UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

CRISTIANE GONÇALVES TITTO

**Capacidade termolítica e respostas comportamentais e hormonais
em vacas Holandesas**

Pirassununga

2010

CRISTIANE GONÇALVES TITTO

**Capacidade termolítica e respostas comportamentais e
hormonais em vacas Holandesas**

Tese apresentada à Faculdade de
Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e
Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dr. João Alberto Negrão

Pirassununga

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo

T622c Titto, Cristiane Gonçalves
 Capacidade termolítica e respostas comportamentais
 e hormonais em vacas Holandesas / Cristiane
 Gonçalves Titto. -- Pirassununga, 2010.
 112 f.
 Tese (Doutorado) -- Faculdade de Zootecnia e
 Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.
 Departamento de Ciências Básicas.
 Área de Concentração: Qualidade e Produtividade
 Animal.
 Orientador: Prof. Dr. João Alberto Negrão.

 1. Cortisol 2. Estresse calórico 3. *Free-stall*
 4. IGF-I 5. Sistema de climatização. I. Título.

À minha família, grande incentivadora, alicerce da vida.

Aos meus pais, Edna e Graciano, pelos sábios conselhos
e pelo amor incondicional só entendido após a maternidade.

À minha irmã Marina, sua calma
e determinação são fontes de inspiração.

Ao querido Rafael, por compartilhar meu sonho que virou realidade:
sem seu apoio e amor eu nada seria.

Ao Luca, meu amor incondicional,
seu sorriso me torna única.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João Alberto Negrão, pela orientação e apoio neste longo período de trabalho.

Ao Prof. Dr. Evaldo Antonio Lencioni Titto, acima de tudo um amigo, pelas horas de discussão que sempre acrescentam muito ao meu conhecimento.

À amiga Taissa, pelo grande apoio nesse “conturbado” doutorado, e pelas muitas risadas que deixavam tudo mais leve. Agradeço de coração.

Aos amigos do laboratório Alice, Fernanda, Innaê, Monalissa, Susana, Diogo Rodrigo e Thiago, pela ajuda no experimento: sem vocês este trabalho teria sido muito mais difícil.

Ao Prof. Dr. Gerson Barreto Mourão e ao Tiago, pelas idéias e análise estatística do projeto, agradeço.

À todos os funcionários que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização do experimento.

À FAPESP pela concessão da bolsa e pelo apoio financeiro para execução deste trabalho.

À Coordenadoria do Campus da USP em Pirassununga por ceder os animais para o projeto.

RESUMO

TITTO, C.G. **Capacidade termolítica e respostas comportamentais e hormonais em vacas Holandesas**. 2010. 112 f. Tese - (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010.

O estudo teve como objetivo avaliar as respostas hormonais, fisiológicas e comportamentais de vacas Holandesas frente a situações de conforto ou estresse térmico ambiental. O experimento desenvolvido entre os verões de 2007 e 2008 no Campus Administrativo da Universidade de São Paulo (USP), Pirassununga, SP, utilizou 28 fêmeas de 1ª a 3ª lactações com produção média de 20 kg/dia divididas em dois grupos experimentais após a parição, com e sem disponibilidade de climatização em galpão do tipo *free-stall*. Os parâmetros ambientais foram avaliados através do cálculo do índice de temperatura e umidade (ITU). As colheitas de dados fisiológicos (temperatura retal, temperatura de superfície corporal do dorso e base da cauda, frequência respiratória), hormonais (cortisol e IGF-I), comportamentais e de produção e qualidade do leite foram realizadas em cinco condições climáticas no ano (outono, inverno, primavera, verão seco e verão chuvoso) caracterizadas pela temperatura, umidade relativa e radiação solar. No verão os animais foram submetidos ao Teste de Capacidade Termolítica (CT) e a um estudo comparativo de um período de sete dias sob estresse calórico em câmara climática e desafio com aplicação de ACTH. No experimento 1 o teste de capacidade termolítica foi validado. A CT foi igual para animais em lactação ou secos ($P>0,05$), e maior para vacas mantidas sob sistema de climatização ao longo do ano ($P<0,01$). Houve influência da exposição ao sol sobre todas as variáveis fisiológicas ($P<0,01$). Os níveis plasmáticos de cortisol foram maiores antes da exposição ao sol e depois do repouso por 1 hora à sombra para vacas em lactação ($P=0,03$) e para as sem disponibilidade de climatização ($P=0,03$). O IGF-I foi maior nas vacas secas em final de gestação ($P<0,01$). No experimento 2 a temperatura retal não teve influência da climatização, com os dois grupos apresentando valores abaixo de 38,56 °C ao longo do ano ($P=0,11$). Observou-se uma tendência de alta ($P<0,01$) nas concentrações plasmáticas de cortisol entre outono e inverno, começando o decréscimo até o início do verão seco e um novo aumento durante o verão chuvoso, e um comportamento

inverso para o IGF-I. Temperatura retal mostrou uma correlação moderada e positiva ($P<0,01$) com a temperatura superficial (0,46) e frequência respiratória (0,35). A temperatura do ar e ITU apresentaram correlações positivas de moderada à alta com as temperaturas retal, da base da cauda e superficial, e também com a frequência respiratória ($P<0,01$). No experimento 3 as vacas passaram a maior parte do dia na sombra em pé (84,2 %) independente da estação do ano. O ambiente climatizado proporcionou maior frequência de alimentação e produção de leite durante o verão ($P<0,05$), assim como teor de gordura 17,9 % maior ($P<0,01$). No experimento 4 os animais foram submetidos ao estresse pontual causado pelo uso do ACTH e ao estresse calórico prolongado em câmara climática. Tanto a administração de ACTH quanto a exposição ao calor prolongado em câmara climática aumentaram os níveis de cortisol plasmático. Durante o estresse calórico houve diminuição do IGF-I e produção leiteira e aumento das variáveis fisiológicas ligadas a termorregulação.

Palavras-Chave: cortisol; estresse calórico; *free-stall*; IGF-I, sistema de climatização.

ABSTRACT

TITTO, C.G. **Thermolysis capacity and behavioral and hormonal responses in Holstein cows**. 2010. 112 f. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010.

The study aimed to evaluate the hormonal, physiological and behavioral responses of Holstein cows in situations of a comfort or heat environment. The experiment was conducted between the summers of 2007 and 2008 in the University of São Paulo (USP), Pirassununga, SP, and used 28 females from 1st to 3rd lactations with average production of 20 kg/day divided into two experimental groups after birth, with and without an evaporative cooling system in a free-stall. Environmental parameters were evaluated by temperature and humidity index (THI). Collection of physiological data (rectal temperature, body surface, internal base of tail, respiratory rate), hormonal (cortisol and IGF-I), behavioral and production and milk quality were conducted in five climatic conditions (autumn, winter, spring, dry summer and rainy summer) characterized by air temperature, relative humidity and solar radiation. In summer the animals were subjected to Thermolysis Capacity Test (CT) and a comparative study of a period of seven days under heat stress in climatic chamber and challenged with ACTH administration. In experiment 1 the Thermolysis Capacity Test was validated. The CT was the same for dry or lactating animals ($P>0.05$) and higher for cows kept in evaporative cooling system throughout the year ($P<0.01$). The results showed influence of sun exposure on all physiological variables ($P<0.01$). Plasma levels of cortisol were higher before sun exposure and after the one hour rest under shade for lactating cows ($P=0.03$) and for no cooled animals ($P=0.03$). IGF-I was higher in dry cows in late gestation ($P<0.01$). In experiment 2 the evaporative cooling system did not show influence on rectal temperature, with both groups having values below 38.56 °C throughout the year ($P=0.11$). It was observed an upward trend ($P<0.01$) in plasma cortisol concentrations between autumn and winter, starting the decline until the beginning of dry summer and a further increase during rainy summer, and an opposite pattern for IGF- I. Rectal temperature showed a moderate and positive correlation ($P<0.01$) with the body surface temperature (0.46) and respiratory rate (0.35). The air temperature and THI showed moderate to high positive correlations with rectal temperatures, and the internal base of tail, and

also with the respiratory rate ($P<0.01$). In experiment 3 cows spent most of the day standing in the shade (84.2%) regardless of season. Cooled cows had a higher feeding frequency and milk production during summer ($P<0.05$) and fat content 17.9% higher ($P<0.01$). In experiment 4, cows were subjected to the short stress caused by the ACTH administration and prolonged heat stress in climatic chamber. Both the administration of ACTH as prolonged exposure to heat in climatic chamber increased the levels of plasma cortisol. During heat stress a decrease in plasma IGF-I and milk production was observed, and an increase in physiological variables related to thermoregulation.

Key-words: cortisol; evaporative cooling system; free-stall; heat stress, IGF-I

Sumário

1. Introdução.....	10
2. Objetivos.....	12
2.1 Objetivo Geral	12
2.2 Objetivos específicos	12
3. Revisão de Literatura.....	13
3.1 Influências de fatores ambientais nas respostas termolíticas	13
3.2 Produção de leite	15
3.3 Cortisol e IGF-I.....	16
3.4 Comportamento animal.....	17
3.5 Capacidade termolítica	19
3.6 Eficiência de sistemas de climatização	20
4. Material e Métodos	21
4.1 Descrição geral.....	21
4.2 Período experimental – Organização geral	24
4.3 Parâmetros ambientais	25
4.4 Forma de análise dos resultados	27
5. Experimento 1: Proposta, validação e aplicação de um Teste de Capacidade Termolítica para vacas holandesas lactantes e secas.....	30
5.1 Introdução.....	32
5.2 Material e Métodos.....	33
5.2.1 Local e instalações.....	33
5.2.2 Proposta e validação do Teste de Capacidade Termolítica	33
5.2.3 Aplicação do Teste de Capacidade Termolítica.....	34
5.2.4 Análise estatística	36
5.3 Resultados.....	37
5.3.1 Validação do Teste de Capacidade Termolítica	37
5.3.2 Vacas secas em gestação x lactantes.....	38
5.3.3 Vacas em Lactação: influência do sistema de climatização.....	41
5.4 Discussão	46
5.5 Conclusão.....	48
6. Experimento 2: Influência da época do ano na variação dos níveis de cortisol e IGF-I em vacas lactantes mantidas em conforto térmico.....	49
6.1 Introdução.....	51
6.2 Material e Métodos.....	52
6.2.1 Animais, instalações e alimentação.....	52
6.2.2 Variáveis fisiológicas mensuradas.....	53
6.2.3 Análise estatística	54
6.3 Resultados.....	55
6.4 Discussão	63
6.5 Conclusão.....	67
7. Experimento 3: Efeitos de sistema de resfriamento adiabático evaporativo sobre o comportamento e a produção e qualidade do leite em vacas holandesas em ambiente tropical.....	68
7.1 Introdução.....	70
7.2 Material e Métodos.....	71
7.2.1 Animais e instalações.....	71
7.2.2 Variáveis ambientais	72
7.2.3 Análise de comportamento.....	73
7.2.4 Produção e qualidade do leite	74
7.2.5 Análise estatística	75
7.3 Resultados.....	76
7.4 Discussão	83
7.5 Conclusão.....	86

8. Experimento 4: Cortisol e IGF-I plasmático em vacas lactantes durante estresse pontual e prolongado.....	87
8.1 Introdução	89
8.2 Material e Métodos.....	90
8.2.1 Desafio com aplicação de ACTH.....	90
8.2.2 Câmara Climática.....	90
8.2.3 Análises	90
8.3 Resultados	92
8.3.1 Desafio com aplicação de ACTH.....	92
8.3.2 Câmara Climática.....	93
8.4 Discussão	97
8.5 Conclusão.....	99
9. Conclusões gerais e implicações	100
10. Referências.....	101

1. Introdução

O estresse por calor sazonal pode influenciar negativamente a produtividade dos animais domésticos causando perdas econômicas importantes. Como a maioria da população mundial de animais de produção se encontra em regiões onde pode ser acometida pelo calor, a busca pelo conhecimento sobre como o estresse calórico atua na fisiologia do animal reduzindo a produtividade cresceu muito nos últimos 20 anos.

Na bovinocultura leiteira, a exposição ao clima quente afeta tanto a fisiologia quanto o comportamento animal. A produtividade nacional de leite de aproximadamente 1670 kg/vaca/ano é considerada baixa e muitas vezes menor que aquela obtida por países considerados como tradicionais exportadores de leite como os Estados Unidos com 9330 kg/vaca/ano (USDA, 2009). O consumo médio diário de leite no Brasil ainda é considerado baixo, estimado em 83,2 ml por habitante (USDA, 2009), volume inferior ao mínimo recomendado pela Organização Mundial de Saúde, também estimado em 175 ml por habitante. Mesmo com o baixo consumo o Brasil não é auto-suficiente devido à baixa produtividade do rebanho, o que leva o país a importar leite *in natura* e derivados, notadamente na entressafra (USDA, 2009).

Para reverter este quadro é preciso atuar em diferentes áreas de conhecimento: genética, sanidade, alimentação, mão de obra qualificada, manejo e instalações adequadas. Porém, há que se concentrarem esforços para identificar os possíveis pontos fracos a serem alterados. Deste modo, a identificação dos principais gargalos que afetam negativamente a produtividade do rebanho nacional pode resultar em pequenas intervenções, muitas delas de baixo custo, que se traduzem em aumentos significativos na produção, o que serve de estímulo para aqueles que continuam investindo na atividade leiteira.

Atualmente aspectos relativos ao bem-estar animal referentes ao conforto térmico são relevantes e a busca de ferramentas para determinar quando o estresse calórico está influenciando negativamente o animal e sua produtividade devem ser mais estudados. Além disso, o desenvolvimento e a utilização de recursos de climatização para vacas leiteiras de alta produção em regiões tropicais e subtropicais são fundamentais para vencer as barreiras impostas pelo clima e maximizar sua produção. Alguns autores têm demonstrado que é possível melhorar

o conforto dos animais melhorando as condições de meio, maximizando assim o desempenho dos animais mais produtivos.

Por outro lado, alguns estudos têm demonstrado que diferentes agentes estressores como o manejo e a ordenha podem alterar os níveis de diferentes hormônios fundamentais para a lactação. A interação entre cortisol e IGF-I na regulação do metabolismo do estresse térmico e da produção de leite não foi totalmente investigado, e a relação entre estes hormônios e o estresse calórico continua controversa.

Tem-se como hipótese que vacas em lactação mantidas em conforto térmico apresentam menores níveis plasmáticos de cortisol e maiores níveis de IGF-I, mesmo quando submetidas a um estresse calórico pontual provocado pela exposição ao sol. Deste modo, a presente tese pretende investigar a influência do conforto térmico sobre alterações hormonais, termorregulatórias e comportamentais e a produção de leite, verificando a eficácia de um sistema de climatização que utiliza ventiladores associados à nebulização posicionados dentro do galpão tipo *free-stall*.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo avaliar as respostas hormonais, fisiológicas e comportamentais de vacas holandesas alocadas em sistema *free-stall* com e sem conforto térmico proporcionado por climatização, e ao submetê-las a um estresse por calor pontual pela exposição ao sol determinar o efeito da ambiência na capacidade de manutenção da homeotermia.

2.2 Objetivos específicos

- Experimento 1: Proposta, validação e aplicação de um Teste de Capacidade Termolítica para vacas holandesas lactantes e secas
- Experimento 2: Influência da época do ano na variação dos níveis de cortisol e IGF-I em vacas lactantes mantidas em conforto térmico
- Experimento 3: Efeitos de sistema de resfriamento adiabático evaporativo sobre o comportamento e a produção e qualidade do leite em vacas holandesas em ambiente tropical
- Experimento 4: Cortisol e IGF-I plasmático em vacas lactantes durante estresse pontual e prolongado

3. Revisão de Literatura

3.1 Influências de fatores ambientais nas respostas termolíticas

Temperatura e umidade do ar elevadas e radiação solar intensa são elementos meteorológicos estressantes, geralmente associados ao baixo desempenho de rebanhos criados nas regiões tropicais (COLLIER et al., 1982). Contudo, a intensidade dos efeitos negativos causados por estes agentes estressantes depende da eficiência de diferentes mecanismos termorreguladores que atuam nos animais (URIBE- VELASQUEZ et al., 1998).

Assim é preciso manter um balanço térmico adequado entre o meio e o animal, e neste contexto sua capacidade em perder e ganhar calor para o meio ambiente tem participação direta neste equilíbrio (TITTO, 1998). Cabe ressaltar que como animais homeotermos, as vacas leiteiras sobrevivem em uma faixa delimitada de temperatura corporal, denominada de zona de conforto ou de termoneutralidade, onde os animais mantêm seu bem-estar, saúde e produtividade, com pequeno desgaste energético e maior longevidade (NÃÃS, 1989).

Segundo BACCARI JR. (1998) a radiação solar incidente sobre vacas, quando da ausência de sombra nas horas mais quentes do dia de verão tropical, torna-se um forte agente estressor, reduzindo substancialmente a produção. Para evitar que o ambiente térmico interfira de maneira negativa na produção animal, deve-se fazer uso de construções adequadas para abrigar os animais, já que o estresse pelo qual passam as fêmeas leiteiras promove respostas comportamentais, fisiológicas e imunológicas negativas (SILVA, 1998).

Quando expostas a ambiente quente, as vacas aumentam a frequência respiratória e temperatura retal (SPIERS et al., 2004), entretanto a influência da temperatura do ar nessas duas medidas pode acontecer por diferentes mecanismos; a frequência respiratória é um modo de regulação térmica enquanto a temperatura retal é o resultado do equilíbrio térmico (KABUNGA, 1992).

Atualmente, a medida da temperatura retal é usada frequentemente como índice de adaptabilidade fisiológica aos ambientes quentes, pois seu aumento mostra que os mecanismos de perda de calor tornaram-se insuficientes para manter a homeotermia (JOHNSON, 1980; MOTA, 1997; PEREIRA, 2008). A referência fisiológica para essa variável está entre 38 e 39,5 °C sob condições termoneutras (DU PREEZ, 2000). Um aumento de 1 °C ou menos na temperatura retal pode ser

suficiente para reduzir o desempenho da maioria das espécies de produção (McDOWELL et al., 1976). Já a frequência respiratória é um indicador mais sensível do estresse calórico do que a temperatura retal (BROWN-BRANDL et al., 2005).

Sob estresse térmico, para manutenção da temperatura corporal há também aumento da temperatura de superfície corporal e frequência respiratória, que começam a elevar-se antes da temperatura retal (BIANCA, 1965; FERREIRA et al., 2006). Existe uma correlação positiva entre temperatura de superfície corporal e frequência respiratória (MARTELLO et al., 2009), sendo esta primeira uma boa medida para descrever o microclima que envolve os animais (COLLIER et al., 2006)

Animais mais pesados, como vacas da raça Holandesa, tendem a ter maior aumento da frequência respiratória, mesmo àqueles que possuem adaptação a condições adversas (GAUGHAN et al., 2000), e em alguns casos, a diminuição da frequência respiratória nem sempre é um indicativo de que o animal está conseguindo enfrentar a situação de estresse calórico. Pode acontecer devido uma mudança na dinâmica da frequência respiratória de rápido ofego para uma fase de respiração profunda que é mais lenta (BROWN-BRANDL et al., 2006).

O índice de temperatura e umidade (ITU) é amplamente utilizado em vacas leiteiras como um avaliador de conforto térmico e acúmulo de calor (BERMAN, 2005; COLLIER; ZIMBELMAN, 2007; IGONO et al., 1985; LACETERA et al., 2002; McDOWELL, 1972; TAPKI; SAHIN, 2006), e é baseado nos efeitos da temperatura ambiente e umidade relativa sobre a fisiologia e produção destes animais (FEHR et al., 1993). Entretanto esse índice pode não descrever completamente o nível de estresse calórico pelo qual o animal está passando, pois é baseado em associações específicas de fatores ambientais desenvolvido para regiões de clima temperado (SILVA, 2000), não considera fatores como aclimação e nível de produção do animal que podem modificar os intervalos críticos determinados para o ITU (MARTELLO et al., 2009), e não leva em consideração o efeito de resfriamento pelo vento (movimentação do ar) ou a proporção de calor absorvido pelos animais pela radiação solar, quando da ausência de sombra (GAUGHAN et al., 2008; MADER et al., 2006). Ainda assim é muito utilizado nas associações com respostas termorregulatórias.

Com o aumento do ITU, novilhas permaneceram sob a sombra, indicando que o aumento do ITU foi sentido como um estresse calórico (CARTER, 2008). A temperatura da superfície corporal e a temperatura retal são afetadas pelo ITU

durante o dia, entretanto sem influência nas medidas noturnas (ZÄHNER et al., 2004)

A dinâmica da resposta ao estresse calórico costuma ser relativamente lenta, com demora de 2 a 3 dias para que a vaca estabilizasse sua resposta ao aumento da temperatura ambiente (FREITAS et al., 2006; SAMPSON et al., 2004; WEST et al., 2003).

3.2 Produção de leite

Um ambiente quente é o principal fator que pode afetar negativamente a produção leiteira, principalmente em vacas que possuem alto mérito genético (KADZERE et al., 2002).

Décadas de pesquisa com populações geneticamente definidas demonstrou que o uso de métodos convencionais de cruzamento para melhorar a resistência ao estresse térmico sempre diminui a produção de leite na geração F1 (COLLIER et al., 2006). Desta forma, melhorar a produtividade leiteira levou a seleção de animais menos tolerantes ao calor, sendo necessária a melhoria do ambiente em relação ao bem estar e melhor manejo nutricional em animais expostos a condições ambientais adversas (KADZERE, et al., 2002). Pesquisadores verificaram que os efeitos adversos do ambiente podem causar um decréscimo de até 25 % na produção leiteira (IGONO et al. 1992). Porém, quando o estresse térmico deixou de ser induzido experimentalmente a produção voltou a aumentar lentamente sem, contudo retornar ao nível mensurado no período pré-estresse (HAHN, 1993; McDOWELL, et al., 1976). Por outro lado, Barbosa et al. (2004) constatou que animais recebendo água sobre a superfície corporal com o uso de aspersores sob pressão associada à ventilação, promoveram aumentos de 8,6 % na produção de leite.

Nääs e Arcaro Jr. (2001) avaliaram o efeito da ventilação associada a aspersão em instalações para vacas lactantes e relataram maiores valores de produção de leite para o grupo de animais que estava alojado nestas instalações, em comparação ao grupo sem ventiladores e aspersores.

Vacas holandesas produzindo mais de 25 kg/dia tiveram maior queda na produção durante o verão do que os animais com produção abaixo de 20 kg/dia (16,1 % e 11,6 % respectivamente), mostrando claramente a maior sensibilidade ao calor em animais de alta produção (TAPKI; SAHIN, 2006)

Para Ravagnolo e Misztal (2002) há redução da produção de leite quando o ITU passa de 72. Entretanto, mesmo com ITU acima de 75, alguns autores não registraram diminuição na produção na comparação entre animais mantidos ou não em sistema climatizado, mas um aumento na proporção de gordura no leite nos animais climatizados (AVENDAÑO-REYS et al., 2006)

3.3 Cortisol e IGF-I

Normalmente, os animais de alta produção são considerados como mais susceptíveis ao estresse, assim a influência dos fatores de meio nestes animais é teoricamente maior e a mobilização de tecidos corporais é maior para suportar a produção de leite (TAYLOR et al., 2006). Alguns autores argumentam que é possível identificar tanto os animais menos susceptíveis ao estresse quanto os animais de maior potencial produtivo (FULKERSON; JAMIESON, 1982; LUCY et al., 1992). Ao mesmo tempo, alguns tipos de estresse foram relacionados ao aumento dos níveis plasmáticos de cortisol e à redução dos níveis plasmáticos de IGF-I, dentre estes fatores estressantes destacam-se o ambiente, parto, desmame, restrição alimentar e sub-nutrição (ELVINGER, 1992; RENANVILLE et al., 2000).

Os estudos realizados até o momento para verificar um possível efeito do ambiente em vaca leiteiras não consideraram simultaneamente os níveis plasmáticos de IGF-I e cortisol. Porém, alguns estudos realizados com outros propósitos experimentais relacionaram o aumento da concentração plasmática do IGF-I (KNIGHT et al., 1990; SECHEN et al., 1989) ou do cortisol (NEGRÃO; MARNET, 2003; RUSHEN et al., 2001) respectivamente ao aumento ou diminuição da produção leiteira. Por outro lado, alguns trabalhos realizados em animais de laboratório e humanos sugerem que as ações do cortisol e IGF-I podem ser antagônicas em diferentes situações estressantes (HOLZENBERGER, 2004; MCCARTHY et al., 1990; RENANVILLE et al., 2002).

Em vacas leiteiras, a controvérsia sobre a possível relação existente entre o cortisol e o IGF-I permanece. Embora vários autores já observassem que o estresse calórico promoveu aumento significativo nos níveis plasmáticos de cortisol (ALNAIMY et al., 1992; ARCARO, 2005; DU PREEZ, 2000), o efeito do meio ambiente sobre os níveis plasmáticos de IGF-I permanece controverso, pois alguns autores relatam que o estresse calórico foi associado à redução dos níveis

plasmáticos de IGF-I (ARMARIO et al., 1987; McCUSHER, 1998; PEISEN et al., 1995; STRAUS, 1994), enquanto outros autores relatam que o estresse calórico aumentou significativamente os níveis plasmáticos de IGF-I (HIRAYAMA et al., 2004)

Christison e Johnson (1972) reportaram a diminuição da concentração plasmática de cortisol em vacas após exposição prolongada a altas temperaturas ambiente, queda também encontrada por Ronchi et al. (2001). A redução do cortisol é relacionada a um mecanismo de adaptação. Hidrocortisona é um hormônio termogênico, e a redução da atividade adrenocortical durante o estresse calórico é considerada uma ação termorregulatória para prevenir o aumento na produção metabólica de calor. Zähler et al. (2004) em estudo com vacas lactantes durante o verão, encontrou menores valores de cortisol no final do dia em relação ao início da manhã, e as concentrações as 17h tiveram efeito do ITU.

