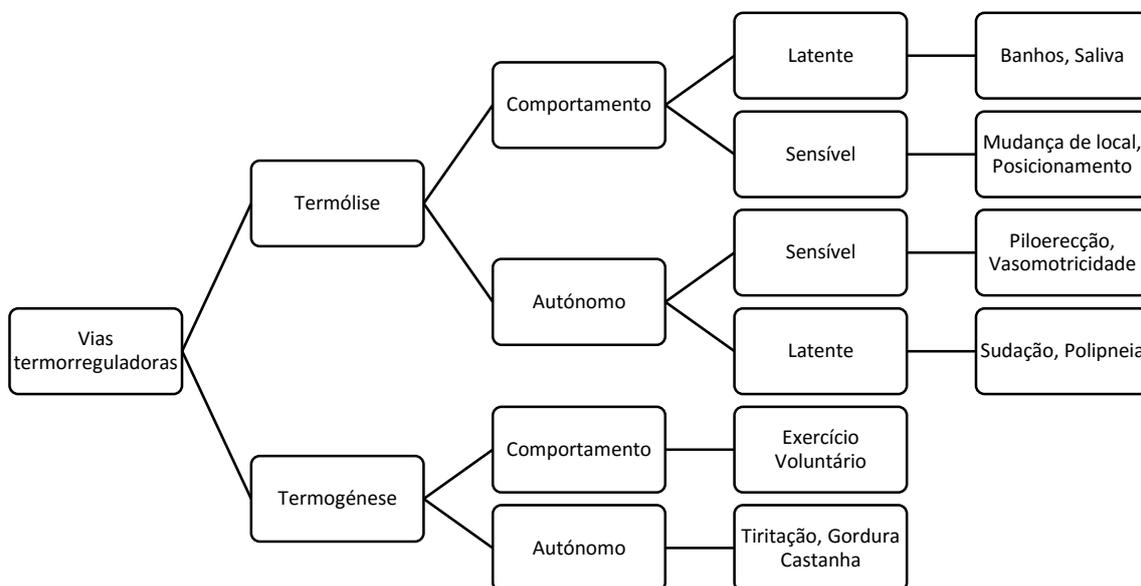


Figura 4. Componentes da termogénese e da termólise (Adaptado de Bligh, 1998)

### 2.3.1. Termogénese

Quando a temperatura se encontra abaixo da Temperatura Crítica Inferior, a vaca leiteira ativa os seus mecanismos de termorregulação para manter constante a sua temperatura

corporal e mesmo a temperaturas em torno de 0º, consegue manter-se termicamente confortável, sem pôr em causa o seu nível produtivo. Já em temperaturas em torno de -10ºC, o aumento da ingestão de alimento não é suficiente, começando a observar-se os efeitos negativos sobre a produção de leite (Muller, 1989).

Nesta condição, é realizada a vasoconstrição periférica e uma eventual piloereção, acompanhados por um aumento da produção de calor endógeno adicional. Acentuam-se alterações etológicas, como o aumento da ingestão de alimentos e mudança de postura. Estas alterações juntamente com o aumento da atividade física e com o aumento da taxa metabólica conduzem a um ponto de metabolismo máximo e caso o fluxo de calor centrífugo se mantenha maior que a termogénese, então o animal entra em hipotermia (Baccari, 1989).

Nas condições climatéricas do nosso país não se verificam temperaturas que sejam capazes de afetar o nível produtivo dos animais uma vez que estes são capazes de compensar a diminuição da temperatura através da alimentação. Este aumento no consumo suplementa as necessidades energéticas dos animais que são forçados a gastar mais energia para manter constantes a temperatura corporal e o nível produtivo. Esta produção de calor provém da fermentação que ocorre no rúmen. Quando os animais passam por períodos prolongados de frio, além do aumento da ingestão de alimentos, verifica-se um aumento da concentração das hormonas da tiroide e conseqüentemente da taxa metabólica (Muller, 1989).

### **2.3.2. Termólise**

Em ambientes quentes, a eficácia com que um animal dissipa calor é fundamental para a manutenção da sua produtividade. O aumento da temperatura ambiente determina uma redução do gradiente térmico que se repercute na maior dificuldade em dissipar calor metabólico por via sensível. Quando a temperatura ambiente se encontra acima da zona de termoneutralidade são acionados certos mecanismos para contrariar esta tendência, como a vasodilatação periférica e o aumento da frequência respiratória (mov./min-1) (Bianca, 1973).

Durante a vasodilatação periférica o maior volume sanguíneo presente à periferia encontra-se a uma temperatura mais próxima da temperatura do núcleo do corpo, devido à redução das permutas de calor por contracorrente. O aumento da temperatura cutânea permite criar condições mais favoráveis para a dissipação de calor por convecção e por radiação, a curto prazo. A manutenção desta situação conduz à redução da ingestão de alimentos, ao aumento da ingestão de água e a certas alterações etológicas, como a mudança de postura e a procura por sombra (Pires, 1998).

O Hipotálamo como centro termorregulador dá início à termólise especialmente por via evaporativa, intensificando a sudação que é completada com o aumento da evaporação

respiratória através da polipneia térmica. Se estes mecanismos não forem suficientes para a perda de calor, a temperatura corporal aumentará e a homeostasia pode estar sob risco (Titto, 1998).

#### **2.4. Stresse térmico**

O clima é um dos fatores mais stressantes na bovinicultura. No verão, os níveis de stresse térmico constituem grandes desvantagens para os níveis de bem-estar e para a produtividade. Em climas mediterrâneos como o da Península Ibérica, a sazonalidade climática é destacada pela existência de verões intensos e rigorosos, onde as elevadas temperaturas interferem negativamente na produtividade dos animais provocando alguns episódios de stresse térmico. A compreensão aprofundada dos aspetos adaptativos, nomeadamente da tolerância ao calor, torna-se crucial para encontrar as soluções mais adequadas nestes contextos climáticos (Gaughan *et al.*, 2010).

Geralmente as situações de stresse penalizam a produtividade, no entanto, também permitem evidenciar a capacidade dos animais em ultrapassar as condicionantes negativas impostas pelo ambiente e destacar a sua capacidade adaptativa, nomeadamente nas componentes reprodutiva e produtiva (Muller, 1989).

Hans Selye (1975) foi o primeiro estudioso que tentou definir stresse atendendo à sua dimensão biológica. De acordo com este autor, o stresse é um elemento que induz modificações na estrutura e na composição química do corpo, as quais podem ser observadas e medidas. A partir desta definição Selye diferencia dois tipos de stresse: o *eustress* que indica a situação em que o organismo possui meios (físicos, psíquicos...) para lidar e ultrapassar determinada situação, e o *distress* ou esgotamento, que indica uma grande exigência orgânica relativamente aos meios que o organismo possui e que nem sempre são ultrapassáveis. Apesar de ainda ser usado em inglês, o termo *distress* caiu quase em desuso, sendo substituído pelo próprio termo stresse, que passou a ter o sentido (atual) negativo de desgaste físico e emocional (Rocha, 2008).

Mais tarde, Silva (2006) denominou estas duas variáveis do stresse classificando o *eustress* como o alerta, o estímulo, a ação e a reação do animal às mudanças que ocorrem no organismo e que podem culminar em resistência e conseqüentemente em adaptação. Referiu, ainda, que o organismo não tem a capacidade de fazer a distinção entre os dois tipos de stresse, sendo o tempo destas alterações o fator dominante sob o efeito negativo ou positivo do stresse.

Existem várias questões acerca dos efeitos prejudiciais do stresse térmico sobre os animais. Atualmente sabe-se que estes são predominantemente fisiológicos e neste sentido, com o objetivo de aperfeiçoar as respostas adaptativas dos animais para que possam expressar

o seu máximo potencial genético, torna-se imprescindível conhecer os limites fisiológicos da exposição dos animais a este tipo de stresse (Broom, 2002).

Entende-se stresse térmico por calor uma situação fisiológica que ocorre quando a temperatura corporal excede os seus limites fisiológicos normais, resultando numa carga total de calor (metabólico e do ambiente) que excede a capacidade de dissipação de calor do animal requerendo respostas fisiológicas e comportamentais. É importante salientar que o stresse térmico também pode variar na intensidade ou duração, condicionando as respostas dos animais. Perante uma mudança e permanência suficientemente prolongadas para um ambiente mais quente verificam-se alterações fisiológicas e anatómicas, cujo processo é designado por aclimação ou aclimatização. Desta forma as respostas dos animais variam de acordo com o tipo de desafio térmico destacando-se as alterações adaptativas de curto prazo das funções comportamentais, fisiológicas e imunológicas (orientadas para a sobrevivência, por exemplo, redução da ingestão) que são consideradas como respostas iniciais a eventos agudos; as alterações a longo prazo, estão relacionadas com o desempenho do animal (por exemplo, a redução da taxa metabólica afeta o crescimento e a reprodução) (Geraldo, 2013).

Os bovinos têm dois mecanismos principais para regular a temperatura corporal quando sujeitos a condições extremas:

- **Favorecendo a dispersão do calor**, em particular através da evaporação, aumentando a vasodilatação periférica, a respiração ofegante, etc. Estes mecanismos de regulação térmica aumentam as necessidades energéticas em 20% (no caso de uma temperatura ambiente de 35°C). No caso das vacas leiteiras isto quer dizer que parte da energia para a produção de leite é redirecionada para a regulação térmica;
- **Limitando a produção de calor**, reduzindo toda a sua atividade e alterando o seu comportamento alimentar. Na realidade, a produção de calor na vaca de leite deve-se principalmente às fermentações ruminais. A ingestão de matéria seca (IMS) pode diminuir 10 a 30%. Para além disso, o processo de ruminação que também produz calor, diminui drasticamente. Os animais tendem a comer menos durante o dia (mais vezes e menos quantidade) e mais durante a noite, quando a temperatura baixa. No entanto o seu comportamento alimentar nas horas de menor temperatura leva a problemas digestivos, pois comem mais depressa e escolhem os componentes da dieta que produzem menos calor durante a digestão, preferindo o concentrado à forragem (Martins, 2014).

Assim, em períodos de stresse térmico, o risco de acidose é maior, sendo os fatores que contribuem para a acidose ruminal os seguintes:

- Comportamento alimentar: os animais preferem comer em grandes quantidades ao amanhecer e ao entardecer.

- Diminuição da IMS com menor proporção de forragem e elevados níveis de concentrado.
- Diminuição das substâncias tampão naturais que os animais possuem devido a:
  - I. Diminuição da ruminação;
  - II. Menor quantidade de saliva a chegar ao rúmen, porque os animais “babam-se” (a saliva é uma importante fonte de bicarbonato);
  - III. Respiração ofegante, o que faz com que mais CO<sub>2</sub> seja expelido, fazendo com que o poder tampão da saliva diminua.

Para além disso, a diminuição do pH ruminal diminui a eficiência na degradação da fibra, porque as bactérias celulolíticas são as mais afetadas quando o pH ruminal diminui para valores inferiores a 6 (Martins, 2014).

O stresse térmico tem bastante impacto tanto na produtividade como na saúde da vaca leiteira. A curto prazo a consequência mais notada do stresse térmico é a redução da produção de leite. Como descrito anteriormente, o stresse térmico leva a uma diminuição da IMS e a um aumento das necessidades energéticas para regular a temperatura corporal do animal. A redução da produção de leite resulta de uma combinação de fatores que têm como base a falta de energia disponível para a produção de leite.

Estudos demonstram que a produção de leite nos meses de verão pode diminuir até 35%. A longo prazo o stresse térmico tem um impacto negativo nos sistemas imunitário e reprodutivo:

- Aumenta a frequência de mamites e a contagem de células somáticas (CCS).
- Diminui a fertilidade, aumenta a mortalidade embrionária, aumentam os casos de retenção placentária e partos prematuros, com consequências no peso vivo do vitelo, viabilidade e saúde (Marques, 2014).

Existe uma variedade de índices utilizados para estimar o grau de stresse térmico a que o animal está sujeito. O Índice Temperatura-Humidade (THI) (Tabela 2) que incorpora estas duas variáveis tem sido amplamente utilizado para verificar o impacto do stresse térmico em vacas leiteiras (Armstrong, 1994).

**Tabela 2.** Índice Temperatura-Humidade (THI) (Adaptado de Collier & Zimbelman, 2012)

Legenda: Amarelo (limiar do stresse); Laranja (stresse moderado); Vermelho (stresse severo)

Temperature		% Relative Humidity														
°F	°C	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70
72	22.0	64	65	65	65	66	66	67	67	67	68	68	69	69	69	70
73	23.0	65	65	66	66	66	67	67	68	68	68	69	69	70	70	71
74	23.5	65	66	66	67	67	67	68	68	69	69	70	70	70	71	71
75	24.0	66	66	67	67	68	68	68	69	69	70	70	71	71	72	72
76	24.5	66	67	67	68	68	69	69	70	70	71	71	72	72	73	73
77	25.0	67	67	68	68	69	69	70	70	71	71	72	72	73	73	74
78	25.5	67	68	68	69	69	70	70	71	71	72	73	73	74	74	75
79	26.0	67	68	69	69	70	70	71	71	72	73	73	74	74	75	76
80	26.5	68	69	69	70	70	71	72	72	73	73	74	75	75	76	76
81	27.0	68	69	70	70	71	72	72	73	73	74	75	75	76	77	77
82	28.0	69	69	70	71	71	72	73	73	74	75	75	76	77	77	78
83	28.5	69	70	71	71	72	73	73	74	75	75	76	77	78	78	79
84	29.0	70	70	71	72	73	73	74	75	75	76	77	78	78	79	80
85	29.5	70	71	72	72	73	74	75	75	76	77	78	78	79	80	81
86	30.0	71	71	72	73	74	74	75	76	77	78	78	79	80	81	81
87	30.5	71	72	73	73	74	75	76	77	77	78	79	80	81	81	82
88	31.0	72	72	73	74	75	76	76	77	78	79	80	81	81	82	83
89	31.5	72	73	74	75	75	76	77	78	79	80	80	81	82	83	84
90	32.0	72	73	74	75	76	77	78	79	79	80	81	82	83	84	85
91	33.0	73	74	75	76	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86
92	33.5	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	85	86
93	34.0	74	75	76	77	78	79	80	80	81	82	83	85	85	86	87
94	34.5	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	86	86	87	88
95	35.0	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89

A suscetibilidade das vacas leiteiras ao stresse térmico e as elevadas temperaturas e humidades relativas constituem um grande obstáculo à termorregulação, com efeito negativo sobre o desempenho produtivo. A recolha do índice THI diário constitui uma boa ferramenta para calcular o efeito do stresse térmico em bovinos de leite (García-Ispierto *et al.*, 2007).

Um índice THI de 68 unidades é considerado o limite da zona de conforto em vacas leiteiras e o início do stresse térmico, no entanto a taxa de conceção apenas é afetada com valores superiores a 72 (Zimbelman & Collier, 2011). Uma vaca sujeita a um stresse térmico moderado apresenta sinais visíveis, tais como (Zimbelman & Collier, 2011):

- Respiração rápida e superficial;
- Diminuição da atividade;
- Diminuição de 10% da produção de leite;
- Diminuição da ingestão de alimento.

Em situações mais graves podem-se observar:

- Boca aberta com a língua de fora;
- Respiração ofegante;
- Diminuição de 30% na produção de leite (Zimbelman & Collier, 2011).

A tabela 3 resume alguns sinais fisiológicos de stresse térmico e a sua associação com a diminuição da produtividade em vacas leiteiras.

**Tabela 3.** Sinais fisiológicos de stresse térmico e a sua associação com a diminuição da produtividade (Adaptado de Martins, 2014)

Nível de stresse	Frequência Respiratória	Temperatura Rectal	Perda de Produtividade
<b>Limiar de stresse</b> THI=[68-71]	> 60 RPM	>38,5°C	-0,283Kg/h
<b>Stresse moderado</b> THI=[72-79]	> 75 RPM	>39,0°C	- 0,303Kg/h
<b>Stresse severo</b> THI=[80-89]	> 85 RPM	>40,0°C	-0,322Kg/h
<b>Stresse extremo</b> THI=[90-99]	>120 RPM	>41,0°C	Não medido.

### 2.4.1. Respostas fisiológicas

Os efeitos do ambiente térmico sobre as variáveis fisiológicas Temperatura Retal (TR), Temperatura Superficial (TS) e Frequência Respiratória (FR), têm sido alvo de vários estudos em animais em lactação, com o fim de caracterizar o stresse térmico ou a adaptação dos animais (Almeida, 2010).

Para Abi Saab & Sleiman (1995) a frequência respiratória, frequência cardíaca e temperatura corporal determinam o nível de tolerância e adaptação dos animais ao calor. Para Bianca & Kunz (1978), a temperatura retal e a frequência respiratória são as referências fisiológicas mais adequadas para estimar a tolerância dos animais ao calor. Hopkins *et al.* (1978) afirmam que valores de temperatura retal próximos à temperatura normal da espécie podem ser considerados como um índice de adaptabilidade. Animais que apresentem menor aumento da temperatura retal e menor frequência respiratória são considerados mais tolerantes ao calor (Baccari, 1989). De acordo com Almeida (2010) a temperatura retal, a frequência respiratória e o nível de sudação desempenham um papel importante, principalmente na termorregulação dos ovinos.

#### 2.4.1.1. Temperatura Retal

A temperatura corporal resulta do equilíbrio entre o ganho e a perda de calor, ou seja, a quantidade de calor produzida no organismo (sistema) ou por ele absorvida e a quantidade libertada para o meio envolvente (vizinhança). Consequentemente, o equilíbrio entre o ganho e a perda de calor pode ser medido pela temperatura retal porque discrimina o valor mais aproximado da temperatura corporal (°C). A medição da temperatura retal é utilizada

frequentemente como um índice de adaptabilidade fisiológica porque o seu aumento indica a insuficiência dos mecanismos de dissipação de calor (Martello *et al.*, 2004).

A temperatura corporal é caracterizada por eventos de ocorrência periódica, obedecendo a um ritmo circadiano que se repete a cada 24h, atingindo o seu ponto máximo entre as 17h e as 19h e o seu ponto mínimo entre as 4h e as 6h (Baccari, 1989).

Martello *et al.* (2004) também confirmam que existe interação entre esta variável fisiológica e a hora do dia. Os valores máximos são atingidos durante a tarde, dependendo da fase de crescimento do animal, por exemplo, as novilhas apresentam na maior parte do dia, maior temperatura retal relativamente às vacas adultas.

Num estudo realizado por Almeida *et al.* (2013) a temperatura retal de vacas Holstein Frísia, em condições de termoneutralidade, apresentou correlação mais elevada (0,96) em relação à hora do dia do que em relação à temperatura do ar (0,71), no período das 8h às 18h. A partir das 15h, a temperatura do ar começou a diminuir e a temperatura retal começou a aumentar comprovando que, durante o dia, esta variável aumenta em função do metabolismo do animal e não propriamente da temperatura ambiente. A temperatura retal da vaca leiteira em termoneutralidade e em repouso oscila geralmente entre 38°C e 39°C (Almeida, 2010).

#### **2.4.1.2. Frequência Respiratória**

A capacidade de resistência do animal a condições de stresse térmico também tem sido avaliada através da frequência respiratória. Os bovinos para evitar a hipertermia aumentam a frequência respiratória, apresentando taquipneia como complemento ao aumento da taxa de sudação. As perdas respiratórias e cutâneas constituem importantes meios de perda de calor corporal por evaporação. A taquipneia é o primeiro sinal visível de resposta ao stresse térmico, embora se situe em terceiro lugar na sequência dos mecanismos de adaptação fisiológica. A vasodilatação e o aumento da sudação ocorrem previamente (Baccari, 1989).

A perda de calor pelo trato respiratório implica um processo de mudança de estado físico, de líquido para gasoso, que ocorre com o ar humedecido nas vias respiratórias superiores. A energia despendida pelas vacas para eliminar o calor endógeno, principalmente pelo aumento da frequência respiratória e pela segregação de suor pelas glândulas sudoríparas, é um dos principais fatores que explicam a menor produção de leite sob stresse térmico porque parte da energia do organismo é desviada do processo produtivo para a manutenção do equilíbrio fisiológico (Almeida, 2010).

Valores de frequência respiratória de 60mov./min indicam animais que não estão sob stresse térmico ou que este é mínimo. No entanto, quando esta frequência ultrapassa os 120mov./min reflete excessiva carga de calor e acima dos 160mov./min, devem ser tomadas

medidas de emergência. A ventilação ou resfriamento evaporativo, são métodos de modificação do ambiente, utilizados para aumentar as perdas de calor e melhorar a produtividade (Hahn *et al.*, 1999; Martins, 2014).

#### **2.4.1.3. Temperatura da Pele**

A resistência ao calor dos bovinos depende da sua adaptação genética e fisiológica ao ambiente. Um dos principais atributos que afetam a resistência desses animais ao calor é a superfície cutânea (Maia, 2002).

A superfície cutânea e a pelagem representam a fronteira entre o ambiente climático e o organismo, podendo assim influenciar o balanço térmico do animal. A sua função termorreguladora pode ser dividida em dois componentes: proteção contra o excesso de absorção da radiação solar e dissipação do calor da superfície do animal (Silva, 2000).

As diferenças verificadas na atividade metabólica dos tecidos fazem com que a temperatura da pele não seja homogênea no corpo todo e apresente variações de acordo com a região anatômica. A superfície corporal apresenta temperatura variável e mais sujeita às influências do ambiente externo (Silva, 2000).

A pele protege o organismo do frio e do calor e a sua temperatura depende principalmente, das condições da temperatura ambiente, humidade e características fisiológicas como vascularização e evaporação do suor. Desta forma, contribui para a manutenção da temperatura corporal mediante trocas de calor com o ambiente (Baccari, 1989). Segundo (Jessen, 2001), a temperatura da pele de vacas holandesas em lactação medida em dois ambientes térmicos, com temperatura do ar entre 27°C e 28°C e entre 23°C e 24°C, estão na ordem de 37,59°C e 36,75°C, respetivamente. Para Martello *et al.* (2004) a temperatura da pele de vacas Holstein Frísias alojadas em instalações climatizadas pode variar de 31,6°C (às 6h) a 34,7°C (às 13h), sem indicação de stresse térmico no animal.

Conforme descrito por Cena & Monteith (1975), superfícies claras apresentam menor absorvidade da radiação solar, sendo que a emissividade dessa radiação depende das propriedades físicas e estruturais dos pelos (espessura, comprimento, densidade, diâmetro e inclinação). A maior transmissão é característica de pelagens brancas enquanto pelagens escuras apresentam emissividade mais baixa ou nula, o que tem levado à maioria dos investigadores a aceitar a vantagem adaptativa de pelagens claras em regiões mais quentes (Silva, 2001).

A região corporal e o nível de climatização dos animais também são fatores importantes. Arcaro Junior *et al.* (2005) mediram a temperatura da pele da região da cabeça, do dorso e da glândula mamária e concluíram que esta foi menor nas vacas submetidas a ventilação forçada e

aspersão na sala de espera, durante 30 minutos, quando comparada à das vacas submetidas apenas a ventilação. A região da cabeça apresentou diminuição média de 4,2°C, na região do dorso uma diminuição de 2,8°C e na glândula mamária 1,0°C. Segundo Baccari (2001) quando a temperatura da pele é mais elevada que a do meio ambiente, o organismo cede calor às moléculas do ar, dando início a uma troca térmica. Quando a temperatura do ambiente diminui, o animal dissipará mais calor e a sua temperatura corporal diminui, o que explica a diminuição da temperatura da cabeça, dorso e glândula mamária verificada nos animais submetidos ao tratamento ventilação forçada e aspersão na sala de espera (Arcaro Junior, et al., 2005).

É importante ressaltar que os efeitos evaporativos e convectivos na perda de calor não são facilmente separáveis. Assim, a velocidade do ar é um fator importante que influencia o processo de transferência evaporativa (Almeida, 2010).

