UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

Biomarcadores de Aclimatação na Saliva - Estudo em vacas leiteiras com diferente potencial leiteiro

Liliana Margarida Sargento Cachucho

Orientação:
Doutora Elsa Cristina Carona de Sousa Lamy
Professor Doutor Alfredo Manuel Franco Pereira

Mestrado em Engenharia Zootécnica

Dissertação

Évora, 2015

UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

Biomarcadores de Aclimatação na Saliva - Estudo em vacas leiteiras com diferente potencial leiteiro

Liliana Margarida Sargento Cachucho

Orientação:
Doutora Elsa Cristina Carona de Sousa Lamy
Professor Doutor Alfredo Manuel Franco Pereira

Mestrado em Engenharia Zootécnica

Dissertação

Évora, 2015

Aos meus pais e à minha irmã, por tudo.

Ao David, por toda a "amizade" e Ciência.

Dedico.

Agradecimentos

Por ser um trabalho extenso e do qual é necessária uma enorme dedicação, quero agradecer a todos os que me ajudaram e que contribuíram para que fosse possível a sua realização.

Em primeiro lugar, quero agradecer à Doutora Elsa Lamy, por ter aceitado ser minha orientadora, pelo acompanhamento incansável e constante orientação, disponibilidade, enorme dedicação e simpatia.

Agradeço ao Professor Doutor Alfredo Pereira, por ter aceitado ser meu coorientador, por ter sido um excelente professor ao longo de todos os anos de licenciatura e mestrado, por toda a ciência, paciência e pela transmissão de conhecimentos.

Gostaria de agradecer à Qui (Ana Geraldo), por toda a ajuda na recolha de amostras de campo e laboratório, pela orientação da equipa e por todos os bons momentos passados. Um enorme obrigado à Lénia Rodrigues, pelo apoio incansável no laboratório, por toda a paciência e amizade, que tornou possível a realização deste trabalho. Agradeço também aos professores que estiveram envolvidos neste projeto, Professora Cristina Pinheiro, por todos os conhecimentos transmitidos, e ao Professor Fernando Capela e Silva por ter disponibilizado o laboratório de fisiologia animal para as análises laboratoriais. À Vânia Resende e ao Joaquim Velhinho, agradeço toda a colaboração, hospitalidade e pelos momentos fantásticos que proporcionaram.

Agradeço à Sociedade Nacional Rústica, nomeadamente à Senhora Alzira Lopes e Senhor Rui Rosa, por terem permitido a realização do trabalho.

Ao Doutor João Fragoso, por todo o profissionalismo e auxílio na recolha de amostras. Agradeço também ao professor Paulo Infante, pela preciosa ajuda na realização da análise estatística.

Um agradecimento especial aos meus colegas e amigos Flávio Silva e Catarina Matos, pelo espírito de entreajuda, trabalho em equipa e por todos os momentos fantásticos que tornaram tudo mais fácil e motivante.

Aos meus colegas e amigos do Mestrado em Engenharia Zootécnica e da licenciatura em Ciência e Tecnologia Animal, Marisa Pereira, Ricardo Madeira, Alexandre Pilirito, Inês Vilas Boas, Katia Santos, Bruno Bento, Tomás Correia, Emanuel Carreira e Ana Luís, por serem os melhores "malinos" de sempre e por estarem sempre presentes.

Por fim, mas não em último, quero agradecer a toda a minha família, principalmente aos meus pais, José e Manuela, pelo simples facto de serem os melhores pais do mundo, pois tudo isto foi possível graças a eles. Agradeço também à minha irmã Catarina, por todo o carinho e cumplicidade, um enorme obrigado. Aos meus avós, Bárbara, Francisca e Manuel, e tios Francisco e José, por estarem sempre presentes em todos os momentos.

Um agradecimento especial ao David, pelas palavras carinhosas, pelo apoio e motivação que me deu sempre que precisei, e principalmente por nunca me deixar desistir. Obrigada por tudo. Foste essencial.

Agradeço aos meus amigos de quatro patas. À Frai, pelos abraços maravilhosos quando menos esperava, e ao Tobi pelo seu olhar reconfortante e pelos passeios fantásticos, que tornaram os dias muito agradáveis. Agradeço também às vacas, por serem animais fascinantes e "contribuírem" para a recolha das amostras.

A todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada.

Este trabalho foi financiado por Fundos FEDER através do Programa Operacional Factores de Competitividade – COMPETE e por Fundos Nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia no âmbito dos Projectos Estratégicos PEst-C/AGR/UI0115/2011 e PEst-OE/AGR/UI0115/2014. Os autores agradecem igualmente o suporte financeiro da FCT na forma do contrato de Investigador FCT de Elsa Lamy, IF/01778/2013.

Título: Biomarcadores de aclimatação na saliva – estudo em vacas leiteiras com diferente potencial leiteiro

Resumo

O ambiente térmico a que um animal está sujeito é um fator importante, que pode afetar a produção de leite. A saliva é cada vez mais utilizada como fonte de biomarcadores não invasivos, sendo o cortisol salivar o parâmetro mais frequentemente utilizado para avaliar stresse. No entanto, este último, isoladamente, apresenta algumas limitações. No presente trabalho foi feita uma comparação do perfil proteico da saliva de vacas *Holstein,* altas (AP) e baixas produtoras (BP), em três períodos diferentes: temperaturas elevadas (P1), temperaturas moderadas (P2) e temperaturas baixas (P3). Foram observados níveis de expressão das proteínas albumina e receptor polimérico de imunoglobulinas mais elevados em AP, nos P1 e P2. Os níveis de cortisol salivar não se observaram associados a stresse térmico. Ainda que necessitando de estudos futuros, os resultados obtidos reforçam o potencial da saliva na avaliação da capacidade de adaptação à temperatura, em animais produtores de leite.

Palavras-chave: Bovinos de leite, saliva, biomarcadores, stresse térmico, aclimatação, cortisol salivar

Title: Salivary biomarkers of acclimatization – study in dairy cows with different milk yield potential

Abstract

The thermal environment is one of the most important factors that can affect milk production. Saliva is increasingly used as a source of non-invasive biomarkers, with salivary cortisol being the parameter most commonly used to evaluate stress. However, cortisol evaluation, alone, has some limitations. In this study a comparison was made, in terms of saliva composition, among Holstein cows with high (AP) and low (BP) productive potential, in three different periods: high temperature (P1), moderate temperatures (P2) and low temperatures (P3). Expression levels of proteins albumin and polymeric immunoglobulin receptor were observed to be higher in AP in P1 and P2. Salivary cortisol levels were not observed to be associated with thermal stress. Although requiring further studies, the results support the potential of saliva for assessing the ability to adapt to temperature in milk-producing animals.

Keywords: Dairy cow, saliva, biomarkers, heat stress, acclimatization, salivary cortisol

Índice

Agradecimentos i
Resumo v
Abstract vi
Lista de abreviaturas ix
Índice de tabelas xi
Índice de figuras xii

1. Introdução 1
1.1. Stresse térmico 1
1.2. Aclimatação 4
1.2.1. Respostas celulares 6
1.2.2. Respostas endócrinas 8
1.3. Saliva 13
1.3.1. Síntese, composição e funções 13
1.3.2. Fatores que afetam a quantidade e qualidade da saliva 17
1.3.3. Particularidades salivares dos ruminantes 18
1.4. Biomarcadores Salivares 20
1.4.1. A saliva e o stresse térmico 23
1.5. Objetivo geral 25
1.5.1. Objetivos específicos 25

2. Material e Métodos 27
2.1. Locais e Laboratórios 27
2.2. Animais 27
2.3. Organigrama 28
2.4. Delineamento experimental 29
2.4.1. Recolha de dados e amostras 29
2.4.2. Análises laboratoriais 30
2.4.3. Análise estatística 35

3. Resultados e Discussão 37
3.1. Dados meteorológicos – Temperatura de Globo Negro 37
3.2. Dados fisiológicos - Temperatura Retal 38
3.3. Concentração proteica da saliva mista de animais de alta e baixa produção 42

3.4. Comparação do perfil proteico nos três períodos, entre animais de alta e baixa produção 43

3.4.1. Comparação do perfil eletroforético entre grupos de produção no período 1 (verão) 43

3.4.2. Comparação do perfil eletroforético entre grupos de produção no período 2 (termoneutralidade)..... 44

3.4.3. Comparação do perfil eletroforético entre grupos de produção no período 3 (inverno) 46

3.5. Identificação das proteínas presentes nas bandas diferencialmente expressas..... 46

3.6. Quantificação do cortisol salivar pelo método ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) e medição do pH salivar 48

4. Conclusão..... 53

5. Referências bibliográficas..... 54

Lista de abreviaturas

ACN	Acetonitrilo
ACTH	Hormona adrenocorticotrófica
A:P	Relação acetato:propionato
APS	Persulfato de amónio
ATPase	Adenosina trifosfato (enzima)
BSA	***B****ovine* ***S****erum* ***A****lbumin* – Albumina de soro bovino
˚C	Graus Celcius
CRH	Hormona libertadora de corticotrofinas
D	Temperatura de bolbo seco
DTT	Ditiotreitol
GH	*Growth hormone* - Hormona de crescimento
g	Grama
H_2O_{MiliQ}	Água Mili-Q (água desionizada)
HHA	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
HSP	*heat shock proteins* - Proteínas de choque térmico
IAA	Iodoacetamida
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
kDa	Kilodaltons
MG1	Mucina altamente glicolisada
MG2	Mucina pouco glicolisada
NDF	Fibra solúvel em detergente neutro
nm	Nanómetro
P1	Período 1 (Verão com altas temperaturas)
P2	Período 2 (temperaturas amenas)
P3	Período 3 (Inverno com baixas temperaturas)
PIgr	*Polymeric Immunoglobulin Receptor* – recetor polimérico de imunoglobulinas
POMC	Pró-opiomelanocortina
SDB	Domínio de ligação ao substrato
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS PAGE	Electroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
T3	Tiroxina
T4	Triiodotironina

TBS-T	Tampão Tris salino com detergente Tween
TCI	Temperatura crítica inferior
TCS	Temperatura crítica superior
TEMED	Tetrametil-etil-enodiamina
TFA	Ácido trifluoroacético
TGN	Temperatura de Globo Negro
THI	Índice de temperatura e humidade
TMB	Tetrametilbenzidina
TNZ	Zona de termoneutralidade
TR1	Temperatura retal registada às 8h
TR2	Temperatura retal registada às 13h
TR3	Temperatura retal registada às 13h
W	Temperatura de bolbo húmido
µg	Microgramas
µL	Microlitros

Índice de tabelas

Tabela 1 - Lista parcial de adaptações endócrinas durante aclimatação ao calor 13

Tabela 2 - Temperaturas de globo negro registadas diariamente no período de verão (P1) e inverno (P3)..... 37

Índice de figuras

Figura 1 - Representação esquemática das relações entre zonas de temperatura e stresse térmico nos mamíferos 2
Figura 2 - Função celular de proteínas de choque térmico 7
Figura 3 - Estrutura tridimensional da HSP70 8
Figura 4 - Estrutura tridimensional da HSP70 com domínio de ligação ao substrato (SDB) e domínio ATPase (NBD) ligados por uma sequência hidrofóbica. 8
Figura 5 - Regulação da secreção de cortisol pelo eixo hipotálamo-hipófise 11
Figura 6 - Componentes da saliva total ou mista. 14
Figura 7 - Representação topográfica das glândulas salivares: sublingual (1), mandibular (2), parótidas (3). 19
Figura 8 - Organigrama dos procedimentos efetuados 28
Figura 9 - Medição da temperatura retal 29
Figura 10 - Recolha de saliva com tampões de algodão (Salivette®, Sarstedt, Nümbrecht, Germany) 30
Figura 11 – Tampão de algodão (Salivette®, Sarstedt, Nümbrecht, Germany) 30
Figura 12 - Valores da temperatura de globo negro registada ao sol e à sombra, nos dois períodos de ensaio 38
Figura 13 - Box plot dos valores de temperatura retal medida às 8h nos 2 períodos de ensaio, para altas (AP) e baixas (BP) produtoras 39
Figura 14 - Box plot dos valores de temperatura retal medida às 13h nos 2 períodos de ensaio, para altas (AP) e baixas (BP) produtoras 39
Figura 15 - Box plot dos valores de temperatura retal medida às 18h nos 2 períodos de ensaio, para altas (AP) e baixas (BP) produtoras 40
Figura 16 - Valores das temperaturas retais registadas nos dois períodos de ensaio, em animais de alta e baixa produção 41
Figura 17 - Concentração proteica das amostras de saliva mista de bovinos de alta e baixa produção de leite, nos três períodos de ensaio 42
Figura 18 - Perfis SDS PAGE representativos de vacas com alto (AP) e baixo (BP) potencial de produção de leite 43
Figura 19 - Volumes relativos das bandas diferencialmente expressas, observadas nos perfis proteicos (SDS PAGE) 44
Figura 20 - Volumes relativos das bandas diferencialmente expressas, observadas nos perfis proteicos (SDS PAGE) 45

Figura 21 - Box plot dos valores de pH salivar nos três períodos de ensaio, para altas e baixas produtoras 49
Figura 22 - Box plot dos valores de cortisol salivar nos três períodos de ensaio, para altas e baixas produtoras 50
Figura 23 - Valores de cortisol salivar (ng/mL) nos diferentes períodos (média ± erro padrão).... 50
Figura 24 - Relação entre o cortisol salivar e a temperatura retal 52

1. Introdução

1.1. Stresse térmico

Yousef (1985) definiu o stresse como a magnitude das forças externas ao corpo que tendem a alterar o seu estado fundamental. No caso do stresse térmico, este é definido como a força exercida pelos componentes do ambiente térmico sobre um organismo, causando uma reação fisiológica diretamente proporcional à intensidade da força aplicada e inversamente proporcional à capacidade do organismo em compensar os desvios causados pela mesma força (Silva, 2000). O stresse térmico, além de uma determinada intensidade, pode ter durações muito variáveis (stresse agudo *vs* stresse crónico), as quais vão condicionar as respostas dos animais, nomeadamente à aclimatação (Geraldo, 2013).

O ambiente térmico pode afetar negativamente a produção de leite, especialmente em animais de alto potencial genético (Kadzere *et al.*, 2002). Assim que se verifica um aumento da temperatura corporal de um animal, iniciam-se uma série de ajustamentos fisiológicos que contribuem para o retorno à homeostase térmica (Reece, 2009). O facto de os animais homeotérmicos conseguirem manter a temperatura corporal dentro de determinados limites é essencial para controlar a velocidade das reações bioquímicas e processos fisiológicos associados ao metabolismo (Shearer & Beede, 1990). Desta forma, para o animal conseguir manter a homeotermia, deve estar em equilíbrio térmico com o ambiente envolvente, que inclui a radiação solar, temperatura, movimento do ar e humidade (Kadzere *et al.*, 2002).

Quando a produção e a perda de calor estão em equilíbrio, o animal encontra-se na sua zona de neutralidade térmica (TNZ) (Randall *et al.,* 2000). Na TNZ o equilíbrio entre termogénese e termólise é atingido através de vias termorreguladoras que não requerem gasto adicional de energia. A neutralidade térmica é assim definida como "o estado físico, no qual todo o calor gerado pelo organismo através do metabolismo trocado em igual proporção com o ambiente, não havendo nem acumulação de calor, nem perda excessiva do mesmo, mantendo a temperatura corporal constante". A TNZ pode ser designada por zona de produção mínima de calor e temperatura retal normal. Geralmente, a TNZ (entre a temperatura crítica inferior (TCI) e a temperatura crítica superior (TCS)) está dependente de fatores como a idade, a espécie, a raça, o consumo de alimento, a composição da dieta, o estado de aclimação ou aclimatação, o tipo de produção, as condições de alojamento, isolamento externo (revestimento), e comportamento dos animais (Yousef, 1985).

A zona de conforto para os animais é então limitada pela temperatura crítica superior (TCS) e temperatura crítica inferior (TCI), sendo que abaixo da TCI os animais sofrem stresse provocado pelo frio e acima da TCS sofrem stresse devido ao calor (Martello, 2006). A partir da

TCS e TCI é sempre necessário recorrer a respostas termorreguladoras, com custo adicional de energia. A TCS pode ser inferida a partir do desencadear das funções da termorregulação, que envolvem as perdas de calor evaporativo (sudação e polipneia térmica) (Berman *et al*., 1985).

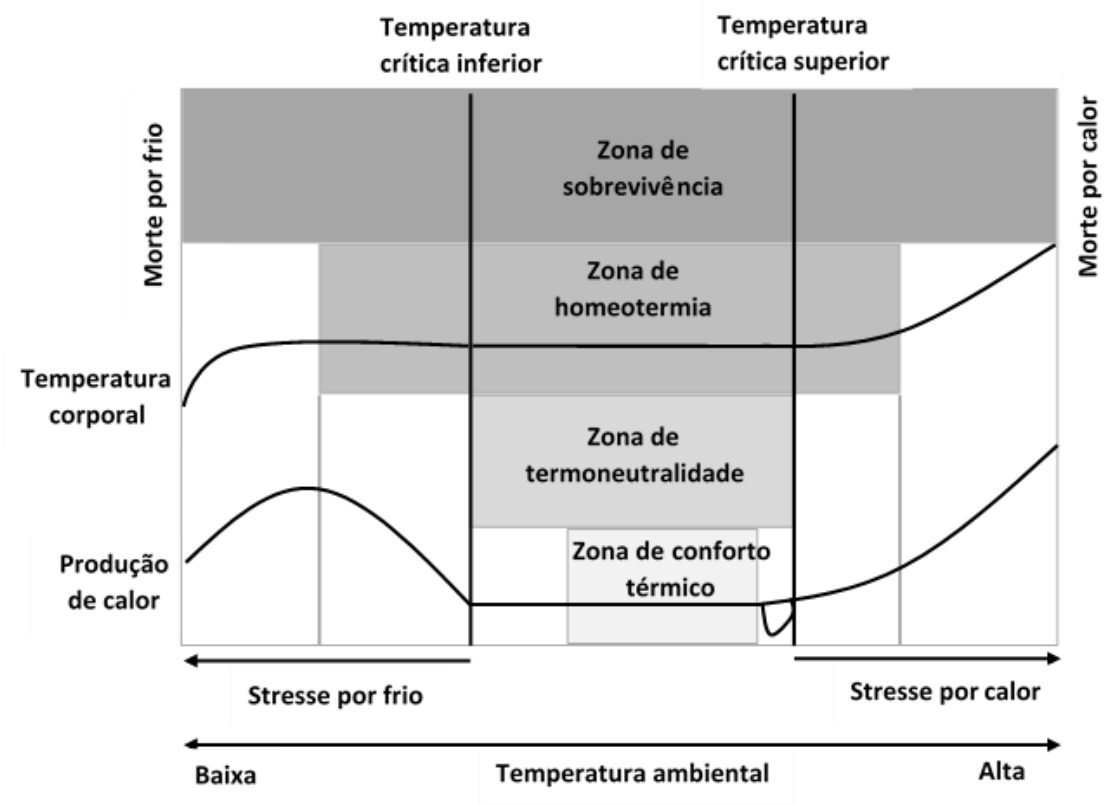


Figura 1 - Representação esquemática das relações entre zonas de temperatura e stresse térmico nos mamíferos (adaptado de Silanikove, 2000)

A temperatura corporal nos mamíferos pode ser mantida dentro de determinados limites, independentemente das variações ambientais. Para a manutenção da temperatura dentro destes limites, o animal necessita de regular a velocidade de ganho e perda de calor (Robinson, 2004, citado por Cruz *et al*, 2011). Existem várias condições térmicas entre as quais os animais são capazes de manter uma temperatura corporal relativamente estável, por meio de mecanismos fisiológicos e comportamentais. Segundo Pires & Campos (2008), a capacidade do animal resistir às condições de stresse térmico tem sido avaliada fisiologicamente por alterações na temperatura retal, frequência respiratória, frequência cardíaca e concentrações hormonais.

O stresse térmico resulta assim da incapacidade do animal para dissipar calor a uma velocidade semelhante àquela com que o adquire. Fatores como a temperatura ambiental, humidade relativa e energia radiante elevados comprometem a capacidade dos animais em manter estável a sua temperatura corporal. Desta forma, ao haver um aumento na temperatura corporal são ativados mecanismos de compensação para restabelecer a homeotermia e

homeostasia. Assim, para que os animais possam exprimir todo o seu potencial produtivo é necessário considerar qual a sua TNZ e respetivas interações entre genética, nutrição, sanidade e ambiente térmico. Este último, geralmente, engloba os efeitos da radiação solar, temperatura, humidade relativa e velocidade do ar, sendo a combinação entre temperatura e humidade relativa, muito relevante para o conforto térmico e o funcionamento geral dos processos fisiológicos (Viana *et al*., 2008).

A temperatura do ar é considerada um fator climático de grande relevância, que influencia em grande parte o ambiente físico onde o animal se encontra (McDowell, 1974).

Alguns índices têm sido desenvolvidos e usados para avaliar o impacto do ambiente nos animais, ou seja, predizer o conforto ou desconforto das condições ambientais (Pires & Campos, 2008). O Índice de Temperatura de Globo Negro, desenvolvido por Buffington *et al.* (1981), é utilizado como índice ambiental para a caracterização do conforto térmico de bovinos de leite, expostos a radiação solar direta e indireta. Através da temperatura de globo negro e da temperatura e velocidade do ar ao redor do globo é possível determinar um valor aproximado da temperatura média radiante (Lamberts & Xavier, 2002). Por outro lado, Mcdowell *et al*. (1976) sugeriu que o índice de temperatura e humidade (THI) poderia ser usado como um indicador das condições do ambiente térmico. O THI é calculado a partir das temperaturas bolbo húmido e bolbo seco de acordo com a seguinte fórmula: THI= 0.72 (W+D) + 40.6, onde W representa a temperatura de bolbo húmido e D é a temperatura de bolbo seco em °C.

As adaptações fisiológicas a que os animais homeotérmicos estão sujeitos, de modo a regular a temperatura corporal, são consequências dos efeitos negativos do stresse térmico (Hansen, 2004). Alguns dos efeitos do stresse térmico no organismo animal são explicados, em parte, pela diminuição da ingestão de alimentos, redução na absorção de nutrientes na ruminação, aumento das necessidades de manutenção e, posteriormente, alterações a nível endócrino (Collier *et al*., 2005), resultando assim num decréscimo da disponibilidade de nutrientes/energia. Naturalmente, uma redução no consumo de energia combinada com aumento do gasto energético para as necessidades de manutenção reduz o balanço energético, e explica parcialmente as razões para as perdas de peso dos animais em lactação e das condições de stresse térmico (Rhoads *et al*., 2009). De acordo com (Moberg, 2000), praticamente todas as funções biológicas são afetadas pelo stresse térmico, incluindo a capacidade imunológica, a reprodução, o metabolismo e o comportamento.

Existem diversos indicadores para a caracterização do conforto e do bem-estar animal e entre eles está a observação criteriosa das respostas fisiológicas e comportamentais dos animais ao stresse térmico (Almeida, 2009).

Nos bovinos, o aumento da frequência respiratória, por períodos longos, causa prejuízos ao organismo animal, tais como a redução no consumo de forragens, produção de calor endógeno adicional devido ao aumento da taxa de respiração, desvio de energia para outros processos metabólicos e redução de CO_2, originando alcalose respiratória pelos baixos níveis de ácido carbónico no sangue (Matarazzo, 2004). Por outro lado, a temperatura retal (TR), como bom indicador de temperatura corporal, pode ser considerada um indicador da adaptabilidade a ambientes quentes. O aumento desta, a partir de determinados valores, indica que os mecanismos termorreguladores não estão a ser eficientes. Segundo Martello *et al.* (2004), a temperatura retal normal para bovinos está em torno de 38,3°C, havendo variações de acordo com a idade, sexo, nível nutricional, lactação e estado reprodutivo. Robinson (1999), citado por Cattelam & Martinez (2013), referiu que a temperatura retal para bovinos de leite pode variar entre 38,0°C e 39,3°C, dependendo por vezes do mérito genético dos animais, sendo as vacas de alto potencial genético ou altas produtoras mais sensíveis ao stresse térmico, comparativamente a animais de baixa produção (Collier *et al*., 2005).