Durante dias longos, bovinos apresentam concentrações mais altas de IGF-I (DAHL et al., 1997; KENDALL et al., 2003), entretanto os estudos que mostraram o impacto das horas de luz na concentração plasmática de IGF-I foram conduzidos em condição de termoneutralidade. Existe a possibilidade de que o estresse térmico possa alterar o efeito do fotoperíodo na concentração de IGF-I (COLLIER et al., 2008), diminuindo a resposta endócrina aos dias mais longos encontrados na primavera e no verão. Como o efeito do estresse por calor sobre a diminuição da alimentação é bem conhecido (COLLIER et al., 2004; McGUIRE et al., 1991) e a redução no balanço energético está associado com ingestão de matéria seca, a diminuição na ingestão de alimentos também pode contribuir com a diminuição do IGF-I circulante.

3.4 Comportamento animal

Os padrões de comportamento dos animais são alterados por estímulos estressantes, tais como fome, sede, calor ou frio (BROOM; MOLENTO, 2004). Ao mesmo tempo, os estudos sobre o comportamento podem revelar se as condições de bem-estar animal estão sendo satisfeitas ou não, tornando-se ferramentas úteis no estudo dos diferentes mecanismos termorreguladores que normalmente são acionados pelo estresse ambiental (MARTIN; BATESON, 1986).

Procura por sombra, mudança de postura corporal usual, movimentação, ingestão de alimentos, relutância das fêmeas em montar quando em cio são

alterações realizadas pelo animal com o objetivo de reduzir a produção ou promover a perda de calor, evitando estoque adicional de calor corporal. Mudanças no comportamento visando promover a eliminação de calor ocorrem principalmente no sentido de maximizar a dissipação de calor por condução e/ou convecção (McDOWELL, 1972).

O tempo deitado pode ser uma resposta de conforto térmico, posição de preferência durante ruminação e ócio. Zähler et al. (2004) verificou que com o aumento do ITU durante o dia houve diminuição do tempo de comportamento deitado. Ansell (1981) também notou que bovinos sob estresse térmico se recusam a deitar, explicando que nessa situação de desconforto o animal busca expor a maior parte do corpo à atmosfera para facilitar a perda de calor.

O estudo do comportamento tem demonstrado que vacas de alta produção são mais sensíveis ao estresse calórico do que vacas de menor produção leiteira, neste caso, os autores argumentaram que vacas de alta produção passavam mais tempo em pé em comparação ao tempo de descansando ou em atividade de locomoção (TAPKI; SAHIN, 2006). Damasceno et al. (1999) observaram mudança no padrão de comportamento de ruminação do dia para a noite em vacas sem acesso a sombra e durante a maior parte do dia, esses animais permaneceram em ócio devido à maior radiação solar.

Estudos realizados no sul da Itália (FRAZZI et al., 2001), demonstraram que vacas leiteiras permanecem mais tempo nas áreas com ventilação e nebulização em relação às áreas com ventilação e aspersão. Porém, Perissinotto et al. (2006) também trabalharam com vacas holandesas e não observaram diferenças significativas entre os sistemas de nebulização e aspersão.

Quando a ventilação e nebulização foram realizadas apenas na área de alimentação, os animais permanecessem mais tempo em pé neste local em relação à área de descanso não climatizada (CALEGARI et al., 2003). Porém, neste mesmo estudo houve redução na frequência de animais deitados na área de descanso sem climatização, e esse comportamento pode promover um aumento do estresse físico destes animais.

Em contrapartida, Matarazzo (2004) em estudo com vacas leiteiras em *free-stall* com área de descanso climatizada ou não por ventilação e nebulização, não encontrou diferença no tempo de permanência dos animais neste local, assim a

utilização destes recursos de climatização não aumentaram o tempo que os animais permaneceram deitados.

Estas contradições indicam que ainda há necessidade de buscar mais conhecimento sobre o efeito do estresse térmico no comportamento de vacas leiteiras confinadas em clima tropical, visando um maior entendimento desta problemática.

3.5 Capacidade termolítica

Uma prova de tolerância ao calor deve manter alta correlação com a produtividade, de tal maneira que se possa prever por medidas pontuais a adaptabilidade dos animais à situação imposta, bem como prever seu desempenho produtivo no futuro (McDOWELL, 1975).

Tendo por base este conceito, espera-se que os animais quando submetidos ao estresse calórico mantenham um mesmo padrão de resposta ao longo de sua vida produtiva. A utilização de teste de tolerância ao calor já demonstrou que existe uma alta correlação positiva entre este índice e ganho de peso em animais de corte, mostrando-se um teste efetivo e útil para avaliação de desempenho de bovinos de corte em condições tropicais (TITTO et al., 1999; TITTO et al., 2006).

A temperatura retal é o principal parâmetro fisiológico para medir o nível de tolerância ao calor de um animal (JOHNSON, 1980). As perdas de calor ocorrem por condução, convecção, radiação e evaporação. Os três primeiros caminhos são dependentes do gradiente térmico e tornam-se efetivos para manter o equilíbrio térmico do animal em ambiente com temperatura do ar abaixo do limite crítico superior da zona de conforto térmico. Em ambientes com temperatura do ar acima desse limite a via evaporativa torna-se a principal maneira de troca de calor (respiração e sudorese). Se esses métodos não forem suficientes para dissipar o calor absorvido, ocorre aumento da temperatura retal acima do limite considerado normal de 39,5°C (DU PREEZ, 2000).

A possibilidade de definir a capacidade termolítica individual pela medida da temperatura retal pode ser uma ferramenta na seleção de animais mais resistentes ao calor.

A realização do teste em vacas leiteiras é interessante para se determinar a tolerância individual do animal e o efeito negativo que um menor índice de tolerância

possa provocar na produção de leite e nas respostas fisiológicas e comportamentais. Com os índices individuais do rebanho pode-se ter uma ferramenta para propor a melhor condição de manejo e ambiência.

3.6 Eficiência de sistemas de climatização

Existem diversas opções de resfriamento de ambiente baseados na combinação de princípios de convecção, condução, radiação e evaporação. Movimentação do ar com uso de ventiladores, molhar o animal, evaporação para esfriar o ar e sombra para minimizar a radiação solar são usados para facilitar a dissipação do calor.

Em estudos anteriores (ARCARO, 2005; FRAZZI et al., 1997; MARTELLO, 2006; PERISSINOTO, 2003), os sistemas de climatização utilizados alteraram eficazmente a temperatura e umidade do ar mantendo as condições de conforto térmico, assim a temperatura retal dos animais manteve-se dentro de um intervalo considerado normal (38 – 39,5 °C).

O uso do sistema de resfriamento evaporativo com auxílio de ventiladores aumentou a produção de leite, em maior proporção no terço final de lactação (CHAIYABUTR et al., 2008).

O uso de sombra e aspersores reduziram a frequência respiratória e a temperatura corporal em vacas de leite quando o ITU foi superior a 69 (KENDALL et al., 2007), e a associação de ventiladores e aspersores também foi eficaz na redução da temperatura retal e frequência respiratória de vacas lactantes quando comparadas a animais não climatizados (NÄÄS e ARCARO JR, 2001).

Em estudo com vacas em pré e pós parto, com e sem acesso a climatização, Averdaño-Reys et al. (2006) verificaram menores valores de temperatura retal e frequência respiratória apenas nos animais em lactação mantidos em climatização, e uma tendência de aumento nos animais pré-parto sem climatização.

4. Material e Métodos

4.1 Descrição geral

O presente estudo foi realizado no Setor de Bovinocultura Leiteira da Coordenadoria do Campus de Pirassununga – CCPS/USP, na cidade de Pirassununga, SP, a uma altitude de 634 m, na latitude sul de 21°80'00" e longitude oeste de 47°25'42", que apresenta clima do tipo Cwa, segundo classificação de Köppen, com temperatura média anual de 22,0 °C e pluviosidade média anual próxima a 1363 mm.

As 28 vacas da raça Holandesa utilizadas nos experimentos estavam entre a primeira e terceira lactações, com produção média de 20 kg/dia e intervalo entre parições no início do experimento de 15 dias. As vacas eram homogêneas em relação à condição corporal e cor de pelagem, com predominância da cor preta. Os animais receberam uma mistura de concentrado e silagem de milho, balanceada de acordo com o NRC (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2001), com 76 % de NDT e 18 % de PB na matéria seca. A alimentação era fornecida após as ordenhas, na proporção de 1 kg de concentrado / 3 litros de leite produzido e $\pm$ 30 kg de silagem de milho por animal.

A instalação utilizada durante o período experimental, que se desenvolveu do início ao final da lactação, foi estábulo do tipo *free-stall* com 2 baias coletivas divididas para dois lotes distintos (14 animais/baia), cada uma com área total coberta de 200 m² (16 x 13 m construído no sentido sudeste-noroeste), com piso de concreto, cobertura de telhas de fibrocimento, pé direito de 3,2 metros e cama de areia. Cada baia coletiva possui cocho linear com 80 cm por cabeça e bebedouro automático posicionados sob o telhado. As vacas tiveram acesso ilimitado a um piquete de capim *coast-cross* sem disponibilidade de sombra, com área de 400 m² (Figuras 1 e 2).

Em uma destas baias foi implantado um sistema de climatização com ventilação forçada e nebulização de alta pressão (Grupo TC: com climatização). A outra baia não dispunha de ventilação forçada nem nebulização, a qual foi designada o Grupo TS (sem climatização). As vacas foram distribuídas ao acaso entre os dois tratamentos e colocadas nas baias experimentais separadas por lona, para evitar que o sistema de climatização não reduzisse o estresse térmico na baia não climatizada.

Para o sistema de climatização foram utilizados 5 ventiladores com potência de 0,5 CV, espaçados a cada 1,5 m, com capacidade de produzir vazão de ar de até $300 \text{ m}^3 \cdot \text{min}^{-1}$. O sistema de nebulização foi montado na direção da cama, com duas linhas no sentido longitudinal do galpão, a uma altura de 3,0 m do chão, com espaçamento entre bicos de 1 m (Figura 3). O sistema de climatização era acionado por um sensor de temperatura colocado no centro do galpão, na altura de 2,5 m, ligado a um climatizador (THC 3400P), que era acionado quando a temperatura do ar ultrapassava 26°C (Figura 9).

Os animais eram ordenhados duas vezes ao dia, às 7:00 h e às 14:30 h e aguardavam a ordenha em sala de espera não climatizada, porém em galpão coberto que permitia conforto térmico.

Figura 1 - Visão frontal do galpão *free-stall*, lado esquerdo sem climatização, lado direito com ventiladores e nebulização.

Figura 2 - Visão lateral (cocho, corredor e camas) e área descoberta cimentada e piquete anexo.

Figura 3 - Sistema de climatização composto por ventiladores e linhas de nebulização

Figura 4 - Animais durante Teste de Capacidade Termolítica, ao sol e à sombra

Figura 5 - Temperatura da base da cauda e termômetro infravermelho de contato

Figura 6 - Termômetro digital para mensuração da temperatura retal e termômetro de laser infravermelho para mensuração da temperatura da superfície corporal dorsal.

4.2 Período experimental – Organização geral

O período experimental foi desenvolvido entre os verões de 2007 e 2008. No início do outono de 2007 as vacas foram divididas em dois grupos experimentais a medida que ocorria a parição. Cada grupo foi alocado em uma das baias experimentais, com e sem disponibilidade de climatização, em galpão do tipo *free-stall* (Figuras 1, 2 e 3). Durante todo o ano os animais foram mantidos nesta instalação, período onde se desenvolveram as colheitas de dados fisiológicos, hormonais e de comportamento, culminando com a realização do teste de capacidade termolítica para verificar a eficácia do sistema de climatização (Figura 4). O teste também foi realizado em vacas no período pré-parto para verificar diferenças em relação aos animais em lactação. Os equipamentos utilizados nas colheitas de dados estão expostos nas Figuras 5 e 6.

As colheitas foram realizadas quando o dia experimental foi considerado típico para estação do ano correspondente, precaução esta para evitar, por exemplo, que uma colheita de sangue fosse feita no dia mais frio dos últimos verões. Cada estação do ano foi caracterizada pela temperatura, umidade relativa e radiação solar mensurada na estação meteorológica do Laboratório de Construções e Ambiência da FZEA/USP (Tabela 1). As estações foram divididas em: Outono (abril, maio, junho), Inverno (junho, julho, agosto), Primavera (setembro, outubro, novembro),

Verão seco (dezembro, até 15 de janeiro), Verão chuvoso (16 de janeiro a 28 de fevereiro).

Após análise prévia dos dados uma contraprova se tornou necessária para validação dos dados fisiológicos sendo realizado um estudo em câmara climática, com ambiente controlado e um desafio com estresse agudo padrão com utilização de ACTH.

As fases experimentais foram divididas em Experimento 1, 2, 3 e 4 para melhor desenvolvimento da análise dos resultados. Os experimentos são descritos individualmente nesta tese, todos seguindo um mesmo formato, com resumo, introdução específica ao tema, descrição do experimento, seguidos dos resultados e discussão.

4.3 Parâmetros ambientais

As variáveis climáticas foram registradas pela estação meteorológica eletrônica do Laboratório de Construções e Ambiência, da FZEA/USP, localizada a 300m do setor de bovinocultura leiteira onde foram realizados os experimentos. Dados médios como temperatura do ar, umidade relativa, radiação solar, pluviosidade e velocidade do ar foram determinadas para cada estação do ano (Tabela 1).

Tabela 1. Dados climáticos médios registrados nas estações do ano registrados pela estação meteorológica eletrônica.

	Outono	Inverno	Primavera	Verão seco	Verão chuvoso
Tar ¹ média	19,23	15,48	21,42	22,95	23,16
Tar ¹ variação	8,9-29,6	3,4-27,7	11,9-33,3	14,4-34,8	15,4-35,3
UR ² variação	42-100	30-100	26-99	24-99	35-98
Rsolar ³ máx	921	867	1215	1361	1554
Rsolar ³ média	376,03	299,73	403,09	510,52	511,85
Pluviosidade ⁴	82,0	46,4	156,6	32,4	272,8
Vento ⁵	0,87	1,44	2,43	3,77	3,27

¹ Temperatura do ar (°C); ² Umidade relativa (%); ³ Radiação solar (média durante horas de luz (W/m²)); ⁴ Pluviosidade acumulada (mm); ⁵ Velocidade do vento (m/s)

Figura 7 - Temperatura de globo negro das baias climatizada (linha tracejada) ou sem climatização (linha contínua) durante as colheitas de dados nas diferentes estações do ano.

Os parâmetros ambientais foram avaliados pelo cálculo do índice de temperatura e umidade (ITU). No centro de cada baia foi posicionado um termômetro de globo negro e um higrômetro, logo acima da cama, para verificar diferença entre os ambientes (Figuras 7, 8 e 9).

Figura 8 - Localização do termômetro de globo negro no centro do galpão.

Figura 9 - Climatizador THC 3400P

4.4 Forma de análise dos resultados

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado (DIC) com 2 tratamentos (com e sem climatização) com 14 animais/tratamento. Os animais foram homogêneos em relação à idade, peso inicial, condição corporal e fase de lactação.

Para o teste de capacidade termolítica foi realizada análises de variância para as medidas fisiológicas (temperatura retal, da base da cauda e dorso, frequência respiratória, cortisol e IGF-I) com efeitos fixos sendo os tempos de exposição ao sol (0, 1 e 2) e a umidade relativa, a data de realização das colheitas como efeito

aleatório e o animal como medida repetida. A temperatura do ar e temperatura de globo negro foram testadas como covariável, entretanto quando não tiveram interferência no modelo foram excluídas. O modelo foi adequado pela distribuição de resíduos. Para comparações entre vacas no período pré-parto e em lactação e entre as baias climatizada ou não foi utilizado o Teste-t com correção de satterthwaite para os graus de liberdade, com efeito para cada tempo de colheita. O nível de significância utilizado no experimento foi de 5 % e todos os resultados experimentais foram apresentados com médias e erro padrão médio. As análises estatísticas dos resultados foram realizadas utilizando o PROC MIXED do SAS e TTEST Procedure (SAS, 2000).

As variáveis fisiológicas foram analisadas como medidas repetidas no tempo (CROWDER; HAND, 1990), utilizando animal como efeito aleatório. Foi realizada análise de variância (Mixed-SAS) para os efeitos das estações do ano e teste de comparação múltipla de médias entre as diferentes estações para os animais de cada baia experimental com e sem sistema de climatização pelo Teste de Tukey-Kramer. A comparação entre as baias experimentais foi realizada pelo Teste-t com correção de satterthwaite para os graus de liberdade. Foram estimados coeficientes de correlação simples entre as variáveis fisiológicas, hormonais e ambientais e depois os pares significativos foram submetidos à análise de regressão. Todos os testes foram realizados a 5 % de probabilidade (SAS, 2000).

O modelo utilizado para a análise de comportamento, por se tratar de modelo não-linear, mas linearizável foi ajustado utilizando-se a teoria de modelos lineares generalizados proposta por Nelder e Wenderburn (1972), utilizando-se o procedimento GLIMMIX do software SAS. Denotando-se a esperança matemática $E[Y_t]$ por μ_t , pode-se tornar a expressão linear aplicando a função de ligação logit, obtendo-se então um preditor linear, funcionalmente ligado à média μ_t . Desta maneira, o ajuste do modelo foi efetuado considerando que a distribuição dos resultados de cada variável de comportamento estudada é binomial, a função de ligação foi incorporada aos estimadores dos efeitos fixos, preditores dos efeitos aleatórios e estimadores dos componentes de variância. Para a análise das variáveis comportamentais de posição à sombra, postura em pé e atividades (alimentação, ruminação, beber água, ócio e interação) considerou-se o efeito de animal em estrutura de medida repetida e o efeito do tempo (horas do dia). Foi analisado o efeito das estações do ano sobre as médias comportamentais dos

animais com e sem disponibilidade de galpão com sistema de climatização comparados por uma análise de variância para os efeitos fixos e comparação de médias por Tuker-Kramer a 5 %. Para comparação das variáveis entre os animais dos grupos experimentais (com e sem climatização) foi realizado teste-t, com correção de satterthwaite para os graus de liberdade, a 5 % de significância.

A produção de leite foi analisada nas estações do ano com efeitos lineares e quadráticos dos dias de lactação por análise de variância e comparação de médias por Tuker-Kramer a 5 %. Mesmo procedimento foi utilizado nas variáveis de qualidade do leite (gordura, proteína, lactose, extrato seco desengordurado, sólidos totais e contagem de células somáticas). As comparações entre grupos foram realizadas pelo teste-t, com correção de satterthwaite para os graus de liberdade, a 5 % de significância.

Foi realizada análise de variância (Proc Mixed) para avaliar os efeitos da aplicação de ACTH nos níveis de cortisol e IGF-I, nos diferentes tempos de colheita (-15, 0, +30, +60 e +120 minutos), considerando os animais as medidas repetidas e para os dados obtidos na câmara climática foi desenvolvida análise fatorial com o tempo (0, 60, 120 e 300 minutos) e os dias de colheita (3º, 5º e 7º de permanência na câmara sob estresse calórico) sendo os fatores principais, sua interação (dia x tempo) e o animal como repetição. Quando não existiu pelo menos um contraste entre as médias da interação significativo, os fatores foram estudados independentemente. O teste de comparação múltipla de médias foi realizado pelo Teste de Tukey-Kramer. Foi realizado teste-t para comparação dos dados de cortisol e IGF-I no desafio de ACTH e na câmara climática nos tempos 0, 60 e 120. Foram estimados coeficientes de correlação simples (Pearson) entre as variáveis fisiológicas. A produção de leite foi analisada antes da entrada na câmara (3 dias), durante a permanência (7 dias) e após a saída (5 dias), com comparação múltipla de médias por Tukey-Kramer. Todos os testes foram realizados a 5 % de probabilidade (SAS, 2000) e todos os valores são apresentados pela média $\pm$ erro padrão da média.

5. Experimento 1: Proposta, validação e aplicação de um Teste de Capacidade Termolítica para vacas holandesas lactantes e secas

RESUMO

O estudo teve como objetivo validar uma nova proposta de avaliação da capacidade de perda de calor após exposição ao sol em vacas e sua aplicação em vacas secas e lactantes mantidas ao não em condição de conforto térmico. O teste consiste de exposição ao sol por uma hora seguido de uma hora de descanso a sombra para determinação da capacidade termolítica individual (CT). As variáveis temperatura retal, superficial e da base da cauda, frequência respiratória e concentrações plasmáticas de cortisol e IGF-I foram medidas antes, durante após a exposição ao sol (tempos 0, 1 e 2). Após validação da proposta inicial, o teste foi aplicado em duas fases. As diferenças entre vaca seca e em lactação foram medidas em 12 animais na fase 1. Na fase 2, foi determinada a CT de 28 animais em lactação, após 8 meses de permanência em *free-stall*, 14 animais com e 14 sem sistema de climatização (nebulizadores e ventiladores). Não houve diferença entre a CT de vacas secas e em lactação ($P>0,05$), porém foi encontrada maior frequência respiratória e IGF-I e menor temperatura de superfície em vacas secas durante a exposição ao sol ($P<0,01$). Houve efeito do tempo de colheita sobre todas as variáveis fisiológicas ($P<0,01$). Apesar de não ter havido diferença para cortisol no tempo 1, nos tempos 0 e 2 os níveis foram maiores para vacas lactantes ($P=0,03$). O efeito da climatização foi observado nas concentrações de cortisol nos tempos 0 e 2 ($P=0,03$), e no tempo 1 da temperatura retal ($P<0,05$) e IGF-I ($P<0,01$), com CT mais elevada nestes animais ($P<0,05$). Houve efeito do tempo de colheita para todas as variáveis, independente da instalação ($P<0,05$). A umidade relativa também teve efeito nas respostas termorregulatórias, excluindo o cortisol e IGF-I ($P>0,05$). O teste de capacidade termolítica foi validado e pode ser utilizado para vacas leiteiras em lactação ou secas. A produção de leite não influenciou as respostas termorreguladoras das vacas holandesas, porém quando em lactação e mantidos em sistema climatizado apresentaram melhor índice de capacidade termolítica

Palavras-chave: cortisol; estabulação livre; estresse térmico; temperatura retal; IGF-I

Experiment 1: Proposal, validation and application of a thermolysis capacity test for lactating and dry cows

ABSTRACT

The study aimed to validate a new proposal for assessing the ability of heat loss after sun exposure in cows and its application in dry and lactating cows kept or not on condition of thermal comfort. The test consists of sun exposure for an hour followed by an hour's rest in the shade to determine the individual thermolysis capacity (CT). The variables rectal temperature, body surface, internal base of tail, respiratory rate and plasma cortisol and IGF-I were measured before, during and after sun exposure (0, 1 and 2). After validation of the initial proposal, the test was applied in two phases. The differences between dry and lactating cows were measured in 12 animals kept in a paddock with shade in phase 1. In phase 2, 28 animals after the onset of lactation were divided into two experimental groups housed in free-stall with and without evaporative cooling system (mist and fans), remaining at the facility for eight months to be subjected to heat stress to be determined CT. There was no difference between the CT of dry and lactating cows ($P>0.05$), but respiratory rate and IGF-I were greater and body surface was lower in dry cows during sun exposure ($P<0.01$). There was effect of collection time on all physiological variables ($P<0.01$). Although there was no difference in cortisol for time 1, the values on 0 and 2 were higher for lactating cows ($P=0.03$). The effect of cooling was observed in cortisol concentrations at time 0 and 2 ($P=0.03$), and on time 1 for rectal temperature ($P<0.05$) and IGF-I ($P<0.01$), and CT higher in these animals ($P<0.01$). There was effect of collection time for all variables, regardless of the cooling system ($P<0.05$). The relative humidity also had an effect on thermoregulatory responses, excluding cortisol and IGF-I ($P>0.05$). The thermolysis capacity test was validated and can be used for either dry or lactating cows. Milk production did not influence the thermoregulatory responses of Holstein cows, but when lactating and kept in cooling system they showed better thermolysis capacity index.

Key-words: cortisol; *free-stall*; IGF-I; rectal temperature; stress

5.1 Introdução

A maioria da população mundial de animais domésticos se encontra em regiões onde o estresse por calor sazonal pode influenciar negativamente a produtividade e as perdas econômicas podem ser altas. Por esse motivo, a busca pelo conhecimento sobre como o estresse calórico atua na fisiologia do animal reduzindo a produtividade cresceu muito nos últimos 20 anos.

Décadas de pesquisa com populações geneticamente definidas demonstrou que o uso de métodos convencionais de cruzamento para melhorar a resistência ao estresse térmico sempre diminui a produção de leite na geração F1 (COLLIER et al., 2006). Desta forma, melhorar a produtividade leiteira levou a seleção de animais menos tolerantes ao calor, sendo necessária a melhoria do ambiente em relação ao bem estar e melhor manejo nutricional em animais expostos a condições ambientais adversas (KADZERE, et al., 2002). Como os custos de energia têm aumentado, o retorno sobre o investimento para modificar principalmente as instalações de vacas leiteiras com uso de sistemas de climatização diminuiu.