#### **2.4.1.4. Sudação**

A sudação foi inicialmente estudada por Dodart (1725) e por Lavoisier e Seguin (1790), a par de muitos outros até aos dias atuais. A eficiência deste mecanismo está parcialmente dependente da natureza da pele e da pelagem e é um processo ativo com base no funcionamento das glândulas sudoríparas. A capacidade máxima de sudação de um bovino é atingida por condições de temperaturas ambientais elevadas, ocorrendo um aumento do volume de sangue para a epiderme, proporcionando às glândulas sudoríparas maiores estímulo e quantidade de nutrientes (Morais, 1999).

As glândulas sudoríparas e a sudação não são distribuídas de forma homogênea na superfície da epiderme. A quantidade de suor produzida depende do número de glândulas sudoríparas ativas por unidade de área da epiderme, da natureza da capa de cobertura cutânea e da sua permeabilidade ao vapor de água, além da capacidade circulatória periférica (Berman, 2011).

O número de glândulas ativas está relacionado com o ciclo de atividade dos folículos pilosos e também com a idade do animal. O tamanho e a extensão da superfície corporal expressam uma adaptação especial aos fatores do meio. A permuta de calor entre o animal e o meio ambiente depende da relação entre a superfície corporal e a taxa metabólica. Em temperaturas ambientais iguais ou acima da temperatura interna do animal, superfícies mais extensas podem tornar-se desvantajosas. A título de exemplo, o tamanho e a forma de bovinos provenientes da Europa ao serem introduzidos nos trópicos ficam mais baixos, mais grossos e curtos, e, em consequência, aumentam a sua capacidade de dissipação de calor. Os apêndices compostos pelas orelhas, barbela (papadas), umbigo e prepúcio têm importância secundária na termorregulação do animal. As orelhas apresentam uma alta relação entre superfície e peso,

associada a uma maior vascularização. A papada ou barbela, apesar de apresentarem maior quantidade de glândulas sudoríparas, não são eficientes devido à baixa irrigação presente nessas áreas. O umbigo e o prepúcio têm baixo poder de evaporação devido ao menor número de glândulas sudoríparas. Apesar destes comparticiparem na sudação, os apêndices não apresentam papel relevante na adaptação dos animais aos climas quentes (Rocha, 2008).

Perante a heterogeneidade na distribuição das glândulas sudoríparas ao longo do corpo, a taxa de sudação deve ser medida numa área que seja representativa do valor médio ponderado. Com efeito, a taxa de sudação não é homogeneamente distribuída pela superfície da epiderme. A variação dentro de cada indivíduo pode ser superior a 300% e fatores como a densidade parecem ser determinantes nessa variação, embora as maiores taxas de sudação pareçam estar mais associadas a regiões onde a espessura da pelagem é inferior (Berman, 2011).

A densidade e a morfologia das glândulas sudoríparas são muitas vezes apontadas como os fatores mais relevantes nas diferenças observadas nas taxas de sudação (Schleger & Bean, 1971). Porém, vários estudos demonstraram que, embora estas características devam ser consideradas, não são suficientes para explicar *per si* as diferentes taxas de sudação (Finch, 1986). Resultados elucidativos são referidos por Pereira *et al.* (2010), salientando que a taxa de sudação é distinta consoante as diversas regiões do corpo e independente da densidade, do volume e da forma das glândulas sudoríparas. As duas características que parecem estar mais diretamente relacionadas com o suor produzido pela glândula sudorípara são: a densidade e o calibre dos vasos sanguíneos presentes na sua periferia e a atividade do folículo piloso (Finch, 1986).

Os bovinos criados em sistemas extensivos e semiextensivos recebem uma grande quantidade de calor por radiação direta sendo de grande importância a capacidade de manter a temperatura corporal dentro de certos limites através da sudação. A taxa de sudação em vacas Holandesas varia bastante em função das condições higrométricas do ambiente, da adaptabilidade dos animais, da capacidade circulatória e de sudação destes, ocorrendo resultados de 133 g mh (McDowell, 1975) ,185 g mh (Suzuki, 1989) e até 275 g mh (Lima, 1991). Apesar disto, o genótipo é determinante na ocorrência de diferenças. As raças zebuínas apresentam normalmente taxas médias de sudação superiores às raças de climas temperados. Titto (1998) utilizando o método desenvolvido por Schleger & Turner (1965) encontraram valores de 216 g.m<sup>2</sup>.h<sup>-1</sup> em bovinos da raça Nelore, 126 g.m<sup>2</sup>.h<sup>-1</sup> em bovinos da raça Marchigiana e 124 g.m<sup>2</sup>.h<sup>-1</sup> em bovinos da raça Simental. Torna-se perceptível que bovinos *Bos taurus* apresentem menor densidade glandular, diâmetros de glândulas menores e morfologia envelhada, ao contrário do caso que se verifica nos zebuínos que apresentam glândulas saculiformes, de maior diâmetro e volume (Pan, 1964).

Finch *et al.* (1982) demonstraram que vacas cruzadas ( $\frac{1}{2}$  Jersey  $\frac{1}{2}$  Zebu) expostas à radiação solar direta, apresentavam um drástico aumento na frequência respiratória e na temperatura superficial. No entanto, a temperatura retal manteve-se constante e a taxa de sudação aumentou de 70 para 250 g.m<sup>2</sup>.h<sup>-1</sup>, ressaltando a grande importância da evaporação cutânea para minimizar o stresse térmico causado pelo ganho de calor via radiação solar direta. Quando se relaciona a taxa de sudação com a temperatura retal observa-se que nos taurinos a sudação atinge o máximo e estabiliza antes da temperatura corporal atingir os 40°C. Nos zebus, dentro dos normais limites de variação da temperatura corporal, não é perceptível qualquer indício de estabilização da taxa de sudação (Finch *et al.*, 1982).

McManus *et al.* (2005) avaliaram a tolerância ao calor em algumas raças bovinas (Curraleiro, Crioulo Lageano, Nelore, Pantaneira, Junqueira, Holandês e Mocho Nacional) considerando alguns parâmetros fisiológicos (frequência respiratória, frequência cardíaca, temperatura retal e taxa de sudação). Os valores para a taxa de sudação variaram entre 215,22 g/m<sup>2</sup>/h (Nelore) a 323,22 g/m<sup>2</sup>/h (Mocho Nacional), tendo a raça Holandesa uma média de 269,13 g/m<sup>2</sup>/h. Comparando os resultados das raças Holandesa e Nelore, o da primeira foi mais elevado, pois o estímulo ao stresse térmico foi maior devido à menor eficiência dos mecanismos de termorregulação, como por exemplo, pelagem menos adequada ao ambiente e menor capacidade respiratória. Nestas condições, os animais Nelore foram capazes de regular melhor a temperatura corporal em resposta ao stresse térmico do que as Holandesas, recorrendo ao aumento da sudação que se apresenta superior ao das raças europeias não adaptadas, porém apenas sob temperaturas do ar extremas (Hahn *et al.*, 1999).

Muitas das diferenças ocorridas entre genótipos a uma determinada temperatura deve-se a diferenças na eficiência da termólise sensível. A maior eficiência na dissipação de calor sensível origina que o início da sudação ocorra a temperaturas mais altas. É também sugerido que a maior eficiência da evaporação do suor nos zebus possa explicar as menores taxas de sudação a temperaturas moderadas (Berman, 2011). Portanto, para que as comparações entre raças e entre ambientes se possam realizar, é indispensável a existência de um referencial comum que possa medir não apenas a taxa de sudação, mas principalmente a eficácia desta na manutenção da estabilidade da temperatura corporal.

#### **2.4.1.5. Proteínas de choque térmico**

Em 1962, o investigador italiano Ritosa estudou glândulas salivares de *Drosophila busckii* e verificou que determinados genes sofriam alterações quando submetidos ao choque térmico. Este trabalho foi o primeiro a descrever a “reprogramação” da expressão génica de “rotina” para uma “resposta ao stresse celular” (Geraldo, 2013).

O stresse térmico ou químico induzia a expressão de genes, até então quiescentes, os quais faziam com que as células sob stresse produzissem grande quantidade de uma classe de proteínas específicas, designadas de *Heat Shock Proteins* (HSP) ou proteínas de choque térmico. O processo pelo qual as células respondiam ao stresse ficou conhecido como *Heat Shock Response* (HSR) ou resposta ao choque térmico. Posteriormente verificou-se que a HSR era um fenómeno praticamente universal a todos os seres vivos. Esta resposta é caracterizada por um aumento extremamente rápido na expressão de um grupo restrito de proteínas, as HSP, não só ocorrendo apenas após exposição ao calor, mas também quando as células são expostas a diversos outros desafios metabólicos, incluindo análogos de aminoácidos, diversos metais pesados, diversos ionóforos e outros xenobióticos (Tabela 4) (Welch, 1992).

**Tabela 4.** Condições que induzem a expressão das HSP (Adaptado de Meyer & Silva, 1999)

<b>Fisiológicas</b>	<b>Patológicas</b>	<b>Ambientais</b>
Ciclo de divisão celular	Infeção viral	Mudanças térmicas (choque de calor/frio)
Fatores de crescimento	Infeção bacteriana	Metais pesados
Diferenciação celular	Infeção parasitária	Etanol
Desenvolvimento de tecidos	Febre	Antibióticos
Estímulos hormonais	Inflamação	Radiação
	Isquemia	
	Danos oxidativos	
	Malignidade	
	Autoimunidade	
	Toxinas	
	Lipossacarídeos	

As HSP são uma classe de proteínas altamente antigas e conservadas, desde seres primitivos (procariotas) até o Homem, constituindo um indício do seu grande valor evolutivo (Peetermans, 1995). As HSP podem ser agrupadas em famílias, de acordo com as suas sequências de aminoácidos e com os seus pesos moleculares (em kD- quilodaltons), determinados pelo método SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamidasódio- dodecil-sulfato) (Fuller *et al*, 1994). Em cada família, há diferentes proteínas - por exemplo, HSP-72 e HSP-73 no grupo HSP-70; os pesos moleculares são semelhantes, no entanto, os padrões de indução e expressão são distintos (Tabela 5). As HSPs melhor entendidas são as que cujo peso é de 110, 90, 70 e 60 kDa. Este primeiro grupo de HSP é expresso a 37°C na ausência de calor. O segundo grupo consiste em HSPs que são induzidas pela privação de glicose e incluem proteínas reguladas pela glicose (GPR) com pesos moleculares de 34, 47, 56, 75, 78, 94 e 174 kDa. Um

terceiro grupo consiste em HSPs de baixo peso molecular (menores que 20 kDa). A família HSP-70 é a mais conservada filogeneticamente. A sua estrutura, no Homem, é 72% homóloga em relação às HSP-70 de drosófilas (Hunt & Morimoto, 1985). As famílias HSP-60 e HSP-70 são as mais ligadas ao processo geral de dobramento de proteínas nas células (Wynn *et al.*, 1994).

*Tabela 5. Principais grupos de HSP (Adaptado de Meyer & Silva, 1999)*

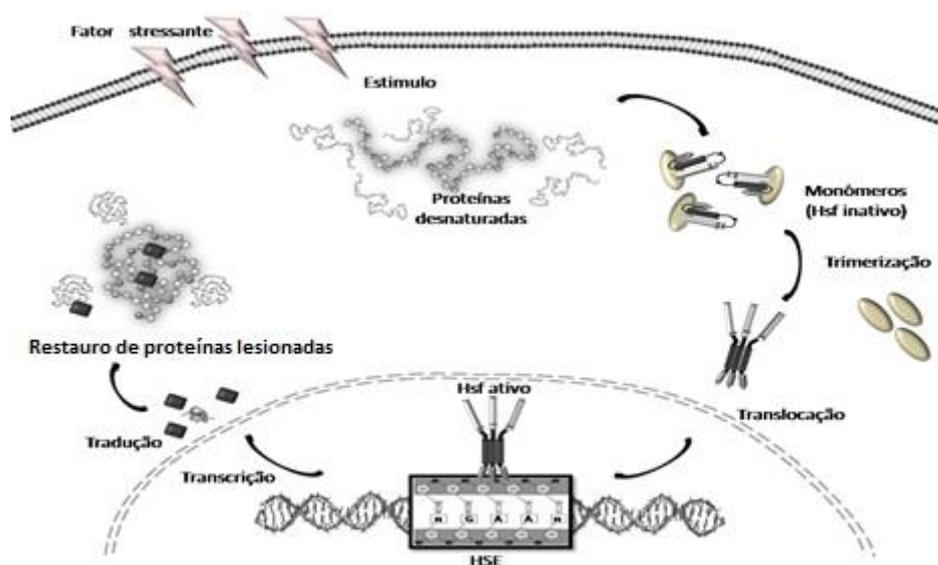
Nome	Tamanho (kDa)	Localização	Função
Ubiquitina	8	Citoplasma/Núcleo	Degradação proteica
HSP10	10	Mitocôndria	Co-factor da HSP60
HSP27	27	Citoplasma/Núcleo	Crescimento e diferenciação
HSP47	47	Retículo Endoplasmático	'Chaperona' Colagénio
HSP56	56	Citoplasma	Complexo recetor de esteróides
HSP60	60	Mitocôndria	'Chaperona' molecular
HSP72	70	Citoplasma/Núcleo	'Chaperona' molecular
HSP73	70	Citoplasma/Núcleo	'Chaperona' molecular
Grp75	70	Mitocôndria	'Chaperona' molecular
Grp78	70	Retículo Endoplasmático	'Chaperona' molecular
HSP90	90	Citoplasma/Núcleo	'Chaperona' molecular
HSP110	110	Citoplasma/Núcleo	'Chaperona' molecular

Diversos tipos de stresse metabólico (exposição ao calor, metais pesados, diversos ionóforos, análogos de aminoácidos e xenobióticos que afetam a produção de ATP) resultam em diversas alterações na expressão de genes, levando à aglomeração das HSP. Muitos destes agentes stressores indutores afetam a conformação correta e a função das proteínas (Minowada & Welch, 1995).

Nas condições em que proteínas incorretamente conformadas se acumulem nas células, é iniciada uma resposta ao stresse, ou HSR. Esta inicia-se pela ativação de um fator específico de transcrição, chamado HSF-1 (Heat Shock Factor ou fator do choque térmico). Tal fator estaria presente na célula normal e “não-stressada” como um monómero inativo. Em resposta ao stresse metabólico, rapidamente sofreria trimerização, o que tornaria possível a sua ligação imediata a uma sequência de nucleotídeos, chamada de HSE (Heat Shock Element ou elemento do choque térmico) localizada dentro da região promotora dos genes que codificam as HSP, resultando num alto nível de transcrição dos genes do choque térmico. Em condições não stressantes as HSPs estão ligadas a HSFs que residem no citoplasma das células de mamíferos. Quando ocorre uma situação de stresse, como por exemplo, um aumento de temperatura, os HSFs separam-se das HSPs, e são fosforilados pela proteína quinase C ou por outra proteína serina-treonina quinase, formando uma estrutura homo-trimérica (Figura 5). Os trimeros entram no núcleo da célula e são depois fosforilados pelas HSF quinases. Tem então início a

transcrição por intermédio do mRNA, seguida da tradução. As HSPs recém-sintetizadas ligam-se aos HSFs para prevenir a futura síntese de HSPs (Kiang & Tsokos, 1998) e assim estarem aptas a atuar numa nova situação de stresse.

As células submetidas ao stresse podem sobreviver ou morrer dependendo do tipo celular, tipo e intensidade do stresse, etc. A exposição prévia das células a stresses não-mortais pode suscitar a HSR com a síntese de HSP. Uma nova exposição das células ao stresse vai produzir menores alterações na homeostasia celular. As células que sintetizaram as HSP ficam protegidas contra novas exposições, refletindo-se desta forma em menores lesões também no organismo ou em partes dele.



**Figura 5.** Mecanismo de aumento das HSPs induzidas por stresse (Adaptado de Kiang & Tsokos, 1998)

As HSP não são induzidas apenas em condições de stresse. Segundo Feige & Polla (1994) há componentes desta classe proteica conhecidas como HSC (Heat Shock Cognates) que são expressos constitutivamente, isto é, dentro da vida normal dos organismos não submetidos a condições de stresse (Fuller *et al.*, 1994). As formas cognatas não são idênticas às formas indutíveis; estas, quando surgem, somam quantidades muito maiores do que as constitutivas. Na família HSP70, a forma induzível HSP72 é a mais conhecida e estudada e existe no interior do núcleo e no citoplasma.

O principal mecanismo de ação das HSP, exceto o da proteção, seria o de atuarem como “chaperonas” moleculares (Feige & Polla, 1994). O termo “chaperonas”, inexistente em português, designa as substâncias que sem fazerem parte da estrutura final de proteínas, evitam interações incorretas entre estas e auxiliam na montagem final das mesmas, bem como a sua síntese, dobramento e degradação (Ellis, 1987). O dobramento de proteínas é um processo

biologicamente importante porque converte cadeias lineares de polipeptídeos em estruturas tridimensionais, as quais possibilitam que as proteínas exerçam todas as suas atividades vitais (Ellis & Hartl, 1996). As proteínas funcionais intracelulares estão normalmente presentes nas suas formas nativas, completamente dobradas. Entretanto, processos vitais da biogénese proteica, tais como a sua síntese e translocação para os compartimentos intracelulares, requerem que a proteína exista, temporariamente em conformação desdobrada ou parcialmente dobrada.

As regiões que estão ocultas quando um polipeptídeo está na sua conformação nativa, tornam-se expostas e interagem com outras proteínas causando uma agregação nociva para a célula. Em condições normais, os polipeptídeos corretamente dobrados têm as porções hidrofóbicas dos seus aminoácidos voltadas para o interior da molécula, ao passo que os componentes hidrofílicos voltam-se para o exterior, possibilitando a solubilidade em meio aquoso e impedindo a agregação. Se a proteína estivesse desdobrada (o que ocorre em determinadas fases da sua síntese e transporte), poderiam existir algumas agregações inadequadas, levando à perda destes polipeptídeos. Deste modo, as HSP atuam evitando tais interações aleatórias - como “protetoras moleculares”, ou “chaperonas” - até que o fim do processo de dobramento ocorra e a proteína adquira resistência (Wynn *et al*, 1994). A fim de evitar esta agregação quando as proteínas estão desdobradas, as HSP protegem as superfícies interativas ligando-se a elas, facilitando o dobramento de novos polipeptídeos com desdobramento inadequado. Noutros casos, a ligação de HSP a superfícies interativas de proteínas completamente dobradas é parte crucial da sua regulação. Na medida em que o choque térmico e outras condições stressantes causam um efeito de desdobramento parcial das proteínas celulares, a capacidade das HSP protegerem as células contra os efeitos adversos do stresse torna-se uma extensão lógica da sua função normal como “chaperonas” (Becker & Craig, 1994). As HSP também proporcionam a rapidez de remoção de proteínas desnaturadas de dentro das células (Terlecky, 1994). Elevados níveis de proteínas de stresse fornecem meios à célula para:

a) identificar e facilitar o redobramento de proteínas afetadas de modo adverso pelo stresse metabólico;

b) identificar e proporcionar a ligação com proteínas anormalmente dobradas, de modo que estas sejam marcadas e enviadas a um sistema proteolítico adequado, facilitando assim a eliminação das proteínas defeituosas;

c) facilitar a síntese e a maturação de novas proteínas, que irão substituir aquelas destruídas no stresse metabólico (Meyer & Silva, 1999).

### 2.4.2. Termotolerância e Aclimação

Sendo a zona sul de Portugal, nomeadamente o Alentejo, uma região de grandes amplitudes térmicas anuais, com especial destaque para os verões quentes, onde não são raros os dias em que a temperatura atinge os 40°C, torna-se essencial conhecer os mecanismos que permitem a sobrevivência e desempenho das espécies aí exploradas na produção de leite (Morais, 1999).

A adaptação refere-se à ação conjunta de características anatómicas, morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e comportamentais para garantir o bem-estar e favorecer a sobrevivência de um organismo num dado ambiente específico (Silva, 2000). O conceito de adaptação a um determinado ambiente pode ser diretamente avaliado e relacionado com mudanças estruturais, funcionais e comportamentais observadas no animal, objetivando a sua sobrevivência, reprodução e produção em condições adversas. A adaptabilidade dos animais tem sido discutida por diversos autores (McDowell, 1975; Baccari, 1989; Nunes, 2002; Santos *et al.*, 2005) e é estudada com diversas perspetivas:

- **Adaptação genética e biológica:** refere-se às características hereditárias do animal que favorecem a sua sobrevivência num ambiente específico e podem promover mudanças ao longo de várias gerações (seleção natural) ou favorecer a aquisição de características genéticas específicas (seleção artificial).

- **Aclimação:** refere-se a mudanças adaptativas, normalmente produzidas em câmaras climáticas, em resposta a uma única variável climática (por exemplo, a temperatura).

- **Adaptação fisiológica (Aclimação):** é o processo de ajustamento do próprio animal a outro ambiente que resulta no aumento da tolerância a estímulos stressores, ao longo do tempo.

Vários testes de tolerância ao calor foram desenvolvidos tal como os de Rhoad (1944) e de Dowling (1956), tendo uma aplicação reduzida em função de algumas limitações. Nota-se que no teste idealizado por Rhoad (1944), também conhecido como o teste de Ibéria, toma-se como base de cálculo a temperatura retal de 38,3°C, tida como temperatura corporal normal e são medidas as temperaturas retais e as frequências respiratórias dos animais de manhã (10:00h) e à tarde (15:00h), durante 3 dias. Por outro lado, o teste de Dowling (1956) baseia-se na capacidade de dissipação do calor corporal, após os animais serem submetidos ao exercício físico sob radiação solar direta, até que a temperatura corporal atinja os 40°C e consequentemente, é marcado o tempo necessário para que a temperatura retal volte ao valor inicial. Uma crítica a este teste é que o calor adquirido nestas condições advém não só da radiação solar, mas também do exercício físico que envolve outros processos fisiológicos e vias

metabólicas não implicadas naturalmente no mecanismo de termorregulação da espécie (Muller, 1989).

O teste de adaptabilidade proposto por Baccari (1989) tem como princípio a capacidade de dissipação de calor e consiste numa medição da temperatura retal dos animais em repouso duas horas à sombra (TR1) e, logo após a medição, os animais devem ser expostos diretamente ao sol por mais uma hora e após essa exposição, os animais devem retornar a sombra por mais uma hora quando a segunda medida da temperatura retal deve ser feita (TR2). As médias das temperaturas retais obtidas (TR1 e TR2 em °C, respetivamente), devem ser aplicadas na seguinte fórmula do Índice de Tolerância ao Calor:

**ITC= 10 – (TR2-TR1)**, a qual determina o grau de tolerância ao calor dos animais pela diferença entre as temperaturas, e consta de uma escala de 0 a 10, sendo o resultado mais próximo de 10 o valor correspondente aos animais mais tolerantes ao ambiente. Souza *et al.* (2007) utilizando o mesmo teste em bovinos, verificaram um elevado índice de tolerância à radiação solar direta de animais raça Sindi, que apresentaram ITC = 9,83, comprovando a elevada adaptação do Sindi às condições do semi-árido.

Considera-se que a adaptabilidade não deve ser avaliada apenas pela capacidade de tolerância ao calor uma vez que são vários os fatores que interferem no processo de adaptação dos animais. Por este motivo, outros testes devem ser aplicados para se verificar com maior exatidão a adaptação dos animais em termos fisiológicos, produtivos e reprodutivos. McDowell (1975) apela que uma prova de tolerância ao calor deve estabelecer alta correlação com a produtividade dos animais de tal forma que se possa prever em animais jovens, através de medidas de adaptabilidade, o desempenho destes e dos seus descendentes. Para (Olivier, 2000) a avaliação de uma raça ou grupo genético não pode ser baseada apenas na capacidade de ganho de peso ou no rendimento de carcaça, mas também na eficiência produtiva, adaptabilidade, prolificidade e taxa de sobrevivência.

A adaptação ao calor pode ser dividida entre termotolerância e aclimação. A termotolerância é a adaptação celular causada por uma única e severa exposição ao calor, permitindo que o organismo tenha melhores condições para sobreviver a um posterior evento de stresse térmico mais intenso. A aclimação refere-se à habilidade do organismo manter uma atividade normal no calor devido a melhorias ocorridas ao longo de um determinado período que possibilitou uma melhor dissipação de calor (Geraldo, 2013).