A maior produção de leite está associada ao maior consumo de alimentos e a uma maior taxa metabólica e, portanto, a uma maior produção de calor metabólico, o que constitui uma dificuldade acrescida na manutenção do equilíbrio térmico dos animais, em condições de calor (Azevedo *et al.*, 2005). O grande desafio para vacas de alta produção leiteira é dissipar, a uma velocidade suficientemente rápida, o calor produzido pelo próprio metabolismo (West, 2003), e assim, minimizar os efeitos do stresse térmico sobre a produtividade.

1.2. Aclimatação

A aclimatação é caracterizada pelas alterações fisiológicas ou comportamentais que ocorrem na vida de um organismo, em resposta às alterações que ocorrem no seu ambiente natural (tais com mudanças sazonais ou geográficas) (Bernabucci *et al.*, 2010). É um processo bifásico temporal que inclui um processo de aclimatação ao calor de curto prazo e de longo prazo (Horowitz, 2002). Em ruminantes a aclimatação ao calor de curto prazo é caracterizada pela redução da ingestão de matéria seca, aumento da ingestão de água e perda de calor por evaporação, com reduções na produção de leite. Por outro lado, as respostas de longo prazo estão relacionadas com o próprio desempenho do animal (Nienaber & Hahn, 2007). A exposição crónica a fatores ambientais que desencadeiem stresse pode proporcionar a aclimatação ou adaptação do animal. Desta forma, as respostas adaptativas de médio e longo prazo visam reajustar o animal às novas condições, minimizando o esforço exigido para a manutenção da homeotermia (Pereira, 2004).

O fenómeno de adaptação é caracterizado pelas alterações que reduzem o esforço fisiológico produzido pelos componentes stressantes de um determinado ambiente. Esta alteração pode ocorrer ao longo da vida de um organismo (fenótipo) ou ser o resultado de seleção genética numa espécie ou subespécie (genótipo) (Bernabucci *et al.*, 2010).

A adaptação ao calor pode ser dividida entre termotolerância e aclimatização (Moseley, 1997). A termotolerância consiste na adaptação celular causada por uma única e severa exposição ao calor. Isto faz com que o organismo possua melhores condições de sobrevivência a um posterior estímulo mais intenso. A aclimatização, por outro lado, consiste nas alterações fisiológicas ou comportamentais que ocorrem ao longo da vida de um organismo em resposta às alterações que ocorrem no seu clima "natural" (Bernabucci *et al*., 2010). O processo de aclimatização é provocado por repetidas e persistentes elevações da sua temperatura nuclear, podendo esta ser mantida por períodos suficientemente longos.

Segundo Fregley (1996), citado por Collier & Zimbelman (2007), a aclimatação é uma resposta fenotípica desenvolvida pelo animal a um estímulo ambiental, no entanto, em condições naturais, é raro que apenas uma variável ambiental mude ao longo do tempo. A aclimatização é o processo pelo qual um animal se adapta a vários fatores de stresse no seu ambiente natural (Bligh, 1976, citado por Collier e Zimbelman, 2007). A aclimatação e aclimatização, por conseguinte, não são adaptações evolucionárias ou seleção natural, que são definidas como modificações que permitem a seleção preferencial do fenótipo de um animal, baseados nos componentes genéticos transmitidos de geração em geração. O fenótipo alterado de animais aclimatados volta ao normal se os estímulos de stresse ambientais forem removidos (Collier & Zimbelman, 2007).

Numa situação em que as alterações de stresse são induzidas experimentalmente num ambiente controlado, em particular fatores ambientais, tais como temperatura ambiente, ocorre aclimação, sendo caracterizada pelas alterações fisiológicas e/ou comportamentais que ocorrem ao longo da vida de um organismo (Bligh & Johnson, 1973).

Tal como descrito por Bligh (1976), citado por (Collier e Zimbelman, 2007), existem três diferenças funcionais entre as respostas de aclimatação e "respostas reflexas" ou homeostáticas. Em primeiro lugar, a resposta de aclimatação demora muito mais tempo para ocorrer. Em segundo lugar, as respostas de aclimatação têm, geralmente, uma ligação hormonal na via do sistema nervoso central para as células efetoras. Em terceiro lugar, o efeito da aclimatação geralmente altera a capacidade de uma célula efetora ou órgão para responder às alterações ambientais. Aclimatação ao stresse térmico é, portanto, um processo que envolve alterações nos sinais hormonais que afetam a capacidade de resposta do tecido alvo a um estímulo ambiental (Collier & Zimbelman, 2007).

A aclimatação envolve as alterações na expressão de características pré-existentes, sendo este um processo conduzido pelo sistema endócrino, com o objetivo de manter o bem-estar animal, independentemente dos fatores ambientais. É um processo que pode demorar dias ou mesmo várias semanas para ocorrer e envolve alterações nos sinais hormonais que afetam a capacidade de resposta do tecido alvo a estímulos ambientais. As respostas à aclimatação possuem uma ligação hormonal na via do sistema nervoso central para as células efetoras, e, geralmente, alteram a resposta das células efetoras ou órgãos a um desafio ambiental. O principal efeito destas respostas é coordenar o metabolismo para alcançar um novo equilíbrio que poderia ser considerado como um novo estado fisiológico (Bernabucci *et al*., 2010). Segundo Bligh e Johnson (1973) a aclimatação é definida como as mudanças fisiológicas e/ou comportamentais que ocorrem durante a vida de um organismo, que reduzem a tensão ou aumentam a resistência à mesma.

Os parâmetros fisiológicos e bioquímicos utilizados para demonstrar as respostas da aclimatação são muito variados. Estes podem ocasionar alterações nas proteínas, nos lípidos das membranas, na locomoção e na taxa metabólica (Bowler, 2005). Como tal destacam-se, como respostas à aclimatação, nomeadamente as respostas celulares, endócrinas bem como possíveis modificações anatómicas.

1.2.1. Respostas celulares

Na resposta ao stresse térmico há a atuação de proteínas denominadas proteínas de choque térmico (HSP – Heat Shock Proteins), sendo esta uma das respostas primárias de proteção celular (Lindquist & Craig, 1988).

As HSP fazem parte da grande família das proteínas conhecidas como “chaperones” moleculares, sendo proteínas que interagem com outras proteínas de modo a minimizar a probabilidade destas interagirem com outras de forma inapropriada (Sørensen *et al*., 2013). Na figura seguinte (**Figura 2**) encontra-se uma representação esquemática da função celular das proteínas de choque térmico, no que diz respeito ao destino das proteínas com configurações não funcional, após a exposição a um estímulo stressante, onde pode ser novamente obtida a configuração funcional, agregação com outras proteínas ou a sua degradação.

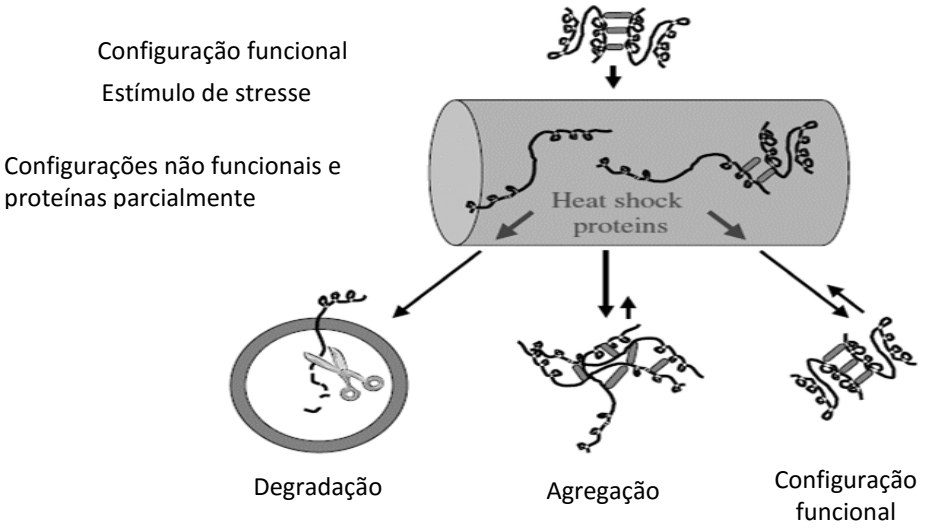


Figura 2 - Função celular de proteínas de choque térmico (Sørensen *et al*., 2003)

Havendo uma exposição das células a um estímulo stressante é induzida a formação de HSP. Após esta, uma nova exposição das células a um estímulo stressante irá, tendencialmente, produzir menos consequências negativas. As células que sintetizaram as HSP ficam assim protegidas contra novas exposições, o que se reflete em menores consequências negativas também no organismo (Meyer & Silva, 1999).

As HSP podem desempenhar várias funções nas células, tais como manter a estabilidade proteica, melhorar a tolerância face a vários agentes stressantes e permitir a normalidade funcional (Li *et al*., 2010). Na presença de condições adversas, como o aumento da temperatura, stresse osmótico ou oxidativo, os níveis de HSP aumentam, auxiliando desta forma a síntese e maturação de novas proteínas que irão substituir aquelas que foram afetadas pelo stresse metabólico (Bukau & Horwich, 1998).

As HSP podem ser agrupadas em seis famílias: HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 e HSP100, de acordo com as sequências de aminoácidos e com as suas massas moleculares (em kDa). A família HSP70 é a mais conservada filogeneticamente, sendo de extrema importância para o "folding" de proteínas nas células (Wynn *et al.,* 1994). Para além disso, é conhecida como sendo a "família de proteínas" que possui uma maior atuação na resposta ao stresse celular, sendo utilizada em vários estudos como indicadora de stresse (Tirelli *et al.*, 2005; Monzo *et al.*, 2012).

Nas figuras que se seguem encontra-se uma representação fictícia da estrutura tridimensional da HSP70 (**Figura 3**) bem como a estrutura tridimensional com domínio de ligação ao substrato (SDB) e domínio ATPase (NBD) ligados por uma sequência hidrofóbica (**Figura 4**).

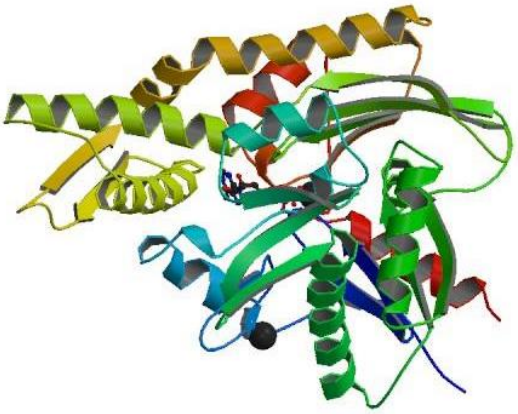


Figura 3 - Estrutura tridimensional da HSP70 - *Fonte: RCSB PDB (1HJO)* Consultado em: Http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1hjo (20 de Abril de 2015)

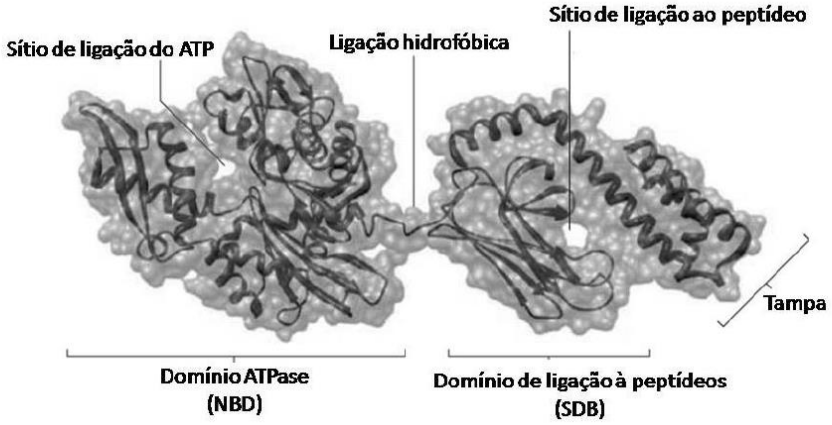


Figura 4 - Estrutura tridimensional da HSP70 com domínio de ligação ao substrato (SDB) e domínio ATPase (NBD) ligados por uma sequência hidrofóbica (Kampinga & Craig, 2010).

O mecanismo de reparação proteico, promovido pela HSP70, envolve ciclos de "folding" semelhantes aos que ocorrem em cadeias peptídicas recém-sintetizadas, sendo imprescindíveis para o restabelecimento da homeostasia celular, bem como na manutenção da viabilidade, devido à inibição da apoptose (Mosser *et al.,* 1997).

As proteínas de choque térmico, nomeadamente a HSP70, têm sido identificadas em diversos fluidos, tais como o sangue (Kristensen *et al.*, 2004) e leite (Eitam *et al.,* 2009) em vacas *Holstein Frisian*, bem como na saliva de humanos (Chatterjee *et al.,* 2014).

1.2.2. Respostas endócrinas

O tipo de resposta, incluindo a resposta hormonal, que ocorre num organismo que se encontra sujeito a condições diferentes das 'habituais' difere de acordo com o contexto em que ocorreu a aclimatação (Hosoya *et al.,* 2007). A resposta hormonal ao stresse desempenha um papel importante na coordenação das respostas biológicas. Por sua vez, os níveis hormonais

podem dar uma indicação do nível ou intensidade do stresse que ocorreu num organismo (Chen *et al*., 2002).

Na aclimatação ocorrem alterações nas respostas homeostáticas (Horowitz, 2002), bem como alterações a nível endócrino que afetam a capacidade de resposta do tecido alvo a estímulos ambientais. As hormonas conhecidas como sendo reguladoras da homeotermia, estão também associadas às respostas da aclimatação. Estas incluem as hormonas da tiroide, a prolactina, somatotrofina, glicocorticóides e mineralocorticóides (Collier & Zimbelman, 2007).

As hormonas da tiroide proporcionam um aumento do metabolismo basal, disponibilizando mais glicose para as células. Para além disso, apresentam um importante papel no controlo da produção de calor em animais homeotérmicos, uma vez que elevam o consumo de oxigénio dos tecidos, resultando num aumento da produção de calor (Mcnabb, 1995). Desta forma, as hormonas da tiroide constituem um importante mecanismo de resposta à aclimatação e têm recebido considerável atenção em vários estudos. A aclimatação ao calor diminui os níveis plasmáticos das hormonas da tiroide, na tentativa de reduzir a produção endógena de calor (Horowitz, 2001).

Quando ocorre um aumento da temperatura corporal, uma das primeiras reações dos bovinos é aumentar a taxa de sudação e a frequência respiratória, podendo assim eliminar o excesso de calor endógeno (Randal *et al*., 1997). Uma outra reação que ocorre durante o stresse térmico é a alteração nas secreções de variadas hormonas importantes para a lactação. Especialmente em espécies que se encontram em fases iniciais de lactação, ocorre uma diminuição nas secreções das hormonas de crescimento (growth hormone - GH), tiroxina (T4) e triiodotironina (T3), com consequente diminuição da produção de leite (Yousef, 1985). Estas alterações metabólicas possibilitam o equilíbrio de certas funções orgânicas relacionadas com a termorregulação, porém podem ocorrer prejuízos nos processos de síntese e secreção do leite. A explicação para o efeito do stresse sobre a lactação é o facto de as reações por ele provocadas alterarem todo este complexo endócrino responsável pela lactogénese e galactopoiese (Ewy, 1987, citado por Morais *et al*., 2008).

A prolactina também tem revelado algum interesse nos estudos que envolvem aclimatação e stresse térmico. Numa situação de stresse térmico, os níveis de prolactina na circulação aumentam. Segundo Roy & Prakash (2007), isto ocorre numa enorme variedade de mamíferos, incluindo os ruminantes. Ao diminuir o consumo de nutrientes as concentrações de prolactina na circulação também diminuem (Bocquier *et al.*, 1998). A prolactina pode desempenhar um papel importante na aclimatação através da melhoria da perda de calor, principalmente através do funcionamento das glândulas sudoríparas (Beede & Collier, 1986).

Segundo (Kaufman *et al*., 1988), ao introduzir bromocriptina (um inibidor da secreção de prolactina), esta vai afetar o funcionamento das glândulas sudoríparas.

Vários estudos indicam que a glândula da tiroide é sensível ao stresse térmico, pelo facto das hormonas produzidas pela mesma se encontrarem associadas à termogénese, uma vez que aumentam a taxa metabólica, além de apresentarem ação potenciadora sobre as catecolaminas.

A aclimatação ao calor diminui os níveis endógenos de hormonas da tiroide, como se observa em vários estudos em mamíferos adaptados a climas quentes (Horowitz, 2001). Portanto, T3 e T4 podem apresentar níveis reduzidos em animais expostos a altas temperaturas, associados à menor produção de calor metabólico (Johnson *et al.,* 1988). Gueorguiev (1999) afirmou que a hipofunção da tiroide em bovinos durante a exposição crónica ao calor, pode estar associada à necessidade de diminuição da taxa metabólica. No entanto, isto pode induzir mudanças noutras funções corporais, tais como diminuição do consumo de alimentos, do peso corporal e na secreção de leite, principalmente em situações de elevada produção.

Segundo Nascimento (1994), há necessidade também de se diferenciarem os efeitos de longo e curto prazo do stresse térmico sobre os níveis circulantes de T3 e T4 em ruminantes, uma vez que a adaptação ao stresse crónico acarreta mudanças endócrinas que podem ser diferentes daquelas condicionadas pelo stresse momentâneo.

O sistema sanguíneo também é particularmente sensível às mudanças de temperatura e caracteriza-se por ser um importante indicador das respostas fisiológicas. As alterações quantitativas e morfológicas nas células sanguíneas estão associadas ao stresse térmico, traduzidas por variações nos valores do hematócrito, número de leucócitos circulantes, conteúdo de eritrócitos e teor de hemoglobina no eritrócito. Numa situação de stresse térmico ocorre um aumento no hematócrito, podendo ser justificado por um acréscimo no número de hemácias. Assim, durante a aclimação ou de aclimatação, verificam-se ajustamentos nos parâmetros sanguíneos. Nos animais sujeitos a stresse térmico, os valores do hematócrito permitem estabelecer uma relação entre a termorregulação e o metabolismo hídrico. As alterações que se verificam nos valores do hematócrito, em animais sujeitos a stresse térmico, demonstram alterações no balanço de água ingerida e utilizada (Silanikove, 1992).

Os níveis de Na^+, K^+ e Cl^- do plasma também são afetados pelo stresse térmico. A concentração de K^+ e Na^+ diminui à medida que a temperatura aumenta (Borges, 1997), enquanto que o Cl- aumenta (Belay & Teeter, 1993). Os níveis séricos de K^+ também são influenciados pelo calor. A excreção de K^+ é influenciada por fatores hormonais (aldosterona, hormona antidiurética e deoxicorticosterona), equilíbrio ácido-base e balanço de catiões.

A ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), com consequente aumento das concentrações plasmáticas de cortisol, é a resposta mais proeminente do animal a condições

stressantes. A secreção de cortisol desencadeia mecanismos fisiológicos que permitem ao animal tolerar o stresse causado por um ambiente quente (Silanikove, 2000). Segundo Randall (2010), os glicocorticóides são as moléculas responsáveis por regular a intensidade da resposta ao stresse, sendo o cortisol a hormona primária responsável por restaurar a homeostase, sendo libertado após exposição a situações stressantes.

Em termos bioclimatológicos, um animal pode possuir uma temperatura corporal elevada quando absorve uma quantidade excessiva de calor do ambiente que o rodeia, quando a sua capacidade de dissipação do calor corporal é reduzida, ou quando existe uma associação de ambos os fatores se estabelece. Independentemente da causa, as consequências da elevação de temperatura manifestam-se sob a forma de uma cascata de acontecimentos, de modo a tentar ajustar o organismo ao desafio imposto (Garcia, 2013). A temperatura corporal é regulada por ação do sistema nervoso autónomo, sendo que o hipotálamo, um órgão localizado no diencéfalo, funciona como um termostato e controla o sistema HHA. Sob condição de stresse, o hipotálamo produz a hormona libertadora de corticotrofinas (CRH), a qual atua sobre a hipófise, aumentando a síntese de pró-opiomelanocortina (POMC) e promovendo a liberação da hormona adrenocorticotrófica (ACTH). A ACTH, por sua vez, tem como alvo o córtex das glândulas adrenais, e a ligação do ACTH aos seus recetores pode desencadear tanto a secreção de glicocorticoides quanto de esteroides sexuais. A ACTH estimula a síntese e a secreção de corticosterona ou cortisol pelo córtex adrenal que possui um efeito de retroalimentação negativa sobre a liberação do CRH. A ativação deste sistema visa melhorar a capacidade adaptativa do organismo e aumentar as suas capacidades para superar os desafios ambientais, mantendo a homeostase. Atualmente, sabe-se que a ativação do eixo HHA pode afetar diretamente o hipotálamo, a hipófise e as gónadas, com reflexos diretos na reprodução animal (Tilbrook *et al.*, 2000).

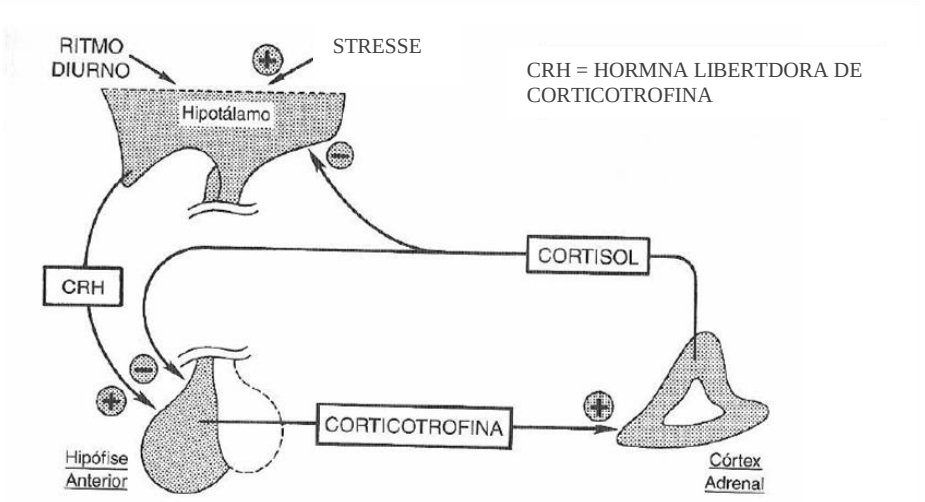


Figura 5 - Regulação da secreção de cortisol pelo eixo hipotálamo-hipófise. (+) Significa estimulação e (-) significa inibição (adaptado de Donin (2007).

Segundo Berbigier (1988), o stresse térmico pode diminuir a resposta do córtex das suprarrenais à presença da hormona ACTH. Isto contribui para que, durante o stresse térmico prolongado, os baixos níveis de cortisol possam cooperar para a diminuição da produção de calor metabólico, contribuindo assim para a eficiência do processo de aclimatação (Alvarez & Johnson, 1971).