Neste sentido, há um novo interesse na redução dos custos de climatização (COLLIER et al., 2006) e na identificação de genes específicos (OLSON et al., 2003), que poderiam melhorar a resistência ao estresse sem prejudicar a produtividade. A utilização de uma prova de tolerância ao calor possibilita a identificação de animais mais adaptados ao ambiente estressante, seja pelo ponto de vista da simples resistência ao calor, seja pela capacidade de eliminar o excesso de calor (HAHN, 1999; PEREIRA et al., 2007).

A temperatura retal é um indicador de balanço térmico e pode ser usada para avaliar a adversidade do ambiente quente (JOHNSON, 1980; MOTA, 1997; PEREIRA, 2008). A referência fisiológica para essa variável está entre 38 e 39,5°C sob condições termoneutras (DU PREEZ, 2000). Um aumento de 1°C ou menos na temperatura retal pode ser suficiente para reduzir o desempenho da maioria das espécies de produção (McDOWELL et al., 1976). Sob estresse térmico, para manutenção da temperatura corporal há também aumento da temperatura de superfície corporal e frequência respiratória, que começam a elevar-se antes da temperatura retal (BIANCA, 1965; FERREIRA et al., 2006). A possibilidade de definir a capacidade termolítica individual pela medida da temperatura retal pode ser uma ferramenta na seleção de animais mais resistentes ao calor.

O objetivo do estudo foi validar uma nova proposta de avaliação da capacidade de perda de calor após exposição ao sol em vacas leiteiras e sua aplicação em vacas secas e lactantes mantidas ao não em condição de conforto térmico.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Local e instalações

O experimento foi realizado no Setor de Bovinocultura Leiteira da Coordenadoria do Campus de Pirassununga – CCPS-USP, na cidade de Pirassununga, SP, a uma altitude de 634 m, na latitude sul de 21°80'00" e longitude oeste de 47°25'42", que apresenta clima do tipo Cwa, segundo classificação de Köppen com temperatura média anual de 22,0 °C e pluviosidade média anual próxima a 1363 mm. O estudo foi realizado entre os verões de 2007 e 2008.

O experimento foi desenvolvido em galpão com área coberta por telhas de barro, com pé direito de 3 m e ventilação natural, e área descoberta anexa com piso de cimento, ventilado, sem disponibilidade de sombra, água e alimentação. Os animais foram mantidos com cabresto e presos individualmente para facilitar o manejo de colheita de dados.

5.2.2 Proposta e validação do Teste de Capacidade Termolítica

Foi realizado um pré-experimento para validação do teste de tolerância ao calor em vacas holandesas, idealizado por Baccari Jr. et al. (1986) e modificado conforme metodologia descrita por Titto et al. (1999).

Doze vacas experimentais da raça Holandesa, seis em período seco e seis em lactação foram submetidas ao estresse (desafio) causado pela exposição ao sol por 1 hora, repetidos em três dias considerados típicos de verão (temperatura de globo negro acima de 45°C, céu limpo e sem movimentação de ar), para determinar a tolerância ao calor individual. O índice de tolerância ao calor é obtido pela diferença entre as duas temperaturas retais obtidas antes da exposição ao sol (T0) e após 1 hora de retorno a sombra (T1) pela fórmula: $[10-(T1-T0)]$ (TITTO et al., 2009). Os valores do índice de tolerância ao calor (ITC) variam de 0 a 10. Nos mesmos tempos da tomada da temperatura retal também foram tomadas a temperatura da superfície corporal e frequência respiratória.

Com os resultados obtidos verificou-se uma dificuldade em mensurar a capacidade termolítica das vacas devido a pouca diferença encontrada entre a temperatura inicial e a final. Para mostrar o aumento das variáveis fisiológicas temperatura retal, temperatura da superfície corporal e frequência respiratória foi proposto incluir uma medida intermediária, após a 1h de sol, antes da entrada dos animais na sombra, para verificar as condições do animal durante a exposição ao sol.

Em relação ao índice de tolerância ao calor foi proposta a seguinte fórmula $10 - [(T1 - T0) - (T2 - T0)]$, onde T1 passou a ser a medida após 1 hora de exposição ao sol (antes da ida à sombra) e T2 a antiga T1. A nova proposta foi chamada de índice de capacidade termolítica, que mostra o quanto aumentou a temperatura retal após exposição ao sol e quanto ela conseguiu diminuir após o período à sombra.

Para verificar o melhor índice para o cálculo da tolerância ao calor foi realizado novamente o teste com a nova proposta de medidas a comparação entre as formas de cálculo.

5.2.3 Aplicação do Teste de Capacidade Termolítica

A determinação da capacidade termolítica individual de vacas holandesas foi realizada pela exposição ao sol, a fim de causar um estresse calórico, pelo Teste de Capacidade Termolítica proposto por Titto (2010), adaptado no descrito por Titto et al. (1999), e realizado em dias considerados típicos de verão (temperatura de globo negro acima de 45°C, céu limpo e sem movimentação de ar), e as variáveis climáticas médias durante o teste são apresentadas na Tabela 2.

O estudo foi dividido em duas partes experimentais, sendo a fase 1 realizada com animais em dois períodos fisiológicos distintos: em período seco gestacional; e em lactação e início da gestação, e a fase 2 apenas com animais em lactação.

Durante o teste, as vacas experimentais foram mantidas das 11:00 às 13:00h em repouso à sombra sem água ou alimento e após este período de 2 horas foi realizada a primeira medida de temperatura retal (T0; tempo 0). Em seguida, as vacas seguiram para o local de exposição ao sol, onde permaneceram durante 1 hora. Após esse período foi tomada a segunda temperatura retal (T1; tempo 1) e logo depois as vacas retornam ao local de repouso à sombra sem água ou alimento, onde permanecem durante mais 1 hora. Ao término deste período foi realizada a terceira medida de temperatura retal (T2; tempo 2).

O índice de capacidade termolítica (CT) foi determinado pelo gradiente de aumento e diminuição da temperatura retal: $CT = \{10 - [(T1 - T0) - (T2 - T0)]\}$. Os valores de CT variam de 0 a 10, onde 10 é considerado o animal com maior capacidade de perda de calor.

Nos mesmos tempos da tomada da temperatura retal também foram realizadas medidas de temperatura radiante da superfície corporal dorsal, temperatura da base da cauda e frequência respiratória, e colhidas amostras de sangue. A colheita de sangue sempre foi realizada por último em cada tempo para evitar que o estresse pelo manejo interferisse nas outras medidas fisiológicas.

O sangue foi recolhido da veia mamária em tubos heparinizados mantidos em gelo. Logo após a colheita o sangue foi centrifugado à 3000 rpm, à 4 °C, durante 15 minutos para obtenção do plasma. O plasma foi acondicionado em tubos e estocado a -20 °C para posterior análise. As análises de IGF-I e cortisol plasmático foram realizadas com o uso de kits imunoenzimáticos (Diagnostic Systems Laboratory Inc) e executadas no Laboratório de Fisiologia Animal da FZEA/USP.

5.2.3.1 Fase 1: Vacas secas e em lactação

O teste de capacidade termolítica foi realizado em 12 vacas holandesas, sendo seis em período seco em final de gestação ($\pm 7,5$ meses), e seis em lactação e início de gestação ($\pm 2,3$ meses). Os animais utilizados no experimento estavam entre a primeira e terceira gestações, com produção média de 20 kg/dia. Estes animais eram mantidos em piquete de capim *coast-cross* com sombra natural, onde também recebiam a alimentação. O desafio de estresse calórico foi realizado no verão e em todos os animais simultaneamente para verificar a diferença entre os dois períodos fisiológicos.

5.2.3.2 Fase 2: Vacas em lactação

Vinte e oito animais foram distribuídos uniformemente de acordo com o início da lactação em dois grupos experimentais. Cada grupo de 14 animais foi alocado em estábulo experimental do tipo *free-stall* em uma baia coletiva com área total coberta de 200 m² (16 x 13 m construído no sentido sudeste-noroeste), com piso de concreto, cobertura de telhas de fibrocimento, pé direito de 3,2 metros e cama de areia. Cada baia coletiva possui cocho linear com 80 cm por cabeça e bebedouro

automático posicionados sob o telhado. Havia também acesso ilimitado a um piquete de capim *coast-cross* sem disponibilidade de sombra com área de 400 m².

O grupo TC (climatizado) foi mantido em uma baia onde foi implantado um sistema de climatização com ventilação forçada e nebulização de alta pressão. Ao grupo TS (sem climatização/só sombra) foi designada baia sem ventilação forçada ou nebulização, apenas com disponibilidade de sombra. As baias experimentais eram anexas e foram separadas por lona para evitar que o sistema de climatização não reduzisse o estresse térmico na baia não climatizada.

Para o sistema de climatização foram utilizados 5 ventiladores com potência de 0,5 CV, espaçados a cada 1,5 m, com capacidade de produzir vazão de ar de até 300 m³.min⁻¹. O sistema de nebulização foi montado na direção da cama, com duas linhas no sentido longitudinal do galpão, a uma altura de 3,0 m do chão, com espaçamento entre bicos de 1 m. O sistema de climatização era acionado por um sensor de temperatura colocado no centro do galpão, na altura de 2,5 m, ligado a um climatizador (THC 3400P), que era acionado quando a temperatura do ar ultrapassava 26 °C.

Após oito meses mantidos nessa instalação, os animais foram submetidos durante o verão ao teste de capacidade termolítica para verificar a influência do sistema de climatização sobre as respostas termorregulatórias.

Tabela 2. Variáveis climáticas médias seguidas de erro padrão médio durante os dois experimentos nos dias do teste de capacidade termolítica.

	Tempo 0	Tempo 1	Tempo 2	Média geral
Temperatura de Globo negro	48,5 (1,03)	50,5 (0,85)	48,9 (1,47)	48,1 (1,32)
Temperatura do ar	31,5 (0,67)	33,0 (0,80)	33,0 (0,62)	31,7 (0,92)
Umidade relativa	41,4 (3,74)	35 (2,89)	33,4 (3,76)	39,5 (3,38)

Média geral se refere ao período experimental durante horário do teste das 11h as 15h. tempo 0 = 13h; tempo1 = 14h; tempo 2 = 15h.

5.2.4 Análise estatística

Para análise da capacidade termolítica foram realizadas análises de variância para as medidas fisiológicas (temperatura retal, da base da cauda e dorso,

frequência respiratória, cortisol e IGF-I) com efeitos fixos de tempo de exposição ao sol (0: antes da exposição ao sol; 1: 1 hora após o início da exposição ao sol; 2: 1 hora após o descanso à sombra) e umidade relativa, a data de realização das colheitas como efeito aleatório e o animal como medida repetida. A temperatura do ar e temperatura de globo negro foram testadas como covariável, entretanto quando não tiveram interferência no modelo foram excluídas. Quando a interação entre alguns desses fatores resultou significativa, foi feito um desdobramento com o intuito de comparar os níveis em cada uma das ocasiões, com análise por Tukey-Kramer. O modelo foi adequado pela distribuição de resíduos. Para comparações entre vacas secas e em lactação, entre as duas fórmulas de cálculo do índice, e entre as baias climatizada ou não foi utilizado o teste-t com correção de satterthwaite para os graus de liberdade, com efeito para cada tempo de colheita.

A análise do índice de capacidade termolítica foi realizada para verificar o efeito da climatização e da fase fisiológica pelo teste-t.

O nível de significância utilizado no experimento foi de 5 % e todos os resultados experimentais são apresentados com médias e erro padrão médios. As análises estatísticas dos resultados foram realizadas utilizando o PROC MIXED do SAS e TTEST Procedure (SAS, 2000).

5.3 Resultados

5.3.1 Validação do Teste de Capacidade Termolítica

A capacidade termolítica média das vacas holandesas foi calculada para os animais em lactação e secos de duas formas. A CT1 utilizou a fórmula do teste de Titto et al (1999) e a CT2 utilizou a fórmula atualmente proposta neste trabalho. Para verificar se as duas fórmulas informavam o mesmo padrão de resultado comparativo entre os dois estágios fisiológicos, os dois cálculos foram realizados utilizando os mesmos dados. Não houve diferença entre a capacidade termolítica dos animais em lactação e no período seco ($P=0,51$ e $P=0,49$ respectivamente; Tabela 3) para as duas formas de cálculo, portanto houve uma equivalência de resultados entre as duas fórmulas, sendo possível utilizar a CT2 para verificar a mesma resposta que era obtida pelo índice de tolerância ao calor de Titto et al. (1999).

Tabela 3 - Capacidade termolítica média para animais em lactação e secos determinada por duas formas de cálculo.

Fase fisiológica	CT1			CT2			P>
	CT	DP	CV %	CT	DP	CV %	
Lactação	9,789	0,4549	4,65	9,539	0,3357	3,52	0,000417
Seca	9,743	0,2818	2,89	9,580	0,2993	3,12	0,00852

CT1 = 10-(T1-T0), proposto por Titto et al. (1999); CT2 = 10-[(T1-T0)-(T2-T0)]

Foi observado menores valores para a CT com o uso da nova fórmula (CT2), o que amplia o intervalo de resultados, sabendo-se que o máximo do índice é 10. O CT1 pode mascarar a capacidade de perda de calor pois usa uma primeira temperatura retal que já pode estar alta devido interferências do manejo e do ambiente, e não mostra efetivamente quanto se perdeu de calor. Com a inclusão de uma medida durante o estresse pontual a CT2 passa a ser mais confiável pois diminui o erro em relação a temperatura inicial e mostra realmente a capacidade de perda de calor após exposição ao sol, com uma hora de sombra para termorregulação.

5.3.2 Vacas secas em gestação x lactantes

Todas as respostas fisiológicas foram influenciadas pela exposição ao sol ($P<0,001$; Tabela 4) e também pela umidade relativa no momento da colheita da temperatura retal, da superfície corporal, da base da cauda e frequência respiratória ($P<0,01$), e das concentrações plasmáticas de cortisol e IGF-I ($P<0,05$).

O estresse calórico pode ser percebido em todos os animais pelo aumento da temperatura retal após a 1 hora de exposição ao sol. Os maiores valores encontrados para temperatura retal foram no tempo 1 para todos os animais, não havendo diferença entre os períodos fisiológicos ($P>0,68$). Apesar de ter havido diminuição da temperatura retal após uma hora de sombra (tempo 2) as vacas secas e lactantes não conseguiram retomar sua temperatura inicial (tempo 0; $P<0,01$).

A média do índice de capacidade termolítica foi de 9,58 ($\pm 0,044$) para vacas secas e 9,54 ($\pm 0,032$) para vacas em lactação mostrando a ausência de diferenças entre os grupos ($P>0,05$).

No tempo 0, maiores valores para frequência respiratória ($P=0,05$) e IGF-I ($P<0,001$) foram encontrados para vacas secas, sem diferença para temperatura de

superfície e da base da cauda ($P>0,05$), e as maiores concentrações de cortisol foram observadas para as vacas em lactação ($P=0,03$).

Para a medida após a exposição ao sol (tempo 1) a frequência respiratória e a concentração de IGF-I continuaram maiores em vacas secas ($P=0,02$ e $P<0,001$ respectivamente), e temperatura da superfície corporal ($P=0,03$) e concentração plasmática de cortisol ($P=0,26$) foi maior em vacas lactantes. Para temperatura da base da cauda os valores foram iguais para todos os animais ($P>0,05$).

Ao final do teste, no tempo 2, todos os animais já haviam voltado em situação de conforto térmico (igual T0), sem diferença entre as variáveis relacionadas a termólise, exceto pela concentração de cortisol em vacas secas não ter alcançado o mesmo nível ($P<0,01$; Figura 10). A maior concentração de IGF-I nos animais secos se manteve em todos os tempos ($P<0,001$, Figura 11). A temperatura retal apresentou diferença entre o tempo 0 e tempo 2 para os dois estágios fisiológicos ($P<0,01$).

Figura 10. Concentração plasmática média (e erro padrão; * $P<0,05$) de cortisol em vacas holandesas em lactação e secas durante o teste de capacidade termolítica, nos tempos 0, 1 e 2 (antes da exposição ao sol, 1 hora após o início da exposição ao sol, e 1 hora após o descanso à sombra).

Tabela 4. Médias seguidas de erro padrão médio das variáveis fisiológicas durante o teste de capacidade termolítica em vacas secas e em lactação.

		Seca		Lactação		
Variável	Tempo (h)	Média	EPM	Média	EPM	P
Temperatura retal (°C)						
	0	37,70 ^c	0,04	38,39 ^c	0,05	0,82
	1	39,05 ^a	0,05	39,06 ^a	0,05	0,82
	2	38,64 ^b	0,05	38,60 ^b	0,07	0,69
Temperatura de superfície (°C)						
	0	35,22 ^b	0,12	34,91 ^b	0,15	0,12
	1	37,70 ^a	0,45	39,09 ^a	0,44	0,03
	2	34,48 ^b	0,34	33,99 ^b	0,31	0,29
Temperatura base da cauda (°C)						
	0	35,73 ^b	0,15	35,67 ^b	0,09	0,72
	1	37,63 ^a	0,17	37,64 ^a	0,12	0,95
	2	35,42 ^b	0,48	35,35 ^b	0,29	0,91
Frequência respiratória (mov.min ⁻¹)						
	0	40,0 ^b	1,26	36,6 ^b	1,23	0,05
	1	65,6 ^a	2,11	58,6 ^a	2,23	0,02
	2	39,4 ^b	1,23	37,5 ^b	1,99	0,42
Cortisol (ng.ml ⁻¹)						
	0	13,12 ^b	1,24	19,99 ^b	1,96	0,03
	1	26,27 ^a	1,60	35,44 ^a	2,54	0,26
	2	21,45 ^a	1,83	25,53 ^b	2,36	0,03
IGF-I (ng.ml ⁻¹)						
	0	179,41 ^a	8,82	89,89 ^a	3,97	<0,001
	1	169,13 ^a	8,95	87,55 ^a	3,85	<0,001
	2	177,43 ^a	8,39	83,38 ^a	4,36	<0,001

Médias seguidas por letra minúscula diferente na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey-Kramer (P<0,05). Diferenças entre baias calculadas pelo teste-t.

Tempo: 0 = antes da exposição ao sol; 1 = após 1 hora da exposição ao sol; 2 = após 2 horas do início da exposição ao sol, com uma hora de descanso sob a sombra.

Figura 11. Concentração plasmática média (e erro padrão; * $P < 0,05$) de IGF-I em vacas holandesas em lactação e secas durante o teste de capacidade termolítica, nos tempos 0, 1 e 2 (antes da exposição ao sol, 1 hora após o início da exposição ao sol, e 1 hora após o descanso à sombra).

5.3.3 Vacas em Lactação: influência do sistema de climatização

Todas variáveis fisiológicas colhidas durante o teste de capacidade termolítica tiveram efeito do tempo de exposição ao sol para os dois grupos climatizado ou não ($P < 0,001$), com exceção do cortisol e IGF-I ($P < 0,05$) para os animais sem ventiladores e nebulizadores.

A média de temperatura retal logo após a exposição ao sol (tempo 1) foi maior para as vacas lactantes com disponibilidade de ambiente climatizado ($P < 0,05$), entretanto os dois grupos passaram por um estresse pontual com aumento da temperatura retal (Figura 12). Houve diferença entre esta medida e as demais realizadas antes da exposição ao sol e depois de uma hora de sombra ($P < 0,01$; Tabela 5).

Para os dois grupos experimentais houve efeito da umidade relativa ($P < 0,01$) sobre as respostas ao estresse calórico de temperatura retal, temperatura de superfície corporal, temperatura da base da cauda. Para frequência respiratória houve um menor efeito, porém significativo ($P = 0,04$).

A capacidade termolítica média das vacas holandesas foi calculada para os animais em lactação divididos em sistema climatizado ou não. O grupo climatizado

alcançou CT médio de 9,61 ($\pm 0,059$), enquanto os animais do grupo sem climatização tiveram 9,48 ($\pm 0,056$). Houve diferença estatística entre os grupos, ocasionada pela diferença entre a medida da temperatura retal no tempo 1, considerado o pico de estresse, maior valor alcançado pelos animais no grupo climatizado ($P < 0,05$).

Figura 12 - Temperatura retal média (e erro padrão; * $P < 0,05$) em vacas lactantes em estabulação climatizada ou não climatizada durante o teste de capacidade termolítica, nos tempos 0, 1 e 2 (antes da exposição ao sol, 1 hora após o início da exposição ao sol, e 1 hora após o descanso à sombra).

Tabela 5 - Médias e erro padrão médio das variáveis fisiológicas de vacas holandesas em lactação mantidas em diferentes instalações e submetidas a desafio por exposição ao sol.

		Baia climatizada		Baia não climatizada		
Variável	Tempo (h)	Média	EPM	Média	EPM	P baias
Temperatura retal (°C)						
	0	38,44 ^c	0,06	38,24 ^c	0,042	0,42
	1	39,18 ^a	0,08	38,85 ^a	0,041	0,05
	2	38,79 ^b	0,07	38,33 ^b	0,045	0,25
Temperatura de superfície (°C)						
	0	35.03 ^b	0.63	34,83 ^b	0,380	0,42
	1	39.78 ^a	0.63	38,67 ^a	0,379	0,32
	2	34.17 ^b	0.63	33,77 ^b	0,380	0,58
Temperatura base da cauda (°C)						
	0	35,83 ^{ab}	0,38	35,89 ^b	0,225	0,77
	1	36,53 ^a	0,45	37,31 ^a	0,266	0,96
	2	34,84 ^b	0,39	35,29 ^b	0,220	0,78
Frequência respiratória (mov.min ⁻¹)						
	0	37,1 ^b	2,0	36,2 ^b	2,81	0,77
	1	59,2 ^a	5,8	58,2 ^a	2,81	0,84
	2	36,1 ^b	1,9	38,1 ^b	2,81	0,58
Cortisol (ng.ml ⁻¹)						
	0	16,07 ^b	1,71	22,69 ^b	2,92	0,03
	1	32,03 ^a	3,23	37,80 ^a	3,62	0,12
	2	21,56 ^b	2,59	28,28 ^{ab}	3,45	0,03
IGF-I (ng.ml ⁻¹)						
	0	86,04 ^b	11,99	93,52 ^a	7,98	0,42
	1	100,32 ^a	11,96	81,49 ^b	7,95	<0,001
	2	85,22 ^b	11,99	84,05 ^{ab}	7,98	0,74

Médias seguidas por letra minúscula diferente na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey-Kramer (P<0,05). Diferenças entre baias calculadas pelo teste-t.

Tempo: 0 = antes da exposição ao sol; 1 = após 1 hora da exposição ao sol; 2 = após 2 horas do início da exposição ao sol, com uma hora de descanso sob a sombra.

Temperatura de superfície corporal e da base da cauda tiveram comportamentos semelhantes durante o teste de capacidade termolítica. Não houve diferença dentro do tempos de colheita para os dois grupos experimentais ($P>0,05$). Para as duas variáveis houve um aumento após a uma hora de sol, retornando ao valor inicial após uma hora de sombra ($P<0,01$).

As respostas de aumento de frequência respiratória foram evidentes após 1 hora de exposição ao sol. Para todos os animais, independente do tipo de instalação a que foram submetidos, a T1 foi maior que a T0 e T2 ($P<0,01$), voltando ao normal após descanso por uma hora na sombra.

A resposta do cortisol ao estresse térmico teve comportamento semelhante para os dois grupos, com aumento no T1 em relação ao T0 ($P<0,05$), entretanto a queda após a volta à sombra (T2) nas vacas do grupo sem climatização não foi significativa ($P<0,05$; Figura 13). As concentrações no grupo sem climatização foram maiores em todos os tempos em comparação com as vacas mantidas em ambiente climatizado, com diferença estatística nos tempos 0 e 2 ($P=0,03$). Esse maior nível de cortisol apresentado pelos animais da baia não climatizada pode caracterizar um possível estresse antes do início do teste.

Para as concentrações plasmáticas de IGF-I também se observou comportamento diferente nos dois grupos experimentais (Figura 14). Houve aumento das concentrações durante o estresse pontual (T1) nos animais com disponibilidade de sistema climatizado e queda no outro grupo ($P<0,01$). Entretanto os valores iniciais e finais (T0 e T2) foram considerados iguais estatisticamente para ambos os grupos e dentro de grupos ($P>0,01$).

Figura 13 - Concentração plasmática média (e erro padrão; * $P < 0,05$) de cortisol em vacas holandesas em lactação em estabulação climatizada ou não climatizada, durante o teste de capacidade termolítica, nos tempos 0, 1 e 2 (antes da exposição ao sol, 1 hora após o início da exposição ao sol, e 1 hora após o descanso à sombra).

Figura 14 - Concentração plasmática média (e erro padrão; * $P < 0,05$) de IGF-I em vacas holandesas em lactação em estabulação climatizada ou não climatizada, durante o teste de capacidade termolítica, nos tempos 0, 1 e 2 (antes da exposição ao sol, 1 hora após o início da exposição ao sol, e 1 hora após o descanso à sombra).

5.4 Discussão

O termo “Capacidade termolítica” foi definido como a capacidade do animal em retornar a sua temperatura retal considerada de conforto (em repouso e sem estresse calórico) após a exposição ao sol, assim, o teste foi nomeado Teste de Capacidade Termolítica, conforme metodologia descrita no item 5.2.3.

Com a avaliação da capacidade termolítica, as diferentes respostas ao estresse calórico encontradas podem ser atribuídas a variação dos níveis da adaptabilidade ao ambiente quente. Animais lactantes são normalmente mais sensíveis do que animais em período seco devido ao maior aporte metabólico ligado a produção de leite, que pode ser evidenciado pelos maiores níveis de cortisol plasmático.