Quando uma determinada condição stressante decorre ao longo da vida do animal de forma persistente e continuada, o indivíduo torna-se mais tolerante a esse stresse, devido à aclimação. De acordo com (Kregel, 2002) o fenómeno da aquisição de termotolerância é transitório na natureza e depende primeiramente do grau de severidade do stresse térmico.

Normalmente este processo envolve alterações na expressão de características pré-existentes que são benéficas ao organismo num ambiente e envolve mudanças a todos os níveis da organização corporal, incluindo reprogramação da expressão genética (Horowitz, 2001).

Um animal quando está adaptado ao meio ambiente onde está inserido encontra-se dentro de certos limites de temperatura que conferem o seu conforto. Estes limites estão condicionados por vários fatores como a espécie, a raça, o peso, a idade, o estado fisiológico, a condição nutricional ou por diversos fatores ambientais. É a relação destes limites de temperatura e destes fatores que define o grau de adaptabilidade do animal ao meio, portanto, uma exposição prolongada ao stresse interfere negativamente com o funcionamento das células, trazendo consequências negativas sobre as propriedades bioquímicas das proteínas que, em condições ideais, existem em estados termodinamicamente estáveis. Em ambientes onde existem desvios à homeostasia celular, é provocado o desdobramento de proteínas que podem perder a sua configuração funcional ou agregarem-se (Morimoto, 1998). Nestas situações de stresse, a síntese da maioria das proteínas é inversamente proporcional às proteínas de choque térmico (HSP) que são rapidamente sintetizadas (Zulkifli *et al.*, 2010). Por este motivo, o estudo destas proteínas é fundamental para compreender a termotolerância e perceber se os animais sofreram aclimação.

## **2.5. Histofisiologia da pele e anexos como intermediários dos processos adaptativos e de termorregulação**

### **2.5.1. A pele**

As formas de agressão a que o organismo está exposto são múltiplas e de diversa origem (radiações solares, temperatura, golpes, traumatismos mecânicos, micróbios patogénicos). Em todos os seres vivos existe uma membrana que serve de revestimento, separando o meio interno do meio externo, denominada de pele ou tegumento. A pele é o maior órgão sensorial do organismo que contém uma série de recetores para o tato, pressão, dor e temperatura (calor e frio) e evidências recentes sugerem que este órgão desempenha um papel fundamental na manutenção da homeostasia corporal, mais do que normalmente aceite (Samuelson, 2007).

Samuelson (2007) enumerou as principais funções da pele:

- a) Proteger o organismo das agressões externas (químicas ou físicas).
- b) Termorregulação
- c) Estabelecer relações sensoriais.
- d) Várias funções metabólicas.
- e) Manter a forma do corpo.

f) Proteção contra a radiação ultravioleta, através da presença de melanina.

A superfície cutânea é constituída pela pele (epiderme e derme) e seus anexos (pelos, lâ, glândulas sudoríparas e glândulas sebáceas) representando uma importante linha de contato entre o organismo e o ambiente. As características da epiderme e dos pelos dos mamíferos justificam a tolerância ao calor característica de cada raça e até mesmo de cada animal. Essas características englobam a pele (pigmentação e espessura), as glândulas sudoríparas (número, distribuição e diâmetro), pelagem (cor e espessura), pelo (pigmentação, inclinação, diâmetro, comprimento, medulação).

A pele é constituída por camadas distintas designadas respectivamente de epiderme, derme e hipoderme (Dukes, 1955). A figura 6 representa esquematicamente a superfície cutânea.

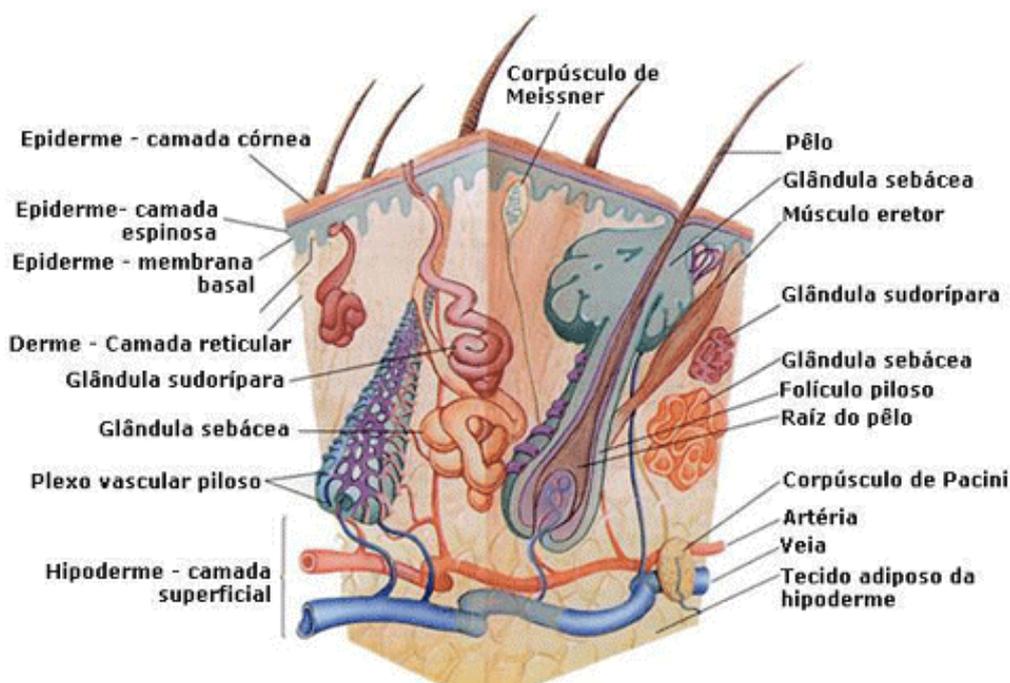


Figura 6. Estruturas cutâneas (Adaptado de Samuelson, 2007)

A epiderme é um epitélio estratificado escamoso constituído por um número variado de células de espessura variável ao longo de todo o corpo (Kimber *et al.*, 1950). Do exterior para o interior identificam-se as seguintes camadas de células: *stratum corneum*, *stratum lucidum*, *stratum granulosum* e *stratum germinativum* (Dukes, 1955) ou seja, camada córnea, camada lúcida, camada granulosa, camada espinhosa e camada basal. Nestas diferentes camadas, a epiderme é constituída por queratinócitos, sendo ainda possível observar, dependendo da camada, melanócitos, células de *Langerhans* e células de *Merkel* (Figura 7) (Simões, 2004; Praça, 2010)

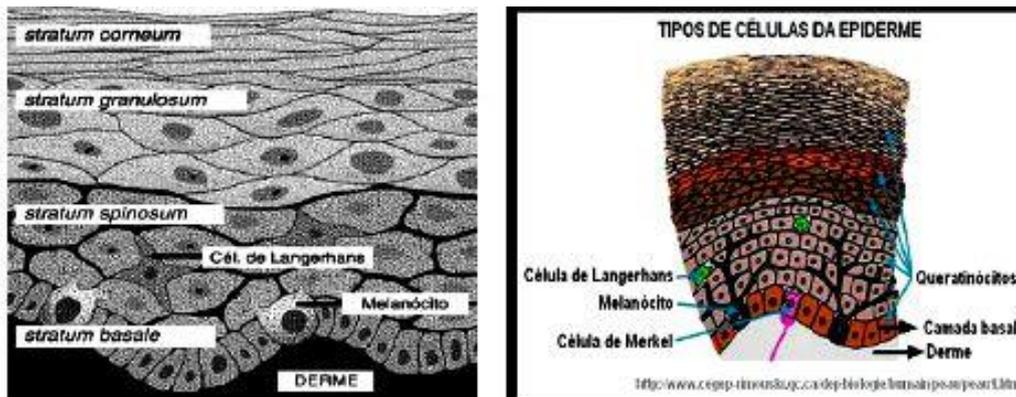


Figura 7. Representação celular da epiderme (Adaptado de Rafeiro, 2013)

Os queratinócitos são as células principais da epiderme viável que produzem queratina, uma proteína importante das células do estrato córneo. A queratina, também chamada de tecido cornificado, é composta primariamente pelos aminoácidos histidina, lisina, arginina e, em especial, por metionina, sendo este último sulfurado. A sua composição apresenta 30% de água, aproximadamente 1% de minerais e uma pequena quantidade de ácidos gordos. À medida que os queratinócitos amadurecem e se diferenciam tornam-se maiores, perdem o seu núcleo e atingem a etapa final da diferenciação com a formação do estrato córneo. O estrato córneo, a camada mais superficial, é constituído por células sem núcleo e por outros elementos celulares usuais que correspondem a verdadeiros depósitos de queratina, surgindo como resultado da evolução celular dos queratinócitos. Os queratinócitos presentes nesta camada são designados de corneócitos, predominantemente constituídos por queratina, com uma forma achatada e sobrepostos alternadamente (Simões, 2004).

Os melanócitos encontram-se na camada basal da epiderme e produzem um pigmento castanho responsável pela coloração da pele e absorção dos raios UV, a melanina. A partir da camada basal onde se inserem, os melanócitos projetam dendrites que se estendem ao longo de toda a epiderme, enviando a melanina produzida nos melanócitos e acumulada nos melanossomas. O número de melanócitos e a taxa de produção da melanina é dependente da raça do animal, no entanto, não chega a ser significativo. Nos animais com pele mais escura os melanossomas são maiores e transferem-se individualmente através das ramificações dendríticas. No caso das Holsteín Frísias, de pele mais clara, os melanócitos produzem menos melanina e os melanossomas agregam-se pelo facto das suas dimensões serem mais reduzidas (Praça, 2010).

As células de Langerhans são o constituinte imunológico predominante da pele. Estas células estão presentes em camadas menos estratificadas da epiderme, com um citoplasma abundante, no entanto não apresentam desmossomas nem melanossomas. As células de Langerhans são células apresentadoras de antígenos ao resto do sistema imunitário, tais como

os linfócitos T e responsáveis pela fagocitose de corpos estranhos. Desta forma, estas células não permitem o crescimento anormal de células além de serem sensíveis à radiação ultravioleta. As células de Merkel estão presentes entre a epiderme e a derme em pequena quantidade e ligam-se às terminações nervosas sensitivas, funcionando como recetores de pressão (Simões, 2004).

O estrato lúcido está presente apenas em zonas muito queratinizadas e sem pelos. As células são achatadas, pavimentosas, sem núcleo nem perfil definidos. No citoplasma observa-se grande quantidade de filamentos muito compactados que constituem a queratina. O estrato granuloso é formado por 3 a 5 camadas de células mais achatadas do que as do estrato espinhoso. As células contêm grânulos de querato-hialina dispersos, os quais correspondem ao início do processo de queratinização. O estrato granuloso pode distinguir-se do estrato espinhoso por não apresentar as “espinhas” de conexão. O estrato espinhoso é formado por 5 a 6 camadas de células poliédricas, unidas pelos desmossomas. É relativamente fácil de identificar uma vez que os queratinócitos parecem ter umas “espinhas” entre células adjacentes. Estas “espinhas” são na verdade os desmossomas. O estrato basal está intimamente unido à derme e separado desta pela membrana basal, sendo o mais ativo mitoticamente. Consiste de uma camada de células mais ou menos cúbicas (Samuelson, 2007).

A pele é abundantemente inervada de modo a permitir levar a cabo múltiplas funções. Na pele existem fibras autónomas eferentes que regulam o calibre dos vasos sanguíneos, controlam a atividade das glândulas sudoríparas e das glândulas sebáceas e excitam os músculos eretores do pelo (Samuelson, 2007). Os capilares que se encontram espalhados por toda a pele são inúmeros e pode-se assegurar que o volume de sangue que contém é significativo em relação ao restante sangue circulante do corpo (Morais, 1999). Em caso de necessidade de dissipação de calor a vasodilatação destes vasos periféricos produz o aumento do fluxo sanguíneo na pele o que aumenta a produção de suor, sendo a vasodilatação e o fluxo associado à glândula que facilita a transferência do calor para o exterior. A perda de calor é assim determinada por duas características: Pigmentação e Espessura (Finch, 1986).

A pigmentação da pele é controlada geneticamente e é resultado da quantidade de melanina. O grau de pigmentação está associado com o clima, nomeadamente com a radiação solar, especialmente em grandes altitudes. Animais de regiões quentes e húmidas apresentam maior pigmentação comparativamente àqueles de zonas frias e secas. A pigmentação é importante na absorção da radiação ultravioleta, que provoca o eritema solar. A pele pigmentada preta absorve totalmente os raios ultravioletas e peles despigmentadas são mais suscetíveis a queimaduras e a danos devido à fotossensibilidade. A raça Hereford e a raça

Simental são bons exemplos da importância da pigmentação, pois o seu déficit leva frequentemente a carcinomas oculares escamosos (Hafez, 1973).

A espessura da pele varia com a região do corpo e é influenciada pela idade, estado nutricional e raça. Animais mais velhos ou subnutridos têm a pele mais grossa. Em climas quentes, a pele melhor selecionada para esta característica é a pele escura uma vez que não é tão afetada pela radiação solar e favorece a perda de calor.

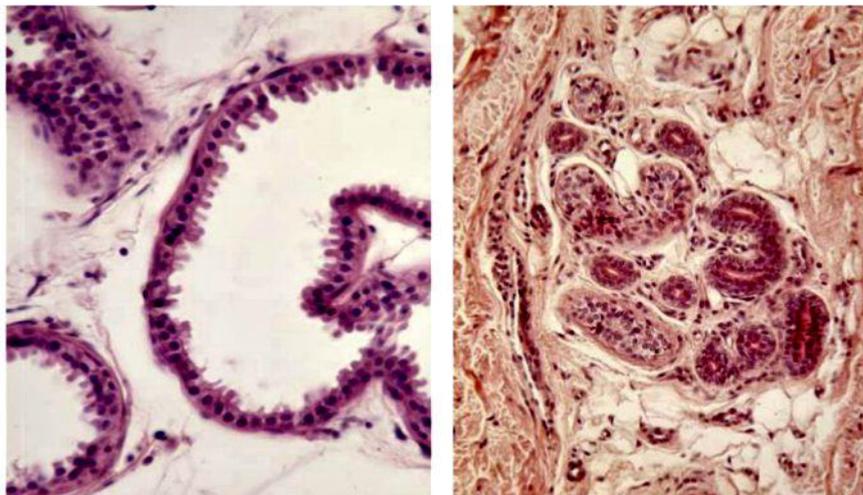
### **2.5.2. Anexos da Pele**

Os anexos da pele, inseridos na derme, incluem as glândulas sudoríparas, as glândulas sebáceas e os folículos pilosos e são também responsáveis por todos estes mecanismos de permuta de calor (McDowell, 1975)

As glândulas sudoríparas são constituídas por uma base enrolada de glândulas que atravessam toda a epiderme até à superfície através de um ducto sudoríparo. A produção de suor através destas glândulas tem o objetivo de manter o equilíbrio térmico corporal. Existem cerca de 2 a 3 milhões de glândulas sudoríparas distribuídas por cada m<sup>2</sup>.

Baseados nas suas características morfológicas e funcionais existem dois tipos de glândulas sudoríparas: as apócrinas, epitriquiaias, ou paratriquiaias e écrinas, merócrinas ou atriquiaias (Figura 8) (Neilsen, 1953). Segundo (Reece, 2006) as glândulas sudoríparas presentes nos bovinos são do tipo apócrinas. Para (McDowell, 1975) não são inteiramente apócrinas, mas também merócrinas devido à perda de material citoplasmático no decorrer da secreção. Estas glândulas são também consideradas epítricas por estarem associadas a um folículo piloso.

As glândulas apócrinas são descritas como glândulas simples tubulares ou saculares, com uma parte secretora espiralada e um ducto reto. As glândulas écrinas são glândulas simples, tubulares e espiraladas, que se encontram essencialmente nas almofadas das patas de cães e gatos, na ranilha dos ungulados e na região nasolabial dos ruminantes e suínos (Dellmann & Brown, 1982). Nas glândulas écrinas não existe perda do conteúdo celular aquando da secreção de suor, contrariamente às glândulas apócrinas onde se verifica fragmentação das células com perda parcial do lúmen celular (Starling & Evans, 1968).



**Figura 8.** Representação microscópica das glândulas sudoríparas apócrinas (lado esquerdo) e das glândulas sudoríparas écrinas (lado direito)

A distribuição de glândulas sudoríparas é heterogênea, ou seja, algumas partes do corpo secretam mais suor que outras. As regiões de sudação mais intensas localizam-se no peito, braços, axilas, seguida das regiões da espátula, cupim e nádegas, depois pescoço, costelas e tórax, seguida pela cabeça e, por último, prepúcio (Morais, 1999).

As glândulas sebáceas estão localizadas na derme e são glândulas alveolares simples ou compostas que produzem uma substância oleosa, branca e rica em lípidos, o sebo. A maioria das glândulas sebáceas estão unidas através de um canal que se situa na parte superior dos folículos pilosos e que permite ao sebo engordurar o pelo e a superfície da pele. Desta forma, o sebo evita a desidratação e protege a superfície da pele contra alguns agentes bacterianos. Em determinados pontos de transição da pele, como é o caso dos lábios ou as pálpebras, as glândulas terminam diretamente na superfície da pele.

O folículo piloso encontra-se distribuído por toda a parte da superfície corporal e a cada folículo está associado um músculo eretor, constituído por tecido muscular liso. O processo de crescimento capilar assemelha-se ao da pele: na base do folículo ocorre a divisão celular e as células diferenciam-se por queratinização acentuada formando o pelo (Simões, 2004).

Muitos trabalhos reportam-se à densidade das glândulas sudoríparas por contagem dos folículos pilosos. Também aí a variabilidade é muito grande. Dowling (1955, citado por Pereira, 2004) salienta que a variabilidade encontrada, desde 582 a 1870 folículos/cm<sup>2</sup>, pode derivar em boa parte da metodologia adotada para as contagens. A contabilização das fibras emergentes pode introduzir um erro de 20%. A biópsia permite quantificar com elevado grau de rigor a densidade folicular e por conseguinte a densidade das glândulas sudoríparas.

A densidade de glândulas ativas na epiderme constitui um dado importante porque nem todas as glândulas sudoríparas se encontram ativas numa determinada altura, estabelecendo uma estreita dependência com o ciclo de atividade dos próprios folículos pilosos. A aclimação sazonal interfere no processo. Durante o verão, maiores números de folículos pilosos estão ativos e conseqüentemente maior número de glândulas apresentam melhores condições para produzirem suor, possibilitando taxas de sudação superiores (Schleger & Turner, 1965; Silva, 2000). Nos trópicos, em que os animais estão sujeitos em grande parte do tempo a temperaturas elevadas, o número de glândulas sudoríparas ativas é superior, repercutindo-se também em maiores taxas de sudação (Murray, 1966; Allen *et al.*, 1970; Silva, 2000).

A densidade das glândulas sudoríparas é muito variável tanto entre raças como no próprio indivíduo. Taneja (1960) verificou que os bovinos cruzados de zebu tendem a apresentar maior densidade de glândulas sudoríparas relativamente à Shorthorn, raça originária de Inglaterra. No próprio indivíduo a espádua e a face dorsal do tronco são as regiões que apresentam densidades superiores. Dowling (1955, citado por Pereira, 2004) observou esta diferença entre taurinos e zebuínos: 1698/cm<sup>2</sup> para os zebus e 1321/cm<sup>2</sup> para os taurinos. As menores densidades são observadas em geral em toda a face ventral, na barbela e nas extremidades (Pereira, 2004).

A morfologia das glândulas sudoríparas está associada com a fase de crescimento do pelo (Amakiri and Hill, 1975). As glândulas de maiores dimensões estão frequentemente em associação com as fases metabolicamente mais ativas do crescimento do pelo (anagénese e catagénese), observando-se o contrário quando decorre a fase de telogénese (Schleger & Bean, 1971).

Quanto à forma estas glândulas, Jenkinson & Nay (1972) referem que bovinos de raças espanholas e portuguesas (raças omissas) apresentam forma de saco e folículos pilosos próximos da epiderme, embora com evidente heterogeneidade volumétrica. Carvalho *et al.* (1995) relataram que os *Bos indicus*, adaptados ao ambiente tropical, possuem glândulas sudoríparas em forma de saco enquanto os *Bos taurus* apresentam glândulas tubulares ou espiraladas (este último também se encontra no porco), confirmando que as glândulas sudoríparas em forma de saco presentes nos *Bos indicus* são mais ativas do que qualquer outro tipo de glândulas sudoríparas.

O volume das glândulas sudoríparas apresenta uma grande heterogeneidade entre raças. Em bovinos *Bos taurus* das raças Frísia, Ayrshire e Illawarra foram observados valores de 14.10, 14.00 e 11.77 x 10<sup>6</sup>mm<sup>3</sup>, respetivamente. Estes valores contrastam com outros registados em outros animais em locais diferentes das raças Shorthorn e Ayrshire que apresentaram valores de 2,00 e 5,74 x 10<sup>6</sup>mm<sup>3</sup> respetivamente (Silva, 2000). Dentro de cada

raça a variação é também muito elevada. Mesmo em locais semelhantes, foi observado na raça Brahman animais com volumes glandulares de  $5,00 \times 10^6 \text{mm}^3$  e outros com  $26,00 \times 10^6 \text{mm}^3$ . Situação semelhante ocorreu com a raça Shorthorn que apresentou volumes de 2,00 e de  $8,00 \times 10^6 \text{mm}^3$  (Jenkinson and Nay, 1972; Jenkinson and Nay, 1973; Jenkinson and Nay, 1975). Tal como a morfologia, o volume das glândulas sudoríparas parece estar dependente de reajustes sazonais associados à temperatura ambiente. Durante o Inverno o volume das glândulas pode atingir metade do volume exibido durante o Verão, sendo o estado de aclimação sazonal em que são realizadas as medições uma fonte de variação provável. As glândulas sudoríparas aparecem normalmente associadas a pelos. Foi observada uma relação de um para um em glândulas sudoríparas e folículos pilosos do porco (Mowafy & Cassens, 1975). Também para raças bovinas europeias também foi observada esta relação, onde vários estudos comprovam que cada folículo piloso tem associado a si uma glândula sudorípara (Jenkinson & Nay, 1972).

A estimulação da atividade das glândulas sudoríparas corresponde tanto a um estímulo direto das terminações nervosas, nas próprias glândulas, como a um estímulo indireto através de fibras sensoriais da pele. O aumento destes dois estímulos é essencial no processo de aclimação a ambientes quentes (Morais, 1999).

Em vacas Holstein Frísia, a cor da epiderme e a cor do pelo são predominantemente claros, pelo que haverá maior penetração da radiação Ultra-violeta (Silva, 1999). Segundo o mesmo autor, o ângulo de inclinação dos pelos em relação à superfície da epiderme é importante porque quanto maior o ângulo de inclinação, maior a penetração da radiação ultravioleta. Este autor exemplifica este efeito citando que sob radiação de ondas curtas da ordem de  $712,86 \text{ W.m}^{-2}$ , os pelos brancos de comprimento de 1,5 cm, sob inclinação de  $70^\circ$  transmitem  $81,4 \text{ W.m}^{-2}$  e os pelos de  $40^\circ$  de inclinação transmitem  $7,0 \text{ W.m}^{-2}$ . Sabendo que a proteção contra os raios ultravioletas é fundamental para prevenir indução de melanomas e carcinomas epidérmicos, este efeito é obtido quando o animal apresenta pelos com menor inclinação. Vacas Holandesas predominantemente pretas e com pelagem de menor espessura estão mais adaptadas a ambientes quentes em relação às de pelagem predominantemente branca.

A presença de pelos e a sua cor também têm um papel importante no isolamento contra a perda de calor, os quais retêm uma camada de ar que aquece o organismo. Isto verifica-se particularmente na exposição à luz solar. Blackshaw & Blackshaw (1994) demonstraram que pelagens escuras podem absorver cerca de 80% da radiação solar incidente, contra 50% no caso de pelagens brancas. Finch (1986) afirma que no *Bos indicus*, a absorção de radiação em novilhos negros é 16% mais elevada que nos castanhos e 58% mais elevada que nos brancos. Assim, pode-

se afirmar que as pelagens brancas e oleosas demonstraram maior refletividade em relação à luz solar. Por outro lado, sabe-se que pelagens curtas e acamadas facilitam a dissipação do calor.

