



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

**Medição de Bem-estar em ovelhas com Stress
Térmico e Nutricional**

Rita Isabel Afonso Marques

Orientadora: Prof.^a Doutora Elvira Sales Baptista

Co-Orientadora: Prof.^a Doutora Fátima de J. Folgôa Baptista

Mestrado em Engenharia Zootécnica

Dissertação

Évora, 2013



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

**Medição de Bem-estar em ovelhas com Stress
Térmico e Nutricional**

Rita Isabel Afonso Marques

Orientadora: Prof.^a Doutora Elvira Sales Baptista

Co-Orientadora: Prof.^a Doutora Fátima de J. Folgôa Baptista

Mestrado em Engenharia Zootécnica

Dissertação

Évora, 2013

Medição de Bem-estar em ovelhas com Stress Térmico e Nutricional

Resumo

O estado nutricional dos ovinos mantidos em regime extensivo varia consideravelmente ao longo do ano, devido a variações na disponibilidade e qualidade das pastagens, fortemente influenciada pelas condições climáticas típicas da região mediterrânica: verão seco e outono com chuva escassa. Estas condições levam a fortes restrições alimentares em qualidade e quantidade, durante cerca de metade do ano, representando fatores de stress crónico. O principal objetivo desta tese é o de efetuar uma primeira abordagem à possibilidade de as concentrações de cortisol salivar e plasmático virem a ser bons indicadores de stress crónico, e como tal, uma importante ferramenta para controlo do bem-estar animal. Tem ainda por finalidade avaliar 3 diferentes kits comerciais ELISA, que permitam determinações de concentrações de cortisol plasmático e salivar.

O ensaio foi realizado na sala de ambiente controlado da Universidade de Évora, localizada na Herdade da Mitra. No ensaio de base, usaram-se 16 ovelhas adultas e 10 datas de colheita de amostras (peso vivo, recolha de sangue e de saliva, entre outras). Este é um estudo preliminar, utilizado para despistar valores médios que possam estar associados a stressores crónicos resultantes factores ambientais (temperatura e humidade elevadas) e também nutricionais (restrição alimentar durante a gestação). Como tal, para as determinações preliminares, apenas se utilizaram 6 animais pertencentes a dois grupos: gestantes com restrição alimentar elevada (20g/kg PV^{0.75}) ou mais baixa (50g/kg PV^{0.75}). Dentro e fora da sala foram registados continuamente os valores de temperatura do ar, humidade e concentração de CO₂.

As condições térmicas e de humidade elevadas aumentaram os níveis de cortisol, quer plasmático quer salivar. Observa-se ainda que a maior restrição alimentar diminuiu as concentrações de cortisol, quer plasmático quer salivar. Associada à enorme variabilidade individual, o cortisol, só por si, não é um bom indicador de stress crónico, uma vez que pode apresentar concentrações elevadas ou diminuídas e deverá ser utilizado associado a outros indicadores. Para a sua determinação o kit da Salimetrics (ref. 1-3002) foi o que apresentou melhores resultados.

Palavras-chave: bem-estar; stress térmico; restrição alimentar; cortisol plasmático; cortisol salivar; ovinos.

Measure of sheep's welfare in heat and nutritional stress conditions

Abstract

The nutritional status of sheep kept in extensive varies considerably throughout the year, Caused by the variations in the availability and quality of pastures, strongly influenced by climatic conditions, typical of the Mediterranean region: dry summer and fall with scarce rain.

These conditions lead to severe dietary restrictions in both, quality and quantity, in about half of the year, this representing chronic stress factors.

The main objective of this thesis is to make a first approach to the possibility of the concentrations of salivary cortisol and plasma, come to be good indicators of chronic stress, and as such, an important tool for control of animal welfare.

Also aims to evaluate three different commercial ELISA kits, which allow determination of concentrations of plasma and salivary cortisol.

The test was conducted in a controlled environment room at the University of Évora, located at Herdade da Mitra. In the basic test, it is used 16 adult sheep and 10 dates of sampling (live weight, collection of blood and saliva and others). This is a preliminary study, used to screen values that can be associated with chronic stressors resulting from environmental factors (temperature and high humidity), and also nutritional (dietary restriction during pregnancy). As such, for the preliminary determinations, only used 6 animals belonging to two groups: pregnant with high dietary restriction (20g/kg BW^{0.75}) or lower (50g/kg BW^{0.75}). Inside and outside the room the values for air temperature, humidity and CO₂ concentration were continuously recorded.

The high thermal and moisture conditions increased cortisol levels, either plasma or saliva. It was also observed that most food restriction decreased cortisol concentrations either plasma or saliva. Associated with enormous individual variability, cortisol alone is not a good indicator of chronic stress, since it can have high or reduced concentrations and should be used in conjunction with other indicators. For your determining the kit Salimetrics (ref. 1-3002) showed the best results.

keywords: Welfare; Heat Stress; Nutritional restriction; Plasma Cortisol; Salivary Cortisol; Sheep.