Tilbrook *et al.* (2000) sugeriu a hipótese de que a exposição mais prolongada ao stresse térmico seria responsável por uma redução da reatividade das células imunes, as quais gradativamente perderiam a sua capacidade de proliferação, como resposta aos níveis cada vez maiores de cortisol (*Mukherjee et al.*, 2011). Assim, o stresse térmico prolongado é um dos fatores que causa diminuição da imunidade dos animais e, não por coincidência, observa-se um aumento na ocorrência de problemas quando os animais são expostos a condições extremas ou a ambientes considerados stressantes.

Alguns autores demonstraram que, tal como já foi referido, sob altas temperaturas na fase aguda do stresse térmico, ocorrem a elevação transitória da concentração sanguínea de cortisol e a redução na concentração das hormonas da tiroide, diminuindo a taxa de produção de calor metabólico. Portanto, estudar as variações na concentração destas hormonas é de extrema importância quando se relaciona stresse térmico e metabolismo.

A aclimatação celular durante a hipertermia envolve assim a coordenação da resposta celular e estímulos endócrinos, juntamente com outras alterações intrínsecas (Rhoads *et al*., 2010). De entre estas alterações destacam-se algumas adaptações endócrinas que ocorrem durante a aclimatação ao calor, representadas na **Tabela 1**.

A compreensão das respostas hormonais na aclimação/aclimatação é assim fundamental para a manutenção de um equilíbrio térmico mais favorável.

Tabela 1 - Lista parcial de adaptações endócrinas durante aclimatação ao calor

Tecido	Resposta	Referência
Adrenal	Secreção de aldosterona reduzida	Collier *et al*. 1982
	Secreção de glucocorticoides reduzida	Collier, Doelger, Head, Thatcher and wilcox, 1982
Pituitária	Aumento da secreção de epinefrina	Alvarez e Johnson, 1973
	Aumento da secreção de progesterona	Collier *et al*. 1982
	Aumento da secreção de prolactina	Wetteman e Tucker, 1979
	Diminuição da secreção se somatotropina	McGuire, Beede, Collier, Buonomo, Delorenzo Wilcox Huntington e Reynolds, 1991
Fígado	IGF-I inalterado ou aumentado	"
Tiroide	Diminuição da secreção de tiroxina	Collier *et al*. 1982
Placenta	Diminuição da secreção de sulfato de estrona	Collier *et al*. 1982

1.3. Saliva

1.3.1. Síntese, composição e funções

A saliva é um fluido com interesse, no que diz respeito à pesquisa de biomarcadores com possibilidades de diagnóstico. A saliva total presente na cavidade oral consiste numa mistura complexa de fluidos provenientes das glândulas salivares maiores (parótida, submandibular e sublingual), das glândulas salivares menores (glândula mucosa labial, palatinas, glândulas de von Eber, por exemplo) bem como do fluido gengival (Lamy & Mau, 2012), sendo os termos "maiores" e "menores" referentes ao tamanho anatómico das glândulas. A saliva total ou mista é o fluido mais frequentemente estudado e utilizado para a maioria dos estudos sobre a composição da saliva e na avaliação de doenças sistémicas, sendo geralmente referida apenas como "saliva" (Gutiérrez *et al.,* 2014). Consiste numa mistura de fluidos orais e inclui secreções de glândulas salivares maiores e menores, bem como vários constituintes de origem não-salivar

(Sreebny, 1989). Apesar de as glândulas maiores diferirem das menores, pela quantidade de volume produzida, a composição difere entre as diferentes glândulas.

A glândula parótida produz uma secreção fundamentalmente serosa, com reduzida concentração proteica (apesar da diversidade em tipos de proteínas), enquanto que as glândulas submandibulares e sublinguais contribuem, principalmente, para a produção de mucinas e de substâncias do grupo sanguíneo (Muneta *et al.*, 2010). Uma vez que a contribuição de cada uma destas fontes pode variar, essencialmente, de acordo com a atividade do sistema nervoso simpático e parassimpático, a composição da saliva pode apresentar variações consideráveis ao longo do tempo (Amerong *et al.*, 2007).

Na figura seguinte (**Figura 6**) encontra-se uma representação esquemática dos vários componentes que, no seu todo, fazem parte da constituição da saliva total.

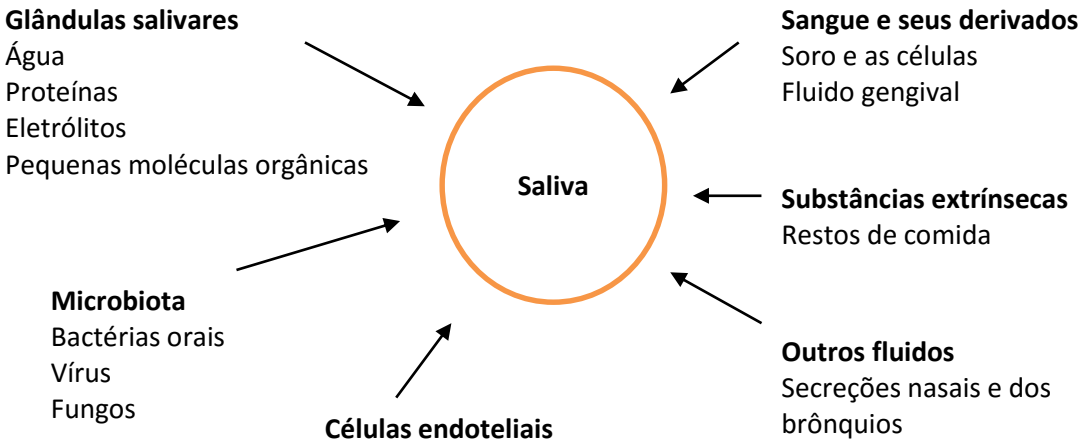


Figura 6 - Componentes da saliva total ou mista (adaptado de Kaufman & Lamster, 2002).

Por outro lado, a saliva originária de uma glândula específica pode ser recolhida diretamente a partir das glândulas salivares parótida, submandibular, sublingual, e glândulas salivares menores (Kaufman & Lamster, 2002). O mesmo autor referiu a utilidade da recolha e avaliação das secreções das glândulas salivares individuais, no que diz respeito a uma infeção, bem como uma obstrução, no entanto, a recolha da saliva existente na cavidade oral é um método mais frequentemente estudado para o diagnóstico de doenças sistémicas.

Nas glândulas salivares são encontradas células acinares, várias células do sistema de ductos e células mioepiteliais. As glândulas salivares são assim compostas por células epiteliais especializadas, estando a sua estrutura dividida em duas regiões específicas: a região acinar e ductal. A região acinar é onde o fluido é produzido e onde a maior parte da síntese de proteína e secreção ocorrem. Os aminoácidos entram nas células acinares por transporte ativo, onde se

conjugam em proteínas, que são armazenadas em grânulos, sendo estas últimas libertadas em resposta à estimulação de secreção (Castle, 1993 citado por Kaufman & Lamster, 2002).

As células acinares, onde a saliva é produzida em primeiro lugar, determinam o tipo de secreção produzida a partir das várias glândulas. A secreção pode ser classificada como serosa, mucosa ou mista. As secreções serosas são produzidas principalmente a partir da glândula parótida, secreções mucosas das glândulas menores e secreções serosas e mucosas das glândulas sublinguais e submandibulares (Roth & Calmes, 1981).

Tem sido proposto que a composição de proteínas da saliva varia consideravelmente entre as espécies, refletindo diferentes dietas e modos de digestão (Lamy *et al*., 2011). As proteínas mais abundantes na saliva de mamífero são α-amilase, as proteínas ricas em prolina, histatinas, cistatinas, mucinas, imunogloblinas, anidrase carbónica e a lactoperoxidase (Sousa-pereira *et al.,* 2013). A saliva é também composta por hormonas e eletrólitos, tais como cálcio, o fosfato, o sódio, o potássio, os bicarbonatos, o cloro e o ferro (Areias, 2011). São também encontradas na saliva imunoglobulinas, proteínas, enzimas, mucinas e produtos azotados, tais como a ureia e o amoníaco. Estes componentes interagem de diferentes formas, consoante a função que desempenham. Os bicarbonatos, fosfatos e ureia regulam o pH e a capacidade de tampão da saliva; as macromoléculas e as mucinas têm como função limpar, aglomerar e/ou anexar microrganismos; o cálcio, fosfato e algumas proteínas atuam num conjunto para modular a desmineralização e remineralização; as imunoglobulinas, proteínas e enzimas proporcionam uma ação antibacteriana (Humphrey & Williamson, 2001). Cada composto ocorre geralmente em pequenas quantidades, variando de acordo com as alterações do fluxo, ainda que continuem a desempenhar funções importantes. As proteínas desempenham mais do que uma função, podendo estas ser semelhantes, mas em diferentes graus, atuando a favor e contra o hospedeiro (Levine, 1993).

A saliva é um líquido diluído, composto por mais de 99% de água, sendo os restantes 1% relativos aos compostos acima referidos. O pH normal da saliva é ligeiramente ácido, na gama de 6 a 7, no caso dos seres humanos, podendo existir diferenças na composição das secreções das glândulas individuais (Humphrey e Williamson, 2001).

A principal função da saliva é auxiliar no humedecimento e pré-processamento dos alimentos, bem como na deglutição. Para além disto, auxilia também no processo digestivo. Para tal a saliva contém enzimas, incluindo proteases, lipases e glicohidrolases, que iniciam o "break-down" dos componentes dos alimentos (Lamy *et al.,* 2012). As funções da saliva podem ser organizadas em cinco categorias principais, que servem para manter a saúde da cavidade oral e criar um equilíbrio ecológico apropriado, sendo estas a lubrificação e proteção, ação de

tamponamento e de apuramento, manutenção da integridade dos dentes e tecidos, atividade antibacteriana, perceção do gosto e digestão (Mandel, 1987).

As mucinas, componentes lubrificantes da saliva, são produzidas nas glândulas salivares mucosas, maiores e menores. São proteínas complexas que estão presentes predominantemente com duas gamas de massas moleculares (“leves” e “pesadas”) (Tabak, 1990). Possuem propriedades tais como baixa solubilidade, alta viscosidade e elasticidade e forte adesividade (Humphrey e Williamson, 2001). As mucinas também desempenham uma função antibacteriana ao permitirem a adesão seletiva de microrganismos às superfícies dos tecidos orais, o que contribui para o controlo da colonização de bactérias e fungos. As secreções das glândulas submandibulares e sublinguais contêm mucinas com elevada e baixa massa molecular, que correspondem a mucinas altamente glicosiladas (MG1) e pouco glicosiladas (MG2), respetivamente (Tabak, 1990).

As ações de tampão e limpeza são uma segunda função da saliva através dos componentes bicarbonato, fosfato, ureia, proteínas e enzimas. O bicarbonato é o sistema tampão mais importante, uma vez que age como um tampão por neutralizar ácidos (Humphrey e Williamson, 2001).

As glândulas salivares, por serem glândulas exócrinas, segregam um fluido contendo agentes imunológicos e não imunológicos, para a proteção das superfícies das mucosas. O conteúdo imunológico da saliva inclui IgA, IgG e IgM. Por outro lado, o conteúdo salivar não imunológico é constituído por proteínas específicas, mucinas, péptidos e enzimas (Humphrey e Williamson, 2001). A IgA, a maior componente imunológica de saliva, é uma imunoglobulina produzida por células plasmáticas em tecidos conjuntivos. Enquanto ativa em superfícies mucosas, pode neutralizar vírus, servir como um anticorpo para antigénios bacterianos, bem como aglomerar agentes bacterianos, inibindo assim a fixação bacteriana aos tecidos (McNabb & Tomasi, 1981). Outras imunoglobulinas presentes na saliva encontram-se em menores quantidades e, provavelmente, têm origem no fluido gengival (Roth & Calmes, 1981).

O conteúdo antibacteriano imunológico e não imunológico da saliva tem origem em duas fontes diferentes, com origem no plasma e nas células do ducto, com diferentes respostas à estimulação e diferentes níveis de conteúdo. O conteúdo antibacteriano não imunológico, como proteínas salivares, mucinas, péptidos e enzimas, bem como os produtos originários de células acinares da glândula, ajudam a proteger a microflora da cavidade oral (Rudney, 1995)

As lisozimas, derivada das células basais de ductos estriados das glândulas parótidas, destroem e inibem o crescimento bacteriano (Grant, 1988, citado por Humphrey SP e Williamson RT, 2001). Por outro lado, as glicoproteínas, aglutininas, proteínas ricas em histidina e proteínas ricas em prolina vão aglomerar as bactérias. Este processo de "aglomeração" reduz a capacidade

das bactérias para aderirem às superfícies dos tecidos da cavidade oral e, assim, controlar a flora bacteriana, fúngica e viral (Mandel, 1989). No entanto, as concentrações de proteínas salivares, assim como outros componentes, também podem estar sujeitos a variações circadianas, podendo ser afetadas pelo stresse, alterações hormonais bem como possíveis patologias (Rudney, 1995).

Por fim, uma quinta função da saliva consiste na perceção dos diferentes gostos bem como auxílio na digestão. No caso dos humanos e de algumas espécies animais, a saliva participa na digestão, através da amílase, ao iniciar a degradação do amido (Mandel, 1987). No caso dos ruminantes, esta proteína salivar não está presente, não sendo, no entanto de excluir alguma participação da saliva em processos digestivos, através da participação de algumas outras proteínas, não se verificando esta situação no caso dos ruminantes.

1.3.2. Fatores que afetam a quantidade e qualidade da saliva

Durante o processo de secreção de saliva existem várias situações que podem alterar a quantidade e qualidade da saliva produzida.

No caso de alterações da temperatura, nomeadamente aumento desta, podem existir alterações na quantidade de saliva produzida. Ao longo do processo evaporativo os animais perdem calor através da sudação, das secreções das vias respiratórias e da saliva. O arrefecimento evaporativo é uma forma que os animais homeotérmicos perderem calor quando a temperatura do ambiente é superior à temperatura corporal (Robinson, 2004, citado por Cruz *et al*., 2011). Neste contexto, a salivação excessiva é uma das atitudes comportamentais demonstradas pelos animais que se encontram sob stresse térmico (Fuquay *et al.,* 2011).

O processo de secreção de saliva, nas glândulas salivares, é também influenciado, em grande parte, pela nutrição. Estudos na morfologia e bioquímica indicaram que a deficiência de proteína resulta numa deficiência de secreção de proteínas na saliva (Johansson *et al*., 1994). A relação entre a função das glândulas salivares e comportamento de ingestão em ruminantes foi sugerida por Hofmann (1989), que descobriu que o tamanho das glândulas salivares em ruminantes está relacionado com os níveis de metabolitos secundários (por exemplo, taninos) presentes na sua dieta habitual.

Segundo Mertens (2001), uma redução no nível de fibra efetiva na dieta origina uma menor mastigação pelo animal, originando assim uma menor secreção de saliva, com capacidade de tampão, maior produção de ácidos gordos voláteis, diminuição do pH ruminal, alterações na atividade microbiana, resultando numa redução na relação acetato:propionato (A:P). Os animais

produzem mais saliva quando mastigam o alimento do que do que quando estão em repouso, sendo esta menor mastigação resultante numa menor salivação e num efeito de tampão ao nível do rúmen (Bianchini *et al*., 2007).

Existem vários mecanismos que promovem a secreção de saliva, tais como estímulos mecânicos, como o ato de mastigar, gustativos e olfativos. Outros fatores que afetam a secreção incluem fatores psíquicos, tais como dor, certos tipos de medicação e várias doenças locais ou sistémicas que afetam as próprias glândulas (Grant, 1988, citado por Humphrey SP e Williamson RT, 2001).

Existe uma grande variabilidade individual na estimulação salivar e tipo de célula secretora, o que faz com que o conteúdo salivar difira de indivíduo para indivíduo. As variações de fluxo também variam conforme o ciclo circadiano. Este afeta não só o fluxo, mas também o nível de concentração dos componentes salivares, tais como eletrólitos e proteínas (Rudney, 1995).

Quando a composição da saliva é insuficiente e/ou existe uma redução do fluxo salivar, (hiposalivação), pode ser devido a uma disfunção da glândula salivar, temporária ou permanente. A hiposalivação é um termo baseado em medidas objetivas da secreção de saliva, onde as taxas de fluxo são significativamente mais baixas do que os "valores normais" geralmente aceites (Pedersen *et al*., 2002). Fatores como distúrbios hormonais, doenças inflamatórias, gastrointestinais e desnutrição são alguns exemplos de doenças que afetam indiretamente a função das glândulas salivares.

Em suma, o processo de secreção de saliva pode ser influenciado pela mastigação (ou ruminação, no caso dos ruminantes), aumentando a secreção de saliva, pelo tipo de alimento, estando os alimentos fibrosos e secos responsáveis pelo aumento da produção de saliva, e pelo olfato. A saliva, para além de ser produzida espontaneamente a partir de certas glândulas em algumas espécies, é controlada pelo sistema nervoso autónomo, que desempenha um papel fundamental no mecanismo de secreção.

1.3.3. Particularidades salivares dos ruminantes

Para além do que foi descrito anteriormente, a salivação nos ruminantes apresentam algumas particularidades, no que diz respeito às funções e composição. Nos bovinos, a disposição das glândulas salivares, na cavidade oral, estão representadas na figura seguinte (**Figura 7**).

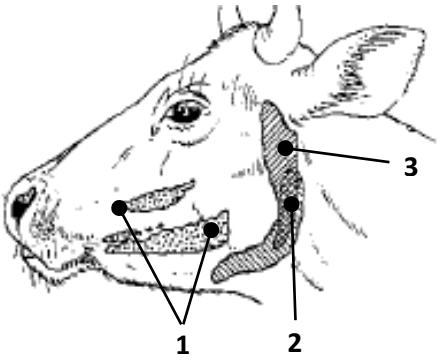


Figura 7 - Representação topográfica das glândulas salivares: sublingual (1), mandibular (2), parótidas (3) (adaptado de Hofmann (1989).

Os ruminantes são conhecidos por produzirem saliva que atua, principalmente, como um tampão de bicarbonato-fosfato, possuindo um pH médio de 8,1 (McDougall, 1948), o que ajuda no tamponamento dos ácidos gordos voláteis, produzidos durante a digestão ruminal, desempenhando um papel importante no equilíbrio hídrico e de eletrólitos. A glândula parótida produz saliva durante a alimentação e ruminação, continuando o seu fluxo reduzido durante os intervalos em que o animal se encontra em repouso. A saliva, proveniente da parótida, é produzida em grandes quantidades, não contendo amilase, mas possuindo uma elevada alcalinidade e poder de tampão. É, consequentemente, a secreção mais importante para a manutenção da função normal do rúmen (McDougall, 1948).

A produção de saliva, pelas glândulas salivares, é controlada pelo sistema nervoso e a composição das secreções salivares pode ser alterada em resposta a vários estímulos. A saliva serve como um tampão fisiológico contra variações, entre os meios internos e externos (Lamy *et al*., 2010). A anidrase carbónica salivar é de grande interesse, uma vez que promove a regulação do pH local da cavidade oral e do aparelho digestivo, no transporte de dióxido de carbono e bicarbonato, bem como no equilíbrio hídrico e de eletrólitos (Parkkila & Parkkila, 1996). Estando envolvida na reação reversível de conversão de dióxido de carbono em bicarbonato, é uma proteína potencialmente importante a nível de capacidade de tamponamento do rúmen. A capacidade tampão do rúmen depende, não só da quantidade de agentes tamponantes na saliva, mas também da quantidade de saliva produzida. A produção de saliva aumenta quando aumenta a ruminação e diminui quando o animal está menos tempo a ruminar, que está relacionado com o conteúdo efetivo de NDF da dieta (Block & Cummings, n.d.).

Os bovinos podem segregar cerca de 200 litros de saliva por dia, que contém uma grande diversidade de compostos, incluindo hormonas, metabolitos e proteínas, que contribuem para o processo digestivo (Ang *et al.*, 2011). Segundo Block e Cummings, estima-se que uma vaca com um peso de 650 kg, consumindo alimentos fibrosos, irá produzir 280 litros de saliva num período

de 24 horas. A reciclagem de ureia, que ocorre na saliva, desempenha um papel importante no metabolismo, constituindo uma fonte de nitrogénio não proteico para os microrganismos ruminais (Gomes *et al.,* 2006).

A composição da saliva de bovinos é um pouco diferente do que a maioria de outras espécies estudadas, uma vez que possui altos níveis de anidrase carbónica, não possui amilase salivar, como foi referido e contém uma grande proporção de proteínas também presentes em circulação (Ang *et al*., 2011). Esta desempenha um papel fundamental no transporte do alimento ingerido durante a ruminação (Ang *et al.*, 2011). Possui uma grande quantidade de proteínas do soro, como a albumina, relativamente a proteínas sintetizadas nas próprias glândulas, o que demonstra o papel da parótida dos ruminantes para a secreção de eletrólitos e fluídos, com uma função mais marcada no tamponamento do que na secreção de proteínas, ao contrário de animais não ruminantes (Lamy *et al*., 2008; Lamy *et al*., 2009). Para além disto, possui ainda a lípase salivar, que atua na hidrólise de triglicerídeos. No entanto, esta enzima é produzida em maior quantidade em animais jovens (alimentados com leite), diminuindo a sua expressão com o aumento do consumo de alimentos grosseiros (Radostits & Bell, 1970).

Em suma, a saliva desempenha várias funções nos ruminantes, tais como manutenção da capacidade de tamponamento no rúmen, auxílio na mastigação e deglutição, promoção da atividade das enzimas, bem como fornecer nutrientes para microrganismos ruminais. A grande quantidade de bicarbonatos produzidos na saliva ajuda a proteger o rúmen contra alterações de pH, causadas pelos ácidos produzidos durante a fermentação. A mucina, ureia, fósforo, magnésio, cloreto estão presentes em concentrações relativamente elevadas na saliva, o que permite o fornecimento de nutrientes disponíveis para microrganismos ruminais.

1.4. Biomarcadores Salivares

Por definição, um biomarcador é uma característica que pode ser medida e avaliada como um indicador de processos biológicos normais, processos patológicos ou respostas farmacológicas a intervenções terapêuticas. Várias aplicações dos biomarcadores têm sido descritas, incluindo o uso de biomarcadores para diagnosticar a presença ou ausência de uma determinada doença (Taba *et al.,* 2005).

Atualmente, os biomarcadores têm sido usados em várias áreas, tais como em oncologia, neurologia, doenças cardiovasculares, respiratórias, bem como em doenças inflamatórias e endocrinopatias (Lavrador *et al*., 2015). A identificação e a quantificação de biomarcadores são assim importantes para a avaliação das respostas fisiológicas e clínicas dos animais, dando

suporte às decisões terapêuticas, à definição dos programas de tratamento e de maneio e à gestão das alterações observadas num indivíduo ou numa população.

O uso da saliva como uma fonte de biomarcadores, para condições fisiológicas e patológicas, é uma abordagem promissora, principalmente devido à grande vantagem da natureza não invasiva deste fluido (Lamy, 2015). Tal como já foi referido, a saliva é composta por uma mistura de proteínas, iões e outros compostos orgânicos, produzidos principalmente pelas glândulas salivares, com uma percentagem proveniente do sangue (Wu *et al.*, 1993). Desta forma, a conexão entre as fontes locais (glândulas salivares) e as sistémicas (sangue) torna a saliva um fluido importante para a pesquisa de biomarcadores de doenças ou para estudar um estado fisiológico em particular (Bailey, 1961).

O alto potencial de saliva como fonte de biomarcadores foi um dos principais responsáveis pelo grande interesse neste fluido (Lamy *et al*., 2012).

A saliva é um fluido que se obtém facilmente, a partir de um grande número de animais, de uma forma não invasiva, e contém uma grande diversidade de compostos, incluindo hormonas, metabolitos e proteínas que podem ser uma boa fonte de biomarcadores da saúde e doença (Ang *et al.,* 2011). Comparativamente ao sangue, é facilmente acessível e pode ser obtida de uma forma não invasiva e sem causar stresse ao animal, o que possibilita a recolha de um grande número de amostras, bem como de repetições, mesmo em intervalos de tempo curtos (Ang *et al.*, 2011).