Pelagens mais espessas, com pelos mais longos e com maiores ângulos de inserção, influenciam negativamente a eficiência de evaporação do suor (Allen *et al.*, 1970). Se a superfície da pele está coberta com uma pelagem longa e densa verifica-se que o seu interior vai ficando com maior pressão parcial de vapor, diminuindo a velocidade de evaporação do suor na pele. Quantidades variáveis de suor tendem por isso a evaporar mais longe da superfície cutânea. Dessa forma, o calor retirado da evaporação não deriva diretamente da superfície da epiderme mas do ambiente dentro da pelagem, o que torna menos eficiente a sudação como via de dissipação de calor (Schleger & Turner, 1965; Schleger & Bean, 1971).

As variações na medulação dos pelos estão associadas à maior tolerância ao calor. Animais adaptados aos climas quentes apresentam maior número de pelos medulados. Por exemplo, a raça Jersey apresenta um melhor desempenho em zonas tropicais do que raças de origem europeia por possuir uma alta percentagem de pelos medulados, tanto no verão como no inverno (Baccari, 1989).

Pelagens brancas, curtas, lisas e suaves e pele preta e pelos medulados constituiriam o cenário ideal pois a pele preta impede a penetração dos raios ultravioletas causadores de eritema solar, enquanto os pelos medulados, curtos, lisos e suaves refletem o calor ocasionado pela incidência dos raios infravermelhos criando assim condições favoráveis de aclimação (Silva, 2000).

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. Ensaio

A primeira parte deste estudo foi desenvolvido na Herdade das Pedras Alvas, localizada em Montemor-o-Novo Évora (Coordenadas GPS: 38° 41' 10.6362"N, 8° 8' 17.631"W), propriedade da Sociedade Nacional Rústica, Lda. (Figura 9). Foi neste local onde foram recolhidas todas as amostras do ensaio.



*Figura 9. Fotografia GPS da Herdade das Pedras Alvas*

Ao longo do ensaio foram utilizadas as mesmas fêmeas da raça Holstein Frísia. Este processo decorreu ao longo de cinco meses, sensivelmente de setembro a fevereiro, comportando dois períodos de recolha de amostras.

Cada período teve a duração de 5 dias e decorreram de 31 de agosto a 4 de setembro e de 2 a 7 de fevereiro correspondendo às estações do ano, verão e inverno, respetivamente. Em qualquer exploração leiteira, as instalações são de grande importância, porque facilitam o manejo dos animais, influenciando diretamente na sua produtividade e saúde. Neste ensaio, existiu sempre um dia “zero” correspondente à marcação dos animais e revisão das condições de trabalho. De seguida apresenta-se um esquema representativo para melhor visualização o programa de recolha de dados (Tabela 6).

**Tabela 6.** Esquema de um período experimental

Dias	0	1	2	3	4	5
<b>Eventos</b>	<b>Marcação dos animais</b>	<b>Recolha Parâmetros Fisiológicos</b>				<b>Recolha Parâmetros Histológicos</b>
		Temperatura Rectal				Pele
		Frequência Respiratória				Pelos
		Taxa de Sudação			Vapómetro	
		Humidade da Pele				
		Temperatura da Pele				

Ao longo dos primeiros quatro dias foram efetuadas medições diárias da frequência respiratória (FR) e da temperatura rectal (TR) às 8:00h, às 13:00h e às 18:00h. Às 13h foram medidos, para além dos parâmetros já mencionados, a Taxa de Sudação (TS), a Humidade (H) e a Temperatura (T) da pele através de um vapómetro (Tabela 7). No último dia, foi reservada a manhã para a recolha da pele e dos pelos.

**Tabela 7.** Esquema do horário estabelecido para os diversos procedimentos diários

Horas	Procedimentos	
7		
8	A	
9		
10		
11		
12		
13	A	B
14		
15		
16		
17		
18	A	
19		
20		

A	Medições da Trectal e Fresp.
B	Medição com Vapómetro

As amostras de pele foram encaminhadas para o Hospital Veterinário da Universidade de Évora para o seu posterior processamento e os pelos foram analisados no Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas (ICAAM), especificamente no Laboratório de Fisiologia Animal Aplicada.

### **3.2. Animais**

Os animais do ensaio foram recriados no exterior, num sistema semi-extensivo. Quando atingiram o primeiro parto foram deslocados para um pavilhão com orientação norte-sul, com estabulação livre em cubículos onde passavam todo o período da lactação. Cerca de dois meses antes do parto, estes animais passavam o período seco novamente no exterior. O único equipamento de arrefecimento consistia numa refrigeração do telhado do pavilhão (em chapa) por aspersão de água, nas horas mais quentes do dia. As vacas em lactação encontravam-se todo o dia à sombra, não recebendo, por tanto, radiação solar direta.

De um grupo de cerca de 150 fêmeas de raça Holstein Frísia, foram escolhidas dez vacas adultas da raça Holstein Frísia. O critério de seleção destes animais baseou-se fundamentalmente na homogeneidade do grupo, atendendo à idade, número de lactações e dias de lactação.

A composição da dieta baseava-se numa mistura de feno de erva, silagem de milho e um concentrado energético e eram disponibilizados blocos minerais e água *ad-libitum*. Os constituintes da dieta foram misturados imediatamente antes de serem distribuídos aos animais. As horas de alimentação nesta propriedade efetuavam-se às 05h30 e às 17h30. Os animais encontravam-se corretamente desparasitados e vacinados sendo o nível de produção leiteira diária, em média, 15 litros.

### **3.3. Delineamento Experimental**

#### **3.3.1. Recolha de dados Meteorológicos: Temperatura do Globo Negro**

A Temperatura do Globo Negro (Tgn) foi medida através de um termómetro do Globo Negro que foi colocado a 1,70m do solo, na mesma linha da altura do flanco do animal para simulação da temperatura corporal. As temperaturas eram recolhidas no início e no fim de cada procedimento, à sombra e ao sol respetivamente. A Tgn foi, portanto, medida 6 vezes por dia.

#### **3.3.2. Recolha dos dados Fisiológicos: Frequência Respiratória e Temperatura Rectal**

A Frequência Respiratória (FR) foi obtida por observação direta do movimento da região das costelas durante 15 segundos e os valores multiplicados por quatro para cálculo da FR  $\text{minuto}^{-1}$ . As medições foram sempre realizadas por, pelo menos, dois operadores diferentes e foram confirmadas por observações adicionais sempre que os resultados apresentavam alguma dúvida.

A Temperatura rectal foi medida através de um termómetro clínico digital (Figura 10) *Talue Elane Medicare* que permanecia no reto do animal e dava sinalização sonora após a estabilização da temperatura máxima.



*Figura 10. Medição da temperatura rectal em tempo real*

### **3.3.3. Recolha dos dados Fisiológicos: Taxa de Sudação e Temperatura da Pele**

Às 13h era acrescentada a medição da Taxa de Sudação (TS), Humidade Relativa (H) Temperatura (T) da pele com a utilização do vapómetro da marca Delfin (Figura 11). Este aparelho era colocado numa superfície depilada, nomeadamente, na zona mediana do tronco entre a região posterior à espádua até à região da antepenúltima costela (Figura 12).



*Figura 11. VapoMeter (Delfin Technology, Kuopio, Finland)*



*Figura 12. Medição da taxa de sudação e temperatura da pele em tempo real*

#### **3.3.4. Recolha de pelos e de tecido cutâneo**

As amostras de pelos foram obtidas no período da manhã através da utilização de uma pinça adaptada e sempre que possível, eram retirados pelos brancos e pretos.

Na mesma manhã, foram obtidas as amostras de tecido cutâneo através de uma biópsia. Após a administração de anestésico local, foi retirada uma amostra de aproximadamente 0,1cm de diâmetro de tecido cutâneo na região lateral direita na altura média do dorso entre a 12ª e 13ª costela de cada animal com o auxílio de um *punch* (Figura 13). De seguida, a ferida foi selada com um *spray* aerossol.



*Figura 13. Realização da biópsia em tempo real*

### **3.4. Análises laboratoriais e Biometria**

#### **3.4.1. Comprimento, Diâmetro e Medulação dos Pelos**

Cada amostra foi mergulhada em éter de petróleo durante 10 minutos. Posteriormente os pelos pretos foram mergulhados em peróxido de hidrogénio a 10%, durante 18 horas. Finalmente as amostras foram lavadas com água e montadas em lâminas de glicerol.

O tipo de medula foi identificado através do método descrito por Udo (1978). Primeiro separou-se uma amostra de dez pelos e, tal como para o comprimento, foram mergulhados em éter de petróleo durante dez minutos. Os pelos pretos, depois do éter de petróleo, ficaram submersos por 18 horas em peróxido de hidrogénio 30%. Depois de secos, os pelos foram montados em lâminas, com o auxílio de um meio de montagem. Foram posteriormente observados em microscópio ótico com uma ampliação de 400x, para se observar o tipo de medula e ainda o diâmetro do pelo (na zona medial), através de ocular micrométrica. 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 dos pelos e mediu-se o seu comprimento com o *software* SigmaScan Pro versão 5, após o que se fez a conversão dos valores em pixéis para centímetros.

### 3.4.2. Histologia

Após a biópsia, a amostra de pele foi fixada em formaldeído neutro a 10%, tamponado (pH 7.4), durante 24 horas. Após a fixação, procedeu-se ao processamento de uma parte da amostra, obtendo-se uma superfície de corte tão grande quanto possível, pelas técnicas histológicas de rotina, em sistema automático: inclusão em parafina (direcionando a secção longitudinal-horizontalmente) e corte em micrótomo rotativo (em secções com 5 µm de espessura). Os cortes foram estendidos em lâminas de vidro de 75 x 25 mm e após desparafinação e hidratação, foram corados com Hematoxilina e Eosina (H&E) para observação da estrutura geral e eventuais alterações histológicas. A hematoxilina é um corante básico que cora as estruturas ácidas (núcleos) e a eosina é um corante ácido que cora estruturas básicas (citoplasma). Como resultado, os núcleos ficam corados de azul e o citoplasma de cor rosada. Após a coloração procedeu-se à montagem para obtenção das preparações definitivas. O meio de montagem (Ethelan) é uma substância utilizada sobre o corte colando a lamela à lâmina, garantindo a sua conservação. Por outro lado, constitui um meio ótico transparente clarificando o corte.

### 3.4.3. Imuno-histoquímica

Dos blocos do estudo histológico realizaram-se cortes que se estenderam em lâminas de vidro de 75x25 mm tratadas com polilisina, para realização da técnica de imuno-histoquímica. Esta técnica foi realizada através do método "*labeled-(strept)avidin-biotin*" (LAB-SA), utilizando o UltraVision Detection System Kit (Thermo Scientific, USA, ref<sup>a</sup> TP-015-HD). O processamento foi feito de acordo com as indicações do fabricante que, em termos gerais, são como se seguem:

1. Desparafinaram-se as secções (incluindo controlos positivos e negativos) devidamente identificadas (3 vezes em xilol: 5 minutos, 5 minutos, 3 minutos), com a seguinte ordem: Hidratação (com álcool a 100% durante 3 minutos; álcool 100%, 3 minutos; álcool 95%, 3 minutos; álcool 80%, 3 minutos) e lavagem em água da torneira e, de seguida, em água destilada.

2. Incubaram-se as secções em solução de peróxido de hidrogénio a 3%, durante 10 a 15 minutos, à temperatura ambiente (uma parte de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30% para nove partes de metanol absoluto).

3. Lavaram-se duas vezes (2 a 3 minutos cada lavagem) em banho de solução salina fosfatada tamponada (PBS, 10mM fosfato de sódio, 0,15 cloreto de sódio, pH 7.5) e removeu-se o excesso em volta do corte. A partir desta fase todos os procedimentos foram realizados em câmara húmida.

4. Incubaram-se as secções com o pré-tratamento adequado (a fixação em formalina promove ligações múltiplas entre os grupos aminos e a formação de pontes de metileno entre os vários aminoácidos presentes nos peptídeos de uma determinada proteína e desta com as proteínas adjacentes. Estas múltiplas ligações bloqueiam o acesso de anticorpos aos epítomos alvo, mascarando o antigénio). A recuperação do antigénio foi feita através de HIER (*Heat Induced Epitope Retrieval*): aqueceu-se uma solução de citrato, pH 6, até 95-98º C e as lâminas foram colocadas nesta solução na temperatura referida, durante 20 minutos. De seguida, deixou-se arrefecer a solução à temperatura ambiente, durante, pelo menos, 20 minutos.

5. Lavaram-se as lâminas quatro vezes em PBS, durante 3 minutos cada. Neste passo delimitaram-se os cortes com caneta hidrofóbica.

6. Incubaram-se as secções com a solução de bloqueio, durante 5 minutos, à temperatura ambiente.

7. Removeu-se o excesso de solução de bloqueio sem lavar.

8. Incubaram-se as secções com os anticorpos primários, na diluição adequada, durante a noite (overnight), a 4ºC (Tabela 8). O volume do anticorpo primário foi o suficiente para cobrir toda a secção. No controlo negativo o anticorpo primário foi substituído por PBS.

9. Lavaram-se as lâminas quatro vezes em PBS, durante 3 minutos cada.

10. Limpou-se o excesso de PBS e incubaram-se as secções com o anticorpo secundário biotinilado, durante 10 minutos, à temperatura ambiente.

11. Lavaram-se as lâminas quatro vezes em PBS, durante 3 minutos cada.

12. Limpou-se o excesso de PBS e incubaram-se as secções com estreptavidina peroxidase, durante 10 minutos, à temperatura ambiente.

13. Lavaram-se as lâminas quatro vezes em PBS, durante 3 minutos cada.

14. Incubaram-se as secções com a solução reveladora de diaminobenzidina (DAB) [DAB-PBS-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>], durante 5-10 minutos, à temperatura ambiente, após o que foram lavadas com PBS, com esguicho e depois em banho de PBS, durante 3 minutos.

15. Contrastaram-se as lâminas com Hematoxilina (3 minutos) à temperatura ambiente. Lavagem em banho de PBS durante 3 minutos e, de seguida, em banho água durante 3 minutos.

16. Cobriram-se as secções com meio de montagem (Ethelan), colocou-se a lamela e deixou-se secar durante a noite.

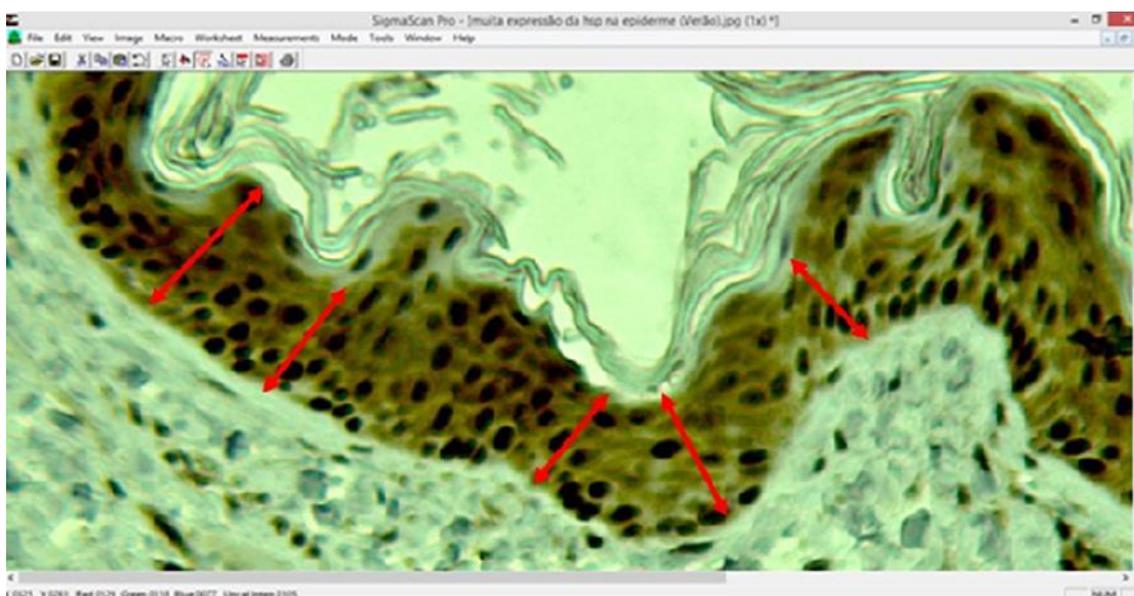
*Tabela 8. Referências dos anticorpos primários utilizados no presente trabalho*

Anticorpo primário	Clone	Marca	Referência	Origem	Diluição
Actina <sup>1</sup>	1A4	Santa Cruz Biotechnology	sc-32251	Mouse monoclonal	1:100
HSP70 <sup>2</sup>	N27F3-4	Santa Cruz Biotechnology	sc-66049	Mouse monoclonal	1:50
PCNA <sup>3</sup>	PC10	Thermo Scientific	MS-106	Mouse	1:200

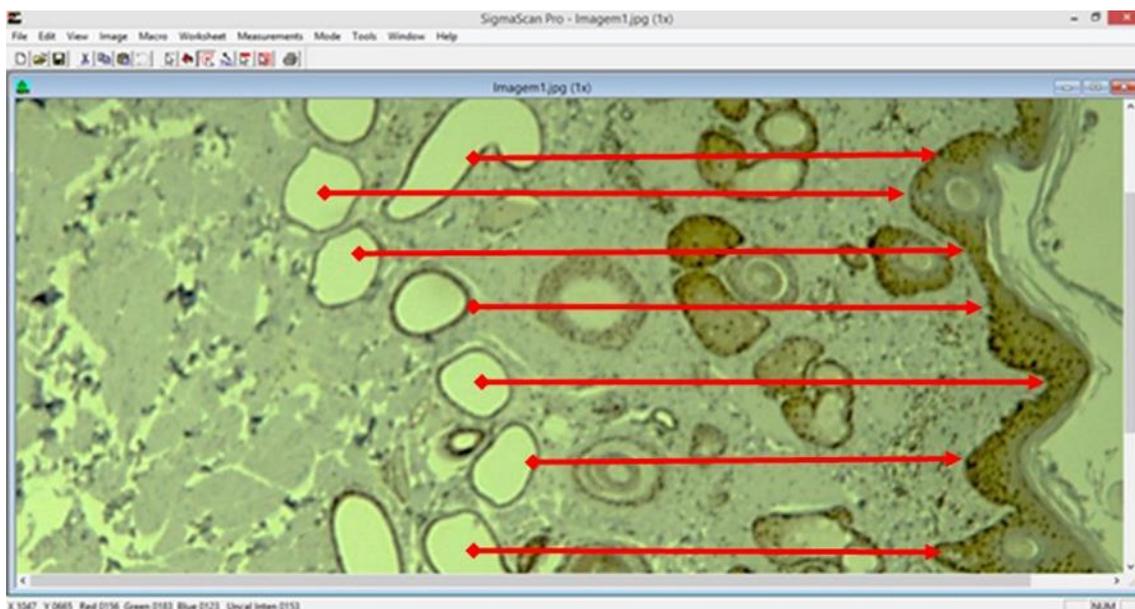
<sup>1</sup> Controlo positivo: intestino delgado de Hamster; <sup>2</sup> Controlo positivo: cancro da mama; <sup>3</sup> Controlo positivo: intestino delgado de Hamster

#### 3.4.4. Análise de Imagem e Morfometria

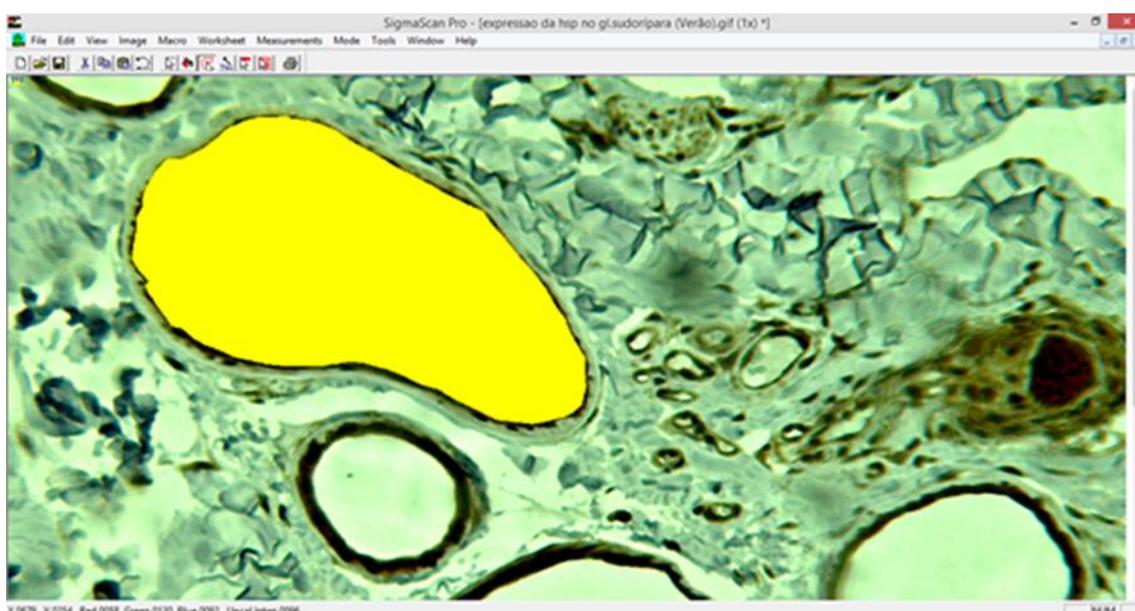
As preparações definitivas foram observadas em microscópio fotónico (Leitz Dialux 20), sendo as imagens obtidas através da câmara digital Leica DC300. Por cada animal e por cada período foi selecionada uma lâmina, das quais, com uma ampliação de 25X, foram obtidas imagens digitais. Nessas imagens, através do programa SigmaScan Pro versão 5 (SPSS, 2002) foram efetuadas as seguintes medições, em pixéis: espessura da epiderme (Figura 14), distância das glândulas sudoríparas à epiderme (Figura 15), perímetro e área das seções das glândulas sudoríparas (Figura 16). No final os valores em pixéis foram posteriormente convertidos a micrómetros.



*Figura 14. Medição da espessura da epiderme, sendo o valor para cada animal a média de cinco medições*



*Figura 15. Medição da distância das glândulas sudoríparas à epiderme, sendo o valor para cada animal a média de dez medições*



*Figura 16. Medição do perímetro e da área das secções das glândulas sudoríparas, sendo o valor para cada animal a média de dez medições*

*Nota: O valor para cada animal corresponde à média de todas as secções encontradas na lâmina. Na imagem o que se encontra a amarelo corresponde à área da respetiva secção que foi calculada automaticamente no SigmaScan Pro.*

Para os marcadores estudados, a avaliação da intensidade de imunomarcção foi qualitativamente estimada de acordo com a seguinte escala: nenhuma expressão = 0, expressão fraca = 1, expressão moderada = 2, expressão forte = 3. A avaliação foi realizada em microscópio

fotónico Leitz Dialuz 20, com a ampliação de 25X, em secções correspondendo a 5 animais/período e 1 secção/animal.

Seguiu-se a mesma metodologia para a medição do comprimento dos pelos. A avaliação da medula e o diâmetro foram directamente medidos na ocular e este último parâmetro, a partir de régua micrométrica. No final os valores também foram convertidos a micrómetros.



*Figura 17. Medição do comprimento dos pelos e utilização da régua micrométrica para medição do diâmetro*

### **3.5. Análise Estatística**

Para os casos em que foi feita análise histomorfométrica e em que foi necessário determinar o efeito de fatores, os valores obtidos (média  $\pm$  desvio padrão) foram analisados através de análise de variância, utilizando-se um teste de Shapiro-Wilk, para determinar a significância estatística das diferenças entre médias, sempre que foram encontrados efeitos significativos ( $P < 0,05$ ). Todas as análises estatísticas foram realizadas recorrendo ao R Studio (versão 3.0.1).