Entretanto a diminuição do incremento calórico pela menor alimentação no período seco pré-parto pode ter compensado o maior aporte fisiológico devido à gestação para não haver diferença entre os dois períodos fisiológicos estudados durante o teste.

A temperatura retal é o principal parâmetro fisiológico para medir o nível de tolerância ao calor de um animal (JOHNSON, 1980). As perdas de calor ocorrem por condução, convecção, radiação e evaporação. Os três primeiros caminhos são dependentes do gradiente térmico e tornam-se efetivos para manter o equilíbrio térmico do animal em ambiente com temperatura do ar abaixo do limite crítico superior da zona de conforto térmico. Em ambientes com temperatura do ar acima desse limite a via evaporativa torna-se a principal maneira de troca de calor (respiração e sudorese). Se esses métodos não forem suficientes para dissipar o calor absorvido, ocorre aumento da temperatura retal acima do limite considerado normal de 39,5 °C (DU PREEZ, 2000).

Para as variáveis analisadas no presente estudo, às ligadas ao sistema termorregulador como temperatura retal, de superfície corporal e da base da cauda e frequência respiratória, aumentaram durante o estresse pela exposição ao sol, retornando aos valores iniciais após repouso por uma hora na sombra. Essa característica mostra a capacidade individual do animal em manter a temperatura corporal lançando mão de ferramentas de perda de calor, como o aumento da frequência respiratória (BROWN-BRANDL et al., 2005; SPIERS et al., 2004).

Segundo o ritmo circadiano exibido por Verwoerd et al. (2006), o aumento da temperatura corporal de vacas leiteiras ocorre de acordo com o aumento da temperatura do ar e ITU, entretanto, quando ocorrem picos de ITU acima de 72 há evidências de que a resposta no aumento da temperatura retal só ocorra com um atraso de 120 minutos.

Temperatura da superfície corporal tem alta correlação com frequência respiratória e é uma boa medida para avaliar o microclima a qual o animal está envolvido (COLLIER et al., 2006). Se a temperatura superficial está abaixo de 35 °C, o gradiente entre a temperatura interna e da pele é grande o suficiente para os animais usarem com eficácia as 4 rotas de troca de calor (WEST, 2003). Durante o estresse provocado pela exposição ao sol, a temperatura superficial das vacas passou dos 35 °C, diminuindo a capacidade de perda de calor pelo animal. Entretanto todos os animais foram capazes de diminuir sua temperatura retal após o descanso na sombra por uma hora, porém sem alcançar a temperatura considerada basal (tempo 0). Com a condição de temperatura radiante acima da temperatura superficial ocorreu um aquecimento do animal, promovendo aumento da temperatura retal. Com a volta para a sombra, a temperatura do ar se tornou mais baixa do que a temperatura superficial, facilitando as trocas térmicas por radiação e convecção (SCHÜTZ et al., 2009).

Os maiores níveis de cortisol encontrados nos animais sem disponibilidade de ambiente climatizado podem ser devido a falta de conforto térmico encontrada na instalação. Mesmo resultado foi encontrado por Chaiyabutr et al. (2008), com valores de cortisol entre 8,8 e 25,3 ng.ml⁻¹, 3,16 vezes maior do que nos animais em conforto.

Uma resposta conhecida para o aumento do IGF-I é a ocorrência de dias longos. Dahl et al. (1997) encontrou esse padrão para vacas em lactação e novilhas durante o verão, porém o mesmo não aconteceu com as vacas secas. Nesse caso os autores afirmaram ser possível que o IGF-I circulante esteja mascarado pela menor ingestão de matéria seca durante essa fase do ciclo de lactação. Entretanto, os valores de IGF-I no presente estudo foram maiores em vacas secas do que nas vacas em produção. Como as vacas tinham sido secas na semana anterior e estavam há cerca de 7 semanas para o parto, a concentração de IGF-I ainda não tinha iniciado o declínio, mesmo caso encontrado por Hadsell et al. (1993) e Pauletti et al. (2005).

Para os dois grupos estudados não houve diferença para o IGF-I, em acordo com Chaiyabutr et al. (2008), que encontrou valores entre 67,2 a 99,80 ng.ml⁻¹. McGuire et al., 1991 também não encontraram efeito do estresse térmico sobre as concentrações de IGF-I.

Os valores do índice de capacidade termolítica encontrados para os animais estudados mostra que não há eficiência máxima em se eliminar o calor absorvido pela radiação solar. Identificar animais com maior tolerância ao calor pode ser uma ferramenta para selecionar animais para melhoramento genético. Essa seleção é possível, e pode ser particularmente efetiva em ambientes com médias elevadas de ITU (RAVAGNOLO; MISZTAL, 2000)

5.5 Conclusão

O teste de capacidade termolítica foi validado e pode ser utilizado para vacas leiteiras em lactação ou secas.

Para as condições climáticas do presente trabalho pode-se afirmar que tanto vacas secas como em lactação conseguiram manter a homeotermia pela perda de calor pelo aumento da frequência respiratória, entretanto a disponibilidade de sistema de climatização durante a lactação proporcionou um índice de capacidade termolítica maior nas vacas Holandesas.

6. Experimento 2: Influência da época do ano na variação dos níveis de cortisol e IGF-I em vacas lactantes mantidas em conforto térmico.

RESUMO

O ambiente climatizado pode aumentar a eficiência produtiva de vacas em lactação devido à maior capacidade em permanecer em conforto térmico. O objetivo deste estudo foi avaliar o impacto da temperatura ambiente sobre a termorregulação e produção de hormônios cortisol e IGF-I e verificar a eficiência do conforto térmico sobre as respostas fisiológicas nos diferentes padrões climáticos do ano. Foram utilizadas 24 vacas holandesas distribuídas a partir do parto em dois grupos com e sem disponibilidade de sistema com ventiladores e nebulização dentro de galpão do tipo *free-stall*. Foram avaliados os parâmetros: temperatura retal (TR), temperatura de superfície corporal (TS), temperatura da base da cauda (TC), frequência respiratória (FR), cortisol e IGF-I durante as ordenhas da manhã (7:00 h) e da tarde (14:30 h), em cinco diferentes padrões climáticos ao longo do ano (outono, inverno, primavera, verão seco e verão chuvoso). TR, TS, TC e FR foram menores pela manhã ($P<0,01$). A temperatura retal não teve influência da climatização, com os dois grupos tendo valores abaixo de 38,56 ao longo do ano ($P=0,11$). As concentrações plasmáticas de cortisol aumentaram entre outono e inverno, começando o decréscimo até o verão seco e um novo aumento durante o verão chuvoso ($P<0,05$). Notou-se um aumento gradual do IGF-I do início do experimento durante o outono até o verão seco, e a diminuição no verão chuvoso ($P<0,05$). Cortisol e IGF-I podem ter sido influenciados pelas horas de luz. Temperatura retal mostrou uma correlação moderada e positiva ($P<0,01$) com a temperatura superficial (0,46) e frequência respiratória (0,35). A temperatura do ar e ITU apresentaram correlações positivas de moderada a alta com as temperaturas retal, da base da cauda e superficial, e também com a frequência respiratória ($P<0,01$). A temperatura ambiente influencia de forma positiva nas variáveis, independente da climatização, porém animais climatizados mantiveram a produção de leite mesmo durante o verão. As concentrações plasmáticas de cortisol e IGF-I podem ter sido influenciadas pelas estações do ano e pela produção de leite.

Palavras-chave: estresse térmico; *free-stall*; sistema de climatização

Experiment 2: Influence of season on plasmatic cortisol and IGF-I in dairy cows under thermal comfort.

ABSTRACT

Access to evaporative cooling system can increase production in dairy cows due to improve thermal comfort. The aim of this study was to evaluate the impact of ambient temperature on thermoregulation, cortisol and IGF-I, and determine the efficiency of evaporative cooling system on the physiological responses in different weather patterns. 24 Holstein cows were housed in two groups with and without access to cooling system with fans and mist in the free-stall. The parameters analyzed were: rectal temperature (TR), body surface (TS), internal base of tail (TC), respiratory rate (FR), cortisol and IGF-I during the morning milking (7:00) and afternoon (14:30 h) in five different weather patterns throughout the year (fall, winter, spring, dry summer and rainy summer). TR, TS, TC and FR were lower in the morning ($P < 0.01$). Cooling system did not affect rectal temperature, with both groups had values below 38.56 over the year ($P = 0.11$). We observed an upward trend ($P < 0.05$) in plasma cortisol concentrations between autumn and winter, starting the decline until the dry summer and a further increase during the rainy summer. A gradual increase of IGF-I happened between autumn until the dry summer, and decreased during the rainy summer ($P < 0.05$). Cortisol and IGF-I may have been influenced by light hours. TR showed a moderate and positive correlation ($P < 0.001$) with the TS (0.46) and FR (0.35). The air temperature and THI showed positive moderate to high correlations with TR, TC, TS and FR ($P < 0.001$). The ambient temperature influences positively on the physiological variables, independent of the cooling system, but cooled animals kept milk production even during the summer. The plasma concentrations of cortisol and IGF-I may have been influenced by the seasons and the milk production.

Key-words: evaporative cooling system; free-stall; heat stress

6.1 Introdução

Há muito se sabe que a estação do ano tem grande impacto sobre as medidas de desempenho do animal leiteiro incluindo o crescimento, reprodução e lactação. Além disso, com o aumento da produção média por vaca, a produção de calor metabólico por animal aumentou substancialmente tornando os animais mais suscetíveis ao estresse térmico (KADZERE et al., 2002). Este, por sua vez, alterou os requisitos de instalações e resfriamento para os animais.

Vacas em estresse calórico agudo apresentam maiores concentrações de cortisol (CHRISTISON; JOHNSON, 1975; WISE et al., 1988), porém há diminuição desses níveis durante o estresse crônico (RONCHI et al., 2001). Alguns autores verificaram diminuição do IGF-I em situação de estresse calórico (HIRAYAMA et al., 2004) enquanto outros não verificaram diferenças entre animais em estresse e em conforto térmico (CHAIYABUTR et al. 2008; McGUIRE et al., 1991). Quando expostos a ambiente quente, as vacas também aumentam a frequência respiratória e temperatura retal (SPIERS et al., 2004), numa tentativa de manter a homeotermia.

A provisão de sombra para vacas de leite diminui o acúmulo de calor pela radiação solar direta, entretanto não tem efeito sobre a temperatura do ar ou umidade relativa, sendo necessário o uso de sistema de climatização em galpões onde os animais ficam instalados durante todo o dia (FRAZZI et al., 2000). O sistema de resfriamento tem como objetivo principal manter a temperatura corporal dos animais em níveis normais e sua eficiência já é bem estabelecida no aumento da produção de leite (RAVAGNOLO; MISZTAL, 2002; TAPKI; SAHIN, 2006; WEST, 2003), contudo faltam informação de seu uso ao longo do ano, não só nos meses de verão.

O trabalho teve como objetivos avaliar o impacto da temperatura ambiente sobre a termorregulação e produção de hormônios cortisol e IGF-I e verificar a eficiência do conforto térmico proporcionado por um sistema de climatização com ventiladores e nebulização em galpão tipo *free-stall* pelas respostas fisiológicas nos diferentes padrões climáticos do ano.

6.2 Material e Métodos

6.2.1 Animais, instalações e alimentação

O experimento foi realizado no Setor de Bovinocultura Leiteira da Coordenadoria do Campus de Pirassununga, SP, a uma altitude de 634m, na latitude sul de 21°80'00" e longitude oeste de 47°25'42", que apresenta clima do tipo Cwa, segundo classificação de Köppen, com temperatura média anual de 22,0 °C e pluviosidade média anual próxima a 1363 mm.

Vinte e quatro vacas da raça Holandesa, entre a primeira e terceira lactações, com produção média de 20 kg/dia, foram divididas em dois grupos experimentais e alocadas em baias distintas de um galpão do tipo *free-stall* durante todas as estações do ano, após o início da lactação. O galpão possui orientação noroeste-sudeste, com piso de concreto, cobertura de telhas de fibrocimento, pé direito de 3,5 metros e cama de areia. Cada baia coletiva possui cocho linear com 50 cm por cabeça e bebedouro automático posicionados sob o telhado. As vacas têm acesso ilimitado a um piquete de capim *coast-cross* sem disponibilidade de sombra.

Em uma destas baias foi implantado um sistema de climatização com ventilação forçada (até 300 m³.min⁻¹) e nebulização de alta pressão (Grupo TC: com climatização). A outra baia não dispunha de ventilação forçada nem nebulização, a qual foi designada o Grupo TS (sem climatização). As vacas foram distribuídas ao acaso, à medida que ocorria a parição, entre os dois tratamentos e colocadas nas baias experimentais separadas por lona, para evitar que o sistema de climatização não reduzisse o estresse térmico na baia não climatizada. O sistema de climatização era acionado por um sensor de temperatura colocado no centro do galpão, na altura de 2,5 m, ligado a um climatizador (THC 3400P), que era acionado quando a temperatura do ar ultrapassava 26 °C.

Os animais receberam uma mistura de concentrado e silagem de milho, balanceada de acordo com o NRC (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2001), com 76% de NDT e 18% de PB na matéria seca. A alimentação era fornecida após as ordenhas, na proporção de 1kg de concentrado / 3 litros de leite produzido e $\pm$ 30 kg de silagem de milho por animal.

As variáveis climáticas foram registradas pela estação meteorológica eletrônica do Laboratório de Construções e Ambiente, da FZEA/USP, que forneceu dados como temperatura do ar, umidade relativa e radiação solar (Tabela 6). O

registro das variáveis climáticas das baías experimentais foi realizado por meio de sensores de temperatura de globo negro ao sol e à sombra e higrômetro posicionados no centro de cada baía, logo acima da cama, para verificar diferença entre os ambientes. Os parâmetros ambientais foram avaliados pelo cálculo do índice de temperatura e umidade (ITU).

Tabela 6. Dados climáticos médios para estações do ano registrados pela estação meteorológica eletrônica e por termômetro de globo negro.

	Outono	Inverno	Primavera	Verão seco	Verão chuvoso
Temperatura ar média	19,23	15,48	21,42	22,95	23,16
Temperatura ar (min-max)	8,9-29,6	3,4-27,7	11,9-33,3	14,4-34,8	15,4-35,3
ITU média (min-max)	69 (42-92)	59 (21-87)	75 (50-99)	78 (57-99)	78 (57-99)
Umidade Relativa (min-max)	42-100	30-100	26-99	24-99	35-98
Radiação solar máxima	921	867	1215	1361	1554
Radiação solar média*	376,03	299,73	403,09	510,52	511,85
Pluviosidade acumulada	82,0	46,4	156,6	32,4	272,8
TGN baía climatizada	24,0-32,0	20,0-28,5	24,0-29,0	25,3-28,3	25,3-32,3
TGN baía não climatizada	25,0-32,0	20,0-28,5	24,0-33,0	25,3-29,3	25,7-33,3

* Radiação solar média durante horas de luz (W/m²).

Temperatura do ar (°C); Umidade relativa (%); TGN: temperatura de globo negro (°C)

6.2.2 Variáveis fisiológicas mensuradas

As medidas de temperaturas radiantes da superfície corporal dorsal e da base da cauda foram mensuradas por termômetro digital infravermelho, frequência respiratória pela contagem de movimentos do tórax e temperatura retal com termômetro digital foram coletadas durante a lactação, nos horários das ordenhas da manhã e da tarde (7:00 h e 14:30 h), em cinco diferentes padrões climáticos (Outono: abril, maio, junho, Inverno: junho, julho, agosto, Primavera: setembro, outubro, novembro, Verão seco: dezembro, até 15 de janeiro, Verão chuvoso: 16 de janeiro a 28 de fevereiro), durante 3 dias consecutivos em cada estação. As colheitas de sangue foram realizadas no terceiro dia, após o término da ordenha. O sangue foi recolhido da veia mamária em tubos heparinizados mantidos em gelo (Figura 15). Logo após a colheita o sangue foi centrifugado à 3000 rpm, à 4 °C,

durante 15 minutos para obtenção do plasma. O plasma foi acondicionado em tubos e estocado a -20°C para posterior análise. As análises de IGF-I e CORT plasmático foram realizadas com o uso de kits imunoenzimáticos (Diagnostic Systems Laboratory Inc) e executadas no Laboratório de Fisiologia Animal da FZEA/USP. A produção de leite foi mensurada durante toda a lactação.

As colheitas de dados foram feitas quando os dias experimentais foram considerados típicos para estação do ano correspondente. Esta precaução evitou, por exemplo, que uma colheita de sangue fosse feita no dia mais frio dos últimos verões.

Figura 15 - Amostra de sangue sendo colhida da veia mamária.

6.2.3 Análise estatística

As variáveis fisiológicas foram analisadas como medidas repetidas no tempo (CROWDER; HAND, 1990), utilizando animal como efeito aleatório. Foi realizada análise de variância (Mixed-SAS) para os efeitos das estações do ano e teste de comparação múltipla de médias entre as diferentes estações para os animais de cada baía experimental com e sem disponibilidade de sistema de climatização pelo Teste de Tukey-Kramer. A comparação entre as baias experimentais foi realizada pelo Teste-t com correção de satterthwaite para os graus de liberdade. Foram estimados coeficientes de correlação simples entre as variáveis fisiológicas, hormonais e ambientais e depois os pares significativos foram submetidos à análise de regressão. Todos os testes foram realizados a 5 % de probabilidade (SAS, 2000) e todos os valores são apresentados pela média $\pm$ erro padrão da média.

6.3 Resultados

Os valores médios obtidos para temperatura retal, temperatura da base interna da cauda, temperatura superficial dorsal, frequência respiratória, concentrações plasmáticas de IGF-I e cortisol nos dois grupos de vacas em lactação mantidas nas baias climatizada e não climatizada são apresentadas a seguir para o horário da manhã (7:00 h) e da tarde (Tabela 7 e 8 respectivamente). Os valores são apresentados por estação do ano.

Tabela 7 - Médias seguidas de erro padrão médio das variáveis fisiológicas para animais durante a manhã (7:00 h) mantidos ou não em galpão climatizado e valor de significância na comparação entre estações do ano.

	Outono	Inverno	Primavera	Verão seco	Verão chuvoso	P
Temperatura retal (°C)						
TC	37,75 (0,09)	37,92(0,06)	37,93(0,06)	37,92(0,07)	37,87(0,13)	0,48
TS	37,73(0,09)	37,91(0,07)	37,95(0,06)	37,92(0,08)	37,83(0,11)	0,48
Temperatura superficial (°C)						
TC	30,47(0,26) ^{Bb}	28,76(0,26) ^c	30,56(0,31) ^b	31,59(0,20) ^a	31,91(0,12) ^a	<0,01
TS	31,46(0,22) ^{Aab}	28,91(0,33) ^c	30,78(0,16) ^b	31,86(0,19) ^a	32,18(0,09) ^a	<0,01
Temperatura da base da cauda (°C)						
TC	32,72(0,64) ^b	32,68(0,41) ^b	34,18(0,47) ^a	32,45(0,32) ^b	35,16(0,34) ^a	<0,01
TS	33,22(0,39) ^{bc}	32,95(0,34) ^c	34,48(0,31) ^{ab}	33,05(0,24) ^c	34,67(0,31) ^a	<0,01
Frequência respiratória (mov.min⁻¹)						
TC	41,4(2,28) ^a	34,7(1,1) ^b	30,8(0,9) ^c	32,4(1,3) ^{bc}	35,1(1,6) ^b	<0,01
TS	35,8(0,9) ^a	33,0(0,8) ^{ab}	33,1(1,0) ^{ab}	29,8(1,2) ^b	37,0(1,74) ^a	<0,01
Cortisol (ng.ml⁻¹)						
TC	23,1(2,4) ^b	38,4(3,5) ^a	17,5(2,1) ^b	12,1(1,2) ^b	13,9(1,7) ^b	<0,01
TS	19,9(1,2) ^b	41,8(3,1) ^a	19,6(2,4) ^b	11,1(2,3) ^b	14,9(2,0) ^b	<0,01
IGF-I (ng.ml⁻¹)						
TC	94,0(16,0) ^c	103,0(12,4) ^{bc}	131,7(14,1) ^{Aa}	119,6(13,0) ^{ab}	98,2(11,7) ^{bc}	0,02
TS	71,1(8,1) ^c	92,0(11,5) ^b	106,2(11,9) ^{Ba}	119,5(13,0) ^a	98,2(11,7) ^{ab}	0,03

TC: disponibilidade de climatização; TS: sem disponibilidade de climatização. Letras maiúsculas iguais na coluna para cada variável não diferem entre si pelo teste-t ($P>0,05$). Letras minúsculas iguais na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey-Kramer ($P>0,05$).

Tabela 8 - Médias seguidas de erro padrão médio das variáveis fisiológicas para animais durante a tarde (14:30 h) mantidos ou não em galpão climatizado e valor de significância na comparação entre estações do ano.

	Outono	Inverno	Primavera	Verão seco	Verão chuvoso	P
Temperatura retal (°C)						
TC	38,55(0,06)	38,30(0,06)	38,43(0,06)	38,32(0,08)	38,44(0,10)	0,11
TS	38,40(0,08)	38,39(0,05)	38,39(0,05)	38,56(0,06)	38,32(0,11)	0,11
Temperatura superficial (°C)						
TC	32,89(0,19) ^d	32,21(0,25) ^d	34,26(0,16) ^{Aa}	33,32(0,14) ^{Ab}	33,95(0,22) ^a	<0,01
TS	33,55(0,22) ^b	32,11(0,19) ^d	33,36(0,17) ^{Bb}	32,80(0,15) ^{Bc}	33,85(0,13) ^a	<0,01
Temperatura da base da cauda (°C)						
TC	34,70(0,42) ^c	34,18(0,26) ^c	36,25(0,25) ^a	34,83(0,27) ^{bc}	35,94(0,30) ^a	<0,01
TS	34,48(0,41) ^c	33,88(0,25) ^c	35,89(0,17) ^{ab}	34,82(0,22) ^{bc}	36,23(0,20) ^a	<0,01
Frequência respiratória (mov.min⁻¹)						
TC	54,0(2,0) ^a	43,2(2,0) ^b	42,4(1,6) ^b	43,0(1,9) ^b	41,8(0,9) ^{Bb}	<0,01
TS	55,0(1,5) ^a	45,2(2,3) ^b	44,5(1,8) ^b	43,8(2,4) ^b	47,1(1,6) ^{Ab}	<0,01
Cortisol (ng.ml⁻¹)						
TC	22,3(3,3) ^b	34,3(3,5) ^a	11,6(1,9) ^c	12,6(1,1) ^{bc}	14,1(1,6) ^{bc}	<0,01
TS	18,3(2,9) ^b	42,0(2,1) ^a	16,4(3,4) ^b	10,5(1,3) ^b	20,2(1,5) ^b	<0,01
IGF-I (ng.ml⁻¹)						
TC	81,4(11,8) ^c	99,0(9,3) ^{bc}	122,4(15,6) ^{ab}	134,1(15,2) ^a	116,6(27,2) ^{ab}	<0,01
TS	75,4(8,5) ^c	85,5(8,9) ^{bc}	100,1(7,9) ^{ab}	123,9(14,5) ^a	96,1(11,9) ^{bc}	0,02

TC: disponibilidade de climatização; TS: sem disponibilidade de climatização. Letras maiúsculas iguais na coluna para cada variável não diferem entre si pelo teste-t ($P>0,05$). Letras minúsculas iguais na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey-Kramer ($P>0,05$).

A variável temperatura retal foi menor nas colheitas da manhã quando comparada as da tarde ($P<0,01$), dentro de cada estação, para os dois grupos experimentais. Mesmo padrão de comportamento das variáveis temperatura da base da cauda, temperatura superficial e frequência respiratória foi encontrado entre manhã e tarde ($P<0,01$). Cortisol não apresentou diferenças entre os níveis plasmáticos da manhã e da tarde ($P>0,05$) em nenhuma estação do ano para os animais das duas baias. Para as concentrações plasmáticas de IGF-I também não houve diferença entre os períodos do dia para todas as estações do ano, independente do tipo de instalação onde os animais estavam alojados ($P>0,05$).

As medidas de temperatura retal não apresentaram diferenças entre o sistema climatizado e o não climatizado para o período da manhã, dentro de estação do ano e entre estações ($P=0,48$) e também para período da tarde ($P=0,11$). Os valores encontrados para as medidas à tarde estão dentro da faixa considerada normal para bovinos, não caracterizando estresse calórico em nenhuma estação do ano.

A temperatura de superfície corporal apresentou diferença entre os grupos climatizado ou não climatizado no outono durante o período da manhã ($P<0,01$) e na primavera e verão seco no período da tarde ($P<0,01$). Nas outras estações do ano, independente do período não houve efeito do sistema de climatização sobre esta variável ($P>0,05$).

Os maiores valores de temperatura da base da cauda foram encontrados durante a primavera e o verão chuvoso, independente do período do dia ($P<0,01$), e não foram encontradas diferenças entre os grupos com e sem ambiente climatizado para essa variável ($P>0,01$).

Pela manhã, a maior frequência respiratória durante o ano foi encontrada no grupo climatizado durante o outono, diferindo ($P<0,01$) quando comparado às outras estações. No grupo não climatizado a menor frequência foi encontrada durante o verão seco, diferente das demais estações ($P<0,01$), provavelmente devido há um menor efeito do estresse térmico ocasionada pela menor umidade relativa do ar. No período da tarde, a única diferença encontrada entre os animais das baias experimentais foi durante o verão chuvoso, com média mais alta para as vacas não climatizadas ($P<0,01$). Novamente as maiores médias foram durante o outono para os dois grupos ($P<0,01$).