Um biomarcador deve possuir características e qualidades fundamentais, o que dependerá da utilização prevista (Aronson, 2005), devendo ser preciso, sensível e específico. A identificação e quantificação de biomarcadores também proporciona uma oportunidade para avaliar, com precisão, as respostas clínicas, para decisões de possíveis tratamentos (Moore *et al*., 2007). A nível biológico, a espécie, raça, sexo e idade do animal devem ser tidas em consideração, uma vez que podem resultar em diferenças significativas na composição dos fluidos corporais. Além disso, o estado de reprodução do animal, as variações circadianas e a dieta também são fatores importantes a ter em consideração na pesquisa de biomarcadores (Moore *et al*., 2007).

As proteínas salivares de seres humanos têm recebido uma atenção substancial, tanto em termos de identificação e caracterização, bem como as propriedades funcionais, sendo a saliva dos animais menos estudada. No entanto, o interesse para este último está a ser cada vez maior, devido à conveniência da utilização de modelos animais para diversas condições patológicas e fisiológicas e, devido ao potencial deste fluido para o diagnóstico de doenças e para a compreensão de estados fisiológicos e comportamentais importantes na produção animal

(Lamy *et al.*, 2012). Identificar os tipos de proteínas na saliva de bovinos e, posteriormente, desenvolver testes de rastreio para os mesmos, é importante para desenvolver uma base de estudo para a descoberta de biomarcadores na saliva de bovinos e avaliar a eficácia deste fluido biológico, para fins de reprodução, produção e gestão (Ang *et al*., 2011).

A proteómica tem sido bastante usada no contexto de pesquisa de biomarcadores salivares. Uma abordagem da proteómica para a descoberta de biomarcadores requer a combinação de tecnologias de separação eficientes e rigorosas e espectrometria de massa de alta resolução (Rifai *et al.,* 2006). A utilização da proteómica, relativamente à pesquisa de biomarcadores, consiste na identificação e caracterização de proteínas, presentes num determinado tecido ou fluido biológico, a avaliação da expressão diferencial de proteínas entre diferentes amostras, ou a deteção e avaliação da modificação de determinadas proteínas (Boehmer, 2011).

A análise do proteoma salivar emerge assim num campo de elevado interesse, com o futuro objetivo de manter e melhorar a produtividade e bem-estar animal. Para além disto, a análise e identificação de proteínas salivares e peptídeos torna-se um pré-requisito necessário para identificar biomarcadores de doenças em animais bem como uma forma de perceber e estudar a fisiologia animal (Lamy & Mau, 2012).

Pesquisas recentes, relativas à análise do proteoma da saliva humana, têm mostrado que os biomarcadores salivares podem contribuir para a deteção de doenças sistémicas e locais, desde a padronização dos procedimentos de amostragem adequados. Recentemente, foram demonstradas algumas funções interessantes e inovadoras, para diferentes famílias de péptidos e proteínas específicas, que podem desempenhar aplicações biotecnológicas relevantes (Castagnola *et al.,* 2011). Atualmente a saliva é utilizada, de forma eficaz, para a deteção de anticorpos específicos, hormonas e produtos farmacêuticos. No entanto, o seu uso generalizado para diagnóstico é complicado devido ao dinamismo e polimorfismo, característico do proteoma salivar (Castagnola *et al*., 2011).

Alguns estudos estão a ser desenvolvidos, demonstrando que a composição da saliva, e particularmente o proteoma salivar, contêm informações sobre as necessidades nutricionais, adaptações à dieta e ao meio ambiente, e também sobre o bem-estar e estado de saúde dos animais. Um dos principais aspetos que tem limitado os avanços na proteómica salivar dos animais tem sido a quantidade limitada de proteínas animais presentes em bases de dados de proteínas. Hoje em dia, este aspeto torna-se menos problemático, devido ao crescente número de espécies com genoma sequenciado (Lamy, 2015).

Na ciência animal, tal como em todas as outras áreas das ciências biológicas, o estudo da proteómica constitui um passo importante para a compreensão mais detalhada dos sistemas

biológicos mais complexos, que controlam a fisiologia e patologia dos seres vivos. No caso dos animais de interesse zootécnico, sendo criados em grande escala, com o objetivo de obter produtos de origem animal para consumo humano, surge a necessidade de compreender as características biológicas que possuem um impacto no rendimento e na qualidade do produto (Bendixen *et al*., 2011). Desta forma, os biomarcadores que possam ajudar a otimizar um equilíbrio sustentável entre a produtividade, a qualidade do produto e o bem-estar animal são de extrema importância (Bendixen *et al*., 2011).

O interesse pelos estudos da proteómica em animais de interesse zootécnico aumentou na última década, tendo sido realizados estudos com o objetivo de compreender as características biológicas importantes para a produção de carne e leite (Bendixen *et al*., 2011).

Geralmente, os estudos de proteómica realizados em bovinos e suínos, estão direcionados para a melhoraria da qualidade do produto (Guy & Fenaille, 2006). Recentemente, os estudos realizados com animais de produção, também se direcionam para áreas como a saúde e bem-estar animal, podendo isto ser controlado e reforçado através de biomarcadores específicos (Bendixen *et al.,* 2010). Desta forma, a saliva, com o seu conteúdo de centenas de péptidos e proteínas, eletrólitos, hormonas e outros componentes, pode ser uma fonte de biomarcadores que ajudam a avaliação dos fatores de stresse devidos a má nutrição, bem como doenças ou infeções virais em animais de produção (Lamy & Mau, 2012). Recentemente, os proteomas na saliva de bovino e suíno foram analisados para encontrar biomarcadores de doenças ou estados fisiológicos. Num estudo realizado por Ang *et al.* (2011), onde utilizou três metodologias diferentes para caracterizar o proteoma salivar de bovinos, foram identificadas 402 proteínas salivares e 45 Glicoproteinas ligadas ao N terminal, incluindo uma grande fração de proteínas não caracterizadas.

A nível da pesquisa de biomarcadores na saliva de ruminantes, os principais estudos, utilizando técnicas de proteómica, estão relacionados com aspetos nutricionais, particularmente em termos de consumo de metabolitos secundários de plantas. Algumas proteínas salivares, tais como proteínas ricas em prolina, parecem estar presentes em "*browsers*" mas ausente em "*grazers*" (Fickel *et al*., 1998). Segundo um estudo realizado, foram observadas algumas diferenças entre os proteomas salivares de ovinos e caprinos, devido a variações nas dietas das duas espécies (Lamy *et al*., 2011).

1.4.1. A saliva e o stresse térmico

No que diz respeito a situações de stresse, o parâmetro salivar mais vulgarmente avaliado é o cortisol salivar. Este parâmetro é, hoje em dia, utilizado como biomarcador de stresse

psicológico e de doenças mentais ou físicas relacionadas (Hellhammer *et al.,* 2009). A concentração de glucocorticóides na saliva rapidamente se torna proporcional à concentração de glucocorticóides no plasma sanguíneo, pelo que a medição de glucocorticóides salivares tem vindo a ser considerada útil como um indicador de bem-estar (Broom, 2006). Os níveis reais de cortisol salivar são mais baixos do que os níveis de cortisol livre no soro, possivelmente devido à degradação enzimática nas células epiteliais salivares, durante a divisão celular (Quissell, 1993), no entanto, a taxa de difusão de hormonas esteroides, particularmente o cortisol, é suficientemente elevada para manter uma relação constante das concentrações hormonais entre os níveis salivares e de soro, independentemente do fluxo salivar (Kaufman & Lamster, 2002). Tal como é muitas vezes referido, o cortisol sanguíneo não permite uma compreensão completa do stresse térmico, devido ao seu ciclo circadiano e porque está relacionado com outros tipos de stresse. O próprio facto da recolha de sangue envolver uma picada, pode constituir um motivo de stresse que interfira nos resultados (Negrão *et al*., 2004). O cortisol salivar, que é utilizado como uma forma não-invasiva de medir este metabolito, apesar de ter a vantagem de não ter stresse associado a recolhas de amostra, também apresenta as limitações mencionadas (Hellhammer *et al*., 2009).

A testosterona é uma hormona que também pode ser identificada na saliva. Num estudo realizado foram detetados níveis de testosterona salivares que propuseram a utilização dos níveis de testosterona salivar para avaliar a função testicular (Walker *et al.,* 1980). Por outro lado, o estradiol também pode ser detetado na saliva em concentrações que representam apenas 1 a 2% das concentrações séricas (valor muito reduzido) (Kaufman & Lamster, 2002).

A saliva foi considerada como um fluido corporal ideal para estudos de investigação sobre stresse em suínos, sendo utilizada também noutros estudos de stresse, numa ampla gama de circunstâncias, tais como recolha de sangue (Merlot *et al.,* 2011). Por outro lado, a medição de cortisol salivar também é uma prática utilizada em bovinos. A testosterona e o cortisol podem entrar na saliva por difusão nas células das glândulas salivares (Broom, 2003). Os níveis de cortisol são mais reduzidos na saliva, no entanto, os estímulos que causam um aumento de cortisol no plasma, causam também um aumento de cortisol salivar, comparáveis em várias espécies (Broom, 2003), sendo esta difusão suficientemente elevada para manter um equilíbrio entre o cortisol livre no plasma e na saliva.

No caso dos bovinos, aqueles que se encontram submetidos a stresse térmico, sofrem uma leve alcalose metabólica, pois ocorre aumento da frequência respiratória e, como mecanismo compensatório, há perda de bicarbonato pelos rins, o que diminui o teor do bicarbonato na saliva, que é um elemento chave para o tamponamento do pH ruminal (González & Campos,

2003). Assim, o bicarbonato presente na saliva também pode ser identificado como um elemento chave para a deteção de stresse nos ruminantes.

Foi também proposto que a IgA salivar poderia estar relacionada com situações de stresse, uma vez que deriva da ativação do sistema nervoso simpático nas glândulas salivares, submandibular e sublingual (Muneta *et al*., 2010). Também a atividade da α-amilase salivar foi sugerida como um possível biomarcador em suínos, submetidos a situações de stresse (Fuentes *et al*., 2011), sendo esta também ativada pelo sistema nervoso autónomo, que controla as glândulas salivares. No entanto, no caso dos ruminantes, esta não será uma proteína a ter em conta, dada a sua ausência na saliva destes animais.

Mais recentemente, vários estudos sugerem o uso de proteínas de choque térmico, como biomarcadores de stresse térmico (Sørensen, 2010). No caso da saliva, as proteínas têm sido amplamente estudadas em seres humanos, devido ao seu potencial como biomarcadores não-invasivos de patologia e fisiologia, e nos últimos anos, a pesquisa surgiu demonstrando o valor deste fluido em estudos com animais de produção (Lamy & Mau, 2012).

As HSP 60, 70 e 90 estão presentes na saliva de humanos (Chatterjee *et al.,* 2014). No estudo realizado por Lamy *et al*. (2008), foi identificada na banda c uma HSP90-beta na saliva de cabras (*Capra hircus*) e de ovelhas (*Ovis aries*), sendo que, pelo menos esta proteína de choque térmico, deve estar presente na saliva de bovinos. No entanto, é necessária a realização de novos estudos que provem a sua existência na saliva de bovinos. Neste caso, seria interessante a identificação de HSP70, uma vez que que possui uma maior atuação na resposta ao stresse celular.

Os mecanismos de transporte passivos de HSP70 de soro sanguíneo, ou de células das glândulas salivares, podem ser as principais vias de secreção salivar de HSP70 (Fábián *et al*., 2003).

1.5. Objetivo geral

O objetivo geral do presente estudo é avaliar a presença de biomarcadores salivares, relativos à aclimatação sazonal, em vacas de leite, da raça Holstein-Frísian, comparando animais de diferente potencial produtivo.

1.5.1. Objetivos específicos

- Avaliar a existências de diferenças entre os perfis proteicos da saliva mista de vacas de alta e baixa produção de leite, em cada um dos diferentes períodos de ensaio [verão,

outono (termoneutralidade) e inverno], através de técnicas de separação (SDS-PAGE) e identificação de proteínas (espectrometria de massa).

- Comparar os níveis de proteínas de choque térmico (HSP 70) salivares, entre períodos e animais com diferente potencial produtivo, através de imunomarcação com anticorpos comerciais, pela técnica de Western Blot.
- Comparar os níveis de cortisol salivar, entre os diferentes períodos de ensaio, e dentro de cada um destes entre animais de alta e baixa produção, bem como medir o pH das referidas amostras e comparar os resultados nos vários períodos e grupos de produção.

2. Material e Métodos

2.1. Locais e Laboratórios

Os ensaios experimentais decorreram na Sociedade Nacional Rústica, Nossa Senhora da Vila - Herdade das Pedras Alvas (38º 41' 10.6362''N e 8º 8' 17.631''W), localizada em Montemor-o-Novo.

As análises laboratoriais tiveram lugar em diversos laboratórios do Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas (ICAAM), situado na Universidade de Évora, na Herdade da Mitra.

A identificação de proteínas, por espetrometria de massa, pela técnica MALDI-TOF (*Matrix-assisted laser desorption/ionization),* foi realizada nos laboratórios da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

2.2. Animais

Para este ensaio foram selecionadas 15 fêmeas de raça *Holstein Frísian* em lactação (8 animais de elevado mérito produtivo e 7 de baixo mérito produtivo). Os animais foram escolhidos de acordo com critério de seleção, com base em lactações corrigidas aos 305 dias.

Das 15 fêmeas inicialmente escolhidas, houve a necessidade de eliminar animais do ensaio devido à presença de mastites, aquando do início do mesmo, ficando assim para a análise 6 animais por grupo de produção. Desta forma, foram analisados 6 animais de elevado mérito produtivo (mais de 9000Kg/lactação), com um valor médio de produção de 40,81 ± 0,96 Kg (média ± erro padrão da média) no período 1 e 29,98 Kg ± 1,39 no período 3 e 6 animais de baixo mérito produtivo (menos de 9000Kg/lactação), com um valor médio de produção de 34,62 Kg ± 1,39 (média ± erro padrão da média) no período 1 e 24,52 Kg ± 0,73 no período 3. A escolha dos animais foi feita de acordo com critérios de homogeneidade entre grupos, i.e.: idade, número de lactação, dias de lactação.

Após a escolha dos animais de cada grupo de produção, foram marcados com tinta, para maior facilidade de identificação.

Relativamente à alimentação, os animais foram alimentados duas vezes por dia com silagem, feno e água *ad libitum*.

Ao longo do ensaio os animais estiveram sempre estabulados.

2.3. Organigrama

O organigrama que se segue (**Figura 8**) representa, de forma esquemática e simplificada, os procedimentos que foram efetuados, no que diz respeito aos dados e amostras recolhidas em campo, bem como as análises laboratoriais realizadas.

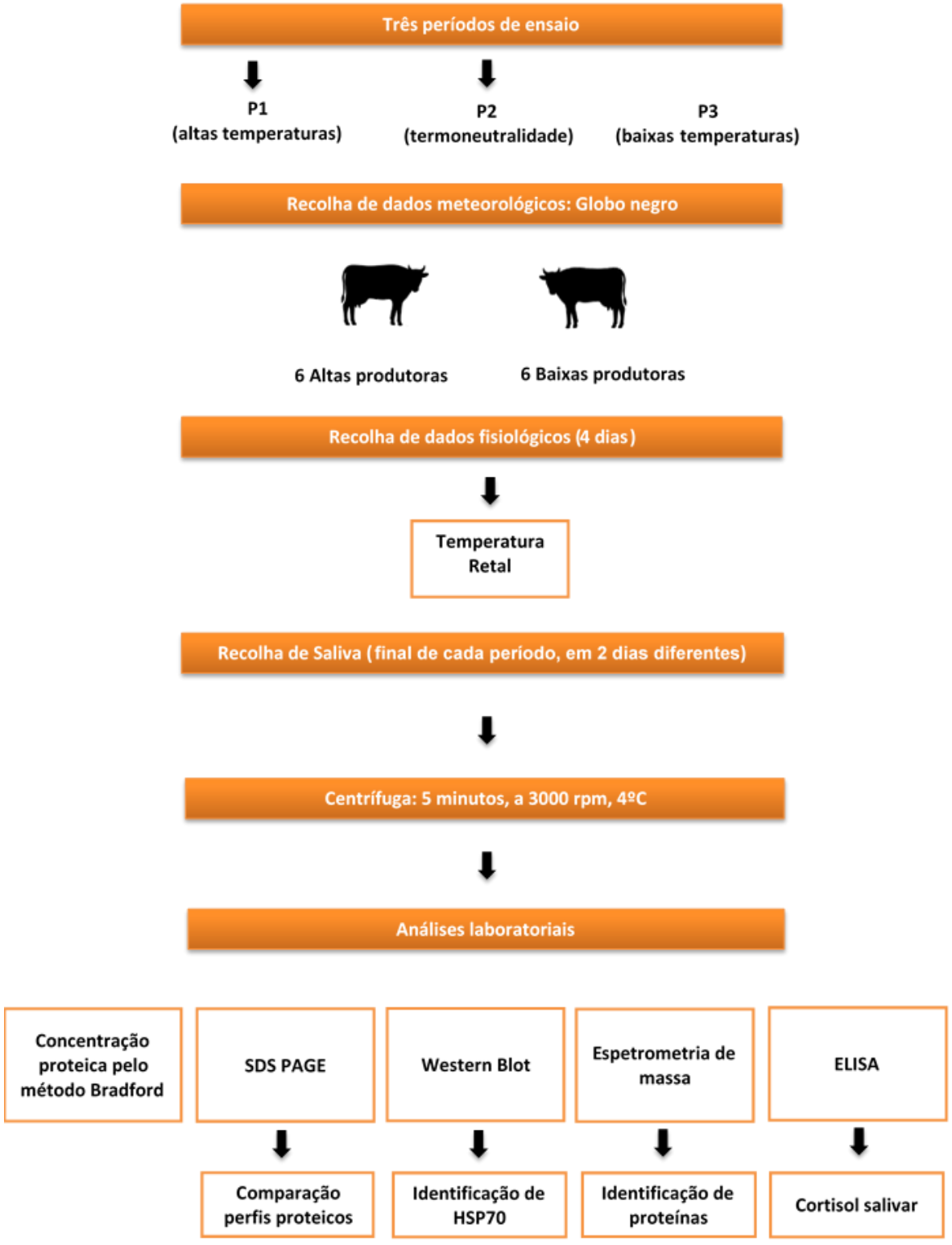


Figura 8 - Organigrama dos procedimentos efetuados

2.4. Delineamento experimental

2.4.1. Recolha de dados e amostras

Uma vez que se pretendia identificar situações em que os animais estariam em diferentes condições de stresse térmico, foram realizados três ensaios em três períodos distintos:

a) O primeiro ensaio realizou-se no mês de Agosto, em condições de Verão, portanto com temperatura ambiental elevada;
b) O segundo ensaio decorreu no mês de Setembro, em condições de verão e de termoneutralidade;
c) O terceiro ensaio foi realizado em Janeiro, em condições de Inverno e com baixas temperaturas ambientais.

Para avaliar a situação térmica dos animais, foi medida a temperatura de globo negro, em todos os períodos do ensaio, com o auxílio de um termómetro de globo negro. Os termómetros foram colocados em dois locais diferentes, no exterior e dentro da instalação, com o objetivo de verificar a temperatura de globo negro à sombra e ao sol. A temperatura foi medida em três períodos diferentes: no período da manhã (8h), à tarde (13h) e ao final da tarde (16h). Após ser feita a medição das temperaturas de globo negro foram medidas as temperaturas rectais.

A medição da temperatura retal foi feita diariamente, durante o período de ensaio (4 dias), após a 1ª ordenha, entre ordenhas e após 2ª ordenha, sendo obtida através de um termómetro clínico digital, com sinalização sonora após a estabilização da temperatura máxima e com precisão de 0.01°C.

Figura 9 - Medição da temperatura retal

As amostras de saliva foram recolhidas em duplicado no final de cada período, em dois dias consecutivos, com recurso a tampões de algodão (Salivette®, Sarstedt, Nümbrecht, Germany) inseridas na boca dos animais com auxílio de uma pinça hemostática, sendo imediatamente colocadas em gelo, onde se mantiveram até transporte para o laboratório (intervalo máximo de 1h). Já no laboratório, as *salivettes* foram centrifugadas, durante 5 minutos a 3000 rpm, 4°C, para recuperação da saliva do algodão. A amostra de saliva de cada animal foi transferida para diferentes microtubos (*eppendorf),* dos quais foram armazenados a uma temperatura de -25°C, até análises laboratoriais.

Figura 11 – Tampão de algodão (Salivette®, Sarstedt, Nümbrecht, Germany)

Figura 10 - Recolha de saliva com tampões de algodão (Salivette®, Sarstedt, Nümbrecht, Germany)

Durante o ensaio decorreu também a colheita de biópsias de pele, pêlos, sangue e leite, comuns para outros trabalhos realizados.

2.4.2. Análises laboratoriais

2.4.2.1. Determinação da concentração proteica pelo método Bradford

As amostras de saliva, provenientes das 2 recolhas de cada um dos períodos, foram descongeladas e, para cada animal, foi constituído um pool, com as amostras dos dois dias de recolha, desse animal. Este pool pretende minimizar possíveis variações devidas ao efeito dia. A mistura da saliva de cada animal foi feita com uma micropipeta.

Numa primeira fase foi determinada a concentração de proteína total das amostras de saliva, pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

Neste procedimento foram feitas quatro diluições para cada amostra, utilizando água desionizada ou água Mili-Q (H2OmiliQ): diluição 16x (75 µL de H2OmiliQ e 5 µL de amostra), diluição 12x (55 µLde H2OmiliQ e 5 µL de amostra), diluição 8x (35 µL de H2OmiliQ e 5 µL de amostra) e diluição 4x (30 µL de H2OmiliQ e 10 µL de amostra). Seguidamente foi traçada uma

curva de calibração, utilizando concentrações de 0 (H2OmilliQ), 25, 50, 75, 100, 150 e 200 µg/mL de albumina do soro bovino BSA (***B**ovine **S**erum **A**lbumin*), colocando 10 µL de cada solução, em triplicado, nos poços bem como as respetivas diluições das amostras. Após colocar as soluções em triplicado nos poços, pipetaram-se 200 µL de reagente Bradford em cada poço. Nos 5 minutos seguintes foi feita a leitura num leitor de microplacas (Glo Max®, Promega) a 600 nm. Posteriormente, para cada placa, traçou-se uma reta de calibração com os valores das absorvâncias.

2.4.2.2. Eletroforese de Proteínas em Gel de Poliacrilamida – SDS (SDS-PAGE)

Este procedimento foi realizado para fazer uma separação eletroforética de proteínas por SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*), em géis de 8 x 10 cm e 1 mm de espessura.