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Temperatura do Globo Negro

As temperaturas médias obtidas com os termómetros Globo Negro ao sol e à sombra, no verão e no inverno, encontram-se na tabela 9, inseridos por período e por hora de medição.

*Tabela 9. Temperaturas de Globo Negro (°C) obtidos no presente estudo, por período e por medição (média ± desvio-padrão)*

Período	Medição	Temperatura do Globo Negro	
		Sol	Sombra
Verão	8h	28,69	19,06
	13h	43,56	26,94
	18h	30,875	28
$\bar{x} \pm \Sigma$		<b>34,37 ± 8,03</b>	<b>24,67 ± 4,88</b>
Inverno	8h	10,81	4,25
	13h	23,19	8,14
	18h	8,63	5,94
$\bar{x} \pm \Sigma$		<b>14,21 ± 7,85</b>	<b>6,11 ± 1,95</b>

A temperatura do Globo Negro é um dado muito importante na medida em que emite o valor da sensação térmica, ou seja, a temperatura ambiente que é percebida pelo animal. Não corresponde efetivamente à temperatura ambiente que existe em determinada hora e lugar, mas à temperatura ambiente que é realmente sentida pelo animal (Pereira, 2004). Pela observação da tabela 9, os valores de temperatura percebidos pelo animal ao sol e à sombra no período de Verão, foram respetivamente 34,37°C e 24,67°C. Já no período do Inverno observam-se valores entre 14,21°C e 6,11°C, aproximadamente.

O fator radiação direta e hora do dia influenciam diretamente as temperaturas registadas. Pode-se verificar que no verão este parâmetro apresenta-se mais elevado durante o período da tarde comparativamente ao período da manhã. No Inverno verificam-se temperaturas mais elevadas no período das 13h.

No verão, mais especificamente nas medições das 13h e das 18h, observa-se um ligeiro aumento de Tgn que põe em causa o conforto térmico dos animais. Uma vez que os animais estavam estabilizados pode-se depreender que a sensação térmica percebida por estes se foca maioritariamente na Tgn Sombra. A partir desta análise e pela revisão da literatura (Pereira *et al.*, 2007), pode-se concluir que os animais permaneceram dentro da zona de conforto térmico ao longo do ensaio.

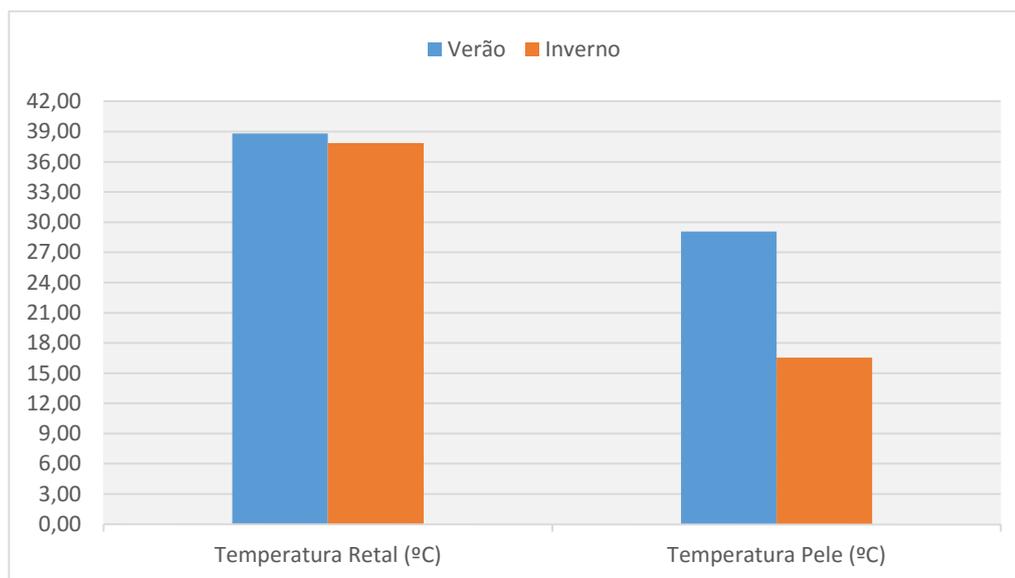
#### **4.2. Frequência Respiratória, Temperatura Rectal, Taxa de Sudação e Temperatura da Pele**

A capacidade de o animal resistir a condições de stresse térmico tem sido avaliada fisiologicamente através da temperatura rectal e frequência respiratória. A medição da temperatura rectal é utilizada frequentemente como um índice de adaptabilidade fisiológica porque o seu aumento indica a insuficiência dos mecanismos de dissipação de calor. Estes parâmetros podem ser influenciados por fatores extrínsecos (hora do dia, ingestão de alimentos e de água, temperatura ambiental, velocidade do vento, estação do ano) e também por fatores intrínsecos (idade, raça e estado fisiológico).

Segundo Baccari (1989) a temperatura corporal é caracterizada por eventos de ocorrência periódica, obedecendo a um ritmo circadiano que se repete a cada 24h, atingindo o seu ponto máximo entre as 17h e as 19h e o seu ponto mínimo entre as 4h e as 6h, variando também com o ciclo estral e estação do ano.

Outro parâmetro que é frequentemente utilizado é a taxa de sudação. No presente estudo, para determinação da taxa de sudação foi utilizado aparelho Vapometer. Trata-se de um aparelho desenvolvido para a análise de perda de água transepidermica (PTEA) e permeabilidade da pele, possuindo a vantagem de calcular dados a partir do ambiente que se encontra entre a superfície da pele e a câmara fechada que está intrínseca no mesmo. Esta câmara evita interferências ambientais externas e fornece medidas rápidas e precisas acerca da quantidade de vapor de água total que se encontra na superfície cutânea (Mouchot *et al.*, 2005).

Martello *et al.* (2004) referem que a temperatura da pele de vacas Holstein Frísias alojadas em instalações climatizadas pode variar de 31,6°C a 34,7°C, sem indicação de stresse térmico no animal. Apesar dos animais do ensaio não se encontrarem em instalações propriamente climatizadas, este parâmetro costuma ser considerado como fator de validação para a taxa de sudação. Os estímulos cruzados da temperatura da pele e rectal podem favorecer, em alguns casos, uma maior preponderância da sudação enquanto noutros casos um maior protagonismo da polipneia (Figura 18) (Louw, 1993).



**Figura 18.** Variação dos valores médios da temperatura da pele (°C) e temperatura retal (°C) no presente estudo

Posteriormente na tabela 10 são ilustrados os resultados das medições dos parâmetros fisiológicos obtidos ao longo do ensaio.

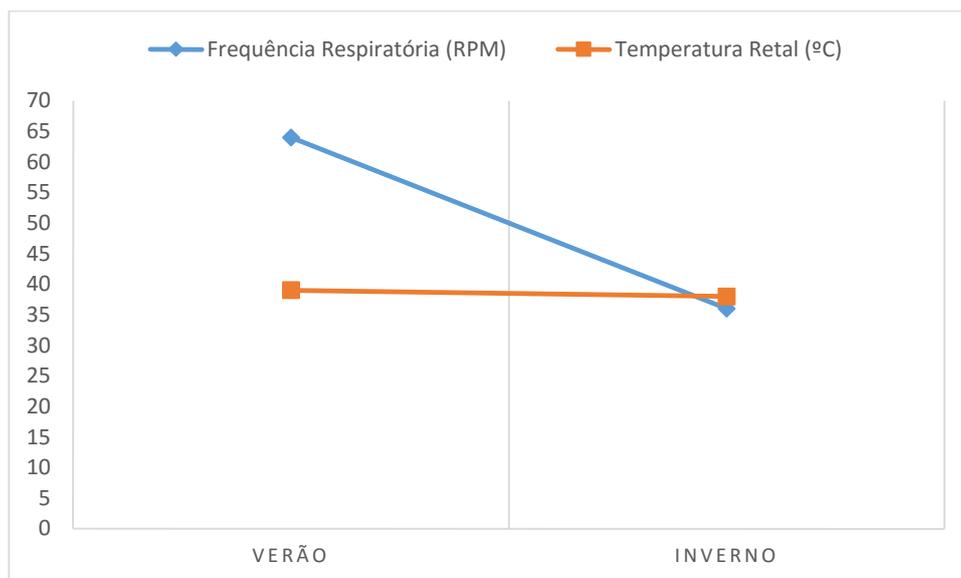
**Tabela 10.** Parâmetros fisiológicos obtidos no presente estudo, por período e por medição (média  $\pm$  desvio-padrão)

Período	Medição	Parâmetros Fisiológicos (p-value < 0,05)			
		Frequência Respiratória (RPM)	Temperatura Retal (°C)	Taxa de Sudação g.m2.h-1	Temperatura da Pele (°C)
Verão	8h	54	38,33		
	13h	70	38,87	76,894	29,078
	18h	69	39,26		
$\bar{x} \pm \Sigma$		<b>64,00 <math>\pm</math> 8,90</b>	<b>38,82 <math>\pm</math> 0,47</b>	<b>76,89 <math>\pm</math> 46,77</b>	<b>29,08 <math>\pm</math> 1,24</b>
Inverno	8h	35	38,00		
	13h	36	38,00	24,00	16,55
	18h	38	37,60		
$\bar{x} \pm \Sigma$		<b>36,00 <math>\pm</math> 1,45</b>	<b>37,87 <math>\pm</math> 0,23</b>	<b>24,00 <math>\pm</math> 7,30</b>	<b>16,55 <math>\pm</math> 1,36</b>

Sabe-se que a frequência respiratória de 60mov./min indica animais que não estão sob stresse térmico ou que este é mínimo. No entanto, quando esta frequência ultrapassa os 120mov./min reflete carga excessiva de calor e acima dos 160mov./min, devem ser tomadas medidas de emergência (Baccari, 1989; Martins, 2014). Pela análise da tabela 10, conclui-se que apenas no período de verão podem ter ocorrido eventos de stresse moderado. Do mesmo modo, verifica-se que a temperatura retal (TR) entre períodos e entre medições encontra-se dentro da faixa de normalidade. No entanto, no período de verão, mais propriamente na medição das 18h, são atingidos os valores máximos que reforçam e justificam uma situação de

stress térmico moderado. Estes resultados sugerem que os animais utilizaram a termólise evaporativa com a finalidade de manter a homeotermia (Almeida, 2010).

Neste estudo a temperatura rectal é utilizada como coadjuvante da frequência respiratória na quantificação do stress térmico. A Figura 19 ilustra a homogeneidade verificada ao nível da temperatura rectal, justificada pelos desvios-padrão próximos de zero e a variação dos valores de Frequência Respiratória (FR), evidenciada pelos valores apresentados na tabela anterior.



**Figura 19.** Variação dos valores médios da temperatura rectal (°C) e da frequência respiratória (RPM) no presente estudo

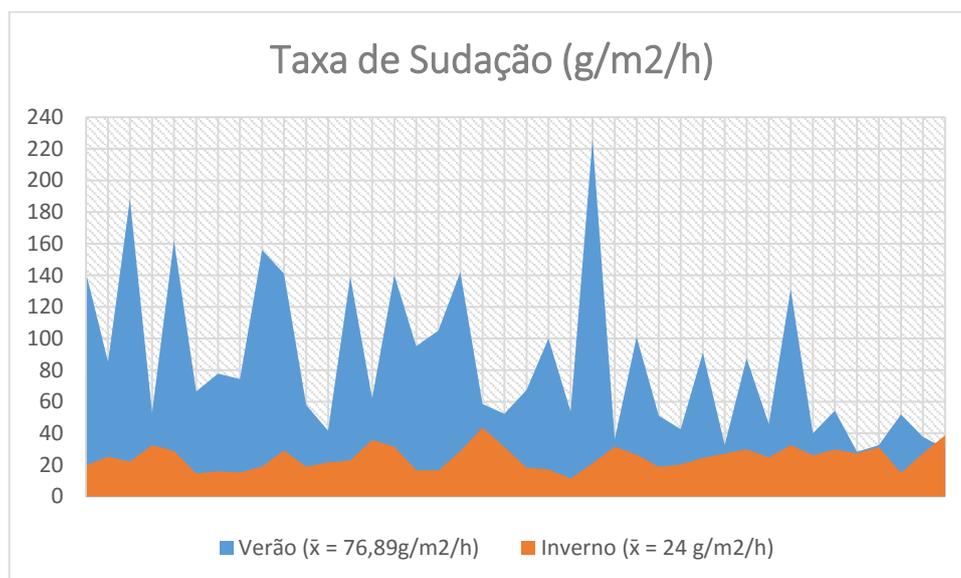
Para a análise estatística destas variáveis foram validados os pressupostos, através do teste de Shapiro-Wilk. Para o parâmetro “Temperatura Rectal” verificaram-se:

- Verificaram-se diferenças significativas entre as medições das 8 horas analisadas nos dois períodos ( $P = 0,0012$ ;  $F = 11,2$ );
- No horário das 8 horas, a Temperatura Rectal foi significativamente superior no verão comparativamente à do inverno ( $38,33^{\circ}\text{C} > 38,00^{\circ}\text{C}$ );
- Verificaram-se diferenças significativas entre as medições das 13 horas analisadas nos dois períodos ( $P < 0,0001$ ;  $F = 58,4$ );
- No horário das 13 horas, a Temperatura Rectal foi significativamente superior no verão comparativamente à do inverno ( $38,87^{\circ}\text{C} > 38,04^{\circ}\text{C}$ );
- Verificaram-se diferenças significativas entre as medições das 18 horas analisadas nos dois períodos ( $P < 0,0001$ ;  $F = 82,37$ );
- No horário das 18 horas, a Temperatura Rectal foi significativamente superior no verão comparativamente à do inverno ( $39,26^{\circ}\text{C} > 38,15^{\circ}\text{C}$ ).

Da mesma forma, para o parâmetro “Frequência Respiratória” concluiu-se:

- Verificaram-se diferenças significativas entre o valor de Frequência Respiratória (medição das 8 horas) médio analisado nos dois períodos ( $P < 0,0001$ ;  $F = 133,64$ ). No verão foi significativamente superior ao inverno (53,92 RPM > 34,70 RPM);
- Verificaram-se diferenças significativas entre o valor de Frequência Respiratória (medição: 13h) médio analisado nos dois períodos ( $P < 0,0001$ ;  $F = 485,011$ ). No verão foi significativamente superior ao inverno (70,42 RPM > 36,10 RPM);
- Verificaram-se diferenças significativas entre o valor de Frequência Respiratória (medição: 18h) médio analisado nos dois períodos ( $P < 0,0001$ ;  $F = 309,2544$ ). No verão foi significativamente superior ao inverno (67,84 RPM > 36,42 RPM).

Foram comparadas as médias das taxas de sudação, verificando-se que a taxa de sudação no verão foi 76,89g/m<sup>2</sup>/h, superior a 24,00 g/m<sup>2</sup>/h relativamente ao período de Inverno. A Figura 20 ilustra esta diferença (=52.89 g.m<sup>2</sup>.h<sup>-1</sup>).



**Figura 20.** Variação dos valores médios da taxa de sudação nos dois períodos de ensaio

Durante o verão ou em períodos mais quentes, os bovinos recorrem a mecanismos adaptativos fisiológicos de perda de calor para evitar a hipertermia. Desta forma, aumentam a frequência respiratória (taquipneia) como complemento ao aumento da taxa de sudação. Ambos constituem importantes meios de perda de calor corporal por evaporação (Avezedo, 2004; Scharf *et al.*, 2008). Shearer & Beede (1990) constataram que a sudação constitui um mecanismo mais importante que a frequência respiratória em bovinos sujeitos a temperaturas

acima de 21°C. Justifica o facto da menor utilização da frequência respiratória para perder calor como uma estratégia energética menos dispendiosa e mais confortável para a sobrevivência de bovinos (Figura 21).

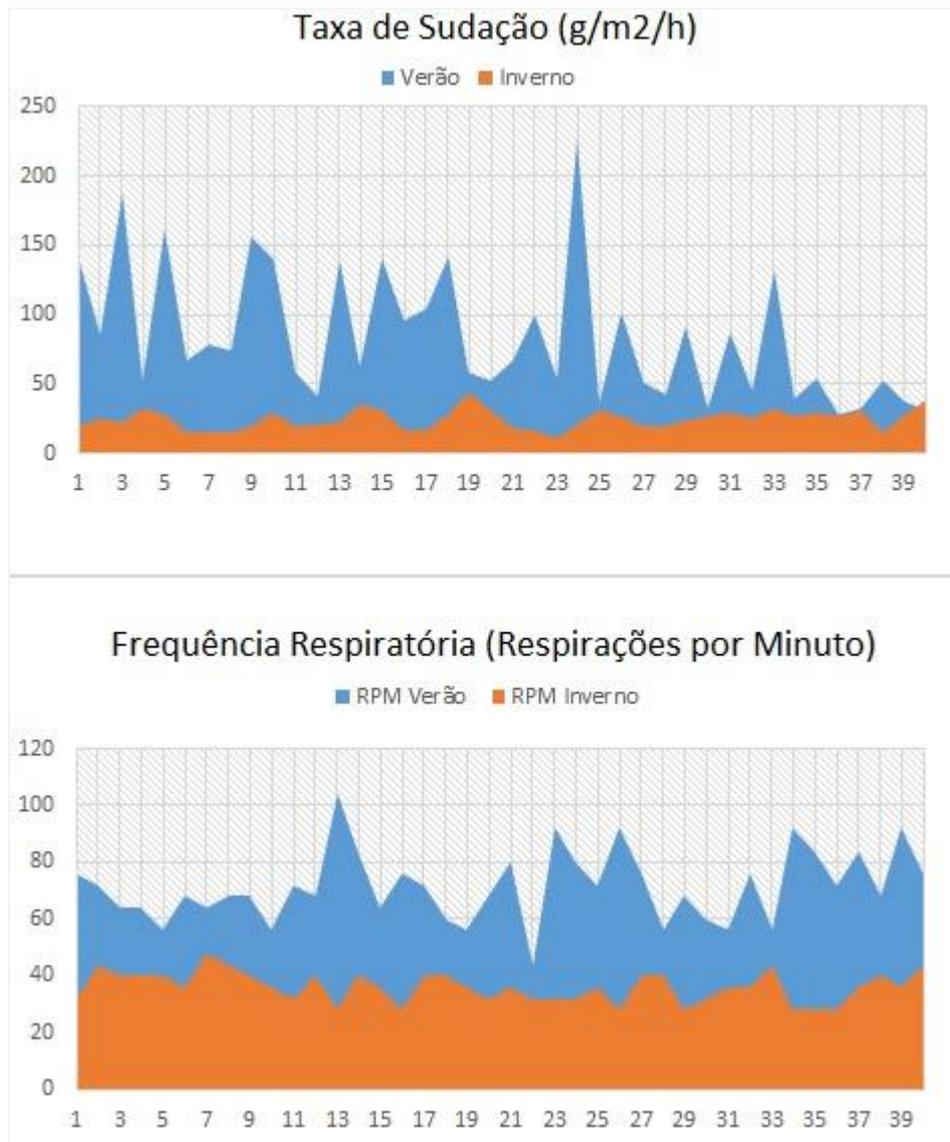


Figura 21. Utilização das vias de termólise

### 4.3. Características das Glândulas Sudoríparas

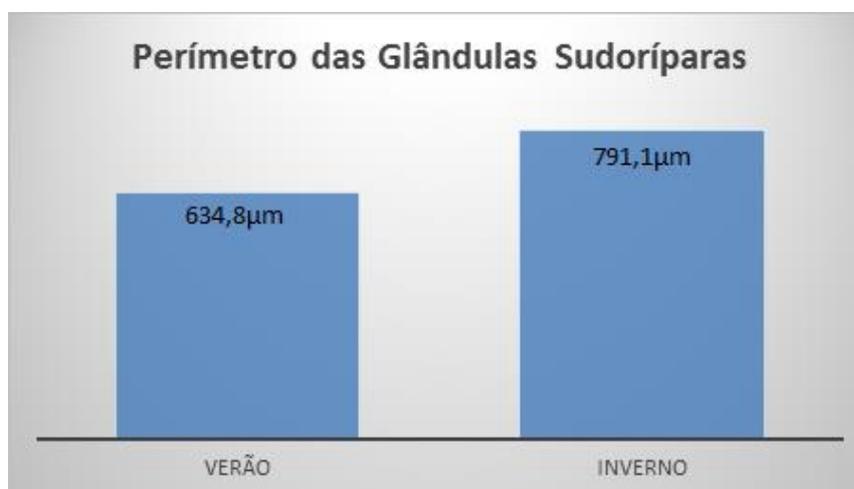
Na Tabela 11, encontram-se os resultados relacionados à avaliação histológica do fragmento do tecido cutâneo.

**Tabela 11.** Características histomorfométricas da pele (média  $\pm$  desvio-padrão)

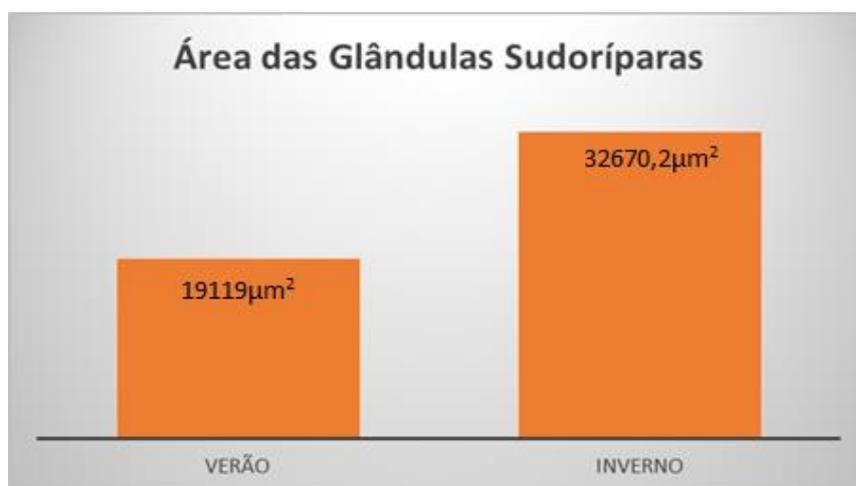
Período	Glândulas Sudoríparas (p-value < 0,05)			Espessura da Epiderme ( $\mu\text{m}$ ) (p-value < 0,05)	
	Área ( $\mu\text{m}^2$ )	Perímetro ( $\mu\text{m}$ )	Distância ao Epitélio ( $\mu\text{m}$ )		
Verão	$\bar{x}$	<b>19119,0</b>	<b>634,8</b>	<b>720,6</b>	<b>65,6</b>
	$\Sigma$	<b>4755,8</b>	<b>133,8</b>	<b>221,1</b>	<b>19,9</b>
	Max.	24864,7	825,7	992,9	95,6
	Min.	12848,2	501,1	445,0	48,0
Inverno	$\bar{x}$	<b>32670,2</b>	<b>791,1</b>	<b>1052,7</b>	<b>48,4</b>
	$\Sigma$	<b>11483,6</b>	<b>195,4</b>	<b>17,3</b>	<b>10,7</b>
	Max.	42736,0	992,4	1075,0	63,3
	Min.	14865,1	506,8	1036,0	38,5

Comparando os dois períodos, verificaram-se menores as áreas das glândulas sudoríparas na época do verão. Estes resultados confirmaram os de Benjamin (1971, citado por (Bhayani & Vyas, 1990), que observou um aumento do volume das glândulas sudoríparas no inverno relativamente ao verão. O menor volume das glândulas sudoríparas indica o seu pico funcional e com aumento do volume no período do inverno, indica a sua inatividade. Uma vez que se verificaram menores áreas das glândulas sudoríparas no verão, conseqüentemente também se podem inferir menores perímetros.

Os valores apresentados na tabela 11 e as conclusões estatísticas são representados de forma esquemática nas figuras posteriores. Estatisticamente conclui-se que existem diferenças significativas entre os perímetros médios medidos nos dois períodos (teste-t= 3,25; valor  $p=0,002$ ). Com 95% de confiança, pode-se afirmar que a diferença média entre os valores do perímetro entre o período de verão e o período de inverno se situa entre 634,8 $\mu\text{m}$  e 791,1 $\mu\text{m}$  (Figura 22).