As menores médias de cortisol plasmático foram encontradas entre a primavera e o verão e as maiores médias ($P<0,01$) ocorreram durante o inverno. Observou-se um aumento ($P<0,01$) nas concentrações plasmáticas de cortisol entre outono e inverno, começando o decréscimo até o verão seco ($P<0,01$) e um novo aumento durante o verão chuvoso ($P>0,05$; Figura 16). O ambiente climatizado não influenciou as respostas de cortisol, independente da estação do ano. Os resultados encontrados para concentrações plasmáticas de cortisol nesse estudo estão acima dos previamente reportados para um animal em conforto térmico.

Na comparação de médias das concentrações plasmáticas de IGF-I entre os grupos climatizado ou não climatizado, apenas houve diferença no período da

manhã durante a primavera ($P<0,01$). Notou-se um aumento gradual do IGF-I do início do experimento durante o outono até o verão seco, e a diminuição no verão chuvoso (Figura 17), que pode ter sido influenciado pelas horas de luz do dia.

Figura 16 - Média e erro padrão da concentração plasmática de cortisol em vacas holandesas mantidas em estabulação climatizada ou não (controle) nos horários das 7:00 h (manhã) e 14:30 h (tarde) ao longo do ano.

Figura 17 - Média e erro padrão médio da concentração plasmática de IGF-I em vacas holandesas mantidas em estabulação climatizada ou não nos horários das 7:00 h (manhã) e 14:30 h (tarde) ao longo do ano.

A produção de leite teve influência do sistema de climatização, com decréscimo nos meses mais quentes do ano, e menores valores encontrados para os animais na baia sem a sua disponibilidade ($P < 0,01$; Figura 18).

Figura 18 - Médias estimadas e erros-padrão de produção de leite em animais mantidos ou não em climatização, durante o ano (* $P < 0,05$).

Foram feitas correlações de Pearson entre todas as variáveis fisiológicas estudadas e parâmetros ambientais (temperatura do ar, umidade relativa e ITU). Os resultados estão apresentados na Tabela 9. Temperatura retal mostrou uma correlação moderada e positiva ($P < 0,01$) com a temperatura superficial (0,46) e frequência respiratória (0,35), moderada e negativa com a umidade relativa (-0,39) e uma correlação fraca e positiva com a temperatura da base da cauda (0,27). Não houve correlação entre a temperatura retal e os hormônios cortisol e IGF-I ($P > 0,05$).

A temperatura do ar e ITU apresentaram correlações positivas de moderada a altas com as temperaturas retal, da base da cauda e superficial, e também com a frequência respiratória ($P < 0,01$; Tabela 9). Apenas correlações fracas ou não significativas foram verificadas para os hormônios IGF-I e cortisol, entre eles e com as variáveis fisiológicas e ambientais.

As análises de regressão foram realizadas com a relação entre as variáveis fisiológicas e o ITU, mostrando quanto o aumento de 1 unidade no ITU altera as respostas de temperatura retal, da base da cauda, superficial e frequência respiratória (Tabela 10). Como a temperatura retal é a principal medida para caracterizar o estresse calórico, foi apresentado na Figura 19 o aumento dessa variável à medida que há o aumento do ITU do ambiente.

Tabela 9 - Coeficientes de correlação de Pearson entre variáveis fisiológicas, ambientais e hormonais.

	Tretal	Tcauda	FR	Tsup	UR	Tar	ITU	IGF-I	Cortisol
Tretal	-	0,27	0,35	0,46	-0,39	0,50	0,49	-0,02 ^{ns}	-0,08 ^{ns}
Tcauda	0,27	-	0,18	0,32	-0,45	0,43	0,38	0,12	-0,05 ^{ns}
FR	0,35	0,18	-	0,39	-0,29	0,43	0,43	-0,21	0,04 ^{ns}
Tsup	0,46	0,32	0,39	-	-0,60	0,72	0,69	0,05 ^{ns}	-0,19
UR	-0,39	-0,45	-0,29	-0,60	-	-0,81	-0,66	-0,08 ^{ns}	0,15
Tar	0,50	0,43	0,43	0,72	-0,81	-	0,97	0,08 ^{ns}	-0,15
ITU	0,49	0,38	0,43	0,69	-0,66	0,97	-	0,08 ^{ns}	-0,14
IGF-I	-0,02 ^{ns}	0,12	-0,21	0,05 ^{ns}	-0,08 ^{ns}	0,08 ^{ns}	0,08 ^{ns}	-	-0,11
Cortisol	-0,08 ^{ns}	-0,05 ^{ns}	0,04 ^{ns}	-0,19	0,15	-0,15	-0,14	-0,11	-

ns = não significativo (P>0,05)

Tabela 10 - Relações entre as variáveis fisiológicas para animais mantidos em sistema climatizado ou não em relação ao ITU.

	R ²	Intercepto	Erro padrão	ITU
Climatizado				
Temperatura retal	0,25	35,3133	0,3061	0,04049
Temperatura superficial	0,51	14,18857	1,06892	0,25352
Temperatura cauda	0,19	29,01921	0,69756	0,22889
Frequência respiratória	0,14	-10,4537	7,70267	0,72606
Não Climatizado				
Temperatura retal	0,23	35,3654	0,29466	0,03984
Temperatura superficial	0,45	17,16469	0,95675	0,21283
Temperatura cauda	0,18	30,11013	0,55047	0,18436
Frequência respiratória	0,23	-24,16836	6,95055	0,92547

Y = a + bx + erro, onde a = intercepto, b = ITU

Figura 19 – Valores observados (pontos) e preditos (linha) da temperatura retal de acordo com os valores de ITU, independente da disponibilidade de sistema de climatização.

Foi proposto um modelo de regressão para o IGF-I com relação aos dias de lactação da vaca, por não ter existido correlação deste hormônio com o ITU. Houve diferença entre os modelos de regressão para os animais com e sem a ambiente climatizado (Tabela 11).

Tabela 11 – Relação entre IGF-I e dias de lactação em vacas lactantes com e sem disponibilidade a ambiente climatizado.

	R2	intercepto	Erro padrão	Dias de Lactação	Valor de P
Climatizado	0,36	47,25647	5,93272	0,3228	<0,001
Não climatizado	0,17	65,86339	3,9631	0,13845	<0,001

$Y = a + bx + \text{erro}$, onde a = intercepto, b = dias de lactação

6.4 Discussão

O padrão de comportamento das variáveis fisiológicas temperatura retal, temperatura da base da cauda, temperatura superficial e frequência respiratória, maior à tarde em relação à manhã também foi encontrado por Baccari Jr. (1984) e Martello et al. (2009), evidenciando o ritmo circadiano da termorregulação encontrado nos animais domésticos.

A referência fisiológica para temperatura retal está entre 38 e 39,5 °C sob condições termoneutras (DU PREEZ, 2000). Os valores de temperatura retal obtidos dentro da sala de ordenha no presente estudo não ultrapassaram a faixa considerada normal para a espécie bovina, mesmos em dias quentes do verão, independente dos animais terem ou não disponível o ambiente climatizado.

Já a frequência respiratória é um indicador mais sensível do estresse calórico do que a temperatura retal (BROWN-BRANDL et al., 2005). Apesar de terem sido encontradas diferença na frequência respiratória entre as estações do ano, apenas no verão chuvoso foi encontrado maior valor durante à tarde nos animais não climatizados. Mesmo assim, os valores estão dentro do intervalo de 18 a 60 mov/min considerado normal para bovinos (ANDERSSON; JÓNASSON, 1996; HAHN et al., 1997).

Durante o verão, diversos autores verificaram a eficácia do sistema de climatização sobre a temperatura retal e frequência respiratória, observando sempre menores valores para os animais com ambiente climatizado (AVENDAÑO-REYES et al., 2006; CHAIYABUTR et al., 2008; CORREA-CALDERON et al., 2004). Todavia, alguns estudos notaram que mesmo com ITU acima de 72 a falta da climatização não ocasionou condição de estresse aos animais (ARCARO 2005; MARTELLO et al., 2004), resultados semelhantes ao encontrados no presente trabalho. Mesmo durante as estações quentes, a diminuição da temperatura do ar observada à noite e a possibilidade de permanecer no piquete após o por do sol, evitando o acúmulo de calor por radiação da instalação e do próprio sol podem ter reduzido o estresse térmico facilitando a dissipação do calor ganho durante o dia, mesmo sem ambiente climatizado. Um ITU menor que 64 por pelo menos 6 horas reduz os efeitos do estresse térmico (IGONO et al., 1992).

Apesar da grande variação entre os valores mínimos de temperatura do ar e ITU nas diversas estações do ano, as máximas temperaturas e ITU ficaram acima

dos valores que indicam condições potencialmente estressantes para vacas em lactação (Tabela 6). Valores críticos de temperatura ambiente acima de 27 °C e ITU acima de 72 parecem ter sido aceitos para determinar o início do estresse térmico em vacas lactantes (FUQUAY, 1981; JONHSON, 1980; MAYER et al., 1999; VERWOERD et al., 2006; WEST, 1999). Entretanto, esses limites máximos podem variar devido a inúmeros fatores como grau de aclimação do animal, tempo de exposição ao estresse, prenhez e nível de produção.

Concentrações de 3,5 ng.ml⁻¹ são consideradas normais para um animal em conforto (SMITH, 1993). Para animais em situação de estresse calórico a literatura apresenta valores entre 4,5 e 15,6 ng.ml⁻¹ (ARCARO, 2005; RONCHI et al., 2001; WISE et al., 1988) e alguns valores mais altos entre 21,5 a 43,0 (CHAIYABUTR et al., 2008; CHRISTISON, JONHSON, 1972; Du PREEZ et al., 2000). Apesar da ausência de sinais que poderiam constatar o estresse calórico, principalmente o aumento da temperatura retal, os valores encontrados para o cortisol no presente estudo podem estar associados à falta de conforto térmico.

A ausência de diferença entre os períodos da manhã e da tarde na concentração plasmática de cortisol pode ser explicada pela baixa variação durante o dia e pela ausência de condições climáticas estressantes às vacas. Em estudos anteriores não foi encontrado relação significativa com as horas do dia (HUDSON et al., 1975) e nas diferentes estações do ano (ALILA-JOHANSSON et al., 2003).

Os valores de IGF-I encontrados neste estudo estão de acordo com outros autores que verificaram concentrações plasmáticas entre 67,2 e 98,4 ng.ml⁻¹, sem diferenças entre animais em conforto e em estresse térmico (CHAIYABUTR et al., 2008). Já McGuire et al. (1991), apesar de também não ter relatado influência do estresse térmico sobre as concentrações de IGF-I, encontrou valores menores, entre 21,5 a 29,0 ng.ml⁻¹.

Apesar dos bovinos leiteiros não serem de raças estacionais, pode ocorrer influência das horas de luz nas respostas hormonais. Durante dias longos, bovinos apresentam concentrações mais altas de IGF-I (DAHL et al., 1997; KENDALL et al., 2003) e durante dias curtos concentrações mais altas de cortisol (ALILA-JOHANSSON et al., 2003). As maiores concentrações plasmáticas de cortisol encontradas no inverno estão em concordância com outros autores (ALILA-JOHANSSON et al., 2003). Todavia, a condição climática pode também criar uma

situação estressante aumentando os níveis plasmáticos no sangue (KADZERE et al., 2002).

Por outro lado, Ronchi et al. (2001) verificaram menores concentrações de cortisol em animais mantidos em ambiente com alta temperatura quando comparados àqueles que permaneceram em conforto térmico, o que pode caracterizar um estresse crônico. As respostas ao estresse são desencadeadas pela ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), provocada pela liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) pelo hipotálamo e a subsequente liberação de hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) pela pituitária anterior e de glicocorticóides pelo córtex da adrenal (VARLEY, STEDMAN, 1994). A resposta do eixo HPA ao estresse é em parte determinada pela habilidade dos glicocorticóides em regular a liberação de ACTH por um sistema de retroalimentação negativa. Como o cortisol é secretado na corrente sanguínea, o hipotálamo detecta sua elevada concentração e ocorre assim um feedback negativo, impedindo a produção de CRH e ACTH e, conseqüentemente, de mais cortisol.

Os altos valores de cortisol plasmático encontrados neste estudo também podem ser relacionados a alguns estímulos positivos como, por exemplo, a ordenha, que promove aumento do nível de cortisol mesmo os animais apresentando comportamentos que caracterizavam seu conforto (GOREWIT et al., 1992; NEGRÃO; MARNET, 2006; TANCIN et al., 1995).

Alguns estudos que mostraram o impacto das horas de luz na concentração plasmática de IGF-I foram conduzidos em condição de termoneutralidade. A possibilidade de que o estresse térmico possa alterar o efeito do fotoperíodo na concentração de IGF-I foi observada por Collier et al. (2008), indicando uma maior média de IGF-I durante o verão comparado ao inverno, porém com um aumento 4 vezes maior durante o verão quando as vacas foram submetidas à aplicações de bST. Novilhas mantidas em fotoperíodo longo apresentam maior crescimento do parênquima mamário e menor acúmulo de gordura no úbere quando comparadas às expostas à dias curtos (COLLIER et al., 2006). Quando são analisados apenas os valores de IGF-I durante as duas colheitas no verão, observou-se que as concentrações plasmáticas foram menores no verão chuvoso, durante o qual foram encontradas temperaturas de globo negro máximas dentro da instalação maiores do que durante o verão seco. Neste caso, o estresse térmico pode ter contribuído para a diminuição do IGF-I, principalmente nos animais não climatizados, assim como o

menor tempo de alimentação que ocorre normalmente no verão (PORTUGAL; PIRES; DURÃES, 2000).

Os maiores valores de IGF-I encontrados na primavera para a baia climatizada pode ser explicado pela maior produção de leite neste grupo de animais.

Como o efeito do estresse por calor sobre a diminuição da alimentação é bem conhecido (COLLIER et al., 2004; McGUIRE et al., 1991) e a redução no balanço energético está associado com ingestão de matéria seca (COLLIER et al., 2008), há, portanto a possibilidade de que o menor consumo de alimentos no verão também possa estar relacionada a diminuição do IGF-I circulante, apesar deste consumo não ter sido mensurado no atual estudo.

Berman (1968) relatou reduções da taxa metabólica na ordem de 20 % do inverno para o verão, sem associação com menor produtividade em vacas em lactação. Esse resultado sugere que em condições normais de produção, as adaptações metabólicas e de trocas de calor, como o aumento da condutividade de tecidos para maior perda de calor para o ar (BERMAN et al., 1985) e suas mudanças sazonais podem ser suficientes para manter a produtividade normal em ambientes sem conforto térmico (WEBSTER et al., 1976; WELDY et al., 1964).

No estresse calórico súbito e prolongado, que pode ocorrer como um veranico durante a estação fria quando são encontradas altas temperaturas (até 35 °C) e forte insolação, ou dias muito quentes durante a primavera ou um verão típico, as vacas são menos capazes de se aclimatar (KADZERE et al., 2002). Nesse caso se observa diminuição na ingestão de alimentos, queda na produção de leite e respostas termorregulatórias como aumento da temperatura retal e frequência respiratória (RONCHI et al., 2001; AVENDAÑO-REYES et al. 2006).

Como observado no presente estudo, o animal pode se adaptar as condições ambientais de calor através de uma gradual aclimatação (PROSSER; BROWN, 1969), sendo possível afirmar que vacas leiteiras de alta produção se aclimatam a um aquecimento gradual durante o ano e baseado nas médias de temperatura do ar durante o dia, é possível afirmar que não existiu estresse térmico prolongado em nenhum período do ano.

6.5 Conclusão

O aumento da temperatura ambiente influencia de forma positiva nas variáveis fisiológicas ligadas à termorregulação, independente do uso de sistema de climatização com ventiladores e nebulização em qualquer condição climática encontrada neste estudo. Entretanto, os animais climatizados mantiveram a produção de leite mesmo durante o verão. As concentrações plasmáticas de cortisol e IGF-I podem ter sido influenciadas pelas estações do ano e pela produção de leite.

Apesar dos valores obtidos para temperatura retal estarem dentro da faixa de normalidade, as concentrações de cortisol evidenciam que os animais deveriam estar sob estresse, calórico ou não.

7. Experimento 3: Efeitos de sistema de resfriamento adiabático evaporativo sobre o comportamento e a produção e qualidade do leite em vacas holandesas em ambiente tropical

RESUMO

O estresse calórico tem efeitos negativos sobre o conforto animal e sua produtividade. O objetivo do presente estudo é verificar como o uso de ventilação e nebulização dentro de galpão do tipo *free-stall* pode alterar positivamente o comportamento e a produção e qualidade do leite de vacas holandesas. Foram utilizados 28 animais em lactação, divididos em duas baias experimentais, apenas uma com sistema de climatização instalado. Durante cinco diferentes padrões climáticos ao longo do ano (outono, inverno, primavera, verão seco e verão chuvoso) as variáveis comportamentais: postura em pé, permanência sob a sombra e atividades diárias (comer, beber, ruminar, interações, ócio) foram observadas a cada 30 minutos durante o dia, com início após a ordenha da manhã até o por do sol. Amostras de leite foram colhidas durante as estações para análise dos principais componentes do leite: proteína, gordura, lactose, sólidos totais e extrato seco desengordurado, e contagem de células somáticas, quando a produção de leite era mensurada. Todos os animais passaram a maior parte do dia na sombra em pé (84,2 %) independente da estação do ano. Houve efeito do sistema de climatização sobre o maior tempo de alimentação durante o verão ($P=0,03$) e as vacas sem climatização tiveram diminuição da frequência de alimentação à medida que os meses foram ficando mais quentes ($P<0,05$). No verão, a disponibilidade de climatização proporcionou maior produção de leite ($P<0,01$), teor de gordura 17,9 % maior e maior contagem de células somáticas ($P<0,01$). Oferecer climatização para vacas lactantes durante os meses mais quentes do ano mostrou-se eficiente no aumento do tempo de alimentação e na maior produção e melhor qualidade do leite.

Palavras-chave: estresse calórico; *free-stall*; nebulização; ventilação

Experiment 3: Effects of evaporative cooling system on behavior, yield and quality of milk in Holstein cattle in a tropical environment

ABSTRACT

The heat stress has negative effects on animal comfort and productivity. The aim of this study is to determine how the use of ventilation and fogging on a free-stall can positively change behavior and production and milk quality of Holstein cows. We used 28 lactating animals, divided into two experimental pens, only one with cooling system. For five different weather patterns throughout the year (fall, winter, spring, dry summer and rainy summer) behavioral variables: standing posture, stay in the shade and daily activities (eating, drinking, ruminating, interaction, idling) were observed every 30 minutes during the day, starting after milking in the morning until sunset. Milk samples were collected during the seasons for analysis of the major components of milk: protein, fat, lactose, total solids and solids, and somatic cell count when the milk production was measured. All animals spent most of the day standing in the shade (84.2%) regardless of season. Cooling system had an effect on feeding during summer ($P=0.03$) and no-cooled cows had a lower feeding frequency when the days became hotter ($P<0.05$). During summer, cooled animals had greater milk production ($P<0.01$), fat content 17.9% higher and higher somatic cell count ($P<0.01$). Providing cooling system for lactating cows during the warmer months of the year proved to be efficient in increasing the feeding time and production and better milk quality.

Key-words: free-stall; fogging; heat stress; ventilation

7.1 Introdução

A produção de leite pode ser negativamente afetada por um ambiente quente, principalmente em vacas com alta produção (KADZERE et al., 2002; TAPKI; SAHIN, 2006), e o estresse calórico tem efeitos negativos sobre o bem-estar animal (JACOBSEN, 1996), que pode ser notado pelas respostas fisiológicas e comportamentais. O aumento da temperatura corporal e frequência respiratória bem como a redução nas atividades diárias e consumo estão relacionados com fatores como a temperatura ambiente, umidade relativa e radiação solar (HAHN, 1999; OMINSKI et al., 2002).

Entre as principais mudanças de comportamento ligadas a termorregulação, assim que o clima se torna mais quente, estão a diminuição do tempo que o animal permanece deitado e diminuição na alimentação (OVERTON et al. 2002; TUCKER et al., 2008; WAGNER-STORCH et al., 2003; ZÄHNER et al., 2004).

Além da diminuição na produção, a qualidade do leite também pode ser influenciada pelo estresse calórico. Células somáticas aumentam com o aumento da temperatura ambiente (IGONO et al., 1988) e teores de proteína e gordura tendem a ser menores (CARVALHO et al., 1996).

No entanto, há uma crescente evidência de que fornecer sombra ou outros métodos de resfriamento seja benéfico para os bovinos, com base em alterações na frequência respiratória e temperatura corporal (GAUGHAN et al., 2004; KENDALL et al., 2007), no tempo de alimentação durante o dia (PORTUGAL; PIRES; DURÃES, 2000) e nas concentrações plasmáticas de cortisol e IGF-I (CHAIYABUTR et al., 2008).

Quando mantidas em galpão do tipo *free-stall*, vacas em lactação permanecem dentro da instalação durante as horas mais quentes do dia para obter abrigo da radiação solar intensa, entretanto, o próprio galpão pode ocasionar estresse calórico se não for bem ventilado e com alto pé-direito. Para melhorar o microclima da instalação, o uso de ventilação forçada (FRAZZI et al., 1997), ventilação com aspersão ou com nebulização (FRAZZI et al. 2000, TURNER, 1998) já mostraram efeitos positivos na produtividade, todavia as alterações de comportamento e preferências das vacas dentro das instalações são menos estudados (HILLMAN et al., 2005; OVERTON et al., 2002; ZÄHNER et al., 2004).

Dentro deste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência do sistema de resfriamento adiabático evaporativo instalado em galpão do tipo *free-stall* sobre as respostas comportamentais e sobre a produção e qualidade do leite de vacas holandesas ao longo do ano.

7.2 Material e Métodos

7.2.1 Animais e instalações

O experimento foi realizado no Setor de Bovinocultura Leiteira da Coordenadoria do Campus de Pirassununga – CCPS/USP, na cidade de Pirassununga, SP, a uma altitude de 634 m, na latitude sul de 21°80'00" e longitude oeste de 47°25'42", que apresenta clima do tipo Cwa, segundo classificação de Köppen, com temperatura média anual de 22,0 °C e pluviosidade média anual próxima a 1363 mm.

Foram utilizadas 28 vacas da raça Holandesa, entre a primeira e terceira lactações, com produção média de 20 kg/dia. Os animais foram divididos em dois grupos experimentais e mantidos em estabulação livre do tipo *free-stall* em duas baias coletivas. O galpão foi construído no sentido noroeste-sudeste, com piso de concreto, cobertura de telhas de fibrocimento, pé direito de 3,5 metros e cama de areia, com duas baias coletivas divididas para dois lotes distintos. Cada baia coletiva possui cocho linear com 50 cm por cabeça e bebedouro automático posicionados sob o telhado. As vacas têm acesso ilimitado a um piquete de capim *coast-cross* sem disponibilidade de sombra.

Em uma destas baias foi implantado um sistema de climatização com ventilação forçada (até 300 m³.min⁻¹) e nebulização de alta pressão (Grupo TC: com climatização). A outra baia não dispunha de ventilação forçada nem nebulização, a qual foi designada o Grupo TS (sem climatização). As vacas foram distribuídas ao acaso entre os dois tratamentos e colocadas nas baias experimentais separadas por lona, para evitar que o sistema de climatização não reduzisse o estresse térmico na baia não climatizada. O sistema de climatização era acionado por um sensor de temperatura colocado no centro do galpão, na altura de 2,5 m, ligado a um climatizador (THC 3400P), que era acionado quando a temperatura do ar ultrapassava 26 °C.

Os animais receberam uma mistura de concentrado e silagem de milho, balanceada de acordo com o NRC (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2001), com 76 % de NDT e 18 % de PB na matéria seca. A alimentação era fornecida após as ordenhas, na proporção de 1 kg de concentrado / 3 litros de leite produzido e $\pm$ 30 kg de silagem de milho por animal.

7.2.2 Variáveis ambientais

As variáveis climáticas foram registradas pela estação meteorológica eletrônica do Laboratório de Construções e Ambiência, da FZEA/USP, que forneceu dados como temperatura do ar, umidade relativa e radiação solar (Tabela 12). O registro das variáveis climáticas das baias experimentais foi realizado por sensores de temperatura de globo negro e higrômetro, posicionados no centro de cada baia logo acima da cama, para verificar diferença entre os ambientes. Os parâmetros ambientais foram avaliados pelo cálculo do índice de temperatura e umidade (ITU).

Tabela 12 - Dados climáticos para estações do ano registrados pela estação meteorológica eletrônica e por termômetro de globo negro.

	Outono	Inverno	Primavera	Verão seco	Verão chuvoso
Temperatura ar média	19,23	15,48	21,42	22,95	23,16
Temperatura ar (min-max)	8,9-29,6	3,4-27,7	11,9-33,3	14,4-34,8	15,4-35,3
ITU média (min-max)	69 (42-92)	59 (21-87)	75 (50-99)	78 (57-99)	78 (57-99)
Umidade Relativa (min-max)	42-100	30-100	26-99	24-99	35-98
Radiação solar máxima	921	867	1215	1361	1554
Radiação solar média*	376,03	299,73	403,09	510,52	511,85
Pluviosidade acumulada	82,0	46,4	156,6	32,4	272,8
TGN baia climatizada	24,0-32,0	20,0-28,5	24,0-29,0	25,3-28,3	25,3-32,3
TGN baia não climatizada	25,0-32,0	20,0-28,5	24,0-33,0	25,3-29,3	25,7-33,3

* Radiação solar média durante horas de luz (W/m²).