Foram preparados dois géis: gel de resolução (12% de Acrilamida) e gel de concentração (4% de Acrilamida). O gel de resolução consistiu em 5mL TRIS (1,5) M, pH 8,8, 8mL Acrilamida/bis, 6,8mL de água destilada, 200µL SDS (10% solução) e 0,15mL APS (0,1g de APS + 1mL H2O) e 0,01mL de solução TEMED. Após mistura colocou-se a solução entre as placas de vidro até uma altura de aproximadamente 6cm, seguida de uma camada de cerca de 1mL de água destilada e aguardou-se, até que o gel polimerizasse. Após ocorrer a polimerização, removeu-se cuidadosamente a água com papel absorvente. Em seguida preparou-se o gel de concentração, misturando 150mL, 2mL TRIS 0,5M, pH 0,8, 1,06mL Acrilamida/bis, 4,86mL água destilada, 80µL SDS, 48µL de APS e 8,8µL de solução TEMED. A mistura foi colocada por cima do gel de resolução, seguida da colocação de um pente de 10 poços e aguardou-se até polimerizar. Montou-se o sistema de eletroforese, preenchendo o recipiente com tampão de corrida (0,025M Tris, 0,192M glicina, 1% (m/v) SDS). As amostras foram preparadas através de mistura com tampão de amostra (0,125M Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS (v/v), 5% 2-mercaptoetanol, 20% glicerol; vestígios de azul de bromofenol). Em seguida, as amostras foram aquecidas em banho seco, a 95,5°C, durante 5min, para que ocorra a desnaturação das proteínas e passadas imediatamente para gelo. Num dos poços de cada gel colocou-se 5 µL de marcador de massas moleculares (Precision Protein Standard, Dual Color, BioRad, Ref 161-0374). Procedeu-se à corrida eletroforética, aplicando uma voltagem constante de 140 V, até a frente corrida atingir o fim do gel (cerca de 1h e 30m). Após este procedimento, colocou-se o gel numa solução de fixação com 40% de metanol e 10% de ácido acético durante cerca de uma hora. Posteriormente os géis foram transferidos para uma solução de azul de Coomassie (0,25% Coomassie Brilliant-Blue G-

250) em 20% etanol para corar os géis, durante duas horas. Seguidamente, os géis foram descorados, com várias lavagens com água destilada. Por fim, os géis foram digitalizados, num *scanner* de alta resolução, para posterior análise da imagem, com auxílio do *software* GelAnalyzer2010a.

Na análise dos géis SDS PAGE foram delimitadas todas as bandas correspondentes a cada *lane*, para o cálculo do volume relativo de cada banda, para posterior comparação de amostras entre géis.

2.4.2.3. Digestão de proteínas em gel

As bandas diferencialmente expressas entre grupos/tratamentos, foram identificadas por espectrometria de massa. Este procedimento dividiu-se em quatro partes:

a) Remoção das bandas do gel

Após lavar o gel com água destilada, as bandas pretendidas foram cortadas com auxílio de um bisturi.

b) Remoção do corante

As bandas coradas com azul coomassie foram lavadas com 500µL de água milli-Q, com agitação durante 5 minutos, à temperatura ambiente. Seguidamente removeu-se o líquido e adicionou-se 500µl de ACN 50%, durante 15 minutos, com agitação à temperatura ambiente. Este procedimento foi repetido até retirar o corante. Adicionou-se de seguida 500µL de ACN 100%, com agitação durante 15 minutos, à temperatura ambiente, para "desidratar" o gel. No final removeu-se o líquido excedente.

c) Redução e alquilação

O objetivo deste passo é reduzir as proteínas a péptidos e expor ao máximo os locais de clivagem. Adicionou-se 50µL DTT 10mM e em seguida foi incubado durante 45 minutos, a 56°C. Seguidamente os tubos foram arrefecidos à temperatura ambiente, sendo removido o excesso de líquido. Adicionou-se 50µL de IAA 55mM e deixou-se incubar à temperatura ambiente, sem luz, durante 30 minutos. Removeu-se o líquido e adicionou-se 500µL de ACN 50%, agitando-se de seguida durante 15 minutos. No passo seguinte juntou-se 50µL de ACN 100%, com agitação durante 30 minutos. Por fim, o líquido foi removido e o conteúdo ficou a secar numa centrífuga, com vácuo.

d) Digestão com Tripsina

Adicionou-se cerca de 25µL de tampão de digestão (6,7ng/µL de tripsina e hidrogenocarbonato de amónio 50mM) e deixou-se incubar durante 45 minutos a 4°C. Removeu-se o excesso de líquido que não foi absorvido. Em seguida adicionou-se cerca de 50µL (o dobro do volume inicial) de tampão hidrogenocarbonato de amónio 50mM, sem tripsina, e deixou-se incubar "*over night*". O digerido foi recuperado para novos microtubos, sendo armazenados a -20°C, juntamente com os géis.

2.4.2.4. Identificação de proteínas por espetrometria de massa

Neste procedimento foram utlizadas as seguintes soluções: ACN 50%, ácido fórmico 0,1%, ACN 100% e ácido fórmico 98%.

Para preparar colunas foi colocado ACN 50%, numa ponta *eppendorf* de 20µL (para concentrar e remover sais das amostras), e 4µL de resina (coluna de fase reversa Poros R2), fazendo pressão de seguida, com auxílio de uma seringa. Na fase seguinte, adicionou-se 50µL de ácido fórmico 0,1%, para equilibrar a coluna, fazendo em seguida pressão com a seringa para retirar a solução da ponta *eppendorf.* Seguidamente procedeu-se à lavagem da placa de MALDI, com água destilada e água milli-Q. Posteriormente, a placa foi limpa com papel e lavada novamente com ACN 100%. Deixou-se secar. Numa outra fase, colocaram-se as amostras nas colunas, sendo as mesmas eluídas para a placa MALDI através da solução de matriz α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA; Fluka) numa concentração de 10ug/uL em 50% ACN com 0,1% TFA. As massas monoisotópicas dos péptisos foram determinadas utilizando o algoritmo SNAP 2 (Data Analysis software version 3.4, BrukerDaltonics)

2.4.2.5. Western Blot para deteção de HSP70

a) Transferência das proteínas do gel para a membrana

Nesta técnica utilizaram-se géis de poliacrilamida com uma espessura de 0,75 mm. Após a separação das proteínas em géis de 12% poliacrilamida (SDS-PAGE), colocou-se o gel num recipiente com tampão de transferência [Tris-HCl 25mM, pH 8,3; glicina 192mM; metanol 20% (v/v); SDS 0,037% (m/v)], durante aproximadamente 15 minutos, para equilibrar. Em seguida, cortou-se a membrana PDVF (difluoreto de polivilideno) do tamanho semelhante ao dos géis. As folhas foram, posteriormente, colocadas em metanol puro (100%), durante 5 segundos, para tornar a membrana hidrofóbica. Seguidamente, montou-se o equipamento de transferência.

Neste passo utilizou-se uma cassete, onde se colocou, em cima da parte preta da cassete, uma esponja e papel de filtro; em cima do papel de filtro colocou-se a membrana com o gel, para que o gel contacte com o papel de filtro; por cima da membrana colocou-se novamente papel de filtro e uma esponja por cima do papel de filtro. De seguida, as cassetes foram fechadas e colocadas na tina. Colocou-se, posteriormente, na tina de eletroforese, juntamente com um acumulador de gelo, o tampão de transferência e um magneto no fundo da tina, que ficou a agitar durante todo o processo de transferência. Neste procedimento, selecionou-se uma corrente constante a 350mA, durante 1h.

b) Deteção da proteína HSP70, transferida para a membrana

Neste procedimento colocou-se a membrana numa solução de bloqueio 5% leite em pó magro em TBS-T [Tris-HCl 25Mm, pH 7,6, Nacl 150mM; 0,1% tween-20], durante duas horas, com agitação, à temperatura ambiente. Seguidamente, as membranas foram incubadas com anticorpo primário (diluição de 1:100 e 1:200), durante 2h, com agitação, à temperatura ambiente ou *overnight* a 4°C. Após este passo, procedeu-se à lavagem das membranas, utilizando 0,1g de leite em pó e TBS-T diluído 1x, repetindo este procedimento 3 vezes, durante 15 minutos. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário (diluição de 1:5000), durante 1h e 30m, com agitação, à temperatura ambiente, ou então *overnight* a 4°C. Procedeu-se novamente à lavagem das membranas com TBS-T, repetindo-se a lavagem 3 vezes, durante 5 minutos cada. No final, as membranas foram reveladas, utilizando substrato quimiofluorescente. Neste procedimento, aplicaram-se algumas gotas justapostas de substrato fosfatase alcalina numa placa. Colocou-se a membrana em contacto com o reagente durante cerca de 5 minutos, retirando-se de seguida o excesso de líquido. As membranas foram depois colocadas num transiluminador (Bio-Rad) para adquirir a imagem das membranas, com a identificação da proteína pretendida.

Numa tentativa de otimizar o protocolo para deteção de HSP70 em saliva de vaca, foram testadas diferentes quantidades de proteína total: 1272,4, 1445,6, 1620,7 e 2503,2 µg/mL.

2.4.2.6. ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) para quantificação do cortisol salivar

Para a quantificação do cortisol salivar pelo método ELISA é utilizada uma microplaca de poliestireno, de 96 poços (IBL International). O procedimento foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Foram adicionados 50µL das soluções standard (0,00, 0,03, 0,06, 0,20, 0,60, 1,50 e 4,00 µg/dL) de cortisol, e dois controlos de qualidade (soluções de concentração

conhecida) e amostras de saliva nos respetivos poços da microplaca, em duplicado. Seguidamente adicionaram-se 100 µL da enzima conjugada em cada poço, selou-se a placa com papel adesivo, para evitar perdas por evaporação, e incubou-se durante 2 horas à temperatura ambiente (18-25°C) num agitador orbital (450rpm). Seguidamente procedeu-se à lavagem da placa, para eliminar moléculas não adsorvidas. O procedimento experimental envolveu 4 lavagens dos poços com 250 µL de tampão de lavagem diluído. Após a lavagem, a placa foi bem seca, batendo sobre papel absorvente. Em seguida adicionou-se 100 µL de substrato (TMB) em cada poço e incubou-se durante 30 minutos à temperatura ambiente (18-25°C), num agitador orbital (450 rpm), verificando-se o produto resultante da reação enzimática com o aparecimento de uma substância de cor azul. Em seguida a reação foi interrompida com a adição de 100 µL de solução *stop* (solução de ácido sulfúrico) em cada poço. Nesta situação ocorreu a passagem da cor azul para amarelo. No final a placa foi lida no leitor de microplacas (Glo Max®), a 450 nm, usando a leitura 600-650 nm como referência.

2.4.2.7. Medição do pH salivar

O pH das amostras foi medido através da utilização de um potenciómetro (HANNA® HI a31400), à temperatura ambiente de 25,5°C. As medições foram feitas com as amostras descongeladas, no laboratório, em todas as amostras dos três períodos de ensaio.

2.4.3. Análise estatística

O delineamento experimental do estudo foi um fatorial com dois fatores fixos (período e nível produtivo). Todas as variáveis foram analisadas de modo a garantir os pressupostos de normalidade, independência e homocedasticidade. O pressuposto da Normalidade foi validado pelo teste de Shapiro-Wilk, e a homocedasticidade pelo teste de Levene. Quando estes não eram verificados utilizou-se uma alternativa não paramétrica.

Para a comparação das médias das temperaturas de globo negro ao sol e à sombra, em cada um dos períodos, bem como para comparação das temperaturas retais entre as várias horas de medição, dentro de cada período, utilizou-se uma análise de variância (ANOVA).

Para a comparação dos valores de pH salivar entre períodos foram realizadas comparações múltiplas a todas as combinações de acordo com modelo fatorial. As médias dos volumes relativos de cada uma das bandas proteicas foram comparadas entre os dois grupos experimentais (vacas alta *vs* baixa produção), em cada um dos períodos, através de teste *t* de Student para amostras independentes.

As correlações de Spearman, para as diferentes variáveis, foram consideradas tendo em conta o nível de significância e o valor de R, sendo esta correlação utilizada para correlacionar as variáveis cortisol, pH salivar e temperatura retal média.

A variável cortisol, nos vários períodos, foi analisa de acordo com metodologia não paramétrica, tendo sido realizados múltiplos testes de Wilcoxon com ajustamento de Holm para evidenciar a existência de diferenças estatísticas entre os períodos.

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do *software* SPSS (IBM, version 21) e RStudio, sendo o nível de significância estatística estabelecido em $P < 0.05$, para um intervalo de confiança de 95%.

3. Resultados e Discussão

3.1. Dados meteorológicos – Temperatura de Globo Negro

Ao longo do período de ensaio foram registadas as temperaturas de globo negro ao sol e à sombra, durante os períodos de verão, com altas temperaturas (P1), e inverno, com baixas temperaturas (P3), às 8h, 13h e 18h, ao longo dos quatro dias de ensaio, em cada período (**Tabela 2**).

Tabela 2 - Temperaturas de globo negro registadas diariamente no período de verão (P1) e inverno (P3) (média ± erro padrão).

Período	**P1**			**P3**		
Horas	8	13	18	8	13	18
TGN Sol	28,69 ± 2,42	45,19 ± 4,19	33,25 ± 1,96	10,81 ± 1,68	23,19 ± 4,83	8,63 ± 0,79
TGN Sombra	19,06 ± 0,77	26,94 ± 1,19	25,63 ± 1,28	4,25 ± 1,04	8,25 ± 0,69	5,94 ± 0,69

Durante o primeiro período do ensaio (P1) foram observadas algumas oscilações na temperatura de globo negro ao longo dos vários dias, sendo os valores de temperatura superiores ao sol comparativamente aos valores registados à sombra (35,71 ± 2,78 *vs* 23,88 ± 1,23) (P=0,001) (**Figura 12**). Neste período, a temperatura máxima registada foi de 53°C ao sol e a mínima à sombra, com 17°C. Relativamente aos valores de temperatura mínima registados, verifica-se que, com exceção de dois dias registados às 8h, as temperaturas à sombra foram sempre superiores a 20°C.

No terceiro período do ensaio (P3), os valores de temperatura média ao sol também foram significativamente superiores aos registados à sombra (14,21 ± 2,64 *vs* 6,15 ± 0,7) (P=0,007), sendo o valor máximo de 35,8°C ao sol, registado às 13h e mínimo 1,5°C à sombra, às 8h.

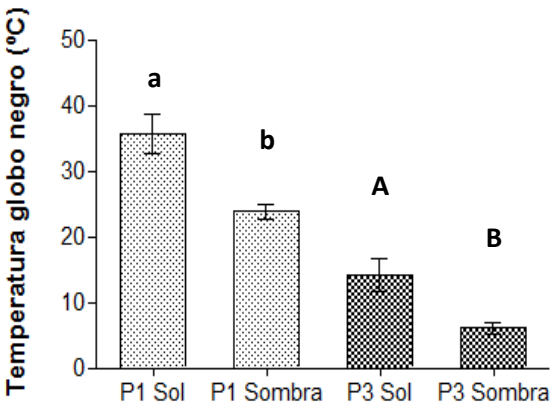


Figura 12 - Valores da temperatura de globo negro registada ao sol e à sombra, nos dois períodos de ensaio (médios e erro padrão). P1 Sol – TGN ao sol no período 1; P1 Sombra – TGN à sombra no período 1; P3 Sol – TGN ao sol no período 3; P3 Sombra – TGN à sombra no período 3. As letras significam as diferenças significativas observadas entre períodos (minúscula para P1 e maiúsculas para P3), para P <0,05

Pela observação do gráfico (**Figura 12**) verifica-se que as TGN médias foram mais elevadas no período de verão, observando-se no P1, ao sol, uma média de 35,71 ± 4,61°C (média ± erro padrão da média), sendo este um valor superior ao registado à sombra (23,88 ± 2,05°C).

No P3 registou-se uma média de TGN ao sol de 14,21 ± 2,61°C e de 6,15 ± 1,01°C à sombra (média ± erro padrão da média), sendo o máximo de 35,75°C ao sol e o mínimo 1,50°C à sombra.

3.2. Dados fisiológicos - Temperatura Retal

Segundo Brown-Brandl *et al*. (2003), a temperatura retal é considerada um bom indicador de stresse térmico, refletindo a capacidade do animal em manter o balanço entre produção e troca de calor com o ambiente.

No período 1 do ensaio foram avaliados os valores diários de temperatura retal, às 8h (TR1), 13h (TR2) e 18h (TR3).

No período 1 (P1), o valor máximo registado foi às 18h (42°C) e mínimo às 8h (37°C). Neste período as altas produtoras atingiram valores médios ligeiramente mais elevados, no entanto, tanto altas como baixas produtoras no P1, atingiram sempre valores superiores aos registados no P3, sendo este resultado justificado pelos valores de TGN, registados em ambos os períodos, serem mais elevados no P1. Estatisticamente verificam-se diferenças significativas nas temperaturas retais médias entre os períodos 1 e 3 (P = 0,005).

Relativamente aos valores diários registados às 8h (TR1), verificaram-se diferenças significativas entre os dois períodos (P = 0,0012), sendo que no P1 a TR1 foi significativamente superior à do P3 (**Figura 13**). O mesmo foi verificado na TR2 (13h), cujos valores apresentaram

diferenças significativas entre períodos (P <0,001), estando os valores significativamente aumentados no P1 relativamente ao P3 (**Figura 14**). Os valores de TR3 (18h) também diferiram significativamente entre períodos (P <0,001), verificando-se também no P1 uma temperatura significativamente superior à do P3 (**Figura 15**). Para ambas as temperaturas (TR1, TR2 e TR3), não se verificaram diferenças significativas na entre altas e baixas produtoras, em cada período.

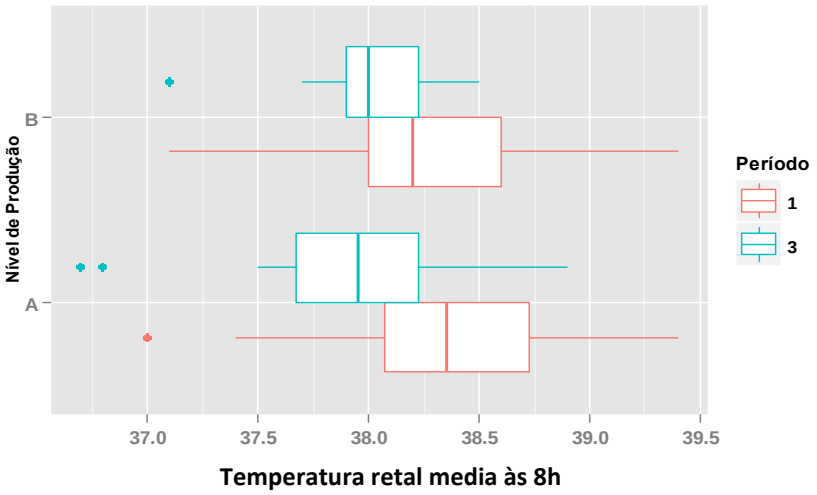


Figura 13 - Box plot dos valores de temperatura retal medida às 8h nos 2 períodos de ensaio, para altas (AP) e baixas (BP) produtoras. Os pontos azul e vermelho dizem respeito aos animais considerados *outliers.* As letras A e B dizem respeito a altas e baixas produtoras, respetivamente.

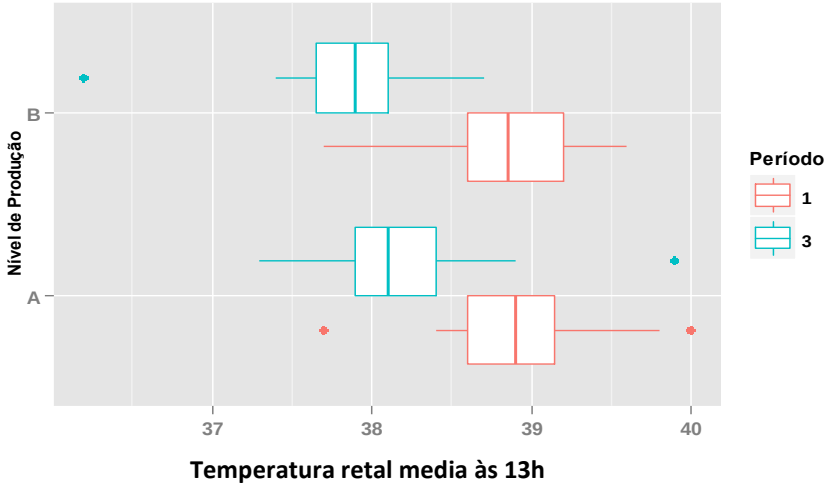


Figura 14 - Box plot dos valores de temperatura retal medida às 13h nos 2 períodos de ensaio, para altas (AP) e baixas (BP) produtoras. Os pontos azul e vermelho dizem respeito aos animais considerados *outliers.* As letras A e B dizem respeito a altas e baixas produtoras, respetivamente.

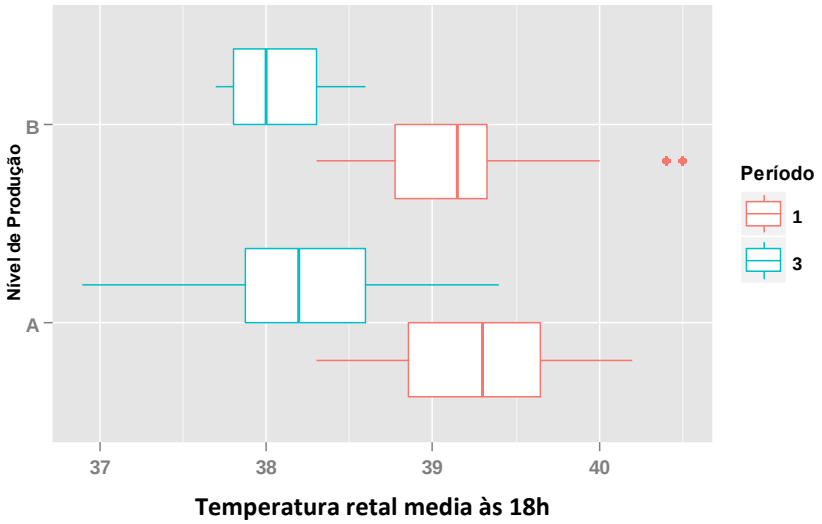


Figura 15 - Box plot dos valores de temperatura retal medida às 18h nos 2 períodos de ensaio, para altas (AP) e baixas (BP) produtoras. O ponto vermelho diz respeito aos animais considerados *outliers.* As letras A e B dizem respeito a altas e baixas produtoras, respetivamente.

O valor médio mais elevado no P1 foi 39,26 ± 0,02°C (média ± erro padrão da média), registado às 18h. Este valor encontra-se dentro do intervalo sugerido por Robinson (1999), citado por Cattelam & Martinez (2013), onde refere que a temperatura retal para bovinos de leite pode variar entre 38,0°C a 39,3°C, dependendo por vezes do mérito genético dos animais, sendo as vacas de alto potencial genético ou altas produtoras mais sensíveis ao stresse térmico, comparativamente a animais de baixa produção. De acordo com Berman *et al*. (1985) pequenos acréscimos na temperatura retal, a partir de 39°C, são negativamente correlacionados com a produção de leite. Um aumento de 1°C é suficiente para reduzir a performance produtiva, na maioria das espécies pecuárias (Mcdowell *et al*., 1976), o que demonstra que a temperatura corporal pode ser um indicador sensível das respostas fisiológicas.

No período 3 verificou-se um valor máximo de 39,9°C e mínimo de 36,2°C, ambos registados às 13h. No entanto, de acordo com os valores médios, o valor máximo foi de 38,15 ± 0,08°C às 18h, estando também este valor dentro do intervalo sugerido por Robinson (1999, citado por Cattelam & Martinez, 2013). Neste período, durante o registo das temperatura ao sol e à sombra, houve dias de sol alternados com períodos de chuva, o que fez com que a sensação térmica ao sol e à sombra não apresentasse grandes oscilações. No entanto, pelos valores médios, as temperaturas foram superiores às 13h ao sol, devido ao efeito da radiação solar direta, sendo os valores à sombra mais baixos mas superiores às restantes horas.

Na **Figura 16**, observa-se a existência de diferenças significativas nas temperaturas retais registadas no P1 ($P < 0,001$) nos animais de alta produção (P1A), bem como entre as temperaturas retais, de animais de baixa (P1B) ($P < 0,001$). Por outro lado, no P3, não se observa

a referida diferença entre as temperaturas retais, tanto nos animais de alta produção (P3A) (P= 0,287) como nos de baixa produção (P3B) (P=2,224).