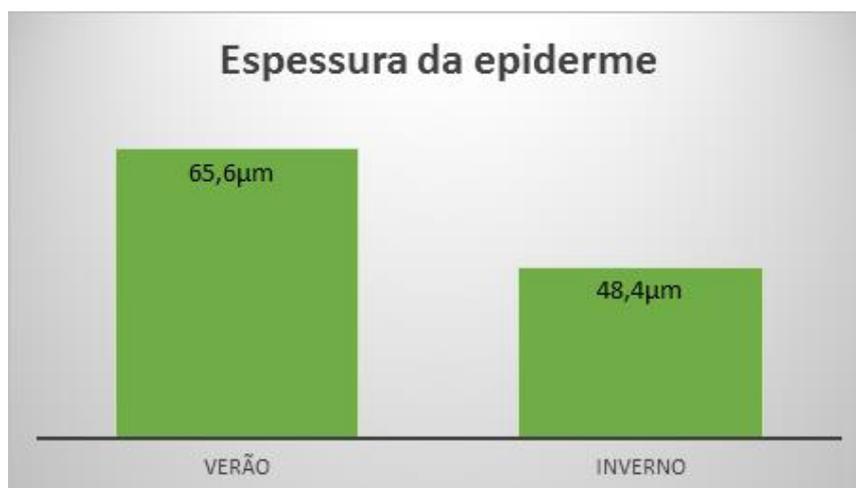
**Figura 22.** Esquema das médias do perímetro das glândulas sudoríparas nos dois períodos de ensaio

Para comparar as médias das restantes variáveis nos dois períodos aplicou-se um teste de Wilcoxon, uma vez que não se conseguiu validar uma distribuição normal para as variáveis: Área, Espessura e Distância. Por não se ter conseguido validar este pressuposto a partir do teste-t mas pelo teste de Wilcoxon, as diferenças foram avaliadas pelos valores das medianas. Concluiu-se que existem diferenças significativas entre as medianas das áreas das glândulas medidas nos dois períodos ( $S=38$ , valor  $p<0,001$ ). Com 95% de confiança pode-se afirmar que a diferença das medianas das áreas entre o período de verão e o período de inverno se situa entre  $19119\mu\text{m}^2$  e  $32670,2\mu\text{m}^2$  (Figura 23).



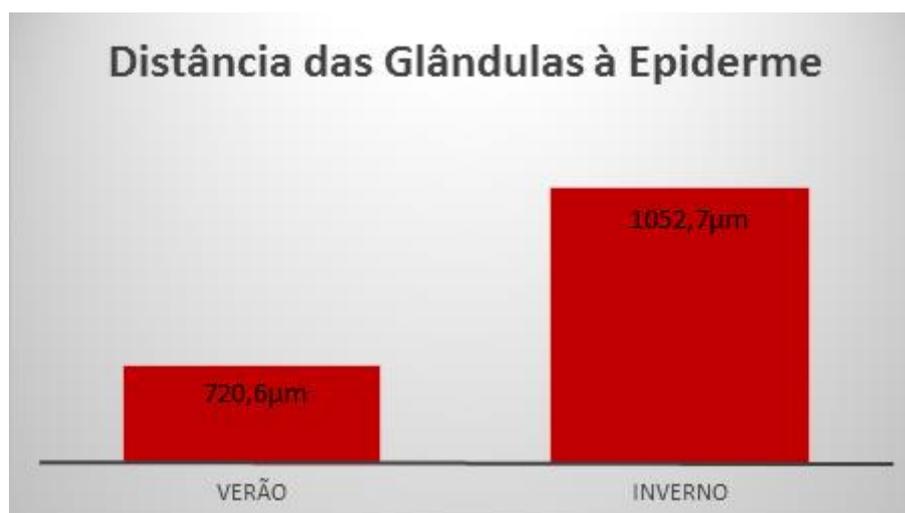
**Figura 23.** Esquema das médias da área das glândulas sudoríparas nos dois períodos de ensaio

Da mesma forma, as diferenças para o parâmetro Espessura da epiderme encontram-se na Figura 24 e estatisticamente, com um intervalo de confiança a 95%, entre o período de verão e o período de inverno, correspondem a  $65,6\mu\text{m}$  e  $48,4\mu\text{m}$ . De realçar que a espessura da pele varia com a região do corpo e é influenciada pela idade, estado nutricional e raça. Sabe-se que animais mais velhos têm a pele mais grossa, pelo que se suspeita que esta característica, também esteja associada à sazonalidade e à menor eficiência de dissipação de calor, quando as temperaturas se apresentam mais elevadas (McDowell, 1975).



*Figura 24. Esquema das médias da espessura da epiderme nos dois períodos de ensaio*

As glândulas sudoríparas encontraram-se localizadas mais superficialmente no verão e mais profundas no inverno. A menor profundidade das glândulas também é um indicador do aumento de atividade funcional. Mugale & Bhosle (2002) ao estudarem as diferenças de profundidade das glândulas sudoríparas em bovinos (distância ao epitélio), observaram que no verão estão localizadas mais superficialmente e atribuíram esta característica à maior atividade destas no verão, indicando que a atividade de sudação é mais intensa nessa época do ano. A Figura 25 ilustra as diferenças da distância das glândulas à epiderme.



*Figura 25. Representação esquemática das médias da distância das glândulas sudoríparas à epiderme nos dois períodos de ensaio*

Existem diferenças significativas entre as medianas da Distância das Glândulas à Epiderme medidas nos dois períodos ( $S=35$ , valor  $p < 0,001$ ). Com 95% de confiança pode-se afirmar que a diferença das medianas da Distância à Epiderme entre o período verão e o período de inverno se situa entre  $720,6\mu\text{m}$  e  $1052,7\mu\text{m}$ .

#### 4.4. Características da Pelagem: Comprimento, Diâmetro e Medulação

Sabe-se que pelagens menos densas e mais curtas favorecem a termólise, sendo mais adequadas no verão. Quanto maior for a espessura e o comprimento dos pelos, maior será o isolamento térmico que pode prejudicar a dissipação de calor em alturas mais quentes. A variação no diâmetro e no comprimento dos pelos observados nas estações do ano também foi verificada por outros autores. Arantes Neto (1985) e Silva (1998) relataram valores de espessura e de comprimento dos pelos maiores no inverno do que no verão. Os resultados para as características comprimento e diâmetro dos pelos podem ser observados na tabela 12.

*Tabela 12. Características dos pelos no presente estudo (média  $\pm$  desvio-padrão)*

Período	Pelos Brancos		Pelos Pretos	
	Comprimento (cm)	Diâmetro ( $\mu\text{m}$ )	Comprimento (cm)	Diâmetro ( $\mu\text{m}$ )
Verão	$1,08 \pm 0,40$	$0,028 \pm 0,01$	$1,26 \pm 0,38$	$0,03 \pm 0,01$
Inverno	$1,20 \pm 0,34$	$0,027 \pm 0,01$	$1,16 \pm 0,36$	$0,03 \pm 0,01$

Com a finalidade de apresentar um modelo operacional para estimar a troca térmica radiante em vacas Holstein Frísias, mantidas em ambiente tropical, Silva (1999) determinou as características da pelagem. O autor encontrou na pelagem preta espessuras, comprimentos, diâmetros e número de pelos, na ordem de  $3,0\text{ mm}$ ;  $1,25\text{ cm}$ ;  $43,5 \times 10^{-6}\text{ m}$  e  $1,46 \times 10^3/\text{cm}^2$  e na pelagem branca valores de  $3,7\text{ mm}$ ;  $1,38\text{ cm}$ ;  $38,4 \times 10^{-6}\text{ m}$  e  $1,40 \times 10^3/\text{cm}^2$ , respetivamente.

Ferreira *et al.* (2009) encontraram em bovinos Holandeses cruzados, espessura da pelagem e comprimento de pelos menores no verão em relação ao inverno e concluíram que a estação do ano influenciou as características da pelagem de forma a maximizar o controlo da homeostasia térmica.

No presente estudo não se observaram diferenças evidentes e significativas no comprimento e diâmetro dos pelos. Apesar disto, as médias dos valores dessas características foram maiores na estação do inverno. Para o tratamento estatístico das variáveis em estudo, aplicou-se um modelo misto com os animais como efeito aleatório e a cor do pelo como variável intrínseca ao animal. Os pressupostos foram verificados, a Homocedasticidade e a Normalidade foi assumida pelo Teste de Shapiro-Wilk:  $W=0,99$ ; valor  $p=0,252$ . Também a normalidade dos

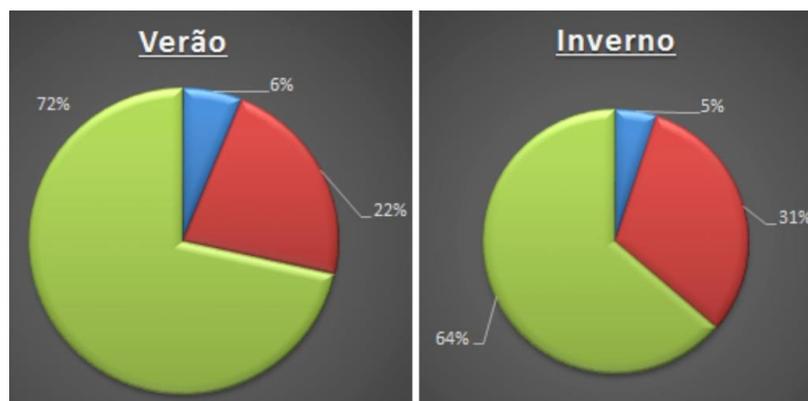
efeitos aleatórios foi validada pelo Teste de Shapiro-Wilk:  $w=0,98$ ; valor  $p=0,926$  e a percentagem de variação devida aos efeitos aleatórios foi de 33,4%.

Estatisticamente concluiu-se o comprimento dos pelos é influenciado pelo período (teste  $F(1,324) = 11,76$ ; valor  $p < 0,001$ ), sendo que no período de inverno os pelos são em média mais curtos. Apenas há diferenças marginalmente significativas entre as cores dos pelos (teste  $F(1,9) = 3,65$ ; valor  $p = 0,089$ ), onde os brancos são em média mais curtos comparativamente aos pelos pretos.

Para estudar a relação entre a cor do pelo e o seu diâmetro, fez-se a mesma abordagem mas não se conseguiu validar os pressupostos. Assim, para comparar os períodos, considerou-se apenas os animais com medições iguais em ambos os períodos independentemente da cor dos pelos. Calculou-se a média das medições em cada período e por cada um dos animais e aplicou-se um teste-t para amostras emparelhadas, uma vez que se pode admitir que a amostra das diferenças dos valores nos dois períodos segue uma distribuição normal (Teste de Shapiro-Wilk:  $W=0,95$ ; valor  $p=0,581$ ). Através do mesmo teste-t conclui-se que não existem diferenças significativas entre os diâmetros médios nos dois períodos ( $t=-0,52$ ; valor  $p=0,616$ ).

Para comparar as cores decidiu-se considerar apenas os animais com medições no período verão uma vez que apenas havia dois animais com medições de pelos brancos e pretos no período Inverno. Calculou-se a média das medições para a cor preta e cor branca por cada um dos 10 animais e aplicou-se um teste-t para amostras emparelhadas, uma vez que se pode admitir que a amostra das diferenças dos valores do diâmetro entre as cores segue uma distribuição normal (Teste de Shapiro-Wilk:  $W=0,96$ ; valor  $p=0,797$ ). Conclui-se que existem diferenças marginalmente significativas entre os diâmetros médios ( $t=-1,88$ ; valor  $p=0,093$ ), sendo que o diâmetro dos pelos brancos parece ser maior.

Para verificar diferenças, também foi medida a medulação dos pelos nos dois períodos. A figura 26 apresenta a percentagem dos valores médios das características da medulação, onde a cor azul representa a percentagem de pelos não-medulados, a cor vermelha representa a percentagem de pelos fragmentados e a cor verde representa a percentagem de pelos medulados.



**Figura 26.** Valores médios (%) de pelos não medulados, fragmentados e medulados nos dois períodos do presente estudo; Legenda: Verde – Pelos medulados; Vermelho – Pelos fragmentados; Azul – Pelos não medulados.

Verifica-se que não houve diferenças significativas entre os dois períodos. Depreende-se que estes animais, nestas condições, não sofreram aclimação uma vez que se verifica uma grande percentagem de pelos medulados em ambos os períodos. Esta casuística justifica uma maior tolerância ao calor (Muller, 1989).

#### 4.5. Imuno-histoquímica

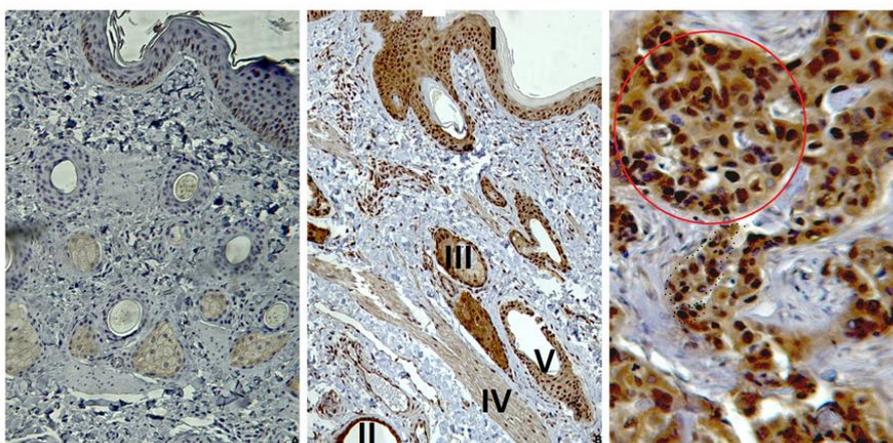
Uma das proteínas de 70kDa que se sabe estar relacionada com o stresse térmico e com a termotolerância é a HSP70. Os níveis de expressão desta proteína em células mononucleares periféricas de bovinos foram referidos como estando relacionados com o potencial produtivo de vacas Holstein (Deb, et al., 2013). A tabela 12 ilustra a expressão das HSP70 nas várias estruturas da pele.

**Tabela 12.** Expressão do marcador HSP70 nas diferentes estruturas\*

Período	Vaca	Epiderme	Derme			
			Glândulas Sebáceas	Glândulas Sudoríparas	Folículos Pilosos	Músculo Erector do Pelo
Verão (P1)	5	3	2	2	2	0
	6	3	2	2	2	0
	13	3	2	2	2	0
	15	3	2	2	2	0
	16	3	2	2	2	0
Inverno (P3)	5	3	2	2	0	0
	6	3	2	2	2	2
	13	3	2	2	2	2
	15	0	0	2	2	0
	16	2	0	2	2	2
<b>C-</b>		<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>

\*0= Sem informação; 1 = ausência de expressão; 2 = ligeira expressão; 3=forte expressão; C- = Controlo Negativo.

Aparentemente não houve diferenças na expressão da HSP70 nas diferentes estruturas histológicas da pele. Houve um ligeiro aumento de expressão no período Verão associado à epiderme, às glândulas sudoríparas e às glândulas sebáceas. Isto pode estar associado aos mecanismos de perda de calor latente (perdas de água pela epiderme) mais evidente nos períodos de maior calor. Na figura 27 é ilustrada a expressão deste marcador.



**Figura 27.** Expressão da HSP, evidenciada pela cor castanha (25X); Legenda (da esquerda para a direita): Controlo Negativo; Expressão da HSP70 na Epiderme (I), Glândula sudorípara (II), Glândula sebácea (III), Músculo erector do pelo (IV) e Folículo piloso (V); Controlo Positivo (cancro da mama).

Para saber da ocorrência de proliferação celular nas diferentes estruturas da pele, traduzindo eventualmente uma resposta a estímulos térmicos, foi avaliada a expressão do marcador de proliferação PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) que dá indicações das células na fase S do ciclo celular. Na tabela 13 e na figura 28 está ilustrada a expressão deste marcador, não parecendo haver, pelo menos aparentemente, diferenças entre os dois períodos, sendo interessante notar células positivas em diferentes estruturas da pele.

Tabela 13. Expressão do marcador PCNA nas diferentes estruturas\*

Período	Vaca	Epiderme	Derme			
			Glândulas Sebáceas	Glândulas Sudoríparas	Folículos Pilosos	Musculo Erector do Pelo
Verão (P1)	5	2	0	2	2	0
	6	2	2	1	2	0
	13	2	2	1	2	0
	15	3	0	1	2	0
	16	2	2	2	2	0
Inverno (P3)	5	2	2	1	2	0
	6	2	2	1	2	2
	13	1	0	1	1	0
	15	0	2	2	2	0
	16	2	0	2	2	0
	<b>C-</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>

\* 0= Sem informação; 1 = ausência de expressão; 2=ligeira expressão; 3=forte expressão; C- = Controlo Negativo.

Embora seja um marcador de proliferação celular, o PCNA pode igualmente ser expresso em associação com a reparação de DNA e, também, muito possivelmente devido à sua longa semi-vida, nas células noutros estádios de diferenciação, como foi demonstrado por coloração PCNA em outros tipos celulares, designadamente condrócitos hipertróficos de placas de crescimento normais de coelho (Aizawa *et al*, 1997). Assim, a expressão do PCNA nas nossas amostras não foi muito conclusiva quanto à hipótese inicial.

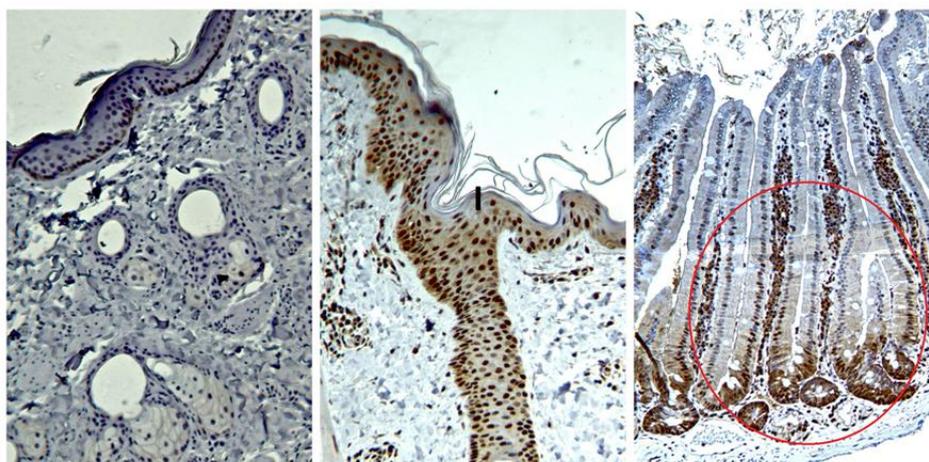


Figura 28. Expressão do PCNA, evidenciada pela cor castanha (25X); Legenda (da esquerda para a direita): Controlo Negativo; Expressão do PCNA na Epiderme (I); Controlo Positivo (intestino delgado de hamster).

A circulação cutânea é um dos principais componentes dos mecanismos de termorregulação (Kellogg 2006). Durante o stresse por calor, em que a temperatura ambiente é superior à temperatura da pele, a temperatura é elevada no núcleo e a temperatura da pele

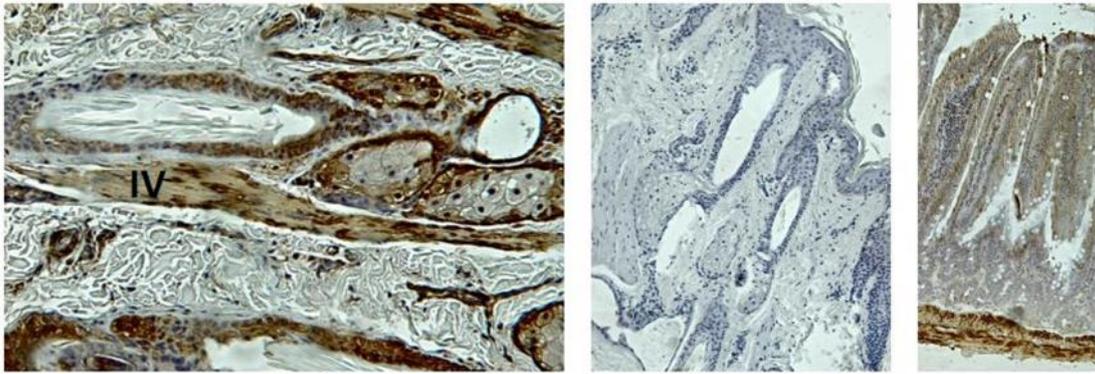
umenta. Isto leva a uma vasodilatação cutânea por meio de combinações de mecanismos neurais e os efeitos locais de temperaturas mais elevadas efectuam-se nos próprios vasos da pele (Kellogg, 2006). Por outro lado, durante o stresse por frio, temperaturas reduzidas levam à vasoconstrição cutânea por meio de mecanismos neurais e locais combinados (Kellogg, 2006). A actina-alfa do músculo liso é uma proteína específica deste tecido e foi descrita nas células musculares lisas dos vasos sanguíneos que estão revestidos por camadas de músculo liso (Vicario *et al*, 2002). Todos os vasos sanguíneos têm o seu lúmen revestido por endotélio e, com excepção dos capilares, estão rodeados por uma, ou mais, camadas de células musculares lisas (DeRuiter, *et al.*, 1997). A formação da parede dos vasos sanguíneos depende, assim, do recrutamento, da proliferação, e da diferenciação dos precursores das células musculares lisas (Lee *et al*, 1997). Deste modo, foi avaliada a expressão da actina nas diferentes estruturas da pele (Tabela 14 e Figura 29).

**Tabela 14.** Expressão do marcador Actina nas diferentes estruturas da pele\*

Período	Vaca	Epiderme	Derme			
			Glândulas Sebáceas	Glândulas Sudoríparas	Foliculos Pilosos	Musculo Erector do Pelo
Verão (P1)	5	2	2	3	2	0
	6	2	2	3	3	0
	13	2	0	2	2	0
	15	2	3	2	2	0
	16	1	1	1	1	1
Inverno (P3)	5	1	0	2	2	0
	6	2	3	2	2	2
	13	1	2	2	2	1
	15	0	2	2	2	0
	16	1	2	2	2	0
	<b>C-</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>

\* 0= Sem informação; 1 = ausência de expressão; 2=ligeira expressão; 3=forte expressão; C- = Controlo Negativo.

Embora aparentemente, não se tenham observado diferenças significativas entre períodos, relativamente à vascularização, é interessante notar que foi verificada expressão da actina nas glândulas sudoríparas no período de Verão e no músculo erector do pelo no período do Inverno (Figura 29). Isto pode estar associado ao mecanismo de piloereção consequente da diminuição de temperatura ambiente e da produção de calor endógeno.



**Figura 29.** Expressão da Actina no músculo erector do pelo (IV), evidenciada pela cor castanha (25X); Legenda (da esquerda para a direita): Expressão da actina no músculo erector do pelo (IV) no período de Inverno; controlo negativo (nenhuma expressão); controlo positivo (intestino delgado de hamster).

## 5. Conclusão

Quando os bovinos são expostos a temperaturas elevadas e as formas físicas de perda de calor (condução, radiação, convecção e evaporação) não são suficientes, verifica-se um aumento da temperatura rectal, da frequência respiratória, da ingestão de água e uma diminuição da ingestão de alimento e da produtividade, entre outras alterações relacionadas com a composição do leite e de alguns parâmetros reprodutivos.

Existem algumas formas de manipulação do ambiente com vista a combater o stresse térmico, como por exemplo, o sombreamento de pastagens ou melhorias na climatização das instalações onde os animais estão inseridos. Apesar deste grupo de animais não ter estado exposto à radiação solar direta por períodos prolongados de tempo, verificou-se individualmente em alguns casos a possibilidade, ainda que moderado, da existência de stresse térmico.

Verificou-se que quando a temperatura do globo negro marcava acima dos 25°C (ao sol ou à sombra) a frequência respiratória e a sudação, com vista ao seu aumento, ficaram evidentemente responsáveis pela dissipação de calor. Desta forma, as glândulas sudoríparas e as vias respiratórias são responsáveis por todo este processo.