Temperatura do ar (°C); Umidade relativa (%); TGN: temperatura de globo negro (°C)

7.2.3 Análise de comportamento

Os registros comportamentais foram avaliados durante toda a lactação das vacas, em cinco diferentes padrões climáticos (Outono: abril, maio, junho; Inverno: junho, julho, agosto; Primavera: setembro, outubro, novembro; Verão seco: dezembro, até 15 de janeiro; Verão chuvoso: 16 de janeiro a 28 de fevereiro) durante 3 dias consecutivos em cada, do nascer ao pôr do sol, de forma direta e contínua, pelo método focal (MARTIN; BATESON, 1986). As anotações dos comportamentos foram instantâneas por amostragem, com intervalo amostral de 30 minutos, registrando-se a localização individual do animal na instalação dentro do *free-stall* ou no piquete, tempo de permanência em pé e à sombra e suas atividades diárias como comer, beber água, ruminar, interações (positivas, negativas, sexuais e externas) e ócio.

Foi elaborado etograma de trabalho com a descrição e definição de cada comportamento (Tabela 13) e as observações foram anotadas em planilha de dados.

Tabela 13 - Descrição dos comportamentos observados nas vacas experimentais.

Comportamento	Descrição
Posição e postura	
A sombra	Ao menos com a cabeça na sombra.
Em pé	Com os 4 apoios no chão.
Atividade	
Comendo	Ingerindo silagem e/ou ração e/ou forragem e/ou sal.
Ruminando	Movimentos de mastigação sem ingestão de alimento.
Bebendo	Ingerindo água do bebedouro, com a boca dentro da água ou água escorrendo da boca logo após a permanência no cocho de água.
Ócio	Sem atividade aparente.
Interação	Lambendo/coçando, briga, monta, interferência externa.

Também foi anotada a posição do animal dentro da instalação, nas regiões definidas pelos números de 1 a 5 delimitados pelas linhas pontilhadas na figura 20: 1) cocho, 2) corredores; 3) área descoberta (cimentado dentro do *free-stall*); 4) cama; 5) piquete de *coast-cross*

Figura 20 - Croqui do *free-stall* e piquete anexo (sem escala). As linhas pontilhadas delimitam cada região. Área azul coberta por telhas de fibrocimento, área vermelha descoberta. Os números de 1 a 5 indicam a região da instalação onde os animais poderiam ocupar.

7.2.4 Produção e qualidade do leite

Realizaram-se colheitas de leite durante o período experimental, com três amostras colhidas nas estações: outono, inverno, primavera, verão seco e chuvoso. As amostras foram colhidas em frascos contendo pastilhas de bronopol e enviadas para a Clínica do Leite, ESALQ/USP, para contagem de células somáticas (CCS) e análise dos principais componentes do leite: proteína, gordura, lactose, sólidos totais e extrato seco desengordurado. A contagem de células somáticas foi determinada

por citometria de fluxo (Somacount, 300) e o restante da composição do leite amostrado determinado por infravermelho (Bentley, 2000). A produção total também foi medida em cada colheita.

7.2.5 Análise estatística

O modelo utilizado para a análise de comportamento, por se tratar de modelo não-linear, mas linearizável foi ajustado utilizando-se a teoria de modelos lineares generalizados proposta por Nelder e Wenderburn (1972), utilizando-se o procedimento GLIMMIX do software SAS. Denotando-se a esperança matemática $E[Y_t]$ por μ_t , pode-se tornar a expressão linear aplicando a função de ligação logit, obtendo-se então um preditor linear, funcionalmente ligado à média μ_t . Desta maneira, o ajuste do modelo foi efetuado considerando que a distribuição dos resultados de cada variável de comportamento estudada é binomial, a função de ligação foi incorporada aos estimadores dos efeitos fixos, preditores dos efeitos aleatórios e estimadores dos componentes de variância. Para a análise das variáveis comportamentais de posição à sombra, postura em pé e atividades (alimentação, ruminação, beber água, ócio e interação) considerou-se o efeito de animal em estrutura de medida repetida e o efeito do tempo (horas do dia). Foi analisado o efeito das estações do ano sobre as médias comportamentais dos animais com e sem disponibilidade de galpão com sistema de climatização comparados por uma análise de variância para os efeitos fixos e comparação de médias por Tukey-Kramer a 5 %. Para comparação das variáveis entre os animais dos grupos experimentais (com e sem ambiente climatizado) foi realizado teste-t, com correção de satterthwaite para os graus de liberdade, a 5 % de significância.

A produção de leite foi analisada nas estações do ano com efeitos lineares e quadráticos dos dias de lactação por análise de variância e comparação de médias por Tukey-Kramer a 5 %. Mesmo procedimento foi utilizado nas variáveis de qualidade do leite (gordura, proteína, lactose, extrato seco desengordurado, sólidos totais e contagem de células somáticas). As comparações entre grupos foram realizadas pelo teste-t, com aproximação de satterthwaite a 5 % de significância.

Todos os valores são apresentados pela média $\pm$ erro padrão da média.

7.3 Resultados

O sistema de climatização foi automaticamente acionado em todas as estações do ano, pois em todas elas a temperatura do ar ultrapassou os 26 °C, valor determinado para ligar o sistema.

Os animais permaneceram a maior parte do dia em pé na sombra (84,2 % do tempo observado), independente da estação do ano e disponibilidade de sistema de climatização ($P=0,18$). Observou-se diminuição do tempo em pé a partir das 11h e aumento após as 14h (Figura 21), vinculada com a diminuição da alimentação e aumento da ruminação (Figuras 22 e 23). Quando deitadas, as vacas preferiram deitar na cama (86% inverno e média de 64% nas outras estações). O segundo lugar mais utilizado para deitar foi o piquete (Figuras 24 e 25).

A atividade “comer” foi a mais freqüente durante as horas de luz, sem diferença entre as baias experimentais, exceto durante o verão seco e chuvoso, onde os animais no sistema não climatizado passaram menos tempo comendo ($P=0,03$; Tabela 14). Ao longo do ano, os animais sem disponibilidade de ambiente climatizado apresentaram o menor consumo durante o verão ($P<0,05$), entretanto o grupo com climatização não teve redução de seu consumo no verão ($P=0,26$; Figura 28). A frequência de consumo de água foi maior durante o inverno no grupo não climatizado ($P=0,03$), apesar dos baixos valores observados ao longo do dia. Não houve diferenças entre as estações do ano para o grupo climatizado, e também não existiu efeito da climatização sobre esta atividade ($P>0,05$).

As maiores frequências de alimentação foram observadas logo após a volta das ordenhas (9:30 h e 16:30 h), quando uma nova dieta era ofertada (Figura 22). Uma hora após esses picos verificou-se diminuição no número de animais comendo. A menores frequências ocorreram nas horas mais quentes do dia, entre as 11:30 h e 14:00 h, quando aumentava a frequência de ruminação (Figura 23). Mesmo padrão foi encontrado para os animais os dois grupos experimentais ($P>0,05$).

Apesar da atividade de ruminação estar associada à postura deitada, observou-se uma diminuição desse comportamento quando os dias foram ficando mais quentes ($P<0,05$), e verificou-se diferença em relação a disponibilidade de climatização em especial no verão seco, onde existiu um maior número de animais que preferiram ruminar em pé ($P<0,01$) ou permanecer em ócio na baia sem climatização (Figuras 26 e 27).

Os animais permaneciam no cocho a maior parte das horas observadas, com maiores frequências encontradas durante o inverno (61,3 % e 58,5 % para com e sem ambiente climatizado, respectivamente; $P>0,05$) e menores frequências durante o verão, no grupo não climatizado (45,6 %; $P<0,01$ para as outras estações e para o grupo climatizado). O restante do período os animais oscilavam entre os corredores cobertos e a cama. A área descoberta cimentada foi a menos utilizada (menos de 2 % do tempo nos dois grupos, em todas as épocas do ano), seguido do piquete, que era mais utilizado no final do dia, quando o sol já era poente.

Tabela 14 – Frequências das atividades diárias observadas das 9:30 as 18:00 horas de vacas holandesas com e sem disponibilidade de ambiente climatizado durante o ano.

	Outono	Inverno	Primavera	Verão seco	Verão chuvoso	P (linha)
Comer						
TC	49,75 ^A	53,51 ^A	50,98 ^A	45,09 ^A	43,15 ^A	0,26
TS	51,23 ^{Aa}	52,56 ^{Aa}	44,12 ^{Aa}	37,20 ^{Bb}	36,11 ^{Bb}	0,05
Ruminar						
TC	13,80 ^{Ac}	15,81 ^{Ac}	18,40 ^{Abc}	26,49 ^{Aab}	27,97 ^{Aa}	0,017
TS	11,25 ^{Ac}	14,57 ^{Abc}	18,78 ^{Aabc}	20,99 ^{Bab}	24,70 ^{Aa}	0,05
Interação						
TC	6,13	5,03	7,23	4,17	3,56	0,31
TS	8,50	2,83	7,32	8,97	8,55	0,38
Beber						
TC	3,99	5,56	3,33	5,38	3,17	0,53
TS	4,50 ^{ab}	6,88 ^a	2,68 ^{bc}	2,91 ^{bc}	1,49 ^c	0,03
Ócio						
TC	26,33	20,09	20,06	28,87	22,19	0,47
TS	24,52	23,14	27,10	29,93	29,16	0,42

TC: disponibilidade de climatização; TS: sem disponibilidade de climatização. Letras maiúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo Teste-T ($P<0,05$), e letras minúsculas diferentes na linha diferem entre si pelo Teste de Tukey-Kramer ($P<0,05$).

Figura 21 – Frequência da postura em pé de vacas holandesas sem disponibilidade de ambiente climatizado durante diferentes padrões climáticos no ano.

Figura 22 – Frequência de alimentação de vacas holandesas sem disponibilidade de ambiente climatizado durante diferentes padrões climáticos no ano.

Figura 23 – Frequência de ruminação de vacas holandesas disponibilidade de ambiente climatizado durante diferentes padrões climáticos no ano.

Figura 24 – Animais em pé sob o sistema de climatização e animal deitado na cama.

Figura 25 – Animais deitados no piquete e na cama

Figura 26 – Frequência média de ruminação e erro padrão médio na posição deitada para vacas holandesas com e sem disponibilidade de ambiente climatizado, durante o ano (* $P < 0,05$).

Figura 27 – Frequência média de ócio e erro padrão médio na posição deitada para vacas holandesas com e sem disponibilidade de ambiente climatizado, durante o ano (* $P < 0,05$).

Figura 28 - Médias estimadas e erros-padrão médios de frequência de alimentação e ruminação em animais mantidos (TC) ou não (TS) em climatização, durante o ano.

Figura 29 - Médias estimadas e erros-padrão médios de produção de leite em animais mantidos ou não em climatização, durante o ano (* $P < 0,05$).

Houve efeito das estações do ano sobre a produção de leite (Figura 29), e também efeito quadrático dos dias de lactação ($P < 0,01$). Nos animais sem disponibilidade de climatização menores produções foram encontradas na primavera e no verão ($P < 0,01$).

Figura 30 - Qualidade do leite média e erro padrão médio em relação aos parâmetros: gordura, proteína, lactose, sólidos totais, extrato seco desengordurado (ESD), para vacas com e sem disponibilidade de ambiente climatizado. Letras diferentes diferem entre si pelo teste-t ($P < 0,05$).

Figura 31 - Qualidade do leite média e erro padrão médio em relação ao parâmetro: Contagem de Células Somáticas (CCS) para as vacas com e sem disponibilidade de ambiente climatizado, durante o ano.

Não houve efeito das estações do ano sobre a qualidade do leite ($P > 0,05$). A ausência de ambiente climatizado proporcionou menor teor de extrato seco desengordurado sem diferença significativa ($P > 0,05$), e não houve diferença entre

proteína e lactose ($P>0,05$, Figura 30). Os valores médios de gordura foram menores (2,56 %) quando comparados aos animais mantidos em estabulação climatizada (3,02 %, $P<0,05$, Figura 30).

Em relação à contagem de células somáticas (CCS) houve diferença significativa entre os grupos experimentais, com menor média encontrada para os animais do ambiente climatizado nos meses das estações mais amenas ($P<0,01$, Figura 31) e maiores valores durante as estações mais quentes ($P<0,01$). Como os dados de CCS não apresentaram distribuição normal foram transformados para Log na base 10. Também houve efeito das estações do ano, com maior contagem encontrada no inverno para os animais não climatizados e no verão chuvoso para o grupo em ambiente climatizado ($P<0,01$).

7.4 Discussão

Os animais permaneceram grande parte do dia (84,2 %) em pé e na sombra. Fregonesi e Leaver (2001) também notaram uma predominância da posição em pé em vacas confinadas, condicionada ao maior tempo comendo, principalmente os animais de alta produção. No presente estudo os animais passaram na média mais de 50% do período de observação comendo ou bebendo água e mais 6,2% do tempo em interações positivas ou agonísticas.

Overton et al. (2002) verificou que vacas em *free-stall* com disponibilidade de ventiladores e aspersão sobre o cocho permaneciam mais tempo em pé sob a climatização ao invés de deitar nas camas para promover a perda de calor. Com o aumento da temperatura dentro do galpão houve uma diminuição no número de animais deitados (OVERTON et al., 2002; SHULTZ, 1984). A postura em pé maximiza a área de superfície corporal exposta ao ambiente e aumenta o fluxo de ar ao redor do animal, facilitando a perda de calor por convecção (ANSELL, 1981; IGONO et al., 1987).

Miller e Wood-Gush (1991) e Overton et al. (2002) observaram que logo após a volta da ordenha, tendo comida disponível os animais permaneciam comendo e em pé pelos próximos 30 a 60 minutos. Imediatamente após esse período a maioria das vacas era observada em ócio. Mesmo padrão de comportamento foi observado neste estudo. O ócio foi bastante observado sob a climatização, que era oferecida sobre a cama, também encontrado por Frazzi et al. (2000). No período anterior a

ordenha mais da metade do animais já não se encontravam mais deitados. Permanecer mais tempo em pé pode ocorrer devido ao aumento da pressão intramamária e início antecipado de ejeção do leite (OSTERMAN; REDBO, 2001).

Verificou-se que nos animais sem disponibilidade ao ambiente climatizado houve uma maior queda da produção de leite entre os períodos menos quentes e o verão. Da mesma forma, Frazzi et al. (2000) verificaram menores quedas na produção de leite em animais mantidos sob resfriamento.

No verão as vacas mudam seu padrão de alimentação diurno para o período noturno, como forma de evitar o incremento calórico ocasionado pelo consumo de matéria seca nas horas mais quentes do dia (PORTUGAL; PIRES; DURÃES, 2000). O menor tempo de alimentação nos animais não climatizados durante o verão pode ter sido influenciado pela temperatura do ar.

Hillman, Lee e Willard (2005) encontraram maior queda na temperatura corporal de vacas em *free-stall* com ventiladores e nebulização e em pé (0,7 °C/h), comparada com animais deitados (0,6 °C/h). Mesmo com acesso a sombra artificial e ao sistema de climatização, as vacas no atual estudo permaneceram mais tempo em pé sob a estrutura, provavelmente como forma de perder mais calor para o meio. Comportamento similar ao encontrado por Tucker et al. (2008).

Os animais buscam a sombra em resposta a um aumento da carga térmica absorvida (KENDALL et al., 2006; SCHUTZ et al., 2009). No caso do presente estudo, a sombra era fornecida pelo telhado do galpão, então havia mesmo assim uma absorção de calor da instalação pela radiação. O sistema de climatização seria uma forma de diminuir o aumento da carga térmica radiante da estrutura pelo resfriamento do ar ambiente, proporcionando maior conforto para as vacas. E esse maior conforto parece não ter sido evidenciado quando se observa as frequências de permanência em pé, entretanto, apesar da atividade comer durante o verão seco e verão chuvoso ter diminuído de 1 a 1,5 horas na comparação com o inverno, onde se observou o maior tempo de alimentação, os animais mantidos em ambiente climatizado permaneceram um maior tempo nessa atividade durante o verão. Com isso, a frequência de ruminação durante as duas fases do verão foi maior para os animais climatizados, o que mostra que o conforto térmico deve ter sido maior para permitir que o animal ruminasse, atividade preferencialmente realizada em conforto.

Avaliando-se a composição do leite de vacas da raça Holandesa submetidas a manejo com e sem disponibilidade de sombra, durante as horas mais quentes do

dia, no período de verão, o leite produzido pelas vacas expostas ao sol apresentou menor teor de extrato seco total, extrato seco desengordurado, proteína e lactose daquele produzido pelas vacas mantidas à sombra (CARVALHO et al., 1996). No presente trabalho também foi encontrado menor teor de extrato seco desengordurado nos animais sem disponibilidade de climatização, mas não para proteína e lactose.

RODRIGUEZ et al. (1985) verificaram que com a elevação da temperatura de 6 para 36 °C, os teores de gordura e proteína diminuíram 0,54 % e 0,44 %, respectivamente, para os animais mantidos a altas temperaturas. Nos animais não climatizados foi encontrada queda semelhante para gordura, ao redor de 15,2 %, comparados aos animais mantidos em estabulação climatizada. Resultados semelhantes foram encontrados por Avendaño-Reys et al. (2006).

Os animais mantidos sob ambiente climatizado tiveram menores médias de contagem de células somáticas durante os meses com temperaturas mais amenas e maiores valores durante os meses mais quentes. Essa constatação pode ser explicada pelo maior tempo de funcionamento do sistema de climatização durante os dias quentes, aumentando a umidade do ambiente. Philpot e Nickerson (2002) afirmaram que a CCS pode ser maior nas estações e regiões de temperatura e umidade ambiente mais elevadas, devido à maior probabilidade de ocorrer infecção intramamária. Entretanto, apesar da oscilação nos valores ao longo do ano, a CCS permaneceu na maioria das colheitas abaixo de 200.000 células.mL⁻¹, valor limite para a ausência de infecção. Dohoo e Leslie (1991) avaliaram a CCS de vacas em intervalos de 28 dias e observaram que o limite de 200.000 células. mL⁻¹ foi o mais indicado para estimar uma nova infecção intramamária, assim como Coentrão et al. (2008).

Apesar da queda na produção de leite ter sido maior nos animais sem disponibilidade de climatização, o decréscimo ocorrido nos animais climatizados também pode ter contribuído para o aumento da CCS, com o aumento da descamação do epitélio proveniente da apoptose mamária (HARMON; RENEAU, 1993; MONARDES, 1994). Mesmo explicação pode ser dada a maior média encontrada durante o inverno devido à diminuição da produção leiteira. BARBOSA et al. (2004) verificaram maior CCS em animais que tiveram acesso à sombra, entretanto concluiu ser devido às aglomerações que contribuíram para uma concentração maior de patógenos no ambiente. As maiores contagens se deram nos

animais não climatizados. Esse resultado pode ter ocorrido devido o maior estresse calórico destes animais, que pode contribuir com a diminuição do sistema imunológico e consequentemente com a maior contaminação do leite.

Como nas estações onde a temperatura ambiente é mais amena (outono, inverno e primavera) não houve diferenças entre as atividades diárias das vacas, principalmente a frequência de alimentação, ruminação e ócio, para todos os animais, independente da climatização, e durante o outono e inverno não houve influência do resfriamento sobre a produtividade, pode-se afirmar que não seja necessário seu funcionamento nestes meses do ano, assim seriam diminuídos os gastos com energia e água.

7.5 Conclusão

O ambiente climatizado para vacas em lactação se mostrou eficiente durante os meses mais quentes do ano no aumento do tempo de alimentação diurno e produção de leite, e melhor qualidade do leite observada pela maior porcentagem de gordura.

8. Experimento 4: Cortisol e IGF-I plasmático em vacas lactantes durante estresse pontual e prolongado

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo verificar as alterações dos hormônios cortisol e IGF-I, das variáveis fisiológicas e produção de leite em vacas lactantes submetidas a estresse pontual via administração intravenosa de ACTH e ao estresse calórico prolongado com permanência por sete dias em câmara climática. A temperatura do ar dentro da câmara variou de 26 °C (desligada) a 37 °C (ligada). O equipamento era ligado das 7h às 10h, após esse horário apenas a ventilação permanecia em funcionamento. As colheitas de dados durante aplicação de ACTH (tempo 0) ocorreram nos tempos -15, 0, 30, 60 e 120 minutos. Durante o estresse calórico, as colheitas foram realizadas no 3º, 5º e 7º dia de permanência na câmara, nos tempos 0 (7h), 60, 120 e 300 minutos, onde foram medidas a temperatura retal, temperatura de superficial e frequência respiratória. Com a aplicação do ACTH, o pico de cortisol foi observado após 60 minutos ($P<0,05$) e o IGF-I não teve diferença entre os tempos ($P>0,05$). Não houve efeito de dia ou de tempo de colheita sobre as variáveis hormonais e fisiológicas ($P>0,05$). Os níveis de cortisol plasmático foram maiores durante o período na câmara climática do que no desafio de ACTH para os tempos 0 e 120 ($P<0,01$), porém no tempo 60 minutos as concentrações plasmáticas foram semelhantes ($P=0,22$). Para o IGF-I menores valores foram encontrados nas colheitas durante o estresse calórico comparadas à administração de ACTH ($P<0,01$). A produção de leite teve queda nos 3 primeiros dias de permanência na câmara ($P<0,05$), retomando os valores encontrados antes do início do experimento. Os valores encontrados para o pico de cortisol após aplicação de ACTH são iguais aos valores encontrados para os animais no período dentro da câmara climática, evidenciando a situação de estresse calórico.

Palavras-chave: ACTH; câmara climática; frequência respiratória; temperatura retal

Experiment 4: Cortisol and plasma IGF-I in lactating cows during short and prolonged stress

ABSTRACT

This study aimed to verify the changes of the hormones cortisol and IGF-I, physiological variables and milk production in lactating cows subjected to stress via intravenous administration of ACTH and to prolonged heat stress for seven days in a climatic chamber. The air temperature inside the chamber varied from 26 ° C (off) at 37 ° C (on). The equipment was turned on from 7 am to 10 am, after this time only the ventilation remained in operation. Collection of data during application of ACTH (time 0) occurred at times -15, 0, 30, 60 and 120 minutes. During heat stress, samples were performed at 3, 5 and 7 days of stay in the chamber at 0 (7h), 60, 120 and 300 minutes, when rectal temperature, body surface and respiratory frequency were measured. After ACTH administration, cortisol peak was observed after 60 minutes ($P<0.05$) and IGF-I had no time differences ($P>0.05$). There was no effect of day or time of samples on the hormonal and physiological variables ($P>0.05$). The plasmatic cortisol levels were higher during the period in the climatic chamber than in the challenge of ACTH for the times 0 and 120 ($P<0.01$), but in time 60 minutes plasma concentrations were similar ($P=0.22$). The lowest values for IGF-I were found in the samples during heat stress compared to the ACTH administration ($P<0.01$). Milk production dropped in the first 3 days of stay in the chamber ($P<0.05$), returning to the values found before the start of the experiment. The values found for the cortisol peak after ACTH administration are equal to those found for animals in the period in the climatic chamber, showing the situation of heat stress.

Key-words: ACTH; climatic chamber; rectal temperature; respiratory frequency

8.1 Introdução

O sistema termorregulatório das vacas leiteiras promove a regulação da temperatura corporal. Sob estresse calórico há um aumento da frequência respiratória e da temperatura retal concomitante com o declínio da produção de leite (SPIERS et al., 2004). Com o aumento da temperatura corporal há início dos mecanismos para a perda de calor como o ofego e a sudação (SPAIN; SPIERS, 1998), como forma de transferência de calor corporal para o ambiente. Entretanto, com o aumento da frequência respiratória há um gasto energético que deve ser compensado com o aumento do requerimento de manutenção de 7 a 25% (NRC, 2001), o qual muitas vezes não consegue ser suprido pela menor ingestão devido ao calor.

Trabalhos prévios identificaram limiares para o estresse calórico em bovinos leiteiros baseados na redução da produção de leite (RAVAGNOLO; MISZTAL, 2002). Todavia, segundo relatos da literatura o estresse calórico pontual provoca respostas fisiológicas e hormonais diferentes ao estresse prolongado.

O cortisol provoca ajustes fisiológicos que possibilitam aos animais tolerar condições estressantes (CHRISTISON, JOHNSON, 1972). Entretanto, os efeitos de altas temperaturas sobre o cortisol são inconsistentes. Em alguns estudos o estresse calórico eleva as concentrações plasmáticas de cortisol (SATTERLEE et al. 1977; ALNAIMY et al., 1992; Du PREEZ, 2000) enquanto em outros há diminuição significativa (COLLIER et al., 1982; RONCHI et al., 2001; ZÄHNER et al., 2004) ou não é afetado (EL-NOUITY et al. 1980).

O efeito do meio ambiente sobre os níveis plasmáticos de IGF-I também permanece controverso, pois alguns autores relatam que o estresse calórico foi associado à redução dos níveis plasmáticos de IGF-I (ARMARIO et al., 1987; McCUSHER, 1998; PEISEN et al., 1995; STRAUS, 1994), enquanto outros autores relatam que o estresse calórico aumentou significativamente os níveis plasmáticos de IGF-I (HIRAYAMA et al., 2004), ou não verificaram diferenças entre animais em estresse e em conforto térmico (CHAIYABUTR et al. 2008; McGUIRE et al., 1991).