Observa-se que os valores de temperatura retal foram mais elevados às 18h (TR3) no período 1, nos animais de alto e baixo potencial genético, o que sugere que, no período de verão, os animais armazenam calor durante o dia, sendo este dissipado durante a noite, uma vez que as temperaturas medidas às 8h (TR1) foram sempre inferiores.

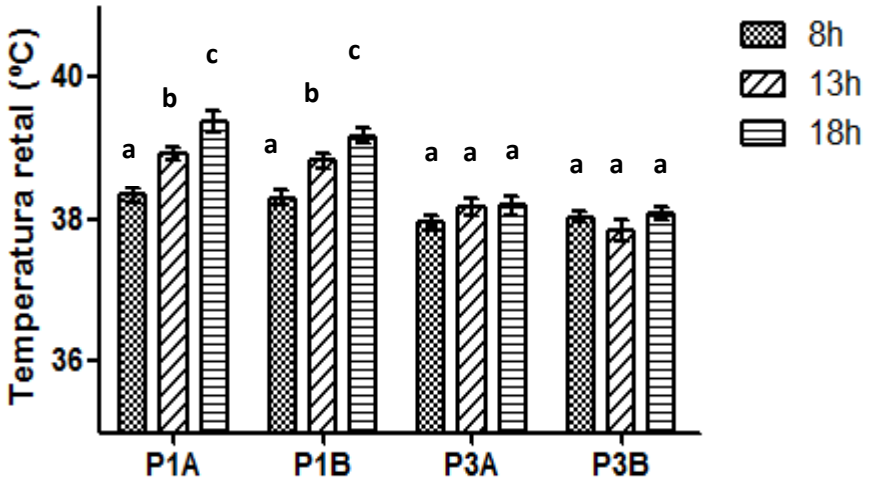


Figura 16 - Valores das temperaturas retais registadas nos dois períodos de ensaio, em animais de alta e baixa produção (média ± erro padrão). P1a – Vacas de alta produção no período 1; P2a - Vacas de baixa produção no período 1; P3a - Vacas de alta produção no período 3; P3b - Vacas de baixa produção no período 3. TR1 – Temperatura retal medida às 8h; TR2 – Temperatura retal medida às 13h; TR3 – Temperatura retal medida às 18h. As letras dizem respeito às diferenças significativas observadas, para P < 0,05

Comparativamente aos valores de temperatura ambiental medidos com o termômetro de globo negro, observa-se que, no período 1, as temperaturas foram mais elevadas às 13h, apresentando os animais valores médios superiores de temperaturas às 18h. No entanto, as alterações verificadas na temperatura retal média não foram muito acentuadas (39,26 ± 0,02°C) (média ± erro padrão da média). Apesar de existirem aumentos consideráveis na temperatura retal, neste período, os animais poderiam não ter chegado a estar em stresse térmico, pois as temperaturas retais médias, no período 1, não chegaram aos valores de temperatura de 39,3°C, já considerados de stresse térmico (Robinson 1999, citado por Cattelam & Martinez, 2013). Por outro lado, considerando simultaneamente AP e BP, no período 3, não se observaram diferenças significativas entre as temperaturas retais medidas às 8h, 13h e 18h (P = 0,37).

Apesar das altas temperaturas ambientais registadas durante o dia, um período de arrefecimento durante a noite poderia minimizar os efeitos do stresse térmico e permitir a

recuperação dos animais. Este período de arrefecimento pode ser pressuposto pelas temperaturas mais baixas registadas (menores que 21°C) à sombra, às 8h. Igono *et al*. (1992, citado por West, 2003), relatou que, apesar das altas temperaturas ambientais durante o dia, um período de arrefecimento de menos de 21°C durante 3 a 6 horas poderia minimizar a descida da produção de leite bem como permitir aos animais tolerar as altas temperaturas durante o dia. Para além disto, os animais não se encontravam expostos à radiação solar direta, o que reduz a carga da radiação. Segundo Collier *et al.* (1981) e Yamamoto *et al.* (1994), citados por Cattelam e Vale, 2013), observaram uma maior temperatura retal em animais expostos a radiação solar direta, visto que esta provoca incremento calórico nos animais, sendo a disponibilização de sombra importante para manter o consumo de alimento, crescimento e sobrevivência dos animais (Blackshaw e Blackshaw, 1994). Os últimos autores acima citados relatam ainda que a sombra reduz a carga de radiação em, pelo menos, 30%.

3.3. Concentração proteica da saliva mista de animais de alta e baixa produção

A concentração proteica das amostras de saliva mista de animais de alta e baixa produção, nos três períodos de ensaio, apresentou alguma variabilidade inter-individual, estando estes valores compreendidos entre 325 e 1788 µg/mL.

Relativamente à concentração em proteína total, das amostras de saliva, não se observaram diferenças significativas entre grupos de produção, em nenhum dos períodos analisados (**Figura 17**), sendo os valores médios obtidos nos três períodos, para altas e baixas produtoras, 959 ± 81 e 1081 ± 99 µg/mL (média ± erro padrão), respetivamente.

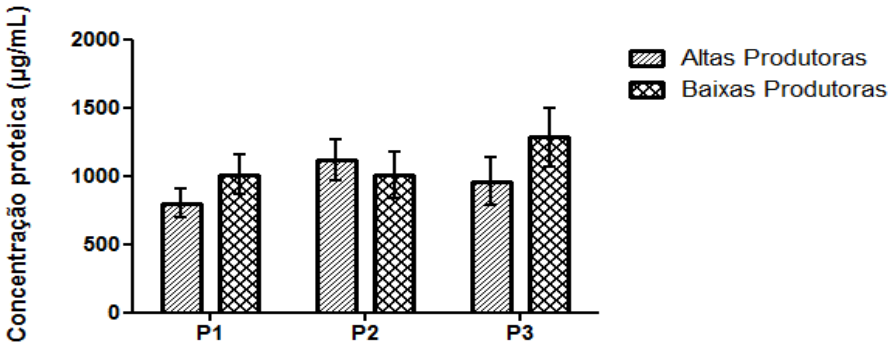


Figura 17 - Concentração proteica das amostras de saliva mista de bovinos de alta e baixa produção de leite, nos três períodos de ensaio (média ± erro padrão da média). P1 – Período um; P2 – Período dois; P3 – Período três

3.4. Comparação do perfil proteico nos três períodos, entre animais de alta e baixa produção

Em termos de perfis proteicos, os resultados foram determinados tendo em conta o valor médio de cada banda proteica, para cada animal, em cada período. No que diz respeito aos perfis proteicos, após a separação das proteínas de acordo com as suas massas moleculares, por SDS PAGE, foram observadas 16 bandas proteicas consistentemente expressas, com massas moleculares entre 10 e 200 kDa (**Figura 18**).

Observaram-se algumas diferenças significativas, em termos de níveis de expressão de algumas proteínas, entre vacas com alto e baixo potencial de produção nos três períodos.

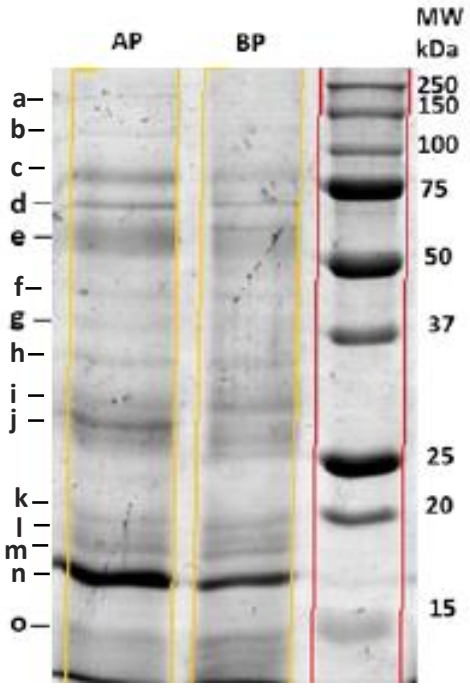


Figura 18 - Perfis SDS PAGE representativos de vacas com alto (AP) e baixo (BP) potencial de produção de leite. As bandas assinaladas (d, e, e o) são aquelas para as quais se observaram diferentes expressões. Bandas d e o, expressas em níveis mais elevados em AP no período 1; banda e expressa em níveis mais elevados em BP, no período 2.

3.4.1. Comparação do perfil eletroforético entre grupos de produção no período 1 (verão)

De acordo com a análise estatística realizada, verificaram-se diferenças significativas na banda d (P = 0,045) (**Figura 19**), sendo uma banda com massa molecular aparente de cerca de 70 kDa, com expressão aumentada nos animais de alta produção comparativamente aos de baixa produção (5,08 ± 0,56% volume *vs* 3,47 ± 0,27% volume) (média ± erro padrão da média).

Foram observadas diferenças significativas na banda o (banda proteica de massa molecular ligeiramente inferior a 15kDa) (P = 0,006) (**Figura 18**), estando esta significativamente aumentada em vacas de alto potencial de produção (10,97 ± 1,01% volume *vs* 6,29 ± 0,63% volume) (média ± erro padrão da média) (**Figura 19**).

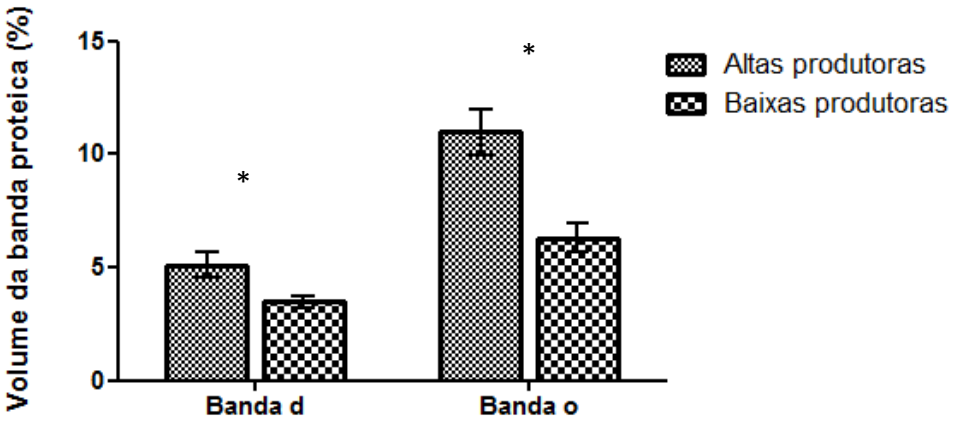


Figura 19 - Volumes relativos das bandas diferencialmente expressas, observadas nos perfis proteicos (SDS PAGE) (média ± erro padrão da média), em vacas de altas e baixa produção, no período 1 (verão). Banda d - massa molecular aparente de cerca de 70 kDa; Banda o - massa molecular ligeiramente inferior a 15kDa. *Diferenças significativas entre altas e baixas produtoras para P <0,05

3.4.2. Comparação do perfil eletroforético entre grupos de produção no período 2 (termoneutralidade)

Foram observadas diferenças significativas nos níveis de expressão da banda b (P = 0,005) e da banda c (P = 0,008), ambas com expressão aumentada nos animais de baixa produção (2,90 ± 0,12% volume e 6,58 ± 0,31% volume), comparativamente aos de alta produção (2,14 ± 0,10% volume e 5,77 ± 0,16% volume) (média ± erro padrão da média), respetivamente (**Figura 20**).

Relativamente à banda d (70 kDa), apesar de ter apresentado diferenças entre vacas de alto e baixo potencial de produção no primeiro período (animais sujeitos a temperaturas elevadas), no segundo período (temperaturas amenas) continuou a observar-se uma tendência para a referida diferença (**Figura 20**). Esta tendência em diversos períodos do tempo, independentes da temperatura, sugere que proteínas salivares com esta massa molecular são potenciais biomarcadores de produção, podendo ser úteis para ajudar na compreensão de mecanismos fisiológicos envolvidos na adaptação dos animais.

A banda e (aproximadamente 60kDa), que também diferiu significativamente entre altas e baixas produtoras (P = 0,008) (**Figura 18**), é expressa em níveis mais altos nos animais com baixas produções, comparativamente aos animais de altas produções (10,89 ± 0,43% volume *vs* 13,26 ± 0,56% volume) (média ± erro padrão da média), apenas no segundo período (termoneutralidade) (**Figura 20**).

Relativamente à banda o (banda proteica de massa molecular ligeiramente inferior a 15kDa) também foram observadas diferenças significativas (P = 0,041) (**Figura 18**) entre altas e baixa produtoras, estando esta significativamente aumentada em vacas de alto potencial de produção (10,97 ± 1,01% volume vs 6,29 ± 0,63% volume) (média ± erro padrão da média) (**Figura 20**). No entanto, é preciso ter em consideração que, para um dos grupos de produção só há 3 animais em que há valores para esta banda. Ainda assim, esta diferença é semelhante à observada no período 1, onde também eram as vacas altas produtoras que apresentavam os valores médios mais elevados, pelo que eta poderá ser uma proteína a ter em conta na avaliação do potencial produtivo.

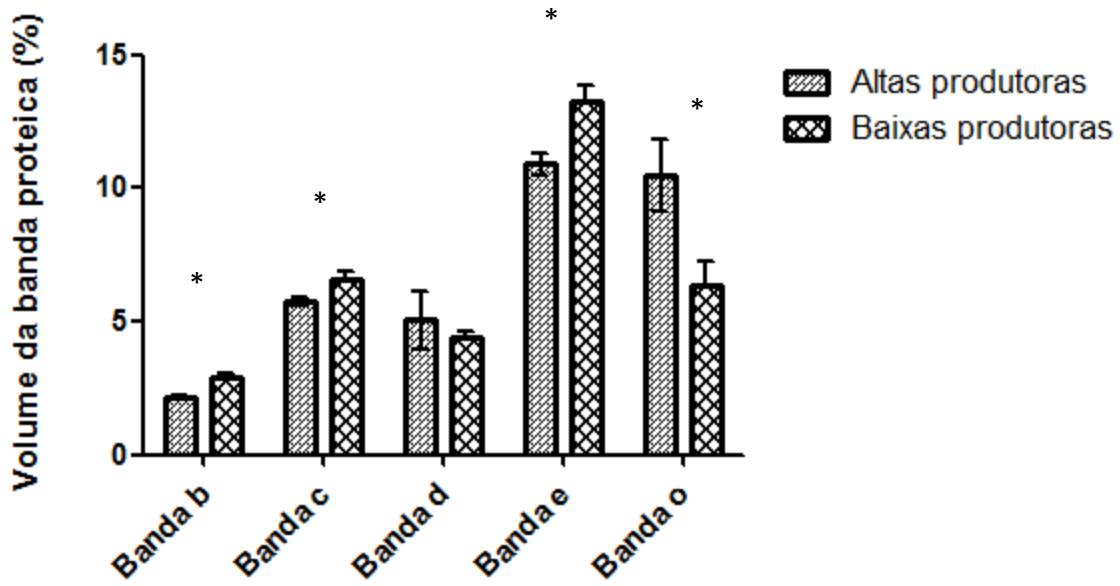


Figura 20 - Volumes relativos das bandas diferencialmente expressas, observadas nos perfis proteicos (SDS PAGE) (média ± erro padrão da média), em vacas de altas e baixa produção, no período 2 (termoneutralidade). Banda d - massa molecular aparente de cerca de 70 kDa; Banda o - massa molecular ligeiramente inferior a 15kDa. *Diferenças significativas entre altas e baixas produtoras para P <0,05

3.4.3. Comparação do perfil eletroforético entre grupos de produção no período 3 (inverno)

No período de Inverno não se observaram diferenças significativas entre vacas de alta e baixa produção, nos perfis proteicos das bandas. Há, no entanto que ressalvar, que neste período, algumas das vacas baixas produtoras já não se encontravam em lactação, o que reduziu o número de animais em condições de análise.

3.5. Identificação das proteínas presentes nas bandas diferencialmente expressas

Uma das proteínas de 70kDa que se sabe estar relacionada com o stresse térmico e com a termotolerância é a HSP70. Os níveis de expressão desta proteína em células mononucleares periféricas de bovinos foram referidos como estando relacionados com o potencial produtivo de vacas Holstein (Deb *et al.*, 2013). Estudos recentes sugerem o uso de proteínas de choque térmico, tais como a HSP70, como biomarcadores de stresse térmico (Sørensen, 2010).

Tendo em conta a presença de Hsp70 na saliva de algumas espécies animais (Chatterjee *et al.,* 2014) e o conhecimento da presença de proteínas de choque térmico na saliva de ruminantes (Lamy et a., 2008), e pelo facto de uma das proteínas que observámos como estando expressa em níveis diferentes ter massa molecular próxima de 70kDa, avaliámos a presença desta proteína na saliva de vaca, através de imunomarcação pela técnica Western Blot. Nas condições usadas, não foi possível observar marcação. Para tornar o método mais eficaz as amostras foram concentradas, para permitir a aplicação de maior quantidade de proteína total no volume permitido pelo volume dos poços. Mesmo com uma quantidade de 50ug de proteína, não foi possível a imunomarcação desta proteína. Que seja do nosso conhecimento, não há referência a valores desta proteína salivar em saliva de bovinos. Tendo em conta que o mesmo anticorpo funcionou em tecidos desta espécie, noutro trabalho (Matos, não publicado) é possível que a ausência de marcação nas amostras de saliva se deva à presença desta proteína em quantidades muito reduzidas na saliva, não sendo esta metodologia suficientemente sensível. Em estudos futuros, técnicas mais sensíveis, como ELISA poderão ser utilizadas para pesquisar a presença e/ou existência de diferenças nos níveis salivares desta proteína.

Através de espectrometria de massa (MALDI TOF), identificou-se a banda d como sendo albumina do soro. Este resultado vai ao encontro do que foi referido por Gonzalez & Rocha

(1998), onde referem que as vacas Holstein de alta produção (>9000Kg/lactação) apresentaram concentrações mais elevadas de albumina no sangue, do que as vacas de baixa produção. Segundo Gonzalez (1997), os níveis de albumina encontram-se relacionados com o desempenho produtivo e reprodutivo, o que confirma o que foi dito anteriormente.

O alto potencial da saliva como fonte de biomarcadores é devido ao facto de possuir várias substâncias que se encontram em quantidades que se relaciona com sangue (Lamy *et al*., 2012). Desta forma, e tendo em conta que a presença de albumina na saliva se deve a passagem do sangue para esta, pode-se pressupor a possibilidade da albumina na saliva ser um biomarcador de potencial produtivo e reprodutivo.

Bernabucci *et al.* (2015) observou uma maior quantidade de albumina presente no soro, em animais sujeitos a altas temperaturas (verão), quando comparada com outras estações. Também Garcia *et al.* (2015), num estudo em que relaciona o stresse térmico com os parâmetros metabólicos e do leite em vacas Holstein, referiu um aumento de proteínas em todas as vacas sob stresse térmico, juntamente com o aumento da albumina, a nível sanguíneo.

A proteína total e a albumina elevada no soro, observada no estudo de Garcia *et al*., (2015), em vacas sob stresse térmico, pode estar relacionada com uma leve (ou transitória) desidratação observada nos animais. Desta forma, a desidratação pode explicar o aumento da albumina. Segundo o que foi referido, o efeito mais evidente do stresse térmico sobre os indicadores metabólicos foi um aumento de proteínas totais e albumina, provavelmente devido à desidratação. Sendo as altas produtoras animais que necessitam mobilizar mais água, no período de verão, em que a temperatura ambiental é mais elevada (levando a maiores perdas de água) e que a diferença entre quantidades de leite produzidas entre altas e baixas produtoras é mais marcada (Silva, não publicado) é possível que as vacas com mérito produtivo mais elevado estivessem em maior desequilíbrio hídrico, relacionando-se este com níveis de albumina mais elevados.

A banda o (banda proteica de massa molecular ligeiramente inferior a 15kDa), foi identificada como correspondendo à proteína "polymeric immunoglobulin receptor", por espetrometria de massa.

A glândula submandibular e parótida são as principais fontes de imunoglobulina A (IgAs), presente na saliva de humanos e de rato. Estas glândulas produzem recetor polimérico de imunoglobulina (pIgR), que por sua vez transporta IgA na saliva (Sakaguchi *et al*., 2013). No entanto, ainda existe pouca informação relativamente ao papel da plgR nas glândulas salivares de ruminantes, particularmente nos bovinos, sendo a informação existente pouco específica.

Foi proposto que a IgA salivar poderia estar relacionada com situações de stresse, uma vez que deriva da ativação do sistema nervoso simpático nas glândulas salivares, submandibular e sublingual (Muneta *et al.*, 2010).

No estudo realizado por Sakaguchi *et al*. (2013), os autores fizeram uma investigação comparativa de expressão pIgR nas glândulas sublingual, submandibular e parótidas de bovinos, para perceber com maior detalhe o mecanismo de regulação da secreção de IgA. Segundo os resultados, os bovinos segregam IgA nas glândulas sublinguais e submandibulares, associados com o pIgR, não se verificando esta situação no caso das parótidas de bovinos e ovinos. Para além disto, verificaram também uma maior densidade de células plasmáticas, que contêm IgA, na glândula sublingual, o que faz com que se pressuponha o facto de esta glândula desempenhar um papel importante no sistema imunitário, da cavidade oral.

No presente trabalho observou-se uma maior expressão desta proteína, em vacas de elevado mérito produtivo, no período 1, sendo este resultado semelhante ao do período 2, onde também se verifica que as vacas altas produtoras apresentavam os valores médios de pIgR mais elevados. Tendo em conta a possível relação entre IgA salivar e stresse, não é de excluir que o facto de animais de elevado mérito produtivo, numa situação de altas temperaturas "sofram" mais os efeitos do calor que animais de mérito produtivo inferior. Mesmo no período 2, e que os animais se encontram em termoneutralidade, estes resultados podem dever-se ainda a efeitos do período anterior. Esta hipótese terá que ser melhor explorada em estudos futuros.

3.6. Quantificação do cortisol salivar pelo método ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) e medição do pH salivar

De acordo com a estatística descritiva, ao comparar os valores médios de cortisol salivar entre os vários períodos, sem considerar o mérito produtivo, verifica-se no período 1, 2 e 3 valores de 1,82 ± 0,28 ng/mL, 2,08 ± 0,21 ng/mL e 2,61 ± 0,54 ng/mL (média ± erro padrão).

Relativamente ao pH salivar, os valores médios estiveram próximos para ambos os períodos: 8,5 ± 0,1 no P1, 8,5 ± 0,1 no P2 e 8,3 ± 0,1 no P3, sendo o valor máximo e mínimo no P1 de 8,9 e 7,9, respetivamente. A saliva dos ruminantes atua como um tampão de bicarbonato-fosfato, possuindo um pH médio de 8,1 (McDougall, 1948), sendo este valor semelhante aos valores médios obtidos no presente trabalho.

Ao comparar os níveis de pH entre grupos de produção e períodos (P1, P2 e P3) verificam-se diferenças significativas entre períodos, em que os valores médios do P2 são superiores aos valores médios do P3 (P = 0,011). No período 2, os valores médios obtidos para o

grupo a (altas produtoras) são mais elevados que os do grupo b (baixas produtoras) (P = 0,044) (**Figura 21**).