As glândulas sudoríparas estão localizadas na camada reticular da derme e aparecem associadas a folículos pilosos, músculos eretores do pelo e a glândulas sebáceas. Para que haja secreção de suor, as células rompem-se e libertam parte do líquido citoplasmático. Perante esta casuística e onde as temperaturas se encontram mais elevadas, as glândulas sudoríparas apresentam-se mais próximas da epiderme, e, associado ao seu pico funcional, apresentam áreas e perímetros menores. No inverno, onde as temperaturas são menores, o seu volume (representado pela área e perímetro nas secções histológicas) diminuem e distanciam-se da pele pelo facto do mecanismo da sudação perder relevância nesta época.

A pelagem representa um papel preponderante na adaptação dos animais e na protecção destes à radiação solar. A eficiência da pelagem está directamente relacionada com a reflexão dos raios solares e, conseqüentemente, depende da sua constituição, cor e tipo. Pelagens claras refletem mais as ondas longas de radiação, conferindo maior conforto térmico aos animais. No presente estudo, e reforçando esta ideia, os pelos brancos apresentaram diâmetros maiores em ambos os períodos, sendo, no entanto, e naturalmente, mais curtos no verão e mais compridos no inverno. Como nas Holstein Frísia existem malhas brancas e pretas, estas conseguem garantir um bom equilíbrio de permuta de calor através do seu tipo de pelo. Concluiu-se que o seu tipo de pelo é curto, liso e suave refletindo de forma bastante eficiente a radiação solar, facilitando a perda por convecção desde a superfície da pele. Por outro lado, observou-se nos dois períodos

uma alta percentagem de pelos medulados o que significa que estes animais não sofreram aclimação, conferindo um bom indicador de adaptação ao ambiente onde estavam inseridos.

A utilização de biomarcadores tem sido uma ferramenta útil em várias áreas, por exemplo, na Biologia, Biomedicina, Genética, entre outros. Através da expressão imunohistoquímica, podem fornecer potenciais informações referentes ao genótipo do animal, possibilitando uma melhor e mais apurada seleção de determinados genótipos desencadeando uma melhor escolha para determinadas características. Uma das proteínas que se sabe estar relacionada com o stress térmico e com a termotolerância é a HSP70. Os níveis de expressão desta proteína em células mononucleares periféricas de bovinos foram referidos como estando relacionados com o potencial produtivo de vacas Holstein. Verificou-se que esta foi expressa na pele e estes resultados apontam no sentido da pele poder ser uma valiosa alternativa para avaliação da termotolerância.

Como trabalho futuro sugere-se que se avalie a expressão destes marcadores em situação experimental, com indução de stress térmico real, correlacionando com os mesmos parâmetros fisiológicos avaliados neste trabalho e também a expressão de aquaporinas, pelo seu reconhecido papel na reabsorção de água e hidratação da pele; e dos receptores da prolactina, uma vez que foram observados níveis elevados de prolactina em situações de stress térmico em várias espécies animais e vários estudos sugerem um seu papel importante nas repostas termo-regulatórias.

## 6. Bibliografia

- Abi Saab, S., & Sleiman, F. (1995). Physiological responses to stress of filial crosses compared to local Awassi sheep. *Nutrition Abstracts and Reviews Series B: Livestock Feeds and Feeding*, 62, 787-835.
- Aizawa, T., Kokubun, S., & Tanaka, Y. (1997). Apoptosis and proliferation of growth plate chondrocytes in rabbits. *J Bone Joint Surg [Br]*, 79-B, 483-486.
- Allen, T., Bennett, J., Donegan, S., & Hutchison, J. (1970). Moisture, its accumulation and site of evaporation in the coats of sweating cattle. *Journal of Agricultural Science*, 74, 247-259.
- Almeida, G. L. (2010). Dissertação (Mestrado). *Cooling Of Pre-Milking Girolando Cows And Its Effect On Production And Quality Of Milk And Animal Behavior*. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Tecnologia Rural, Recife.
- Almeida, G. L., Pandorfi, H., Barbosa, S. B., Pereira, D. F., Guselini, C., & Almeida, G. A. (2013). Comportamento, produção e qualidade do leite de vacas Holandês-Gir com climatização no curral. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 17, 892-899.
- Aoki, K., Kondo, N., Shibasaki, M., Takano, S., Tominaga, H., & Katsuura, T. (1997). Circadian variation of sweating responses to passive heat stress. *Acta Physiology Scand*, 161, 397-402.
- Arantes Neto, J. (1985). Dissertação (Mestrado). *Aspectos genéticos da variação de algumas características da pele e do pelame em gado Jersey*. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista, São Paulo.
- Arcaro Junior, I., Arcaro, J., Pozzi, C., Fava, C., Fagundes, H., Matarazzo, S., & Oliveira, J. a. (2005). Physiological responses of dairy cows to fan plus sprinkler in holding pen. *Ciência Rural*, 35, 639-643.
- Armstrong, D. V. (1994). Symposium: Nutrition and heat stress. Heat stress interaction with shade and cooling. *Journal of Dairy*, 77, 2044-2050.
- Azevedo, M. (2004). Tese (Doutoramento). *Efeitos do verão e do inverno sobre os parâmetros fisiológicos de vacas mestiças Holandês-Zebu, em lactação, na região de Coronel Pacheco*. Universidade Federal de Minas Gerais., Belo Horizonte.
- Baccari, J. (1989). Maneio Ambiental de Vacas Leiteiras em Clima Quente. *I SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AMBIÊNCIA NA PRODUÇÃO DE LEITE* (pp. 24-67). UEL: Londrina.
- Baêta, F., & Souza, C. (1997). *Ambiência em edificações rurais - conforto animal 1ªed*. Viçosa: MG: UFV.
- Becker, J., & Craig, E. (1994). Heat-shock proteins as molecular chaperones. *Eur J Biochem*, 23, 219pp.

- Benjamin M., A. C. (1994). Cytoskeleton of cartilage cells. *Microscopy Reserch and Technique*, 28, 372-377.
- Berman, A. (2011). Invited review: Are adaptations present to support. *J. Dairy Sci.*, 94, 2147–2158.
- Bhayani, D., & Vyas, K. (1990). Regional differences in the sweat gland characteristics in Gir cattle with reference to thermoregulation. *Indian J. Anim. Sci.*, 60, 817-820.
- Bianca, W. (1973). Termorregulation. Em E. Hafez, *Adaptation of domestic animals* (pp. 97-118). Philadelphia, Londres: Lea & Fabiger.
- Bianca, W., & Kunz, P. (1978). Physiological reactions of hree breedes of goats to cold, heat and hight altitude. *Livestock Production Science*, 5, 57-69.
- Blackshaw, J., & Blackshaw, A. (1994). Heat stress in cattle and the effect of shade on production and behaviour: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 34, 285-295.
- Bligh, J. (1998). Mammalian Homeothermy: An IntegrativeThesis. *Journal of Thermal Biology*, 23, 143-258.
- Broom, D. (2002). Welfare in wildlife management and zoos. *Advances in Ethology*, 37, 4-6.
- Carmargo, A. (1988). *Comportamento de vacas holandesas num confinamento do tipo freestall no Brasil central*. Brasília: USP-ESALQ.
- Carvalho, F., Lammoglia, M., & Simões, M. &. (1995). Breed affects thermorregulation and epithelial morphology in imported and native cattle subjected to heat stress. *Journal of Animal Science*, 73, 3570-3573.
- Cena, K., & Monteith, J. (1975). Transfer processes in animal coats. I. Radiative Transfer. *Proceedings*, 43, 377-393.
- Clark, B., & Keating, A. (1995). Biology of bone marrow stroma. *Ann N Y Acad Sci*, 770, 70-78.
- Collier, & Zimbelman, B. (27 de Abril de 2012). *Lallemand Animal Nutrition*. Obtido de Heat Stress: an underestimated issue for dairy cows: <http://lallemandanimalnutrition.com/blog/heatstressanunderestimatedissuefordairy-cows/>
- Collier, R., Dahl, G., & Vanbaale, M. (2006). Major advances associated with environmental effects on diary cattle. *Journal of Dairy Science*, 89, 1244-1253.
- Curtis, S. E. (1981). Environment management in animal agriculture. *Iowa: Iowa State University Press, 2ed.*, 407pp.
- Damasceno, F. A., Viana, J. M., & Tinôco, I. F. (2010). Ambiência na produção de bubalinos destinados ao abate. *Adaptação de bubalinos ao ambiente tropical*, 7, 1370-1381.

- Deb, R., Sajjanar, B., Singh, U., Kumar, S., Brahmane, M., Singh, R., . . . Sharma, A. (2013). Promoter variants at AP2 box region of Hsp70.1 affect thermal stress response and milk Production traits in Frieswal cross bred cattle. *Gene*, 532, 230-235.
- Degen, A., & Young, B. (1984). Effects of ingestion of warm, cold and frozen water balance in cattle. *Journal of Animal Science*, 64, 73-80.
- Dellmann, H., & Brown, E. (1982). *Histologia Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- DeRuiter, M., Poelmann, R., VanMunsteren, J., Mironov, V., Markwald, R., & Gittenberger-de Groot, A. (1997). Embryonic endothelial cells transdifferentiate into mesenchymal cells expressing smooth muscle actins in vivo and in vitro. *Circ Res*, 80, 444-45.
- Dornelas, M., Rodrigues, M., Machado, D., Gollner, A., & Ferreira, A. (2009). Expression of cell proliferation and apoptosis biomarkers in skin squamous cell carcinoma and actinic keratosis. *An Bras Dermatol*, 84, 469-75.
- Dukes, H. (1955). The Phisiology of Domestic Animals. *Comstock Publishing Associates*, 507-653.
- Ellis, R. (1987). Proteins as molecular chaperones. *Nature*, 9, 328-378.
- Ellis, R., & Hartl, F. (1996). Protein folding in the cell:Competing models for chaperonin function. *FASEB J*, 6, 10-20.
- Fahimuddin, M. (1975). *Domestic water Buffalo*. New Delhi: Oxford & IBH Publishing.
- Feige, U., & Polla, B. (1994). Hsp70 - a multi-gene, multi-structure, multi-function family with potential clinical applications. *Experientia*, 50, 86-979.
- Finch, V. (1986). Body temperature in beef cattle: its control and revelance to production in the tropics. *Journal of Animal Science*, 62, 531-542.
- Finch, V., Bennett, I., & Holmes, C. (1982). Seating response in cattle and its relations rectal temperature, tolerance to sun and metabolic rate. *Jounal of Agricultural Science*, 99, 479-487.
- Fraser, A., & Broom, D. (1990). *Farm Animal Behaviour and Welfare*. Wallingford: CAB International.
- Frish, J. E. (1998). The role of adaptation in improving productivity of cattle in the tropics. *Congresso de Biometereologia*, 2 (pp. 74-98). Gôiania: Anais.
- Fuller, K., Issels, R., & Slosman, D. (1994). Cancer and the heat shock response. *Eur J Cancer*, 91, 30.
- Garcia-Ispierto I, A. S.-G. (2011). Coxiellaburnetii seropositivity is highly stable throughout gestation in lactating high-producing dairy cows. *Reprod Domest Anim*, 46, 1067-1072.

- Gaughan, J. B., Mader, T. L., Holt, S. M., Sullivan, M. L., & Hahn, G. (2010). Assessing the heat tolerance of 17 beef cattle genotypes. *International Journal of Biometeorology*, *54*, 617-627.
- Geraldo, A. (2013). Tese (Doutoramento). *Thermotolerance in cows: cellular and physiological approaches*. Universidade de São Paulo - Faculdade de Zootecnia e Engenharia dos Alimentos, Pirassununga.
- Guimarães, C., Falco, J., Titto, E., Frazolin Neto, R., Muniz, J., & al., e. (2001). Termorregulação em bubalinos submetidos a duas temperaturas de ar e duas proporções de volumoso-concentrado. *Revista de Ciência e Agrotecnologia*, *25*, 437-443.
- Habeeb, A., Maray, I., & Kamal, T. (1992). Heat stress. Em C. Philips, & D. Piggins, *Farm animals and the environment* (pp. 27-47). Wallingford: CAB International.
- Hafez, E. (1973). *Adaptacion de los animales domésticos*. Barcelona: Vírgula.
- Hahn, G., Parkhurst, A., & Gaughan, J. e. (1999). *Cattle respiration rate as a function of ambient temperature*. St. Joseph: MC97.
- Hall, P. A. (1990). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J. Pathol.*, *162*, 285-94.
- Hall, P. A., & Levinson, D. A. (1990). Review: assessment of cell proliferation in histological material. *J. Clin. Pathol.*, *43*, 184-200.
- Han, C., Campbell, G., & Campbell, J. (2001). Circulating bone marrow cells can contribute to neointimal formation. *J Vasc Res*, *38*, 113-119.
- Hardy, R. (1981). *Temperatura e Vida Animal*. São Paulo: Universidade de São Paulo.
- Himms-Hagen, J. (1983). Thyroid hormones and thermogenesis. Em L. Girardier, & M. Slock, *Mammalian Thermogenesis* (pp. 141-177). London: Chapman and Hall.
- Hopkins, P., Knights, G. I., & Lefeure, A. (1978). Studies of the environmental physiology of tropical Merinos. *Australian Journal Agriculture Research*, *29*, 61-71.
- Horowitz, M. (2001). Heat acclimation: phenotypic plasticity and cues to the underlying molecular. *Journal of Thermal Biology*, *26*, 357-363.
- Hunt, C., & Morimoto, R. (1985). Conserved features of eukaryotic hsp70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human hsp70. *Proc Natl Acad Sci USA*, *6*, 82.
- Ingber D.E., P. D. (1995). Cell shape, cytoskeletal mechanics, and cell cycle control in angiogenesis. *J Biomech*, *28*, 1471-1484.
- Ingram, D., & Mount, L. (1975). *Man and Animals in Hot Environments*. New York: Springer-Verlag.

- IPCC, I. P. (2007). *Climate change. The physical science basis, summary for policymakers*. Geneva: IPCC, 2007.
- Jenkinson, D., & Nay, T. (1972). The sweat glands and hair follicles of European cattle. *Australian Journal of Biological Science*, 585-595.
- Jenkinson, D., & Nay, T. (1972). The sweat glands and the hair follicles of European cattle. *Australian Journal Biology Science*(25), 585-595.
- Jessen, C. (2001). *Temperature Regulation in Humans and Others Mammals*. Berlim: Springer. Obtido em 16 de Abril de 2015, de <http://download.springer.com/static/pdf/353/bfm%253A978-3-642-59461-8%252F1.pdf?originUrl=http%3A%2F%2Flink.springer.com%2Fbook%2Fbfm%3A978-3-642-59461-8%2F1&token2=exp=1434463878~acl=%2Fstatic%2Fpdf%2F353%2Fbfm%25253A978-3-642-59461-8%25252F1.pdf%3Forigi>
- Joshi, B. (1968). Composition of skin secretions from three Indian breeds of cattle under thermal stress. *Journal Dairy Science*(51), 917-920.
- Kawamoto, & Emi Kawamoto, E. (2003). *Anatomia e Fisiologia Humana*. São Paulo: Editora Pedagógica e Universitária.
- Kellogg, D. (2006). Cholinergic mechanism of cutaneous active vasodilation during heat in cystic fibers. *J Appl Physiol*, 103, 963-968.
- Kiang, J. G., & Tsokos, G. C. (1998). Heat shock protein 70kDa: molecular biology, biochemistry and physiology. *Pharmacology & Therapeutics* 80, 183-201.
- Kimber, D., Gray, C., Stackpole, C., & Leavell, L. (1950). *Anatomy & Physiology*. New York: The MacMillan Company.
- Kregel, K. C. (2002). Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *Journal of Applied Physiology* 92, 2177-2186.
- Kurki, P. e. (1986). Expression of proliferating cell nuclear (PCNA)/ cyclin during cell cycle. . *Exp. Cell. Res.*, 166, 20919.
- Lee, S., Hungerford, J., Little, C., & Iruela-Arispe, M. (1997). Proliferation and differentiation of smooth muscle cell precursors occurs simultaneously during the development of the vessel wall. . *Dev Dyn*, 209, 342-352.
- Lima, L. (1991). Dissertação (Mestrado). *Aspectos genéticos da relação entre a taxa de sudação e a produção de leite em vacas Holandesas*. Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.
- Lofgreen, G. P. (1975). Effect of drinking water temperature on beef cattle performance. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers*, 3, 223-229.
- Louw, G. (1993). *Physiological Animal Ecology*, 3rd/Ed. Hong Kong: Longman.

- Maia, A. (2002). Dissertação (Mestrado). *Variação genética e ambiental das características morfológicas e das propriedades radiativas efectivas do pelame de bovinos da raça holandesa*. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- Marques, N. (2014). *Variações sazonais da taxa de fertilidade*. (Nugon, Ed.) Obtido em 7 de Abril de 2015, de Revista Ruminantes: <http://www.revista-ruminantes.com/revista-ruminantes/newsletter/ruminantes.pdf>
- Martello, L., Júnior, H., Luz e Silva, S., & Titto, E. e. (2004). Respostas fisiológicas e produtivas de vacas holandesas em lactação submetidas a diferentes ambientes. *Revista brasileira de Zootecnia*, 33, 181-191.
- Martins, G. (2014). Os efeitos do calor em vacas leiteiras. *Ruminantes*, 14, 40-43.
- Matarazzo, S., Silva, I., Perissinotto, M., & Fernandes, D. (2006). Intermitência de acionamento do sistema de resfriamento evaporativo em freestall e sua influência no conforto térmico de vacas em lactação. *Eng. Agríc.*, 26, 654-662.
- McConaghy, F. (1996). Redistribution of cardiac output in response to heat exposure in the pony. *Equine Veterinary Journal*, 22, 42-46.
- McDowell, R. (1975). *Bases biológicas de la producción animal en zonas tropicales*. Zaragoza: Editorial Acribia.
- McManus, C., Paludo, G., & Louvandini, H. (2005). Heat Tolerance in naturalized cattle in Brazil: physical factors. *Archivos de Zootecnia*(54), 453-458.
- McMormick, D., & Hall, P. (1992). The complexities of proliferating cell nuclear antigen. *Histopathology*, 21, 591-4pp.
- Meyer, T., & Silva, A. (1999). Resposta Celular ao Stress. *Rev Ass Med Brasil*, 27, 181-188.
- Mighel, A. (1995). PCNA and p53. *Eur. J. Cancer B. Oral Oncol.*, 31, 4-403.
- Minowada, G., & Welch, W. (1995). Clinical implications of the stress response. *J Clin Invest*, 11, 95pp.
- Morais, P. (1999). Dissertação (Mestrado). *Caracterização da epiderme e glândulas sudoríparas de quatro raças bovinas*. Universidade dos Açores - Departamento de Ciências Agrárias, Angra do Heroísmo.
- Morimoto, R. (1998). Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes & Development*, 12, 3788–3796.
- Mouchot, N., Thiercelin, F., PERRE, P., & Zoulalian, A. (2005). Charactererization of diffusional transfers of bound water and water vapor in beech and spruce. *UHP*, n°1093 , 50-62.

- Mowafy, M., & Cassens, R. (1975). Microscopic structure of pig skin. *Journal of Animal Science*, 41, 1281-1290.
- Mugale, R., & Bhosle, N. (2002). Effect of age, sex and season on the sweat gland density and depth in Deoni cattle. *Indian Vet. J.*, 79, 157-159.
- Muller, P. B. (1989). *Bioclimatologia aplicada aos animais domésticos*. Porto Alegre: Sulina.
- Murray, D. M. (1966). A comparison of cutaneous evaporation rates in cattle exposed to heat in a climate laboratory and in the field. *Journal of Agricultural Science*, 66, 175-179.
- Nããs, I. (1989). *Princípios de Conforto Térmico na Produção Animal*. São Paulo: Ícone.
- Nunes, J. (14 de Agosto de 2002). *Secom/Emepa*. Obtido de <http://www.secom.jp.com.br>
- Nylander, K. (1995). p53 Expression and Cell Proliferation in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Cancer*, 75, 87-93.
- Olivier, J. J. (2000). Breeding plans for Dorper sheep and Boer gotas in South Africa. *I Simpósio Internacional sobre Caprinos e Ovinos de Corte* (pp. 213-220). João Pessoa: EMEPA-PB.
- Pan, Y. (1964). Variation in hair characters over the body in Sahiwal, Zebu and Jersey Cattle. *Australian Journal of Agricultural Research*, 15, 346-356.
- Pelletier, L., Regnard, J., Fellmann, D., & Charbord, P. (2002). An in vitro model for the study of human bone marrow angiogenesis: role of hematopoietic cytokines. *Lab Invest*, 80, 501-511.
- Pereira, A. (2004). Tese (Doutoramento). *Adaptação ao Ambiente Geofísico Mediterraneo de Bovinos Nativos e Exóticos - Tolerância ao Calor*. Universidade de Évora, Évora.
- Pereira, A., Alves, A., Infante, P., L., E. A., Titto, Baccari Jr., F., . . . Almeida, J. A. (2010). A device to improve the Schleger and Turner method for sweating rate measurements. *Int J Biometeorol*, 54, 37-43.
- Pereira, A., Baccari, F. J., Titto, E., & Almeida, J. (2007). 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*, 8, 167-175.
- Perissinotto, M. (2007). Tese (Doutoramento). *Sistema inteligente aplicado ao acionamento de climatização em instalações para bovinos leiteiros*. Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura Luíz de Queiroz, Piracicaba.
- Pires, M. (1998). Reflexos do stresse térmico no comportamento de vacas em lactação. *Simpósio de ambiência na produção de leite* (pp. 68-102). Piracicaba: Anais.
- Praça, F. (2010). *Liberação e permeação in vitro de produtos transdérmicos: um estudo metodológico de aparatos e de condições experimentais*. Lisboa: Mc GrawHill.

- Rabenhorst, S. H., Burini, R. C., & Schimitt, F. C. (1994). Ciclo celular mecanismos reguladores e marcadores bioquímicos. *Rev. Bras. Cancerologia*, 40, 141-47.
- Rafeiro, D. (2013). Dissertação (Mestrado em Ciências Farmaceuticas). *Novas estratégias de promoção da permeação transdérmica*. Universidade Lusófona Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde, Lisboa.
- Ray, D., & Roubicek, C. (1971). Behavioral of feedlot cattleduring two seasons. *Journal of Animal Science*, 33, 72-76.
- Reece, W. (2006). *Dukes. Fisiologia dos animais domésticos*. (12ª ed.). Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan.
- Rocha, D. (2008). Dissertação (Pós-Graduação em Zootecnia). *Avaliação do stresse térmico em vacas leiteiras mestiças (Bos taurus x Bos indicus) criadas em clima tropical quente húmido no estado do Ceará*. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- Rodrigues, E. (23 de Janeiro de 2015). Conforto térmico das construções. Obtido de <http://ead.sitescola.com.br/arquivo/documento/homeotermia.pdf>
- Samuelson, D. (2007). *Textbook of Veterinary Histology*. Saunders: Elsevier.
- Santos, F., Souza, B., Alfaro, C., César, M. F., Pimenta, E., Acosta, A., & Santos, J. (2005). Adaptabilidade de caprinos exóticos e naturalizados ao clima semiárido do Nordeste brasileiro. *Ciência e Agrotecnologia*, 29, 142-149.
- Scharf, B., Wax, L., & Aiken, G. e. (2008). Regional difference in sweat rate response of steers to short-term heat stress. *Int. J. Biometeorol.*, 52, 73.
- Schleger, A., & Bean, K. (1971). Factors determining sweating competece of cattle skin. *Australian Journal of Biological Science*, 24, 1291-1300.
- Schleger, A., & Turner, H. (1965). Sweating rates of cattle in the field and their reaction to diurnial and seasonal changes. *Australian Journal Agricultural Research*, 16, 92-106.
- Selye, H. (1975). The stress of life. Em H. Selye, *Stress without distress* (pp. 11-51). New York: N. A. Library, ed.
- Shearer, J., & Beede, D. (1990). Thermoregulation and physiological responses of dairy cattle in hot weather. *Heat stress. Agri-Pract.*, 11, 517.
- Silva, E. (2006). Avaliação da adaptabilidade de caprinos exóticos e nativos no semi-árido paraibano. *Ciência e Agrotecnologia*, 33, 516-521.
- Silva, G. (2000). *Introdução à Bioclimatologia Animal*. São Paulo: Nobel.
- Silva, I. (1998). Climatização das instalações para bovino leiteiro. *Simpósio Brasileiro de Ambiência na Produção de Leite* (pp. 114-145). Piracicaba: FEALQ.
- Silva, R., & Maia, A. (2011). Evaporative cooling and cutaneous surface temperature of Holstein cows in tropical conditions. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39, 1143-1147.