Diante do exposto o estudo teve como objetivo verificar as alterações fisiológicas, hormonais e produtivas em vacas lactantes submetidas ao estresse pontual via aplicação de ACTH e ao estresse calórico prolongado em câmara climática.

8.2 Material e Métodos

8.2.1 Desafio com aplicação de ACTH

Cinco vacas holandesas em lactação não gestantes foram submetidas a um estresse pontual via administração exógena de ACTH (Sigma®). Estas vacas receberam via intravenosa pela veia mamária 0,6 UI de ACTH/kg de PV (FULKERSON & JAMIESON, 1982).

As colheitas de sangue foram realizadas 15 minutos antes da aplicação de ACTH (tempo -15), no momento da aplicação (tempo 0), e após 30, 60 e 120 minutos (tempos 30, 60, 120).

8.2.2 Câmara Climática

Após o desafio pontual de estresse com ACTH os mesmos animais foram mantidos por sete dias consecutivos em câmara climática em situação de estresse calórico, com temperatura do ar variando de 26 °C com o equipamento desligado a 37 °C quando ligado. O sistema de aquecimento era ligado às 7 horas da manhã, quando era colhida a primeira amostra de sangue (tempo 0). Durante as duas primeiras horas sob calor intenso eram colhidas mais duas amostras de sangue, 60 e 120 minutos após a primeira. Às 10 horas o sistema de aquecimento era desligado, permanecendo apenas ligada a ventilação. Uma última colheita de sangue foi realizada após 300 minutos da primeira. Dentro da câmara era ofertada alimentação e água a vontade, com duas saídas diárias para realização da ordenha (6:30h e 14:30h). Os dois primeiros dias do período experimental foram utilizados para adaptação dos animais, no 3º, 5º e 7º dia foram realizadas as colheitas de sangue, frequência respiratória, temperatura retal e temperatura de superfície corporal dorsal nos tempos 0, 60, 120 e 300 minutos. Nos dias que não existiram colheitas os animais permaneciam dentro da câmara climática, com o mesmo manejo de aquecimento e alimentação.

8.2.3 Análises

As amostras de sangue recolhidas da veia mamária em tubos heparinizados foram mantidas em gelo e logo após a colheita o sangue foi centrifugado à 3000 x g, à 4 °C, durante 15 minutos para obtenção do plasma. O plasma foi acondicionado em tubos e estocado a -20 °C para posterior análise. As análises de IGF-I e cortisol

plasmático foram realizadas com o uso de kits imunoenzimáticos (Diagnostic Systems Laboratory Inc) e executadas no Laboratório de Fisiologia Animal da FZEA/USP.

A temperatura retal foi mensurada por termômetro digital, temperatura radiante de superfície corporal dorsal por termômetro de infravermelho digital e frequência respiratória pela contagem de movimentos do tórax por 15 segundos sendo sua medida expressa em movimentos por minuto.

A produção de leite foi mensurada diariamente durante todo o experimento, bem como 3 dias antes do início e 5 dias após sua finalização para verificação de alterações na produção.

Foi realizada análise de variância (Proc Mixed) para avaliar os efeitos da aplicação de ACTH nos níveis de cortisol e IGF-I, nos diferentes tempos de colheita (-15, 0, 30, 60 e 120 minutos), considerando os animais as medidas repetidas e para os dados obtidos na câmara climática foi desenvolvida análise fatorial com o tempo (0, 60, 120 e 300 minutos) e os dias de colheita (3º, 5º e 7º de permanência na câmara sob estresse calórico) sendo os fatores principais, sua interação (dia x tempo) e o animal como repetição. Quando não existiu pelo menos um contraste entre as médias da interação significativo, os fatores foram estudados independentemente. O teste de comparação múltipla de médias foi realizado pelo Teste de Tukey-Kramer. Foi realizado teste-t para comparação dos dados de cortisol e IGF-I no desafio de ACTH e na câmara climática nos tempos 0, 60 e 120. Foram estimados coeficientes de correlação simples (Pearson) entre as variáveis fisiológicas. A produção de leite foi analisada antes da entrada na câmara (3 dias), durante a permanência (7 dias) e após a saída (5 dias), com comparação múltipla de médias por Tukey-Kramer. Todos os testes foram realizados a 5 % de probabilidade (SAS, 2000) e todos os valores são apresentados pela média $\pm$ erro padrão da média.

8.3 Resultados

8.3.1 Desafio com aplicação de ACTH

Com a aplicação do ACTH intravenoso nos animais houve uma resposta hormonal observada pelo pico de produção de cortisol (Figura 32). Comparadas aos valores basais (tempos -15 e 0), as concentrações plasmáticas de cortisol aumentaram significativamente após administração do ACTH ($P < 0,05$), alcançando valores máximos nos tempos 30 e 60 minutos, sem diferença entre eles. 120 minutos após o estímulo as concentrações já iniciaram a queda, com tendência de alcançarem os valores basais novamente ($P > 0,05$).

A concentração plasmática de IGF-I não foi influenciada pela aplicação de ACTH, e apesar da oscilação das médias observada na Figura 33 não houve diferença entre os tempos de colheita ($P > 0,05$).

Não houve correlação significativa entre a concentração plasmática de cortisol e de IGF-I durante o desafio de ACTH ($P > 0,05$).

Figura 32 - Concentração plasmática média (com erro padrão médio) de cortisol em vacas lactantes durante desafio de ACTH. Letras diferentes diferem entre si pelo Teste de Tukey-Kramer ($P < 0,05$).

Figura 33 - Concentração plasmática média (com erro padrão médio) de IGF-I em vacas lactantes durante desafio de ACTH.

8.3.2 Câmara Climática

As médias de cortisol plasmático encontradas para os animais mantidos durante 7 dias em câmara climática em situação de estresse calórico são apresentadas na Figura 34. Não houve interação entre dias de permanência na câmara e tempos de colheita de dados ($P>0,05$). O tempo de permanência sob alta temperatura também não influenciou os níveis de cortisol ($P>0,05$). Apesar dos maiores valores terem sido observados no tempo 120, não houve diferença estatística entre os tempos ($P>0,05$). Todos os valores estavam acima dos encontrados no pico de produção de cortisol após a aplicação do ACTH.

Durante o estresse calórico o IGF-I plasmático não apresentou alteração significativa, independente do dia e do tempo de colheita ($P>0,05$; Figura 35). Entretanto, sua diminuição entre os dias 3 e 7 pode estar relacionada à redução da produção de leite.

Os níveis de cortisol plasmático foram maiores durante o período na câmara climática do que no desafio de ACTH para os tempos 0 e 120 ($P<0,01$), porém no tempo 60 minutos as concentrações plasmáticas foram semelhantes ($P=0,22$). Para o IGF-I menores valores foram encontrados nas colheitas durante o estresse calórico comparadas à administração de ACTH ($P<0,01$).

Figura 34 - Concentrações plasmáticas de cortisol (com erro padrão médio) de vacas lactantes mantidas em câmara climática em situação de estresse calórico, após 3, 5 e 7 dias de permanência.

Figura 35 - Concentrações plasmáticas de IGF-I (com erro padrão médio) de vacas lactantes mantidas em câmara climática em situação de estresse calórico, após 3, 5 e 7 dias de permanência.

O tempo de exposição ao calor dentro da câmara influenciou significativamente as variáveis fisiológicas: temperatura retal, temperatura superficial e frequência respiratória ($P < 0,001$). Contudo, não houve influência dos dias de

permanência sobre elas ($P>0,05$; Tabela 15). No tempo 0 foram observadas as menores médias em relação aos tempos após o início da exposição ao calor ($P<0,001$). Mesmo duas horas após o desligamento do aquecimento os animais ainda permaneciam com valores acima do considerado conforto (tempo 0).

A temperatura retal mostrou correlação forte e positiva ($P<0,01$) com a frequência respiratória (0,71) e moderada e positiva com a temperatura de superfície corporal (0,57), que podem ser observadas nas Figuras 36 e 37.

Tabela 15 - Média seguida de erro padrão médio de temperatura retal, temperatura superficial e frequência respiratória de vacas holandesas lactantes mantidas em câmara climática em situação de estresse calórico por 7 dias.

	Tempo de colheita (min)			
	0	60	120	300
Temperatura retal (°C)				
	38,10(0,14) ^b	38,54(0,15) ^a	38,81(0,13) ^a	38,83(0,12) ^a
Temperatura superficial (°C)				
	31,97(0,68) ^c	35,10(0,24) ^{ab}	35,49(0,14) ^a	34,23(0,18) ^b
Frequência respiratória (mov.min⁻¹)				
	44(3,8) ^b	65(4,0) ^a	75(4,9) ^a	66(3,6) ^a

Letras minúsculas iguais na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey-Kramer ($P>0,05$).

Figura 36 – Correlação entre temperatura retal e frequência respiratória de vacas Holandesas lactantes mantidas em câmara climática sob estresse calórico.

Figura 37 – Correlação entre temperatura de superfície corporal e frequência respiratória de vacas holandesas lactantes mantidas em câmara climática sob estresse calórico.

Figura 38 - Produção de leite de vacas holandesas mantidas em câmara climática sob estresse calórico. Valores entre as linhas pontilhadas se referem ao período dentro da câmara climática (Dia 0 entrada, dia 7 saída).

Foi observada queda na produção de leite durante os 3 primeiros dias de estresse calórico em relação aos dias antes da entrada na câmara climática ($P < 0,05$, Figura 38). Entretanto, já a partir do 4º dia a média de produção retornou à valores semelhantes aos do início do experimento ($P > 0,05$) e após seu término a produção voltou aos patamares encontrados antes da exposição ao calor ($P < 0,05$).

8.4 Discussão

Quando comparados aos valores basais, as concentrações de cortisol aumentaram significativamente após a administração do ACTH. Em geral, os resultados encontrados no presente estudo foram similares aos observados por outros autores (NEGRÃO et al., 2004; VEISSIER, Le NEIDRE, 1988; VEISSIER et al., 1999).

Concentrações de $3,5 \text{ ng.ml}^{-1}$ são consideradas normais para um animal em conforto (SMITH, 1993). Para animais em situação de estresse calórico a literatura apresenta valores entre $4,5$ e $15,6 \text{ ng.ml}^{-1}$ (ARCARO, 2005; RONCHI et al., 2001; WISE et al., 1988) e alguns valores mais altos entre $21,5$ a $43,0 \text{ ng.ml}^{-1}$ (CHAIYABUTR et al., 2008; CHRISTISON; JONHSON, 1972; Du PREEZ et al., 2000).

As altas médias de cortisol observadas no tempo 0 durante a permanência na câmara climática podem ter sido influenciadas pela ordenha, que ocorreu 30 minutos antes da colheita. Neste horário a câmara climática encontrava-se desligada. Negrão et al. (2004) observou picos de cortisol 20 minutos após a ordenha, assim como Gorewit et al., 1992; Rushen et al., 2001. Todavia, com o uso de ACTH a máxima resposta do cortisol obtida foi menor do que os valores encontrados logo após a ordenha, resultado inverso encontrado por Lay et al. (1996) e Veissier et al. (1999). No caso do presente estudo, o estresse calórico pode ser o efeito principal dos altos níveis de cortisol plasmático encontrados nas vacas em câmara climática.

Situações adversas desencadeiam respostas das adrenais, que resultam em um aumento de glicocorticóides. Estes aumentos são a primeira resposta de mecanismos endócrinos para defender o organismo contra as condições estressantes (MÖSTL; PALME, 2002). Entretanto, como mecanismo fisiológico o estresse não é por si só ruim (MOBERG, 2000). Como exemplo, o cortisol é liberado em resposta a situações em que não são consideradas normalmente estressantes

como a ordenha e a cópula (BROOM; JOHNSON, 1993). Por este motivo, é ideal determinar o valor basal dos hormônios do estresse com o uso do ACTH para verificar com eficiência uma condição estressante.

Neste sentido, o pico de cortisol observado 60 minutos após aplicação do ACTH pode servir como referência de um animal em estresse, confirmando que todas as medidas realizadas nos animais sob estresse calórico em câmara climática estavam com níveis altos de cortisol, evidenciando a ausência de conforto térmico.

Os valores de IGF-I encontrados neste estudo estão de acordo com outros autores que verificaram concentrações plasmáticas entre 67,2 e 98,4 ng.ml⁻¹, sem diferenças entre animais em conforto e em estresse térmico (CHAIYABUTR et al., 2008). Já McGuire et al. (1991), apesar de também não ter relatado influência do estresse térmico sobre as concentrações de IGF-I, encontrou valores menores, entre 21,5 a 29,0 ng.ml⁻¹.

Apesar dos resultados de temperatura retal terem apresentado valores mais altos após exposição ao sol, não ultrapassaram o limite de 39,5°C considerado normal para a espécie (DU PREEZ, 2000). Entretanto, um aumento de menos de 1 °C na temperatura retal pode ser suficiente para reduzir o desempenho da maioria das espécies (McDOWELL et al., 1976). Provavelmente, os animais conseguiram evitar um maior aumento da temperatura corporal pela perda de calor com o aumento da frequência respiratória, considerado um indicador mais sensível do estresse térmico (BROWN-BRANDL et al., 2005), que ultrapassou 60 mov.min⁻¹, considerado limite de conforto (ANDERSSON; JÓNASSON, 1996; HAHN et al., 1997).

O aumento de quase 4°C na temperatura superficial observado durante a exposição ao calor com o aquecimento da câmara é uma boa medida para descrever o microclima que envolvia as vacas (COLLIER et al., 2006).

Martello et al. (2009) também encontraram correlações moderada a altas e positivas entre a temperatura retal e frequência respiratória e temperatura superficial.

A diminuição na produção de leite está relacionada ao estresse calórico, e à consequente redução na ingestão de matéria seca (WEST; MULLINIX; BERNARD, 2003). Na tentativa de perder calor a vaca aumenta sua frequência respiratória e diminui a ingestão (COLLIER et al, 2004; McGUIRE et al., 1991), reduzindo o balanço energético (COLLIER et al., 2006). Esse aspecto pode ter levado também a

diminuição do IGF-I circulante (COLLIER et al., 2008). Como observado no presente estudo, a produção voltou aos patamares médios após três dias de estresse calórico. Neste caso, o animal pode se adaptar as condições ambientais de calor através de uma gradual aclimação (PROSSER; BROWN, 1969)

Durante o estresse de curto prazo, os glicocorticóides melhoram o desempenho pela mobilização de energia e podem mudar o comportamento (KORTE; BOUWS; BOHUS, 1993). Dentro da câmara climática os animais permaneciam a maior parte do tempo sem atividade aparente, como forma de diminuir o metabolismo. No entanto, o estresse crônico grave (longos períodos de altas concentrações de cortisol) pode diminuir o desempenho individual pela imunossupressão e atrofia dos tecidos como a glândula mamária (DOBSON; SMITH, 1995), com diminuição da produtividade (GAUGHAN et al., 2009).

8.5 Conclusão

Tanto a administração de ACTH quanto a exposição ao calor prolongado em câmara climática aumentaram os níveis de cortisol plasmático. Durante o estresse calórico houve diminuição do IGF-I e aumento das variáveis fisiológicas ligadas a termorregulação. Apesar de ter havido diminuição da produção de leite nos primeiros dias de estresse calórico, os animais mantiveram sua produtividade após três dias de aclimação.

9. Conclusões gerais e implicações

Este trabalho teve como proposta buscar conhecimento sobre respostas hormonais, fisiológicas e comportamentais de vacas holandesas mantidas em conforto térmico proporcionado por climatização.

As vacas mantidas em sistema de climatização durante a lactação apresentaram um índice de capacidade termolítica maior, mostrando mais eficiência na perda de calor em situação de estresse calórico. O ambiente climatizado também se mostrou eficiente durante os meses mais quentes do ano, observado pelo aumento do tempo de alimentação diurno e produção de leite, e melhor qualidade do leite pela maior porcentagem de gordura.

Como o aumento da temperatura ambiente influencia de forma positiva nas variáveis fisiológicas ligadas à termorregulação, o uso de ventiladores e nebulização pode se restringir ao período do ano onde há maior radiação solar e maiores temperaturas mínimas, como na primavera e verão. Evitando a diminuição da produtividade e o aumento da gordura no leite o produtor pode aumentar seu lucro na atividade, uma vez que alguns laticínios remuneram pela qualidade do leite.

Os valores encontrados para o pico de cortisol após aplicação de ACTH são semelhantes aos valores encontrados para os animais no período dentro da câmara climática, evidenciando a situação de estresse calórico também observado pela diminuição da produtividade. Da mesma forma, em comparação com o valor de cortisol encontrado para a situação antes da aplicação do ACTH, que pode ser considerada o padrão basal para os animais deste estudo, as concentrações plasmáticas no experimento durante o ano estiveram acima desse nível. Portanto, neste caso, apesar da ausência de indicadores fisiológicos de estresse calórico, como o aumento de temperatura retal e frequência respiratória, as concentrações de cortisol evidenciam que os animais deveriam estar sob estresse, calórico ou não. Esses resultados indicam a necessidade de mais estudos para buscar a fonte dos altos valores de cortisol encontrados para os animais desse rebanho, bem como uma maior investigação sobre a relação entre o cortisol e IGF-I, não evidenciada neste trabalho.

Tais conhecimentos podem auxiliar na adoção do manejo mais adequado a cada propriedade brasileira de forma a melhorar o ambiente térmico das instalações e buscar o aumento de produtividade.

10. Referências

- ALILA-JOHANSSON, A.; ERIKSSON, L.; SOVERI, T.; LAAKSO, M. Serum cortisol levels in goats exhibit seasonal but not daily rhythmicity. **Chronobiology International**, New York, v.20, n.1, p.65-79, 2003.
- ALNAIMY, A. HABEEB, M. FAYAZ, I. MARAI, M. KAMAL, T.H. Heat stress. In: PHILLIPS, C. PIGGINS, D. **Farm animals and the environment**. Wallingford: CAB International, 1992. Cap.2, p.27-47.
- ANDERSSON, B.E.; JÓNASSON, H. Regulação da temperatura e fisiologia ambiental. In: SWENSON, M.J. (Ed.) **Dukes - Fisiologia dos animais domésticos**. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p.805-841.
- ANSELL, R.H. Extreme heat stress in dairy cattle and its alleviation: a case report. In: CLARK, J.A. (Ed.), **Environmental Aspects of Housing for Animal Protection**., London, United Kingdom: Butterworths, 1981. p.285-306.
- ARCARO, J.R.P. **Efeitos do sistema de resfriamento adiabático evaporativo em free-stall sobre a produção, fisiologia, comportamento e ocorrência de mastite em vacas em lactação**. 2005. 124 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2005.
- ARMARIO, A.; GARCIA-MARQUEZ, C. JOLIN, T. Crowding-induced changes in basal and stress levels of thyrotropin and somatotropin in male rats. **Behavioral and Neural Biology**, New York, v.48, p.334-343, 1987.
- AVENDAÑO-REYES, L.; ALVAREZ-VALENZUELA, F.D.; CORREA-CALDERÓN, A.; SAUCEDO-QUINTERO, J.S.; ROBINSON, P.H.; FADEL, J.G. Effect of cooling Holstein cows during the dry period on postpartum performance under heat stress conditions. **Livestock Science**, Amsterdam, v.105, n.1-3, p.198-206, 2006.
- BACCARI JR, F. Adaptação de sistemas de manejo na produção de leite em clima quente. In: SILVA, I.J.O. (Ed.) **Ambiência na produção de leite em clima quente**, Piracicaba: FEALQ, 1998. p.24-67.
- BACCARI JR, F.; POLASTRE, R.; FRÉ, C.A.; ASSIS, P.S. Um novo índice de tolerância ao calor para bubalinos. Correlação com ganho de peso. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 23., 1986, Campo Grande. **Anais...**Campo Grande:SBZ, 1986. p.316.
- BARBOSA, O.R.; BOZA, P.R.; SANTOS, G.T.; SAKAGUSHI, E.S.; RIBAS, N.P. Efeitos da sombra e da aspersão de água na produção de leite de vacas da raça Holandesa durante o verão. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, Maringá, v.26, n.1, p.115-122, 2004.
- BERMAN, A. Nychthermeral and seasonal patterns of thermoregulation in cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v.19, p.181–188, 1968.
- BERMAN, A., Y. FOLMAN, M. KAIM, M. MAMEN, Z. HERZ, D. WOLFENSON, A. ARIELI, AND Y. GRABER. Upper critical temperatures and forced ventilation effects

for high-yielding dairy cows in a subtropical environment. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.68, p.1488–1495, 1985.

BIANCA, W. Reviews of the progress of dairy science. Section A. Physiology. Cattle in a hot environmental. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v.32, p.291-345, 1965.

BROWN-BRANDL, T.M.; NIENABER, J.A.; EIGENBERG, R.A.; MADER, T.L.; MORROW, J.L.; DAILEY, J.W. Comparison of heat tolerance of feedlot heifers of different breeds. **Livestock Science**, Amsterdam, v.105, p.19-26, 2006.

BROWN-BRANDL, T.M.; EIGENBERG, R.A.; HAHN, G.L.; NIENABER, J.A.; MADER, T.L.; SPIERS, D.E.; PARKURST, A.M. Analyses of thermoregulatory responses of feeder cattle exposed to simulated heat waves. **International Journal of Biometeorology**, Lisse, v.49, p.285-296, 2005.

BROOM, D.M.; JOHNSON, K. G. **Stress and animal welfare**. London: Chapman & Hall, 1993.

BROOM, D.M.; MOLENTO, C.F.M. Bem-estar: conceito e questões relacionadas – Revisão. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v.9, n.2, p.1-11, 2004.

CALEGARI, F.; CALAMARI, L; FRAZZI, E. Effects of ventilation and misting on behaviour of dairy cattle in the hot season in south Italy. In: INTERNATIONAL DAIRY HOUSING, 5., 2003, Texas-USA. **Proceedings...**Texas:ASABE, 2003. p.303-311.

CARVALHO, N.M.; OLIVO, C.J.; TRONCO, V.; BURIOL, G.A. Efeitos da disponibilidade de sombra, durante o verão, sobre a composição do leite de vacas da raça holandesa. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, Santa Maria, v.4, n.2, p.19-24, 1996.

CARTER, B.H. **Mitigating heat stress on dairy farms during three phases of production**. 2008. 87p. Master of Science – Texas A&M University, Texas, 2008.

CHAIYABUTR, N.; CHANPONGSANG S.; SUADSONG, S. Effects of evaporative cooling on the regulation of body water and milk production in crossbred Holstein cattle in a tropical environment. **International Journal of Biometeorology**, Lisse, v.52, p.575–585, 2008.

CHRISTISON, G. I.; JOHNSON, H. D. Cortisol turnover in heat-stressed cows. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.35, p.1005-1010, 1972.

COENTRÃO, C.M.; SOUZA, G.N.; BRITO, J.R.F.; PAIVA E BRITO, M.A.V.; LILENBAUM, W. Fatores de risco para mastite subclínica em vacas leiteiras. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.60, n.2, 2008.

COLLIER, R.J.; DOELGER, S.G.; HEAD, H.H; THATCHER, W.W.; WILCOX, C.J. Effects of heat stress during pregnancy on maternal hormone concentrations, calf birth weight and postpartum milk yield of Holstein cow. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.54, p.309-319, 1982.

COLLIER, R.J.; BAUMGARD, L.H.; LOCK A.L.; BAUMAN, D.E. Physiological limitations, nutrient partitioning. In: WISEMAN, J.; SYLVESTOR, R. **Yields of farmed species: constraints and opportunities in the 21st century**. Nottingham, UK: Nottingham Univ. Press; 2004. p. 351–78.

COLLIER, R.J.; DAHL, G.E.; VANBAALE, M.J. Major Advances Associated with Environmental Effects on Dairy Cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.89, p.1244–1253, 2006.

COLLIER, R.J.; MILLER, M.A.; McLAUGHLIN, C.L.; JOHNSON, H.D.; BAILE, C.A. Effects of recombinant bovine somatotropin (rbST) and season on plasma and milk insulin-like growth factors I (IGF-I) and II (IGF-II) in lactating dairy cows. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v.35, p.16-23, 2008.

CORREA-CALDERON, A.; ARMSTRONG, D.; RAY, D.; DENISE, S.; ENNS, M.; HOWISON, C. Thermoregulatory responses of Holstein and Brown Swiss Heat-Stressed dairy cows to two different cooling systems **International Journal of Biometeorology**, Lisse, v.48, p.142-148, 2004.

CROWDER, M.J.; HAND, P.J. **Analysis of repeated measures**. London: Chapman & Holl, 1990.

DAHL, G. E.; ELSASSER, T.H.; CAPUCO, A.V.; ERDMAN, R.A.; PETERS, R.R. Effects of a long daily photoperiod on milk yield and circulating concentrations of insulin-like growth factor-I. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.80, p.2784-2789, 1997.

DAMASCENO, J. C. BACCARI, F. TARGA, L. A. Behavior responses of Holstein dairy cows with constant or limited access to shade. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.34, n.4, p.709-715, 1999.

DOBSON, H.; SMITH, R.F. Stress and reproduction in farm animals. **Journal of Reproduction and Fertility: Supplement**, Oxford, v.49, p.451–61, 1995.

DU PREEZ, J.H. Parameters for determination and evaluation of heat stress in dairy cattle in South Africa. **Onderstepoort Journal Veterinary Research**, Pretoria, v.67, p.263-271, 2000.