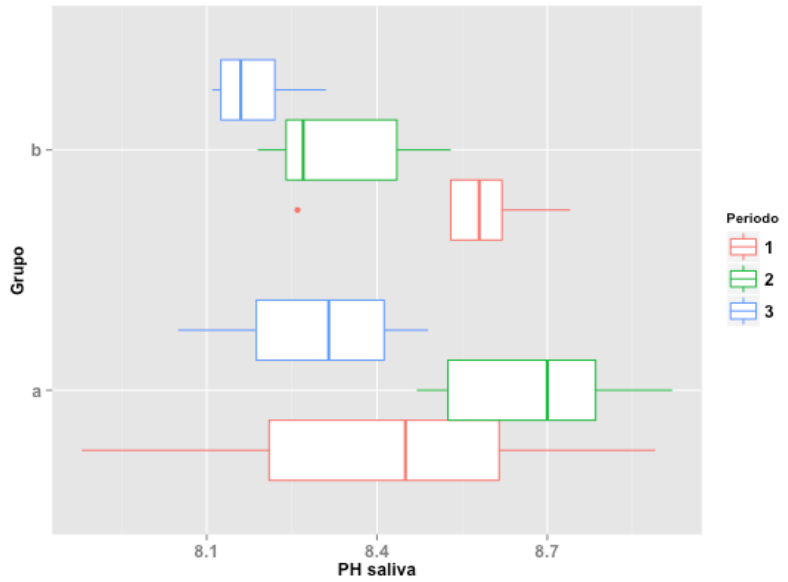


Figura 21 - Box plot dos valores de pH salivar nos três períodos de ensaio, para altas e baixas produtoras. O asterisco a vermelho diz respeito a um animal considerado *outlier*. As letras A e B dizem respeito a altas e baixas produtoras, respetivamente.

No caso dos bovinos, aqueles que se encontram submetidos a stresse térmico, sofrem uma leve alcalose metabólica, pois ocorre aumento da frequência respiratória e, como mecanismo compensatório, há perda de bicarbonato pelos rins, o que diminui o teor do bicarbonato na saliva, que é um elemento chave para o tamponamento do pH ruminal (González & Campos, 2003). Uma redução do pH ruminal poderia, eventualmente, originar uma maior produção de ácido lático, originando uma redução do pH sanguíneo e, consequentemente salivar. Assim, poder-se-ia esperar valores mais baixos de pH no período 1, ao contrário do que se observou. Os valores mais baixos de pH que se observam no período 3 (baixas temperaturas), podem não estar relacionados com situações de stresse mas sim com características alimentares. No entanto, não temos informação relativa a consumo de alimento ou qualidade nutricional do mesmo que nos permita confirmar esta hipótese. As diferenças que se observam, entre grupos de produção, no período 2 também se poderão dever a questões alimentares, ou a algum outro fator ambiental, não controlado, o qual não conseguimos explicar com os dados do presente trabalho.

Relativamente ao cortisol salivar, não se verificaram diferenças significativas, quer através da transformação para análise paramétrica como nas análises não paramétricas (**Figura 23).** A percentagem de variação devida aos efeitos aleatórios (animais escolhidos) foi de 38,9%.

Não se observaram diferenças significativas entre período e nível de produção (P =0,268). O mesmo não foi observado entre os períodos (P = 0,15) e ente os grupos de produção (P = 0,609) (**Figura 23**).

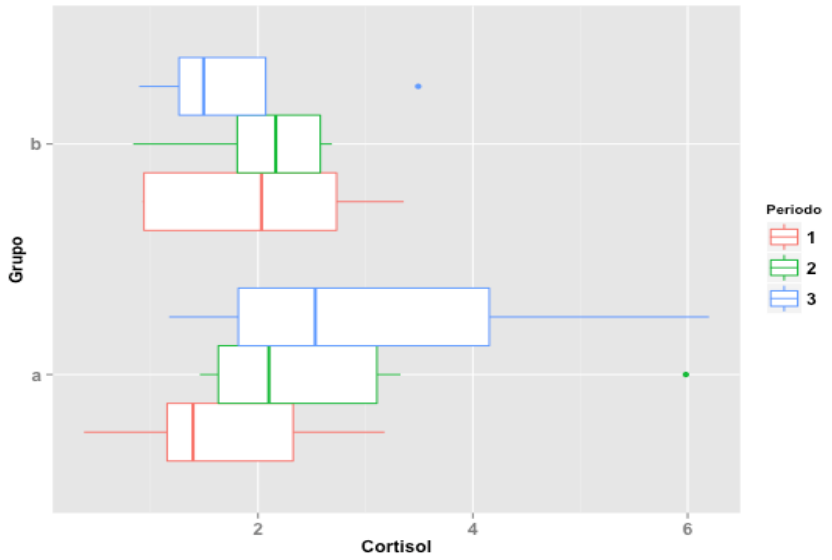


Figura 22 - Box plot dos valores de cortisol salivar nos três períodos de ensaio, para altas e baixas produtoras. Os pontos azul e verde dizem respeito a um animal considerado *outlier.* As letras A e B dizem respeito a altas e baixas produtoras, respetivamente.

Este resultado vai ao encontro dos resultados de Pereira *et al.* (2008), onde não refere a existência de diferenças estatísticas entre as concentrações de cortisol sanguíneo, entre períodos de termoneutralidade e stresse térmico.

Verifica-se, no entanto, uma tendência para valores de cortisol mais elevados no P3, relativamente ao P1 (**Figura 23**). Esses valores mais elevados no P3 notam-se principalmente para as vacas altas produtoras.

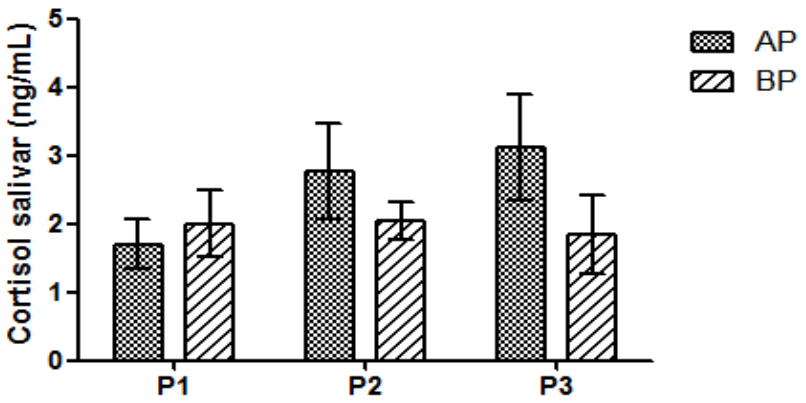


Figura 23 - Valores de cortisol salivar (ng/mL) nos diferentes períodos (média ± erro padrão). P1 – Verão; P2 – Termoneutralidade; P3 – Inverno

Johnson (1972), citado por (Uribe-Velasquez *et al.,* 1998), obteve concentrações plasmáticas de cortisol significativamente mais baixas em vacas de leite submetidas a stresse térmico, quando comparadas ao grupo de vacas na ausência de stresse.

Segundo Pereira (2004), numa primeira fase, o stresse térmico desencadeia uma resposta inespecífica, com aumentos das concentrações de cortisol, uma vez que se pretende reduzir a termogénese, devendo portanto a resposta específica implicar uma redução dos níveis de cortisol. O mesmo autor citou Alvarez e Johnson (1971), que referem que durante o stresse térmico prolongado, os baixos níveis de cortisol podem contribuir para a diminuição da produção de calor metabólico, contribuindo assim para a eficiência do processo de aclimatação. Podendo o cortisol estar associado à produção de calor metabólico, faz sentido que os valores estejam mais elevados quando os animais estão sujeitos a baixas temperaturas, tal como se observou no presente trabalho.

Ainda que os trabalhos referidos atrás digam respeito a níveis de cortisol plasmático e, no presente trabalho tenham medidas as concentrações de cortisol salivar, segundo (Pérez *et al.* (2004), existe uma correlação positiva entre as concentrações do plasma sanguíneo e as concentrações do cortisol salivar (r = 0,746). Este autor afirmou que a concentração de cortisol salivar pode, portanto, ser utilizada em vez das concentrações plasmáticas. Os níveis de cortisol na saliva correspondem à fração livre de cortisol no plasma, que é a única fração biologicamente ativa no organismo, devido ao facto de ser capaz de se ligar a recetores celulares (Vining *et al.,* 1983), citado por (Verduzco, 2004).

Assim, pressupõe-se que as concentrações de cortisol podem ser medidas na saliva e usadas na avaliação das respostas ao stresse em bovinos, tal como é referido por Cooper *et al*. (1989). Há no entanto algumas limitações à utilização do cortisol.

Relativamente aos valores da T3 plasmática, verificaram-se diferenças significativas entre períodos (P <0,001) (Silva, não publicado), sendo as concentrações mais elevadas no P3. Desta forma, ao obter-se valores de cortisol com tendência a serem superiores no P3, pode reforçar a hipótese destes valores com tendência para estarem mais elevados no inverno se deverem ao aumento da termogénese.

No P1 verifica-se ainda que os valores de cortisol salivar estão negativamente correlacionados (correlação moderada a forte) com a temperatura retal média (P = 0,033), com um coeficiente de correlação de -0,615.

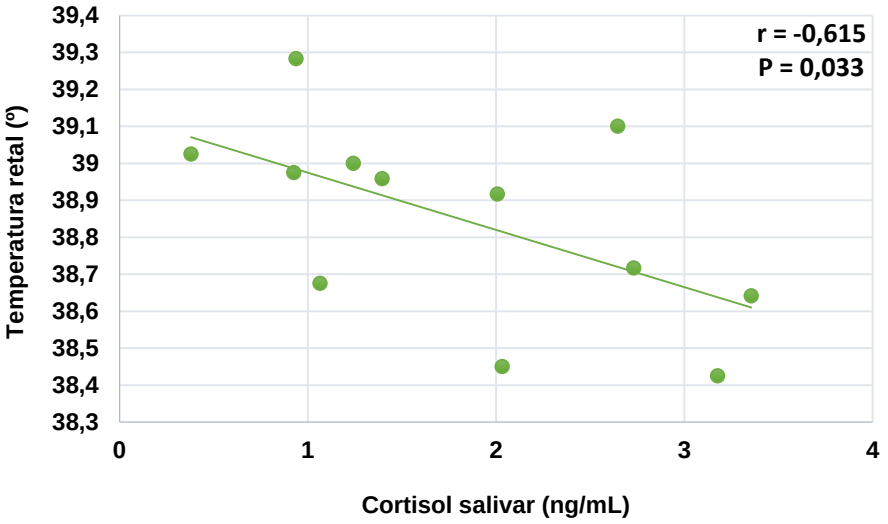


Figura 24 - Relação entre o cortisol salivar e a temperatura retal

O stresse psicológico pode aumentar as concentrações de cortisol no sangue, com influência positiva sobre a termogénese e influência negativa sobre a tolerância ao calor (Pereira et al., 2008).

Assim, segundo Pereira (2004), o animal ao necessitar reduzir a produção de calor metabólico determina uma resposta específica, visando uma diminuição global da termogénese, onde se verifica normalmente uma diminuição dos níveis de glucocorticoides, abaixo dos valores basais de referência.

4. Conclusão

O trabalho apresentado na presente dissertação teve como objetivo avaliar a presença de biomarcadores salivares, relativos à aclimatação sazonal, em vacas de leite, da raça Holstein-Frísian, comparando animais com diferente potencial produtivo. Nesse sentido, foram avaliadas as diferenças existentes nos perfis proteicos da saliva mista de vacas de alta e baixa produção de leite, em cada um dos diferentes períodos de ensaio, bem como as diferenças nos níveis de cortisol salivar, entre os diferentes períodos e, dentro de cada um destes, entre animais de alta e baixa produção.

Animais com diferente potencial produtivo (alto e baixo mérito produtivo) apresentam diferenças nos níveis de expressão de algumas proteínas salivares, sendo algumas dessas diferenças comuns a diferentes períodos (diferentes condições climáticas, nomeadamente em termos de temperaturas ambientais) e outras específicas de cada período. Uma das proteínas expressa em níveis mais elevados em vacas altas produtoras, comparativamente a vacas baixas produtoras, é a albumina. A manutenção de diferentes expressões desta proteína, em diferentes períodos de tempo, sugere que a mesma possa estar relacionada e/ou servir como biomarcador do desempenho produtivo de vacas de leite.

A proteína recetor polimérico de imunoglobulina também apresenta maiores níveis de expressão em vacas de elevado mérito produtivo, apenas em períodos de elevadas temperaturas, podendo ser uma proteína salivar importante na compreensão dos processos envolvidos na tolerância ao calor, nomeadamente na possibilidade de diferentes adaptações por parte de animais com diferente potencial produtivo.

O cortisol salivar, que é maioritariamente utilizado na avaliação de situações de stress, poderá não ser um bom biomarcador de stress térmico. No presente trabalho os valores mais elevados deste analito salivar formam observados no inverso, mostrando que em condições ambientais em que não existe um stresse agudo, os níveis de cortisol salivar poderão estar mais associados a outros tipos de alterações metabólicas (nomeadamente termorregulação) do que a stresse térmico.

Em termos gerais, o presente trabalho mostra o potencial da saliva, como fonte de biomarcadores não invasivos, no estudo de aclimatação sazonal. Futuramente, estudos com um maior número de animais e com variações de temperatura controladas e mais acentuadas, poderão ser de interesse para validar, ou invalidar, estas proteínas salivares como biomarcadores de termotolerância em função do potencial produtivo.

5. Referências bibliográficas

Almeida, G. (2009). *Climatização na Pré-Ordenha de Vacas de Raça Girolando e Seus Efeitos na Produção e Qualidade do Leite e no Comportamento Animal*. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

Alvarez, M. B., & Johnson, H. D. (1971). Environmental Heat Exposure on Cattle Plasma Catecholamine and Glucocorticoids. *Journal of Dairy Science*, *56*(2), 189–194.

Amerong, A., Ligtenberg, A., & Veerman, E. (2007). Implications for Diagnostics in the Biochemistry and Physiology of Saliva. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *6*, 1–6.

Ang, C. S., Binos, S., Knight, M. I., Moate, P. J., Cocks, B. G., & McDonagh, M. B. (2011). Global survey of the bovine salivary proteome: Integrating multidimensional prefractionation, targeted, and glycocapture strategies. *Journal of Proteome Research*, *10*, 5059–5069.

Areias, C. (2011). *Efeito da composição da saliva na prevalência da cárie dentária em crianças com trissomia 21*. Universidade do Porto, Faculdade de Medicina Dentária.

Aronson, J. K. (2005). Biomarkers and surrogate endpoints. *British Journal of Clinical Pharmology*, *59*(5), 491–494.

Azevedo, M., Pires, M., Saturnino, H., Quintão, A., Sampaio, I., Monteiro, J., & Morato, L. (2005). Estimativa de Níveis Críticos Superiores do Índice de Temperatura e Umidade para Vacas Leiteiras ½ , 3/4 e 7/8 Holandês-Zebu em Lactação. *Revista Brasileira de Zootecnia*, *34*(6), 2000–2008.

Bailey, C. B. (1961). Saliva secretion and its relation to feeding in cattle. *British Journal of Nutrition, 15*, 489–498.

Beede, D. K., & Collier, R. J. (1986). Potential nutritional strategies for intensively managed cattle during thermal stress. *Journal of Animal Science*, *62*, 543–554.

Belay, T., & Teeter, R. G. (1993). Broiler water balance and thermobalance during thermoneutral and high ambient temperature exposure. *Poultry Science*, *72*, 116–124.

Bendixen, E., Danielsen, M., Hollung, K., Gianazza, E., & Miller, I. (2011). Farm animal proteomics - A review. *Journal of Proteomics*, *74*(3), 282–293.

Bendixen, E., Danielsen, M., Larsen, K., & Bendixen, C. (2010). Advances in porcine genomics and proteomics - a toolbox for developing the pig as a model organism for molecular biomedical research. *Briefings in Functional Genomics*, *9*(3), 208–219.

Berbigier, P. (1988). *Bioclimatologie des ruminants domestiques em zone tropicale* (Paris: INR.).

Berman, A., Folman, Y., Kaim, M., Herz, Z., Wolfenson, D., Arieli, A., & Graber, Y. (1985). Upper Critical Temperatures and Forced Ventilation Effects for High-Yielding Dairy Cows in a Subtropical Climate. *Journal of Dairy Science*, *68*, 1488–1495.

Bernabucci, U., Lacetera, N., Baumgard, L. H., Rhoads, R. P., Ronchi, B., & Nardone, a. (2010). Metabolic and hormonal acclimation to heat stress in domesticated ruminants. *Animal*, *4*, 1167–1183.

Bernabucci, U., Lacetera, N., Ronchi, B., & Nardone, A. (2015). Effects of the hot season on milk protein fractions in Holstein cows. *Animal Research*, *51*(1), 25–33.

Bianchini, W., Rodrigues, É., Mendes, J., & Andrigheto, C. (2007). Importância da fibra na nutrição de bovinos. *Revista Eletrónica de Veterinária*, *VIII*(2), 1695–7504.

Bligh, J., & Johnson, K. (1973). Glossary of terms for thermal physiology. *Journal of Applied Physiology*, *27*, 439–446.

Block, E., & Cummings, K. Acid-base Balance in the ruminant - Economic Importance to the Dairy Producer.

Bocquier, F., Bonnet, M., Faulconnier, Y., Millo, M., Martin, P., & Chilliard, Y. (1998). Effects of photoperiod and feeding level on perirenal adipose tissue metabolic activity and leptin synthesis in the ovariectomized ewe. *Reproduction Nutrition Development*, *38*, 489–498.

Boehmer, J. L. (2011). Proteomic Analyses of Host and Pathogen Responses during Bovine Mastitis. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, *16*, 323–338.

Borges, S. (1997). *Suplementação de CLoreto de Potássio e Bicarbonato de Sódio para Frangos de corte Durante o Verão*. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

Bowler, K. (2005). Acclimation, heat shock and hardening. *Journal of Thermal Biology*, *30*, 125–130.

Broom, D. M. (2003). Transport stress in cattle and sheep with details of physiological, ethological and other indicators. *DTW. Deutsche Tierarztliche Wochenschrift*.

Broom, D. M. (2006). Adaptation. *Berliner Und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*, *119*, 1–6.

Brown-Brandl, T., Nienaber, J., Eigenberg, R., Hahn, G., & Freetly, H. (2003). Thermoregulatory responses of feeder cattle.pdf. *Journal of Thermal Biology*, *28*(October 2002), 149–157.

Buffington, D. E., Collazo-Arocho, A., Canton, G. H., Pitt, D., Tahtcher, W. W., & Collier, R. J. (1981). Black globe-humidity index (ITGU) as confort equation for dairy cows. *Transactions of ASAE*, (3), 711–714.

Bukau, B., & Horwich, A. L. (1998). The Hsp70 and Hsp60 Chaperone Machines, *92*, 351–366.

Castagnola, M., Cabras, T., Vitali, A., Sanna, M. T., & Messana, I. (2011). Biotechnological implications of the salivary proteome. *Trends in Biotechnology*, *29*(8), 409–418.

Cattelam, J., & Martinez, M. (2013). Estresse térmico em bovinos. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, *108*, 96–102.

Chatterjee, S., Damle, S. G., & Sharma, A. K. (2014). Salivary heat shock proteins and their interactions with oral microenvironment. *Inflammation and Cell Signaling*, 1–8.

Chen, C., Ji, R., Schwab, D. J., Beletsky, D., Fahnenstiel, G. L., Jiang, M., … Lavrentyev, P. J. (2002). A model study of the coupled biological and physical dynamics in Lake Michigan. *Ecological Modelling*, *152*, 145–168.

Collier, R., Baumgard, L. H., Lock, A., & Bauman, D. (2005). Physiological Limitations, Nutrient Partitioning. *Constraints and Opportunities in the 21st Century3*, (September 2015), 51–377.

Collier, & Zimbelman, R. B. (2007). Heat Stress Effects on Cattle : What We Know and What We Don ' t Know. In *22nd Annual Southwest Nutrition & Management Conference* (pp. 76–83).

Cooper, T. R., Trunkfield, H. R., Zanella, A. J., & Booth, W. D. (1989). An enzime-linked immunosorbent assay for cortisol in the saliva of man and domestic farm animals. *Journal of Endocrinology, 123*, R13–R16.

Cruz, L., Angrimani, D., Rui, B., & Silva, M. (2011). Efeitos do Estresse Térmico na Produção Leiteira: Revisão de Literatura. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, 1679–7353.

Deb, R., Sajjanar, B., Singh, U., Kumar, S., Brahmane, M. P., Singh, R., Sharma, A. (2013). Promoter variants at AP2 box region of Hsp70.1 affect thermal stress response and milk production traits in Frieswal cross bred cattle. *Gene*, *532*(2), 230–235.

Donin, D., Heinemann, R., Moreira, N. (2007). Estresse térmico e suas consequências sobre as características do sêmen de machos suínos. *Revista Brasileira de Reproduçã Animal*, 31(4), 456-461.

Eitam, H., Brosh, A., Orlov, A., Izhaki, I., & Shabtay, A. (2009). Caloric stress alters fat characteristics and Hsp70 expression in milk somatic cells of lactating beef cows, 173–182.

Fábián, T. K., Gáspár, J., Fejérdy, L., Kaán, B., Bálint, M., Csermely, P., & Fejérdy, P. (2003). Hsp70 is present in human saliva. *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, *9*(1), BR62–R65.

Fickel, J., Goritz, F., Joest, B. A., Hildebrandt, T., Hofmann, R. R., & Breves, G. (1998). Analysis of parotid and mixed saliva in Roe deer (Capreolus capreolus L .). *Journal of Comparative Physiology B*, *168*(257-264).

Fuentes, M., Tecles, F., Gutiérrez, A., Otal, J., Martínez-Subiela, S., & Cerón, J. (2011). Validation of an automated method for salivary alpha-amylase measurements in pigs (Sus scrofa domesticus) and its application as a stress biomarker. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 23*, 282–287.

Fuquay, J. W., Fox, P. F., & McSweeney, P. L. F. (2011). Encyclopedia of dairy Science, *4*, 567–574.

Garcia, A. B., Angeli, N., Machado, L., de Cardoso, F. C., & Gonzalez, F. (2015). Relationships between heat stress and metabolic and milk parameters in dairy cows in southern Brazil. *Tropical Animal Health and Production*, *47*, 889–894.

Garcia, A. R. (2013). Conforto térmico na reprodução de bubalinos criados em condições tropicais. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, *37*, 121–130.

Geraldo, A. (2013). *Termotolerância em fêmeas bovinas : abordagens celular e fisiológica*. Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Almentos.

Gomes, S. P., Leão, S. C., Filho, V., & Paulino, M. (2006). Contaminação salivar da extrusa em novilhos alimentados com diferentes volumosos, com e sem suplementação. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria E Zootecnia*, *58*(6), 1199–1205.

González, F., & Campos, R. (2003). Indicadores Metabólico-Nutricionais do Leite. In *Anais do I Simpósio de Patalogia Clínica Veterinária da Região do Sul do Brasil* (pp. 31–46). Porto Alegre.

Gonzalez, F. H. D. (1997). O perfil metabólico no estudo de doenças da produção em vacas leiteiras. *Arq.Fac.Vet. UFRGS*, *25*(2), 13–33.

Gonzalez, F. H. D., & Rocha, J. A. R. D. A. (1998). Metabolic Profile Variations and Reproduction Performance in Holstein Cows of Different Milk Yields in Southern Brazil. *Arq.Fac.Vet.UFRGS*, *26*(1).

Gueorguiev, I. (1999). Thyroxine and triiodothyronine concentrations during lactation in dairy cows.

Gutiérrez, A. M., Cerón, J. J., Fuentes-Rubio, M., Tecles, F., & Beeley, J. a. (2014). A proteomic approach to porcine saliva. *Current Protein & Peptide Science*, *15*, 56–63.

Guy, P., & Fenaille, F. (2006). Contribution of mass spectrometry to assess quality of milk-based products. *Mass Spectrometry Reviews*, *25*, 290–326.