- Simões, S. (2004). *A pele humana II - Liberação Transdérmica*. Lisboa: Moreira JR Editora.
- Sirohi, S., & Michaelowa, A. (2007). Sufferer and cause: Indian livestock and climate change. *Climatic Change*, 93, 120-134.
- Souza Junior, M. (2009). Revisão de Literatura de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. *Características da adaptabilidade em bovinos de corte*. Mato Grosso.
- Souza, B. S., & Marinho, M. L. (2003). Parâmetros fisiológicos e índice de tolerância ao calor de bovinos da raça sindi no semi-árido paraibano. *Ciências e Agrotecnologia*, 16, 55-59.
- Souza, B., Silva, I. J., Mellace, E. M., Santos, R. F., Zotti, C. A., & Garcia, P. R. (2010). Avaliação do ambiente físico promovido pelo sombreamento sobre o processo termorregulatório em novilhas leiteiras. *Agropecuária Científica do Semiárido*, 6, 59-65.
- Starling, E., & Evans, C. (1968). *Princípios de Fisiologia Humana*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
- Sumitono, S. H. (1996). Growth pattern of experimental squamous cell carcinoma in rat submandibular glands – na immunohistochemical evaluation. *Oral Oncol. Eur. J. Cancer*, 32, 5-97.
- Suzuki, A. e. (1989). Sudação, características do pelame e produção de leite em vacas holandesas. *Ciência Zootécnica*, 4, 1-2.
- Takahashi, L. S., Biller, J. D., & Takahashi, K. M. (2009). *Bioclimatologia zootécnica* (1ª ed.). Jaboticabal: UNESP.
- Taneja, G. (1960). Sweating in cattle. VI. Density of sweat glands and its relationship with cutaneous evaporation. *Journal of Agricultural Science*, 55, 109-110.
- Team, R. C. (2013). R Foundation for Statistical Computing. *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria. Obtido de <http://www.R-project.org/>
- Terlecky, S. (1994). Hsp70 and lysosomal proteolysis. *Experientia*, 25, 50-1021.
- Titto, E. A. (1998). *Clima: Influência na produção de leite*. Piracicaba: FEALQ: Anais.
- Udo, H. M. (1978). *Hair coat characteristics in friesian heifers in the Netherlands and Kenya*. Ageningen: H. Veenman & Zonen B.V.
- Vicario J.H., P. J. (2002). Médula ósea autóloga via seno coronário y angiogénesis en cerdos con injuria miocárdica. *Rev Fed Arg Cardiol*, 31, 441-449.
- Vilela, R. (2008). Dissertação (Mestrado). *Comportamento e termorregulação de vacas Holandesas lactantes frente a recursos de ventilação e nebulização em estabulação livre*. Universidade de São Paulo - Faculdade de Zootecnia e Engenharia dos Alimentos, Pirassununga.

- Walker, C. (1957). Studies of the cattle of northern Rhodesia - II. The apocrine gland population of the skin of northern Rhodesian cattle and its connexion with the heat toleration coefficient. *Journal of Agriculture Science*, 20, 401-404.
- Welch, W. (1992). Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiological Reviews*, 72, 1063.
- West, J. (1999). Nutritional strategies for managing the heat-stressed dairy cow. *Journal of Science*, 77, 21-35.
- Wong, A., & Gotlieb, M. (1990). Endothelial monolayer integrity: perturbation of F-actin filaments and the dense peripheral band-vinculin network. *Arteriosclerosis*, 10, 76-84.
- Wynn, R., Davie, J., Cox, R., & Chuang, D. (1994). Molecular chaperones: heat-shock proteins, foldases and matchmakers. *J Lab Clin Med*, 31, 31.
- Yousef, M. K. (1985). Stress Physiology: Definition and Terminology. *Journal of Animal Science*, 28, 1 Basic Principles, 677-683.
- Yousef, M. K. (1985). *Thermoneutral Zone*. Boca Raton: CRC Press.
- Zimbelman, R., & Collier. (2011). Feeding Strategies for High-Producing Dairy Cows During Periods of Elevated Heat and Humidity. *Tri-State Dairy Nutrition Conference* (pp. 111-119). Limberlost, Tucson: Arizona.
- Zulkifli, I., Norbaiyah, B., Cheah, Y. W., Soleimani, A. F., Sazili, A. Q., Goh, Y. M., & Rajion, M. e. (2010). A note on heat shock protein 70 expression in goats subjected to road. *Animal*, 6, 6-973.

## **7. ANEXOS**

**Anexo I: Dados recolhidos na Herdade das Pedras Alvas no período de verão**

Dia	Animal	1ª medição - 8h		2ª medição - 13h		3ª medição - 18h		Vapómetro - 13h			
		FR min-1	TR (°C)	FR min-1	TR (°C)	FR min-1	TR (°C)	TS (g.m2.h-1)	H (%)	T (°C)	
31/ago/14	1	60	38,1	60	-	60	38,7	-	-	-	
	4	60	37,7	-	-	60	38,6	-	-	-	
	5	44	38	76	39,2	68	38,9	142	39	28	
	6	52	38,3	72	39	52	39,3	85,3	44	26	
	7	60	38	64	38,3	60	38,6	188	44	29	
	8	36	38	64	38,6	60	39,3	53,2	40	29	
	9	48	38,7	56	38,4	64	38,6	162	37	29	
	10	52	37,8	68	38,6	60	39,2	66,4	42	29	
	11	44	37,4	64	38,5	56	38,8	77,8	42	29	
	13	64	38,3	68	38,6	64	38,9	74,4	40	28	
	14	60	37,9	68	38,6	52	42	156	43	29	
	15	40	38,2	56	38,6	60	39,8	141	35	29	
	16	40	38,2	72	39,1	64	39,6	58	46	29	
	01/set/14	1	60	38,4	68	38,6	76	38,8	41,7	50	30
		4	56	38,3	104	39	80	39,3	139	32	31,9
		5	52	38,6	84	39,5	104	40	62,2	32	31
6		36	38,2	64	39,3	80	40,5	140	43	30	
7		44	37,1	76	38,9	84	40,4	95,2	50	30	
8		44	38	72	38,8	56	38,9	105	33	30	
9		44	38,3	60	39	76	39,7	142	39	31	
10		56	38,3	56	39	64	40	58,6	43	30	
11		48	38,5	68	39,3	72	39,6	52,3	44	30	
13		56	37,4	80	38,9	64	39,3	67,4	39	30	
14		64	38	44	38,7	80	39,4	100	38	31	
15		52	38,6	92	39,5	84	40,1	53,7	45	30	
16		60	39,1	80	40	92	40	226	36	31	
02/set/14		1	60	38,6	72	39,2	64	38,3	36,2	58	30
		4	48	38	92	38,4	60	38,6	101	46	30
		5	60	38,6	76	38,8	64	39,3	51,2	43	29
	6	48	39,4	56	39,6	72	39,8	42,7	45	29	
	7	48	38,2	68	38,6	72	39,2	91	47	30	
	8	64	38,2	60	38,2	68	39,1	32,8	63	30	
	9	56	38,3	56	39,4	68	39,5	87,5	48	30	
	10	64	39,4	76	39,4	64	39	45,9	50	30	
	11	56	38,8	56	37,7	60	38,3	131	42	29	
	13	56	38,6	92	38,6	72	38,9	40,1	44	30	
	14	64	38	84	39	72	39,3	54,4	44	30	
	15	68	38,6	72	39,8	68	39,5	28,3	58	30	
	16	56	38,8	84	39,4	68	38,5	32,5	51	30	
	03/set/14	1	56	38,4	68	39	76	39,2	51,9	49	28
		4	56	38,1	92	38	64	38,9	37,7	51	28
		5	68	39,1	76	38,8	76	38,9	30,4	53	26
6		56	39,2	64	39,4	60	39,4	27	57	26	
7		60	38,6	64	39,2	68	39,5	82,2	52	28	
8		48	38	52	37,7	64	38,6	33,3	54	28	
9		44	38,5	60	38,9	68	40,2	56	45	28	
10		56	39	60	39,1	64	39,2	37,7	47	28	
11		56	37	72	38,6	64	38,6	53,9	56	26	
13		60	38,8	92	38,6	68	39,2	51	51	28	
14		60	39,1	72	38,7	76	38,3	60,9	58	28	
15		60	38,1	76	39,1	60	38,4	30,3	61	27	
16		44	38,4	44	38,4	92	39,7	30,6	52	28	

**Anexo II: Temperaturas do Globo Negro ao sol e à sombra (verão)**

Dia	Medição	Hora	TGNsol (°C)	TGNsombra (°C)
31/ago/14	1ª	8h10	23	16
		9h15	31,5	18
	2ª	13h00	52	24
		14h20	51	27
	3ª	18h30	31	21
		19h45	29	26
01/set/14	1ª	8h10	29	19
		8h48	39,5	21
	2ª	12h40	58,5	29,5
		13h45	47,5	31
	3ª	18h20	31	40,5
		18h50	28,5	38
02/set/14	1ª	8h07	28,5	20
		8h57	35	22
	2ª	12h53	45	28
		13h49	44	28
	3ª	18h10	36,5	26,5
		18h45	32	25
03/set/14	1ª	8h00	17,5	17,5
		8h44	25,5	19
	2ª	13h00	30,5	24
		13h50	33	24
	3ª	18h23	36	24
		18h57	23	23

### Anexo III: Dados recolhidos na Herdade das Pedras Alvas no período de inverno

Dia	Animal	1ª medição - 8h		2ª medição - 13h		3ª medição - 18h		Vapómetro - 13h		
		FR minuto-1	TR (°C)	FR minuto-1	TR (°C)	FR minuto-1	TR (°C)	TS (g.m2.h-1)	H (%)	T (°C)
02/fev/15	5	32	37.9	32	37.9	48	38.6	19.6	67	18
	6	40	37.1	44	37.4	28	37.7	25.2	90	15
	7	40	38.5	40	37.7	48	38.2	22	77	16
	8	52	38.3	40	38.1	48	38	32.6	66	18
	10	28	38.3	40	37.9	56	38.5	28.8	77	17
	11	32	38.4	36	38.6	28	38.3	14.6	74	18
	13	36	38.8	48	38.4	36	38.6	15.9	67	18
	14	32	36.8	44	38	60	37.5	15.1	70	17
	15	40	37.7	40	37.9	60	38.1	18.9	72	17
16	48	38.2	36	37.4	48	38.2	29	61	19	
03/fev/15	5	32	38.3	32	38.1	44	38	18.8	71	15
	6	32	37.7	40	38.2	36	37.8	21.6	70	16
	7	32	38	28	38.5	36	38.5	22.8	73	16
	8	32	38.4	40	38.7	40	38.2	35.8	64	18
	10	36	38.6	36	38.2	52	37	31.6	74	15
	11	40	38.2	28	38.7	36	38.5	16.5	72	16
	13	48	38.9	40	38.9	44	39.2	16.5	72	16
	14	44	37.6	40	38	36	38.6	28.6	56	18
	15	56	38	36	37.9	36	38.1	43.6	52	18
16	40	38.1	32	38.3	36	38.2	31.4	67	16	
04/fev/15	5	24	38.2	36	37.9	28	37.8	18.2	37	16
	6	32	38	32	36.2	36	37.8	17.1	35	16
	7	36	38	32	37.5	28	38.6	11.4	35	15
	8	24	37.9	32	37.5	28	38.3	21	39	16
	10	32	37.9	36	38	32	38.6	31.5	40	16
	11	28	38.3	28	38.4	28	39.4	26.5	40	15
	13	32	37.5	40	39.9	36	39.1	18.8	34	16
	14	40	38.1	40	37.4	32	38.6	20.2	49	15
	15	36	37.8	28	37.9	28	37	24.5	38	16
16	28	37.7	32	37.3	32	37.9	27.1	41	15	
06/fev/15	5	24	38	36	37.9	52	37.8	29.9	48	16
	6	32	37.9	36	37.8	32	37.7	24.7	45	16
	7	36	38.2	44	38.1	32	38.3	32.5	43	16
	8	24	38.1	28	37.9	36	38	26.1	41	18
	10	28	37.9	28	37.7	36	38.1	29.7	39	18
	11	36	38.2	28	38.3	28	38.1	27.2	36	20
	13	24	37.6	36	38.4	28	38.5	31.4	43	19
	14	40	37.9	40	38.3	36	36.9	14.9	54	14
	15	32	36.7	36	38.3	32	37.7	27.3	52	16
16	28	37.6	44	38	28	37.8	38.8	46	16	

**Anexo IV: Temperaturas do Globo Negro ao Sol e à Sombra (Inverno)**

Dia	Medição	Hora	TGNsol (°C)	TGNsombra (°C)
02/fev/15	1ª	8h05	6	6,5
		8h36	6	6,5
	2ª	13h00	13	8
		14h15	8	8,5
	3ª	18h00	10	8
		19h00	9	7
03/fev/15	1ª	8h00	7	6
		8h33	12	6
	2ª	13h00	11	8,5
		14h00	25	9
	3ª	18h00	9	6
		18h45	7,5	6
04/fev/15	1ª	8h00	15,5	1,5
		8h45	14	1,5
	2ª	13h00	36,5	6
		14h00	35	...
	3ª	17h40	14	7
		19h00	7	0,5
06/fev/15	1ª	07:45	7	3
		08:55	19	3
	2ª	12h45	38	8,5
		14h15	19	8,5
	3ª	17h35	7,5	7
		18h50	5	6

### Anexo V: Medição da Área e do Perímetro das Glândulas Sudoríparas, da distância ao epitélio e da Espessura da Epiderme (verão e inverno)

Vaca	Verão								Inverno								
	Área		Perímetro		Distância à Epiderme		Espessura da Epiderme		Área		Perímetro		Distância à Epiderme		Espessura da Epiderme		
	Pixeis	Microns	Pixeis	Microns	Pixeis	Microns	Pixeis	Microns	Pixeis	Microns	Pixeis	Microns	Pixeis	Microns	Pixeis	Microns	
5	11700	12526,8	450,7594514	482,6118323	775,2805944	830,0648762	50,15974482	53,70422358	40178	43017,1	797,6955262	854,0637325	1084,776475	1161,430915	36,05551275	38,60333271	
	12703	13600,6	440,3158005	471,4301933	706,6540879	756,5889592	58,13776741	62,24600365	47265	50604,9	938,8326112	1005,174102	1029,768906	1102,536302	58,85575588	63,01472792	
	8505	9106	400,5168107	428,8188551	946,1606629	1013,019982	79,62411695	85,25066055	20914	22391,9	832,3473298	891,1641647	993,241159	1063,427365	31,30495168	33,51707889	
	17961	19230,2	552,9432175	592,0162928	741,247597	793,6269775	32,55764119	34,85828821	39908	42728,1	775,0924958	829,8634859	1037,427558	1110,736176	28,28427125	30,28294566	
	25032	26800,9	687,9554108	736,5689623	854,5712375	914,9584984	49,47726751	52,97351982	46589	49881,2	930,2884553	996,0261834	950,2210269	1017,367266	38,05259518	40,7415366	
	31562	33792,3	776,1219331	830,9656671	537,4011537	575,3759676	0	0	34365	36793,4	793,903679	850,003939	1063,176373	1138,304468	0	0	
	18075	19352,2	580,8010819	621,8427001	823,7718131	881,9826693	0	0	25018	26785,9	611,7127702	654,9387261	977,8057067	1046,901185	0	0	
	24442	26169,2	704,8427125	754,6495851	728,0934006	779,5432555	0	0	62043	66427,2	1271,359523	1361,198633	1011,584895	1083,067339	0	0	
	32493	34783,1	775,9797975	830,8134877	1076,551903	1152,625164	0	0	72492	77614,6	1619,58492	1734,030964	1164,632131	1246,929476	0	0	
	20477	21924	790,3401872	846,1886373	846,6262458	906,4520833	0	0	38588	41314,8	1010,337229	1081,731509	1047,520883	1121,542701	0	0	
	6	17230	18447,5	568,2985566	608,4566987	1154,015598	1235,562739	54,03702434	57,85548645	37752	40419,7	1253,508801	1342,086511	1144,043705	1224,886194	54,03702434	57,85548645
		18547	19857,6	557,7888886	597,2043775	1120,028571	1199,174059	56,0357029	59,99539925	78012	83524,6	1365,501659	1461,993211	1294,61809	1386,100739	33,28663395	35,63879438
9690		10374,7	415,3624817	444,7135778	1196,528311	1281,079562	56,88585061	60,90562164	62906	67351,2	1224,790981	1311,33938	552,1231747	591,1383027	44,72135955	47,88154127	
10504		11246,3	435,0365799	465,7792228	795,0069182	851,1851373	53,85164807	57,67501078	24074	25775,2	598,6417023	640,9440067	1324,95132	1418,57743	39,69886648	42,5041397	
34053		36459,3	985,7026689	1055,356177	834,6927578	893,6753296	50,35871325	53,91725187	23088	24719,5	699,0092347	748,4038915	1642,019488	1758,050844	45,607017	48,82978266	
32620		34925,1	1033,685425	1106,729577	1282,350966	1372,966773	0	0	40533	43397,2	1062,34733	1137,416842	1330,02406	1424,00863	0	0	
20383		21823,3	720,6000718	771,5204195	962,0332635	1030,014201	0	0	22358	23937,9	586,4995667	627,9438616	8,246211251	8,828919969	0	0	
24832		26586,7	786,666089	842,2549133	870,4540581	931,9598052	0	0	26291	28148,8	714,8254685	765,3377607	1132,113069	1212,112494	0	0	
24686		26430,4	922,648845	987,8467291	755,7909764	809,1980475	0	0	82279	88093,1	1673,928066	1792,214203	1038,233114	1111,598623	0	0	
24149		25855,5	628,1147904	672,4997756	957,7577982	1025,436615	0	0	23175	24812,6	744,8670991	797,5022474	1284,126162	1374,867411	0	0	
13		23935	25626,3	693,1930009	742,1766605	676,0118342	723,7814071	34,17601498	36,59102246	13686	14653,1	449,9898987	481,7879001	1506,126157	1612,554772	36,76955262	39,36782936
		12950	13865,1	482,0731599	516,1382868	916,2645411	981,0108716	56	59,95717345	19410	20781,6	557,1269837	596,4956999	1242,040257	1329,807556	66,48308055	71,18102843
	19358	20275,9	551,9898987	590,9956089	341,9005703	366,0605678	45,607017	48,82978266	25398	27192,7	652,783838	698,9120321	1196,809091	1281,380183	47,41307836	50,76346719	
	36089	38639,2	1158,6215	1240,494111	399,9399955	428,20128	58,03447251	62,13540954	26463	28333	901,4528855	965,1529823	1308,441821	1400,901307	49,47726751	52,97351982	
	51186	54803	1527,69971	1635,652794	271,1899703	290,3532873	46,04345773	49,29706395	33040	35374,7	715,8376618	766,4214794	618,0291255	661,7014192	41,03656906	43,93636944	
	43533	46609,2	1281,248917	1371,786849	290,9982818	311,5613296	0	0	46157	49418,6	875,5016588	937,367943	1087,341713	1164,177423	0	0	
	23813	25495,7	961,8620485	1029,830887	409,8389928	438,7997782	0	0	37824	40496,8	827,411255	885,879288	713,5937219	764,0189742	0	0	
	18708	20030	745,0264787	797,6728894	250,3916932	268,0853246	0	0	24321	26039,6	956,1808076	1023,748188	1048,0687	1122,129229	0	0	
	8414	9008,57	408,4335495	437,2950209	426,6755207	456,8260393	0	0	33825	36215,2	887,1513703	949,8408676	781,6137153	836,8455196	0	0	
	10661	11414,3	447,3452378	478,9563574	466,8404438	499,829169	0	0	26854	28751,6	681,1269837	729,2580125	1069,102427	1144,649279	0	0	
	15	13043	13964,7	532,3158005	569,9312639	377,6188555	404,3028431	70,71067812	75,70736415	30055	32178,8	797,3523805	853,6963389	-	0	-	0
		20190	21616,7	711,7544007	762,0496796	521,1564065	557,9833046	70,71067812	75,70736415	8367	8958,24	426,1909089	456,307183	-	0	-	0
16495		17660,6	583,7960313	625,049284	418,1339498	447,6808884	86,83317338	92,96913638	10147	10864	409,7888886	438,7461334	-	0	-	0	
4443		4756,96	278,8772004	298,5837263	664,0722852	710,998164	96,5194281	103,3398588	10631	11382,2	432,6173157	463,1877042	-	0	-	0	
6878		7364,03	333,4213562	356,9821801	666,5133157	713,611687	153,3101432	164,1436223	7610	8147,75	368,7178208	394,7728274	-	0	-	0	
5296		5670,24	284,1492783	304,2283494	837,3219214	896,4902799	0	0	5071	5429,34	310,4751801	332,4145397	-	0	-	0	
13128		14055,7	536,1980515	574,0878496	694,1613645	743,2134524	0	0	12395	13270,9	473,1442277	506,5784022	-	0	-	0	
23753		25431,5	705,2102448	755,0430887	311,7242731	333,7518599	0	0	22254	23826,6	578,8427125	619,7459449	-	0	-	0	
11772		12603,9	507,6711396	543,5451173	710,2816343	760,4728419	0	0	8739	9356,53	372,1320344	398,4283024	-	0	-	0	
13484		14436,8	537,4528855	575,4313549	275,5358416	295,0062544	0	0	33382	35740,9	898,7909806	962,3029771	-	0	-	0	
16		8821	9444,33	394,374675	422,2426927	931,5964792	997,4266373	82,80096618	88,65199805	24655	26397,2	611,1858582	654,3745805	1199,906663	1284,696641	65,60487787	70,2407686
		16481	17645,6	609,4041123	652,4669297	859,9255782	920,6911972	82,21921916	88,02914257	22219	23789,1	616,9848481	660,5833491	949,7536523	1016,866865	65,29931087	69,91360907
	18837	20168,1	569,5706345	609,8186665	604,0529778	646,7376636	80,9197133	86,63780867	52090	55770,9	924,9503602	990,3108782	1098,220379	1175,824817	62,22539674	66,62248045	
	18554	19865,1	597,8721497	640,1200746	326,4352922	349,5024542	71,69379332	76,75995002	14950	16006,4	526,1320344	563,3105293	940,1659428	1006,601652	62,28964601	66,69126982	
	11827	12662,7	448,0315293	479,6911449	914,3216064	978,9310561	62,76941931	67,20494573	49780	53297,6	862,038672	922,9536103	1156,826694	1238,572478	61,22091146	65,54701441	
	7744	8291,22	333,4213562	356,9821801	784,1683493	839,5806738	0	0	60018	64259,1	1037,418398	1110,726336	1086,119699	1162,869057	0	0	
	10922	11693,8	426,27417	456,3963276	846,0023641	905,7841157	0	0	27033	28943,3	765,8132752	819,9285602	944,5951514	1011,343845	0	0	
	18833	20163,8	565,4873734	605,4468666	539,3514624	577,4640925	0	0	31852	34102,8	688,1980515	736,8287489	1051,157457	1125,436249	0	0	
	23920	25610,3	668,3401872	715,5676522	1161,52486	1243,602634	0	0	34745	37200,2	719,1269837	769,9432374	867,0178776	928,2846655	0	0	
	23240	24882,2	643,51176	688,9847537	1171,687672	1254,483589	0	0	32709	35020,3	726,1320344	777,4432916	1131,427417	1211,378391	0	0	