EL-NOUTY, F.D.; ELBANNA, I.M.; DAVIS, T.P.; JOHNSON, H.D. Aldosterone and ADH response to heat and dehydration in cattle. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v.48, p.249–255, 1980.

ELVINGER, F.; NATZKE, R.P.; HANSEN, P.J. Interactions of Heat Stress and Bovine Somatotropin Affecting Physiology and Immunology of Lactating Cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.75, p.449-462, 1992.

FEHR, R.L.; PRIDDY, K.T.; McNEILL, S.G.; OVERHULTS, D.G. Limiting swine stress with evaporative cooling in the southeast. **Transactions of American Society of Agricultural Engineering**, St. Joseph, v.26, n.4, p.542-545, 1993.

FERREIRA, F.; PIRES, M.F.A.; MARTINEZ, M.L.; COELHO, S.G.; CARVALHO, A.U.; FERREIRA, P.M.; FACURY FILHO, E.J.; CAMPOS, W.E. Parâmetros

fisiológicos de bovinos cruzados submetidos ao estresse calórico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.58, n.5, 2006.

FRAZZI, E.; CALAMARI, L.; CALEGARI, F.; MAIANTI, M.G.; CAPPA, V. The aeration, with or without misting: effects on heat stress in dairy cows. In: INTERNATIONAL LIVESTOCK ENVIRONMENT SYMPOSIUM, 5., 1997, Minnesota. **Proceedings...**St. Joseph:ASAE, 1997. p.907-914.

FRAZZI, E.; CALAMARI, L.; CALEGARI, F. Animal welfare indicator and behaviour of dairy cows exposed to different climatization systems during summer season. In: INTERNATIONAL LIVESTOCK ENVIRONMENT SYMPOSIUM, 6., 2001, Louisville. **Proceedings...**Kentucky:ASAE, 2003. p.22-28.

FRAZZI, E.; CALAMARI, L.; CALEGARI, F.; STEFANINI, L. Behavior of dairy cows in response to different barn cooling systems. **Transactions of the ASAE**, St. Joseph, v.43, n.2, p.387-394, 2000.

FREGONESI, J.A.; LEAVER, J.D. Behaviour, performance and health indicators of welfare for dairy cows housed in strawyard or cubicle systems. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v.68, p.205-216, 2001.

FREITAS, M.S.; MISZTAL, I.; BOHMANOVA, J.; WEST, J. Utility of on- and off-farm weather records for studies in genetics of heat tolerance. **Livestock Science**, Amsterdam, v.105, n.1-3, p.223-228, 2006.

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

FUQUAY, J.W. Heat stress as it affects animal production. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.32, p.164-174, 1981.

GAUGHAN, J.B.; HOLT, S.M.; HAHN, G.L.; MADER T. L.; EIGENBERG R. Respiration Rate – Is It a Good Measure of Heat Stress in Cattle? **Asian-Australasian Journal Animal Science**, Seoul, v.13 Supplement, p. 329-332, 2000.

GAUGHAN, J.B.; TAIT, L.A.; EIGENBERG, R.; BRYDEN, W.L. Effect of shade on respiration rate and rectal temperature of Angus heifers. **Proceedings of Australian Society of Animal Production**, Park Ridge, v.25, p.69–72, 2004.

GAUGHAN, J.B.; LACETERA, N.; VALTORTA, S.E.; KHALIFA, H.H.; HAHN, L.; MADER, T. Response of domestic animals to climatic challenges. In: EBI, K.L.; BURTON, I.; MCGREGOR, G.R. **Biometeorology for adaptation to climate variability and change**. Netherlands: Springer, 2009. Cap. 7, p. 131-170.

GOREWIT, R.C.; SVENNERSTEN, K.; BUTLER, W.; UVNAS-MOBERG, K. Endocrine responses in cows milked by hand and machine. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.75, p.443–448, 1992.

HADSELL, D.L.; BAUMRUCKER, C.R.; KENSINGER, R.S. Effects of elevated blood insulin-like growth factor-I (IGF-I) concentration upon IGF-I in bovine mammary

secretions during the colostrum phase. **Journal of Endocrinology**, Bristol, v.137, n.2, p.223-230, 1993.

HAHN, G.L. Bioclimatologia e instalações para bovinos leiteiros. In: WORKSHOP BRASILEIRO DE BIOCLIMATOLOGIA ANIMAL, 2., 1993, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal:FUNEP, 1993.

HAHN G. L.; PARKHURST, A.M.; GAUGHAN, J.B. Cattle respiration rate as a function of ambient temperature. **Transactions of ASAE.**, St. Joseph, Paper n.MC97-121, 1997.

HAHN, G.L. Dynamic responses of cattle to thermal heat loads. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.77,n.2, p.10-20, 1999.

HARMON, R.J.; RENEAU, J.K. **Fatores que afetam a contagem de células somáticas no leite**. Curitiba: Altech do Brasil, 1993.

HILLMAN, P.E.; LEE, C.N.; WILLARD, S.T. Thermoregulatory responses associated with lying and standing in heat-stressed dairy cows. **Transactions of the ASABE**, St. Joseph, v.48, n.2, p.795-801, 2005.

HIRAYAMA, T.; KATOH, K.; OBARA, Y. Effects of heat exposure on nutrient digestibility, rumen contraction and hormone secretion in goats. **Animal Science Journal**, Tokyo, v.75, p.237-243, 2004.

HOLZENBERGER, M. The GH/IGF-I axis and longevity. **European Journal of Endocrinology**, Oslo, v.151, p.S23-S27, 2004.

HUDSON, S.; MULLORD, M.; WHITTLESTONE, W.G.; PAYNE, E. Diurnal variations in blood cortisol in the dairy cow. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.58, n.1, p.30-33, 1975.

IGONO, M.O.; JOHNSON, H.D.; STEEVENS, B. J.; KRAUSE, G.F.; SHANKLIN, M.D. Physiological, Productive, and Economic Benefits of Shade, Spray, and Fan System Versus Shade for Holstein Cows During Summer Heat. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.70, p.1069-1079, 1987.

IGONO, O.; JOHNSON, H.D.; STEEVENS, B.J.; HAINEN, W.A.; SHANKLIN, M.D. Effect of season on milk temperature, milk growth hormone, prolactin, and somatic cell counts of lactating cattle. **International Journal of Biometeorology**, Lisse, v.32, n.3, p. 194-200,1988.

IGONO, M. O.; BJOTVEDT, G.;SANFORD-CRANE, H.T. Environmental profile and critical temperature effects on milk production of Holstein cows in desert climate. **International Journal of Biometeorology**, Lisse, v.36, p.77-87, 1992.

JACOBSEN, K.L. (Ed.), **The Well-Being of Dairy Cows in Hot and Humid Climates. II. Reducing Stress**. Compendium of Continuing Education in Practical Veterinary, vol. 18. Trenton, NJ: Veterinary Learning Systems, 1996. p.242-254.

JOHNSON, H.D. Environmental management of cattle to minimize the stress of climatic change. **International Journal of Biometeorology**, Lisse, v.24, p.65-78, 1980.

KABUNGA, J. D. The influence of thermal conditions on rectal temperature, respiration rate and pulse rate of lactating Holstein-Friesian cows in the humid tropics. **International Journal of Biometeorology**, Lisse, v.36, p.146-150, 1992.

KADZERE, C.T., MURPHY, M.R., SILANIKOVE, N., MALTZ, E. Heat stress in lactating dairy cows: a review. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v.77, p.59–91, 2002.

KENDALL, P.E.; AUCTIONG, T.L.; SWANSON, K.S.; RADCLIFF, R.P.; LUCY, M.C.; DRACKLEY, J.K.; DAHL, G.E. Effect of photoperiod on hepatic growth hormone receptor 1A expression in steer calves. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.81, p.1440-1446, 2003.

KENDALL, P.E.; VERKERK, G.A.; WEBSTER, J.R.; TUCKER, C.B. Sprinklers and shade cool cows and reduce insect-avoidance behavior in pasture based dairy systems. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.90, p.3671-3680, 2007.

KNIGHT C.H.; FOWLER P.A.; WILDE C.J. Galactopoietic and mammogenic effects of long-term treatment with bovine growth hormone and thrice daily milking in goats. **Journal of Endocrinology**, Bristol, v.127, p.128–138, 1990.

KORTE, S.M.; BOUWS, G.A.H.; BOHUS, B. Central actions of corticotropin-releasing hormone (CR-H) on behavioral, neuroendocrine and cardiovascular regulation: brain corticoid receptor involvement. **Hormones and Behavior**, New York, v.27, p.167–83, 1993.

LAY, Jr., D.C. et al. Adrenocorticotrophic hormone dose response and some physiological effects of transportation on pregnant Brahman cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.74, p.1806–1811, 1996.

LUCY, M.C.; BECK, J.; STAPLES, C.R.; HEAD, H.H.; DE LA SOTA, R.L.; Thatcher, W.W. Follicular dynamics, plasma metabolites, hormones and insulin-like growth factor I (IGF-I) in lactations cows with positive or negative energy balance during the preovulatory period. **Reproduction Nutrition Development**, Cambridge, v. 32, n.4, p.331-341, 1992.

MacADAM, W.R.; EBERHART, R.J. Diurnal Variation in Plasma Corticosteroid Concentration in Dairy Cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.55, n.12, p.1792-1795, 1972.

MARTELLO, L.S.; SAVASTANO JR., H.; SILVA, S.L.; TITTO, E.A.L. Respostas fisiológicas e produtivas de vacas holandesas em lactação submetidas a diferentes ambientes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Belo Horizonte, v.33, n.1, p.181-191, 2004.

MARTELLO, L.S. **Interação animal-ambiente: efeito do ambiente climático sobre as respostas fisiológicas e produtivas de vacas Holandesas em free-stall**. 2006.

106 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2006.

MARTELLO, L.S.; SAVASTANO JR., H.; SILVA, S.L.; BALIEIRO, J.C.C. Alternative body sites for heat stress measurement in milking cows under tropical conditions and their relationship to the thermal discomfort of the animals. **International Journal of Biometeorology**, Lisse, DOI 10.1007/s00484-009-0268-6, 2009.

MARTIN, P.; BATESON, P. **Measuring behavior: an introductory guide**. Cambridge University Press, 1986.

MATARAZZO, S. V. **Eficiência do sistema de resfriamento adiabático evaporativo em confinamento do tipo free-stall para vacas em lactação**. 2004. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

MAYER, D.G.; DAVIDSON, T.M.; MCGOWAN, M.R.; YOUNG, B.A.; MATSCHOSS, A.L.; HALL, A.B.; GOODWIN, P.J.; JOHNSON, N.N.; GAUGHAN, B. Extent and economic effect of heat loads on dairy cattle production in Australia. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v.77, p.804-808, 1999.

McCARTHY, T.L.; CENTRELLA, M; CANALIS, E. Cortisol inhibits the synthesis of insulin-like growth factor-I in skeletal cells. **Endocrinology**, Baltimore, v.126, p.1569-1575, 1990.

McCUSHER, R.H. Controlling insulin-like growth factor activity and the modulation of insulin-like growth factor binding protein and receptor binding. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.81, p.1790-1800, 1998.

McDOWELL, R.E., et al. Effect of climate on performance of Holstein in first lactation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 59, p 965-973, 1976.

McDOWELL, R.E. **Bases biológicas de la producción animal en zonas tropicales**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1975.

McDOWELL, R.E. **Improvement of livestock production in warm climates**. San Francisco: Freeman & Company, 1972.

McGUIRE, M.A.; BEEDE, D.K.; COLLIER, R.J.; BUONOMO, F.C.; DELORENZO, M.A.; WILCOX, C.J.; HUNTINGTON, G.B.; REYNOLDS, C. K. Effects of acute thermal stress and amount of feed intake on concentrations of somatotropin, insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-II, and thyroid hormones in plasma of lactating Holstein cows. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.69, p.2050–2056, 1991.

MILLER, K.; WOOD-GUSH, D.G.M. Some effects of housing on the social behaviour of dairy cows. **Animal Production**, Bletchley, v.53, p.271-278, 1991.

MOBERG, G.P. Biological response to stress: implications for animal welfare. In: MOBERG, G.P.; MENCH, J.A. **The biology of animal stress**. UK: CABI Publishing, 2000. p. 123–146.

MONARDES, H. Somatic cell counting and genetic improvement of resistance to mastitis. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 31, 1994, Maringá. **Anais...** Maringá: UEM, 1994. p.1-19.

MÖSTL, E.; PALME, R. Hormones as indicators of stress. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v.23, p.67-74, 2002.

MOTA, L.S. **Adaptação e interação genótipo-ambiente em vacas leiteiras**. 1997. 69 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1997.

NÄÄS, I.A. **Princípios de Conforto Térmico na produção Animal**. São Paulo: Ícone, 1989.

NÄÄS, I.A.; ARCARO JR., I. Influência de ventilação e aspersão em sistemas de sombreamento artificial para vacas em lactação em condições de calor. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.5, n.1, p.139-142, 2001.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. NRC. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7th ed. Washington, 2001. 381p.

NAZIFI, S.; SAEB, M.; KARIMI, T.; GHANBARI, S. Diurnal variation of serum biochemical parameters in the Iranian fat-tailed sheep. **Comparative Clinical Pathology**, Berlin, v.14, n.1, p.1-4, 2005.

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

NEGRÃO, J.A.; PORCIONATO, M.A.; PASILLÉ, A.M.; RUSHEN, J. Cortisol in saliva and plasma of cattle after ACTH administration and milking. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.87, p.1713-1718, 2004.

NEGRÃO, J.A.; MARNET, P.G. Milk yield, residual milk, oxytocin and cortisol release during machine milking in Gir, Gir x Holstein and Holstein cows. **Reproduction Nutrition Development**, Cambridge, v.46, p.77-85, 2006.

OLSON, T.A.; LUCENA, C.; CHASE JR., C.C.; HAMMOND, A.C. Evidence of a major gene influencing hair length and heat tolerance in Bos taurus cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.8, p.80-90, 2003.

OMINSKI, K.H.; KENNEDY, A.D.; WITTENBERG, K.M.; MOSHTAGHI NIA, S.A. Physiological and production responses to feeding schedule in lactating dairy cows exposed to short-term, moderate heat stress. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.85, p.730-737, 2002.

OSTERMAN, S., REDBO, I. Effects of milking frequency on lying down and getting up behaviour in dairy cows. **Applied Animal Behaviour Science**, Amsterdam, v.70, p.167-176, 2001.

OVERTON, M.W.; SISCHO, W.M.; TEMPLE, G.D.; MOORE, D.A. Using timelapse video photography to assess dairy cattle lying behavior in a freestall barn. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.85, p.2407–2413, 2002.

PAULETTI, P.; BAGALDO, A.R.; KINDLEIN, L.; PAZ, C.C.P.; LANNA, D.P.D.; MACHADO NETO, R. IGF-I e IgG Séricos e nas Secreções Lácteas em Vacas Tratadas com rbST no Período Pré-Parto. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Belo Horizonte, v.34, n.3, p.976-986, 2005.

PEISEN, J.N.; McDONNELL, K.J.; MUSRONEY, S.E.; LUMPKIN, M.D. Endotoxin-induced suppression of the somatotrophic axis is mediated by interleukin-1 beta and corticotropin-releasing factor in the juvenile rat. **Endocrinology**, Baltimore, v.136, p.3378-3390, 1995.

PEREIRA, A.M.F; BACCARI JR., F.; TITTO, E.A.L.; ALMEIDA, J.A.A. 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**, Lisse, v.52, n.3, p.199-208, 2008

PERISSINOTO, M. **Avaliação da eficiência produtiva e energética de sistemas de climatização em galpões tipo free-stall para confinamento de gado leiteiro**. 2003. 122f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

PERISSINOTO, M.; MOURA, D.J.; MATARAZZO, S.V.; MENDES, A.S.; NAAS, I.A. Behavior of dairy cows housed in environmentally controlled free-stall. **Agricultural Engineering International**, Hokkaido, v.8, p.1-11, 2006.

PHILPOT, N.W.; NICKERSON, S.C. **Vencendo a luta contra a mastite**. Piracicaba : Westfalia Surge/Westfalia Landtechnik do Brasil, 2002. 192p.

PORTUGAL, J.A.B.; PIRES, M.F.A. DURAES, M.C. Efeito da temperatura ambiente e da umidade relativa do ar sobre a frequência de ingestão de alimentos e de água e de ruminação em vacas da raça Holandesa. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** [online], v.52, n.2, p. 154-159, 2000.

PROSSER, C.L.; BROWN, F.A. **Comparative Animal Physiology**. London: Saunders Co., 1969.

RAVAGNOLO, O.; MISZTAL, I. Studies on genetics of heat tolerance in dairy cattle with reduced weather information via cluster analysis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.85, p.1586–1589, 2002.

RENAVILLE, R.; VAN EENAEME, C.; BREIER, B. H.; VLEURICK, L.; BERTOZZI, C.; GENGLER, N.; HORNICK, J. L.; PARMENTIER, I.; ISTASSE, L.; HAEZEBROECK, V.; MASSART, S.; PORTETELLE, D. Feed restriction in young bulls alters the onset of puberty in relationship with plasma insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding proteins. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v.18, n.2, p.65-176, 2000.

RENAVILLE, R.; HAMMADI, M.; PORTETELLE, D. Role of the somatotrophic axis in the mammalian metabolism. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v.23, n.1-2, p.351-360, 2002.

RODRIGUEZ, L.A.; MCKONNEN, G.; WILCOX, C.J. et al. Effects of relative humidity, maximum and minimum temperature, pregnancy and stage of lactation on milk production and yield. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.68, p.973-978, 1985.

RONCHI, B.; STRADAIOLI, G.; VERINI SUPPLIZI, A.; BERNABUCCI; LACETERA, N.; ACCORSI, P.A.; NARDONE, A.; SEREN, E. Influence of heat stress or feed restriction on plasma progesterone, oestradiol-17 β , LH, FSH, prolactin and cortisol in Holstein heifers. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v.68, n.2-3, p. 231-241, 2001.

RUSHEN, J.; MUNKSGAARD, L.; MARNET, P.G.; DE PASSILÉ, A.M. Human contact and the effects of acute stress on cows at milking. **Applied Animal Behaviour Science**, Amsterdam, v.73, p.1-14, 2001.

SAMPSON, J.D.; SPIERS, D.E.; SPAIN, J.N. Use of ambient and physiological markers to predict production changes in dairy cows resulting from acute heat challenge. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.82, suppl. 1, 2004.

SAS/STAT[®] **User's guide**, Release 8.2 Edition, SAS Institute, Inc. Cary, NC, 2000.

SATTERLEE, D.; ROUSSEL, J.D.; GOMILA, L.F.; SEGURA, E.T. Effect of exogenous corticotropin and climatic conditions on bovine adrenal cortical function. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.60, p.1612-1616, 1977.

SCHÜTZ, K.E.; ROGERS, A.R.; COX, N.R.; TUCKER, C.B. Dairy cows prefer shade that offers greater protection against solar radiation in summer: Shade use, behaviour, and body temperature. **Applied Animal Behaviour Science**, Amsterdam, v.116, p. 28-34, 2009.

SECHEN, S. J.; MCCUTCHEON, S. N.; BAUMAN, D. E. Response to metabolic challenges in early lactation dairy cows during treatment with bovine somatotropin. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v.6, n.2, p.141-154, 1989.

SILVA, I.J.O. Climatização das instalações para bovino leiteiro. In: SILVA, I.J.O. (Ed.) **Ambiência na produção de leite em clima quente**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.114-145.

SILVA, R.G. **Introdução à bioclimatologia animal**. Nobel, São Paulo, 2000.

SMITH, B.P. **Tratado de medicina veterinária interna de grandes animais**. São Paulo: Manole, 1993.

SHULTZ, T. A. Weather and shade effects on cow corral activities. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.67, n.4, p.868-873, 1984.

SPAIN, J.N.; SPIERS, D. Effect of fan cooling on thermoregulatory responses of lactating dairy cattle. In: INTERNATIONAL DAIRY HOUSING CONFERENCE, 4., 1998, St. Louis. **Proceedings...** St. Louis: ASAE, 1998. p.232-238.

SPIERS, D. E.; VOGT, D. W.; JOHNSON, H. D.; GARNER, G. B.; MURPHY, C. N. Heat-stress responses of temperate and tropical breeds of *Bos taurus* cattle. **Archivos Latinoamericanos de Produccion Animal**, Mayaguez, v. 2, p.41-52, 1994.

STRAUS, D.S. Nutritional regulation of hormones and growth factors that control mammalian growth. **Federation of America Societies for Experimental Biology Journal**, Bethesda, v.8, p.6-12, 1994.

TANCIN, V.; HARCEK, L.; BROUCEK, J.; UHRINCAT, M.; MIHINA, S. Effect of suckling during early lactation and changeover to machine milking on plasma oxytocin and cortisol levels and milking characteristics in Holstein cows. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v.62, p.249-256, 1995.

TAPKI, I.; SAHIN, A. Comparison of the thermoregulatory behaviours of low and high producing dairy cows in a hot environment. **Applied Animal Behaviour Science**, Amsterdam, v.99, p1-11, 2006.

TAYLOR, V.J.; BEEVER, D.E.; BRYANT, M.J.; WATHES, D.C. Pre-pubertal measurements of the somatotrophic axis as predictors of milk production in Holstein-Friesian dairy cows. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v.31, p.1-18, 2006.

TITTO, C.G., et al. Tolerância ao calor em bovinos de corte de raças européias utilizadas em cruzamento industrial no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BIOMETEOROLOGIA, 4., 2006, Ribeirão Preto. **Anais...**Ribeirão Preto:SBBIomet, 2006. CD-ROM.

TITTO, E.A.L. Clima, Influência na produção de leite. In: SILVA, I.J.O. (Ed.) **Ambiência na produção de leite em clima quente**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.10-23.

TITTO, E.A.L.; PEREIRA, A.M.F.; PASSINI, R.; BALIEIRO NETO, G.; FAGUNDES, A.C.A.; LIMA, C.G.; GUIMARÃES, C.M.C.; ABLAS, D.S. Estudo da tolerância ao calor em tourinhos das raças Marchigiana, Nelore e Simental. In: CONGRESSO DE ZOOTECNIA, 9., 1999, Porto-Portugal. **Anais...**Porto-Portugal: APEZ, 1999.

TUCKER, C.B.; ROGERS, A.R.; SCHÜTZ, K.E. Effect of solar radiation on dairy cattle behaviour, use of shade and body temperature in a pasture-based system. **Applied Animal Behaviour Science**, Amsterdam, v.109, p.141–154, 2008.

TURNER, L. W. Fan and high pressure mist (fog) system performance for cooling lactating cows. In: *INTERNATIONAL DAIRY HOUSING CONFERENCE*, 4., 1998, St Louis, Mo., **Proceedings...** St.Joseph, Michigan: ASAE, 1998. p. 201-208.

USDA, 2009. **Dairy: World markets and trade**. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/dlp/circular/2009/122909dairyfull.pdf>>. Acesso em: 20 abr. 2010.

- URIBE-VELASQUEZ, L.F.; OBA, E.; BRASIL, L.H.A. et al. Concentrações plasmáticas de cortisol, hormônios tireoideanos, metabólicos lipídicos e temperatura corporal de cabras alpinas submetidas ao estresse térmico. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Belo Horizonte, v.6, p.1123-1130, 1998.
- VEISSIER, I.; LE NEINDRE, P. Cortisol responses to physical and pharmacological stimuli in heifers. **Reproduction Nutrition Development**, Cambridge, v.28, p.553-562, 1988.
- VEISSIER, I.; VAN REENEN, C.G.; ANDANSON, S.; LEUSHUIS, I.E. Adrenocorticotrophic hormone and cortisol in calves after corticotropin-releasing hormone. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.77, p.2047-2053, 1999.
- VERWOERD, W.; WELLBY, M.; BARRELL, G. Absence of a causal relationship between environmental and body temperature in dairy cows (*Bos taurus*) under moderate climatic conditions. **Journal of Thermal Biology**, Oxford, v.31, n.7, p.533-540, 2006.
- WAGNER-STORCH, A.M.; PALMER, R.W.; KAMMEL, D.W. Factors affecting stall use for different free-stall bases. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.86, p.2253-2266, 2003.
- WEBSTER, A.J.F.; OSUJI, P.O.; WEEKES, T.E.C. Origins of the heat increment of feeding in sheep. In: Symposium Energy Metabolism, 7., Vichy, France. **Proceedings...** France:EAAP Publication 19, 1976. p. 45-53.
- WELDY, J.R.; MCDOWELL, R.E.; BOND, J.; VAN SOEST, P.J. Responses of winter-conditioned heifers under prolonged heat stress. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.47, p.691-692, 1964.
- WEST, J.W. Nutritional strategies for managing the heatstressed dairy cow. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.82, p.21-35, 1999.
- WEST, J. Effects of heat-stress on production in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.86, p.2131-2144, 2003.
- WEST, J.; MULLINIX, B.G.; BERNARD, J.K. Effects of hot, humid weather on milk temperature, dry matter intake, and milk yield of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.86, p.232-242, 2003.
- WISE, M.E.; ARMSTRONG, D.V.; HUBER, J.T.; HUNTER, R.; WIERSMA, F. Hormonal alterations in the lactating dairy cow in response to thermal stress. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.71, p.2480-2485, 1988.
- ZÄHNER, M.; SCHRADER, L.; HAUSER, R.; KECK, M.; LANGHANS, W.; WECHSLER, B. The influence of climatic conditions on physiological and behavioural parameters in dairy cows kept in open stables. **Animal Science**, Penicuik, v.78, p.139-147, 2004.