Hansen, P. J. (2004). Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. *Animal Reproduction Science*, *83*, 349–360.

Hellhammer, D. H., Wüst, S., & Kudielka, B. M. (2009). Salivary cortisol as a biomarker in stress research. *Psychoneuroendocrinology*, *34*, 163–171.

Hofmann R R. (1989). Adaptation steps of ecophysiological Evolutionary of ruminants : and diversification view of their digestive system. *Oecologia*, *78*, 443–457.

Horowitz, M. (2001). Heat acclimation : phenotypic plasticity and cues to the underlying molecular mechanisms, *26*, 357–363.

Horowitz, M. (2002). From molecular and cellular to integrative heat defense during exposure to chronic heat. *Comparative Biochemitry and Physiology*, *131*, 475–483.

Hosoya, S., Johnson, S. C., Iwama, G. K., Gamperl, A. K., & Afonso, L. O. B. (2007). Changes in free and total plasma cortisol levels in juvenile haddock (Melanogrammus aeglefinus) exposed to long-term handling stress. *Comparative Biochemitry and Physiology*, *146*, 78–86.

Humphrey, S. P., & Williamson, R. T. (2001). A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *Journal of Prosthetic Dentistry*, *85*(2), 162–169.

Johansson, I., & Lenander-Lumikari, M. Saellström, A. K. (1994). Saliva composition in Indian children with chronic protein-energy malnutrition. *Journal of Dental Research*, *73*, 11–9.

Johnson, H. D., Katti, P. S., Hahn, L., & Shanklin, M. (1988). Short-term Heat Acclimatation Effects on Hormonal Profile of Lactating Cows (p. 30). Missouri: University of Missouri.

Kadzere, C. T., Murphy, M. R., Silanikove, N., & Maltz, E. (2002). Heat stress in lactating dairy cows : a review, *77*, 59–91.

Kaufman, E., & Lamster, I. (2002). The Diagnostic Applications of Saliva - A Review. *Annual Review of Psychology*, *13*(2), 201–226.

Kaufman, F. L., Mills, D. E., Hughson, R. L., & Peake, G. T. (1988). Effects of bromocriptine on sweat gland function during heat acclimatization. *Hormone Research, 29*, 31–38.

Kristensen, T. N., Løvendahl, P., Berg, P., & Loeschcke, V. (2004). Hsp72 is present in plasma from Holstein-Friesian dairy cattle, and the concentration level is repeatable across days and age classes. *Cell Stress & Chaperones*, *9*(2), 143–149.

Lamberts, R., & Xavier, A. (2002). Conforto Térmico e Stress Térmico. Laboratório Eficiência Energética em Edificações.

Lamy, E. (2015). The potential of saliva in animal physiology, nutrition and welfare studies. *1º Simpósio Nacional: Biomarcadores Em Ciência Animal E Ciências Veternária - Ma Abordagem Interdisciplinar*.

Lamy, E., Costa, A., Antunes, C., Vitorino, R., & Amado, F. (2012). Protein Electrophoresis in Saliva Study, 63–84.

Lamy, E., Da Costa, G., E Silva, F. C., Potes, J., Coelho, A. V., & Baptista, E. S. (2008). Comparison of electrophoretic protein profiles from sheep and goat parotid saliva. *Journal of Chemical Ecology*, *34*, 388–397.

Lamy, E., da Costa, G., Santos, R., Capela E Silva, F., Potes, J., Pereira, Sales Baptista, E. (2009). Sheep and goat saliva proteome analysis: a useful tool for ingestive behavior research? *Physiology & Behavior*, *98*(4), 393–401.

Lamy, E., Da Costa, G., Santos, R., Capelae Silva, F., Potes, J., Pereira, Sales Baptista, E. (2011). Effect of condensed tannin ingestion in sheep and goat parotid saliva proteome. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *95*, 304–312.

Lamy, E., Graça, G., da Costa, G., Franco, C., E Silva, F. C., Baptista, E. S., & Coelho, A. V. (2010). Changes in mouse whole saliva soluble proteome induced by tannin-enriched diet. *Proteome Science*, *8*(1), 65.

Lamy, E., & Mau, M. (2012). Saliva proteomics as an emerging, non-invasive tool to study livestock physiology, nutrition and diseases. *Journal of Proteomics*, *75*(14), 4251–4258.

Lamy, E., Rawel, H., Schweigert, F. J., Silva, F. C. E., Ferreira, A., Costa, A. R., … Sales-Baptista, E. (2011). The effect of tannins on mediterranean ruminant ingestive behavior: The role of the oral cavity. *Molecules*, *16*(March), 2766–2784.

Lavrador, C., Vilhena, M., Assunção, R., Alvito, P., & Duarte, E. (2015). Biomarkers in a One Health perspective: current knowledge of their ability to merge human and animal health. *1º*

Simpósio Nacional: Biomarcadores Em Ciência Animal E Ciências - Uma Abordagem Interdisciplinar.

Levine, M. J. (1993). Development of Artificial Salivas. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, *4*(3/4), 279–286.

Li, Q., Han, J., Du, F., Ju, Z., Huang, J., Wang, J., Zhong, J. (2010). Novel SNPs in HSP70A1A gene and the association of polymorphisms with thermo tolerance traits and tissue specific expression in Chinese Holstein cattle. *Molecular Biology Reports*, *38*, 2657–2663.

Lindquist, S., & Craig, E. A. (1988). The heat-shock proteins. *Annual Review of Genetics*, *22*, 631–677.

Mandel, I. D. (1987). The functions of saliva. *Journal of Dental Research*, *66*, 623–627.

Mandel, I. D. (1989). Impact of saliva on dental caries. *Compend Suppl*, 76–81.

Martello, Júnior, H., Silva, S., & Titto, E. (2004). Respostas Fisiológicas e Produtivas de Vacas Holandesas em Lactação Submetidas a Diferentes Ambientes. *Revista Brasileira De Zootecnia*, *33*(1), 181–191.

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

Matarazzo, S. (2004). *Eficiência do Sistema de Resfriamento Adiabático Evaporativo em Confinamento do Tipo Freestall Para Vacas em Lactação*. Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil.

Matos, C. (n.d.). *Histofisologia das Glândulas Sudoríparas Face à Aclimatação Sazonal: Estudo em Vacas Leiteiras com Diferente Potencial Leiteiro*. Universidade de Évora.

McDougall, E. I. (1948). Studies on ruminant saliva. The composition and output of sheep's saliva. *Biochem J*, *43*, 99–109.

McDowell, R. E. (1974). *Bases biológicas de la producción animal em zonas tropicales* (1 ed. Zara.).

Mcdowell, R. E., Hooven, N. W., & Camoens, J. K. (1976). Effect of Climate on Performance of Holsteins in First Lactation. *Journal of Dairy Science*, *59*(5), 965–971.

Mcnabb, F. (1995). Conference : Metabolie Modifiers Thyroid Hormones , Their Activation , Degradation and Effects on Metabolism. *Journal of Nutrition*, *125*, 1773S–1776.

McNabb, P. C., & Tomasi, T. B. (1981). Host defense mechanisms at mucosal surfaces. *Annual Review of Microbiology, 35*, 447–96.

Merlot, E., Mounier, A. M., & Prunier, A. (2011). Physiology & Behavior Endocrine response of gilts to various common stressors : A comparison of indicators and methods of analysis. *Physiology & Behavior*, *102*(3-4), 259–265.

Mertens, D. R. (2001). Physical effective NDF and its use in formulating dairy rations. Simpósio Internacional em bovinos de leite, Lavras:UFLA-FAEPE.

Meyer, T. N., & Silva, A. L. Da. (1999). Resposta celular ao estresse. *Revista Da Associação Médica Brasileira*, *45*, 181–188.

Moberg, G. P. (2000). Biological response to stress: Implications for animal welfare, 1–21.

Monzo, C., Haouzi, D., Roman, K., Assou, S., Dechaud, H., & Hamamah, S. (2012). Slow freezing and vitrification differentially modify the gene expression profile of human metaphase II oocytes. *Human Reproduction*, *27*(7), 2160–2168.

Morais, D., Maia, A., Silva, R., Vasconcelos, A., Lima, P., & Guilhermino, M. (2008). Revista Brasileira de Zootecnia Variação anual de hormônios tireoideanos e características termorreguladoras de vacas leiteiras em ambiente quente 1 Annual thyroid hormone variation and thermo regulators traits of milk cows in hot environment. *Revista Brasileira de Zootecnia*, *37*(84), 538–545.

Moseley, P. L. (1997). Heat shock proteins and heat adaptation of the whole organism: invited review. *American Physiological Society*, (13), 1413–1417.

Mosser, D., Bourget, C., Denis-Larose, C., & Massie, B. (1997). Role of the Human Heat Shock Protein hsp70 in Protection against Stress-Induced Apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, *17*(9), 5317–5327.

Mukherjee, J., Pandita, S., Huozha, R., & Ashutosh, M. (2011). In Vitro Immune Competence of Buffaloes (Bubalus bubalis) of Different Production Potential : Effect of Heat Stress and Cortisol. *Veterinary Medicine International*, *2011*.

Muneta, Y., Yoshikawa, T., Minagawa, Y., Shibahara, T., & Maeda, R. (2010). Salivary IgA as a Useful Non-Invasive Marker for Restraint Stress in Pigs. *Immunology*, *72*(10), 1295–1300.

Nienaber, J. A., & Hahn, G. L. (2007). Livestock production system management responses to thermal challenges, 149–157.

Parkkila, S., & Parkkila, A. K. (1996). Carbonic anhydrase in the alimentary tract. Roles of the different isozymes and salivary factors in the maintenance of optimal conditions in the gastrointestinal canal. *Scandinavian Journal of Gastroenterology, 31*, 305–17.

Pedersen, A. M., Bardow, A., Jensen, S., & Nauntofte, B. (2002). Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion. *Oral Diseases*, *8*(5), 117–129.

Pereira, A. (2004). *Adaptação ao Ambiente Geofísico MEditerrânico de Bovinos Nativos e Exóticos - Tolerância ao Calor*.

Pereira, A. M. F., Baccari, F., Titto, E. a L., & Almeida, J. a A. (2008). Effect of thermal stress on physiological parameters, feed intake and plasma thyroid hormones concentration in Alentejana, Mertolenga, Frisian and Limousine cattle breeds. *International Journal of Biometeorology*, *52*(3), 199–208.

Pérez, G. C., Laita, S. G., Portal, J. C. I., & Liesa, J. P. (2004). Validation of an EIA technique for the determination of salivary cortisol in cattle. *Spanish Journal of Agricultural Research*, *2*(1), 45–51.

Pires, M. F., & Campos, A. T. (2008). Conforto Animal para maior produção de leite, Viçosa. 252.

Quissell, D. O. (1993). Steroid hormone analysis in human saliva. *Ann NY Acad Sci.*, *694*, 143–145.

Radostits, O. M., & Bell, J. M. (1970). Nutrition of the Pre-Ruminat Dairy Claf With Special Reference to the Digestion and Absorption of Nutiets: A Review. *Canadian Journal of Animal Science*, *50*(3).

Randall, D., Burggren, W., & K., F. (2000). Usando a energia: enfrentando desafios ambientais. *Fisiologia Animal*, 619–674.

Randall, D., Burgreen, W., & French, K. (1997). *Animal physiology: mechanisms and adaptations* (4 ed.).

Randall, M. (2010). The Physiology of Stress: Cortisol and the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis. *DUJS Online - The Darmouth Undergraduate Journal of Science*.

Reece, W. O. (2009). Body heat and temperature regulation. *Funcional Anatomy and Physiological of Domestic Animas*, 421–429.

Rhoads, M. L., Kim, J. W., Collier, R. J., Crooker, B. A., Boisclair, Y. R., Baumgard, L. H., & Rhoads, R. P. (2010). Effects of heat stress and nutrition on lactating Holstein cows : II . Aspects of hepatic growth hormone responsiveness 1. *Journal of Dairy Science*, *93*(1), 170–179.

Rhoads, M. L., Rhoads, R. P., Vanbaale, M. J., Collier, R. J., Sanders, S. R., Weber, W. J., & Crooker, B. A. (2009). Effects of heat stress and plane of nutrition on lactating Holstein cows : I . Production , metabolism , and aspects of circulating somatotropin. *Journal of Dairy Science*, *92*, 1986–1997.

Rifai, N., Gillette, M. A., & Carr, S. A. (2006). Protein biomarker discovery and validation : the long and uncertain path to clinical utility, *24*(8), 971–983.

Roth, G., & Calmes, R. (1981). Salivary glands and saliva. *Oral Biology*, 196–236.

Roy, K. S., & Prakash, B. S. (2007). Seasonal variation and circadian rhythmicity of the prolactin profile during the summer months in repeat-breeding Murrah buffalo heifers. *Reproduction, Fertility and Development, 19*, 569–575.

Rudney, J. D. (1995). Does variability in salivary protein concentrations influence oral microbial ecology and oral health ? *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, *6*(4), 343–367.

Sakaguchi, K., Yokota, H., Miyasho, T., Maeda, N., Nakamura, K., Onaga, T., Taniyama, H. (2013). Polymeric immunoglobulin receptor expression and local immunoglobulin A production in bovine sublingual, submandibular and parotid salivary glands. *Veterinary Journal*, *197*(2), 291–296.

Shearer, J. K., & Beede, D. K. (1990). Thermoregulation and physio- logical responses of dairy cattle in hot weather. *Agri-Practice*, 5–17.

Silanikove, N. (1992). Effects of water scarcity and hot environment on appetite and digestion in ruminants : a review. *Livestock Production Science*, *30*, 175–194.

Silanikove, N. (2000). Effects of heat stress on the welfare of extensively managed domestic ruminants, *67*, 1–18.

Silva, F. (n.d.). *Variações Anátomo-fisiológicas face à Aclimatação Sazonal - Estudo em Vacas Leiteiras com Diferente Potencial Leiteiro*. Universidade de Évora.

Silva, R. G. (2000). *"Introdução à Bioclimatologia Animal", Nobel, São Paulo.*

Sørensen, J. G. (2010). Application of heat shock protein expression for detecting natural adaptation and exposure to stress in natural populations. *Current Zoology*, 1–17.

Sørensen, J. G., Kristensen, T. N., & Loeschcke, V. (2003). The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecology Letters*, *6*, 1025–1037.

Sousa-pereira, D., Amado, F., Abrantes, J., & Ferreira, R. (2013). An evolutionary perspective of mammal salivary peptide families : Cystatins , histatins , statherin and PRPs. *Archives of Oral Biology*, *58*, 451–458.

Sreebny, L. M. (1989). Salivary flow in health and disease. *Compend Suppl*, *13*, 461–469.

Taba, M., Kinney, J., Kim, A., & Giannobile, W. (2005). Diagnostic Biomarkers for Oral and Periodontal Diseases. *Dental Clinics of North America.*, *49*(3), 1–21.

Tabak, L. A. (1990). Structure And Funcion of Human Salivary Mucins. *Oral Biology and Medicine*, 229–234.

R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: http://www.R-project.org/.

Tilbrook, A. J., Turner, A. I., & Clarke, I. J. (2000). Effects of stress on reproduction in non-rodent mammals : the role of glucocorticoids and sex differences. *Reviews of Reprodution*, (5), 105–113.

Tirelli, M., Basini, G., Grasselli, F., Bianco, F., & Tamanini, C. (2005). Cryopreservation of pig granulosa cells : effect of FSH addition to freezing medium. *Domestic Animal Endocrinology*, *28*, 17–33.

Uribe-Velasquez, L. F., Oba, E., Brasil, L. H. D., Wechsler, F. S., & Stachissini, a V. M. (1998). Plasma concentrations of cortisol, thyroid hormone, lipids metabolites and corporal temperature of lactating Alpine goats submitted to heat stress. *Revista Brasileira De ZootecniaBrazilian Journal of Animal Science*, *27*(1985), 1123–1130.

Verduzco, C. E. H. (2004). Effects of social separation on cortisol, milk yield and composition, udder health and behaviour in dairy cattle. *Animal Science*, 1–23.

Viana, E. G. H., Lima, J. J. P., Vigoderis, R. B., Santos, Í. R., & Brandão, D. S. (2008). Determinação Do Índice De Temperatura E Umidade Da Região De Caruaru- Pe Para Avaliar O Bem Estar Térmico De Bovinos De Leite No Periodo de Verão, (087).

Walker, R. F., Wilson, D. W., Read, G. F., & Riad-Fahmy, D. (1980). Assessment of testicular function by the radioimmunoassay of testosterone in saliva. *International Journal of Andrology, 3*, 105–12.

West, J. (2003). Effects of Heat-Stress on Production in Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*, *86*, 2131–2144.

Wu, A. J., Atkinson, J. C., Fox, P. C., Baum, B. J., & Ship, J. A. (1993). Cross sectional and longitudinal analyses of stimulated parotid saivary constituents in healthy, diferent-aged subjects. *The Journals of Gerontology, 48*(5), M219–24.

Wynn, R. M., Davie, J. R., Cox, R. P., & Chuang, D. T. (1994). Molecular chaperones: heat-shock proteins, foldases and matchmakers. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, *24*, 31–36.

Yousef, M. K. (1985). *Basic Principles. Stress Physiology in Livestock*.

Anexos

Anexo 1 – Abstract apresentado no XIX Congresso de Zootecnia – Diversidade na produção, na Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Viana do Castelo, em Refóios, Ponte de Lima (16 a 18 de abril de 2015)

EVALUATION OF SALIVARY PROTEINS WITH POTENTIAL TO BIOMARKERS OF PRODUCTION IN DAIRY COWS

Cachucho[1], L., Silva[1], F., Matos[1], C., Geraldo[2], A.C.A.P.M., Pinheiro[2,3], C., Lamy[2], E., Capela e Silva[2,4], F., Pereira[2,3], A.M.F.

Heat stress greatly impairs animal's performance. This question has particular importance in dairy, since changes in the amount of milk produced may have a great economic impact. The existence of biomarkers of production that allow to select the animals best adapted with the great productions is of interest. An assay was developed where Holstein dairy cows with high milk production were compared with dairy cows with low milk production. Saliva was collected on two different periods: high temperatures (August) and moderated temperatures (October), using cotton rolls. Salivary proteins were separated by SDS PAGE. One band of approximately 70kDa and one of about 15 kDa were highly expressed in high production potential cows, both at high and moderated temperatures. Besides these, two other protein bands were observed to be differently expressed between groups, but specifically for each period. Although being essential to identify the proteins present in the referred bands, these results suggest a high potential of salivary proteins as non-invasive biomarkers of milk production associated to thermal stress adaptation.

Anexo 2 – Poster apresentado no XIX Congresso de Zootecnia – Diversidade na produção, na Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Viana do Castelo, em Refóios, Ponte de Lima (16 a 18 de abril de 2015).

AVALIAÇÃO DAS PROTEÍNAS SALIVARES COM POTENCIAL PARA BIOMARCADORES DE PRODUÇÃO EM VACAS LEITEIRAS

Cachucho[1], L., Silva[1], F., Matos[1], C., Geraldo[2], A.C.A.P.M., Pinheiro[2,3], C., Lamy[2], E., Capela e Silva[2,4], F., Pereira[2,3], A.M.F.

[1] Aluno do mestrado em Engenharia Zootécnica, Departamento de Zootecnia, Universidade de Évora, Portugal
[2] ICAAM - Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, Universidade de Évora, 7002-554, Évora, Portugal
[3] Departamento de Zootecnia, Universidade de Évora, Portugal
[4] Departamento de Biologia, Universidade de Évora, Portugal

XIX CONGRESSO DE ZOOTECNIA

Introdução

As alterações no clima têm particular importância para os produtores de leite, uma vez que estas podem conduzir a alterações na quantidade e qualidade de leite produzido, com grande impacto económico.

Nos últimos anos, a saliva tem recebido considerável atenção como biomarcador de doenças ou estados fisiológicos, visto que para além dos constituintes de origem glandular, apresenta também moléculas provenientes do sangue (Jaysari *et al.*, 2014). Além disso, o modo não invasivo de recolha aumenta o seu potencial.

O proteoma salivar está grandemente estudado no caso de humanos e algumas espécies de animais de laboratório, mas muito menos estudado em espécies de interesse zootécnico (Lamy *et al.*, 2009; Lamy e Mau, 2012).

Hipótese

Vacas Holstein de elevado e baixo potencial de produção de leite apresentam diferenças no perfil de proteínas salivares;

Material e Métodos

Exploração situada no Alentejo – Montemor-o-Novo.

- 12 vacas Holstein Frisian: 6 altas produtoras (>9000Kg) e 6 baixas produtoras .
- 2 períodos de ensaio: P1 – animais sujeitos a temperaturas elevadas (Verão); P2 – animais aclimatados ao calor e em termoneutralidade (Outono).

Processamento da saliva:

- Primeira fase: determinação da concentração de proteína total das amostras de saliva, pelo método de Bradford (Bradford, 1976).
- Segunda fase: separação das proteínas salivares por massas moleculares, através de electroforese SDS-PAGE em mini-géis de 12% poliacrilamida.
- Médias dos volumes relativos de cada uma das bandas proteicas comparadas entre os dois grupos experimentais (vacas alta vs baixa produção), em cada um dos períodos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 72:248-254.
- Lamy E, Mau M, 2012. Saliva proteomics as an emerging, non-invasive tool to study livestock physiology, nutrition and diseases. J Proteomics 75:4288-4298.
- Lamy E, de Cindio G, Santos R, Capela e Silva F, Potes J, Pereira A, Coelho AV, Sales-Baptista E, 2009. Sheep and goat saliva proteome analysis: A useful tool for ingestive behavior research? Physiol Behav 98:383-401.
- Jaysari IC, Pedreaja E, Prasad PE, 2014. Proteomics in Animal Health and Production. J Agric Vet Sci 7(6): 65-80.

Resultados

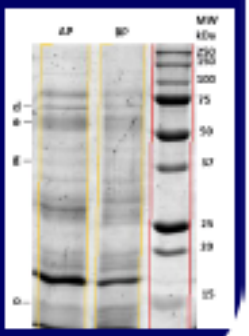
- Não se observaram diferenças na concentração em proteína total entre grupos de produção, em nenhum dos períodos analisados.
- 16 bandas proteicas consistentemente expressas, com massas moleculares entre 200 e 10 kDa.

□ Diferenças entre vacas com alto e baixo potencial de produção em ambos os períodos:

- Banda d (70 kDa) – expressão aumentada nas vacas altas produtoras. Significativa no P1 (animais sujeitos a temperaturas elevadas), mas a mesma tendência continuou a ser observada no P2 (termoneutralidade).
- Banda o (~15 kDa) – expressão aumentada em vacas de alto potencial de produção.

□ Diferenças entres vacas com alto e baixo potencial de produção em condições de termoneutralidade (P2):

- Banda e (~60kDa) - expressa em níveis mais altos nos animais com baixas produções
- Banda g (~40kDa) – expressa em níveis mais altos nos animais com altas produções



Conclusão

Diferenças importantes na zona dos 70 kDa, o que sugere HSP70.

Proteínas salivares como potenciais biomarcadores de produção, o que pode ser útil para entender os mecanismos fisiológicos envolvidos na adaptação dos animais.

Estes resultados apontam para que a saliva possa ser uma boa alternativa ao sangue para avaliação de termotolerância.

Agradecimentos: Este trabalho é financiado por Fundos FEDER através do Programa Operacional Factores de Competitividade – COMPETE e por Fundos Nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia no âmbito dos Projectos Estratégicos PEst-C/AGR/UI0115/2011 e PEst-C/AGR/UI0115/2014. Os autores agradecem igualmente o suporte financeiro da FCT na forma do contrato de investigação FCT de Rita Lamy (IF/01782/2013).