Índice

Resumo	i
Abstract	ii
Índice	iii
Índice de Quadros	v
Índice de Figuras	vi
Abreviaturas	vii
Agradecimentos	viii
1.Introdução	1
2.Revisão Bibliográfica.....	3
2.1. Stress e Bem-Estar	3
2.1.1. Definição do conceito.....	3
2.1.2. Resposta ao Stress	5
2.2. Stress térmico.....	6
2.2.1. Definição.....	6
2.2.2. Variáveis climáticas.....	7
2.2.3. Índice Temperatura-Humidade (THI).....	9
2.3.1. Efeitos do stress térmico.....	10
2.4. Stress Nutricional	11
2.4.1. Observação do Stress Nutricional	11
2.4.1. Variáveis Fisiológicas	13
2.5. Cortisol plasmático e salivar.....	14
3. Materiais e métodos	20
3.1. Sala de ensaio	20
3.2. Os animais	23
3.3. O alimento	24
3.4. Colheita de amostras	24
3.5. Análise das amostras de sangue e saliva	26

4. Resultados e discussão	29
4.1. Caracterização climática	29
4.2. Cortisol e salivar	35
4.3. Stress térmico e nutricional	38
5. Conclusões	42
6. Bibliografia	43
7. Anexos	48

Índice de Quadros

Quadro 1 Valores de cortisol plasmático observados em ovinos submetidos a diversas condições de stress (restrição alimentar)	18
Quadro 2 Descrição das médias diárias dos dados climáticos: Temperatura (°C), HR (%), CO ₂ (ppm) e índice de THI durante o período experimental (7 Junho- 20 Julho) (média± desvio padrão)	31
Quadro 3 Valores de Humidade Relativa (HR) e Temperatura (T) máxima, média e mínima e THI por níveis térmicos (stress e conforto).	33
Quadro 4 Médias totais e desvio padrão de cortisol plasmático e salivar (ng/mL) por animal	35
Quadro 5 Médias totais desvio padrão e coeficiente de variação de cortisol plasmático e salivar (ng/mL) por data	36
Quadro 6 Resultado do teste t para a comparação de cortisol plasmático entre níveis de conforto térmico (BTH _{ic} X=24,5; BTH _{is} X=28,5).	38
Quadro 7 Resultado do teste t para a comparação de cortisol salivar entre níveis de conforto térmico (BTH _{ic} X=24,5; BTH _{is} X=28,5).	38
Quadro 8 Resultado do teste t para a comparação de cortisol plasmático entre níveis de restrição alimentar (BRA ₂₀ = 20 g/kg 0,75; BRA ₅₀ = 20 g/kg 0,75).	39
Quadro 9 Resultado do teste t para a comparação de cortisol salivar entre níveis de restrição alimentar (BRA ₂₀ = 20 g/kg 0,75; BRA ₅₀ = 20 g/kg 0,75).	39

Índice de Figuras

Figura 1 Zona de conforto térmico dos ruminantes (adaptado de Echevar,2002)	8
Figura 2 Interior sala da Sala de ambiente controlado (SAC) (1- Janelas,2-Sensores higrométricos, 3- Ventiladores 4- Ar condicionado).	22
Figura 3 Interior sala de ensaio – Zona de repouso	22
Figura 4 Representação esquemática da sala de ensaio	23
Figura 5 Cronograma dos períodos de adaptação, controlo das variáveis climáticas, alimentação e colheitas.	24
Figura 6 Animais no parque de acesso à sala.	25
Figura 7 Interior da sala de ambiente controlado (SAC)- Zona de repouso (1- Parques de alimentação; 2- Comedouro;3- Bebedouro; 4- Zona de repouso -Tapete de borracha).	25
Figura 8 Leitor de Placas Elisa (Diareader Elx 800 G, Dialad, Austria).	27
Figura 9 Tratamento das amostras de sangue e saliva EIA kit.	28
Figura 10 Variação da temperatura (°C) interior e exterior.	30
Figura 11 Temperatura (°C) e Humidade relativa (%) interior médias.	31
Figura 12 Variação do CO2 médio e temperatura máxima ao longo do período de ensaio.	32
Figura 13 Resultados do doseamento de cortisol plasmático por animal e por data.	34
Figura 14 Resultados do doseamento de cortisol salivar por animal e por data.	34
Figura 15 Perfis de cortisol plasmático (a) e salivar (b) por data.	36
Figura 16 Cortisol plasmático versus salivar (ng/mL).	37

Abreviaturas

FAO: Food and Agriculture Organization

THI: Índice de Temperatura- Humidade

CRH: Cortitropina

ACTH: Hormona adrenocorticotrópica

HR: Humidade relativa

HRM: Humidade relativa média

T: Temperatura

TMD: Temperatura média diária

TM: Temperatura média

RA: Restrição alimentar

LH: Hormona luteinizante

TMB: Taxa metabólica basal

AC: Ar condicionado

G: Gestação

EIA: Ensaio imunoenzimático

Agradecimentos

Em primeiro lugar aos meus pais por todas as oportunidades e esforços que fazem constantemente em função do meu futuro.

À Professora Elvira a minha orientadora e impulsionadora de todo o ensaio, obrigada pela oportunidade, pelo apoio sem ela esta experiência e trabalho não se tinham realizado.

À Professora Fátima a minha Co-Orientadora por a atenção e a disponibilidade

Ao ICAAM por o financiamento do Projeto.

Ao Professor José Manuel Martins, diretor do Mestrado de Engenharia Zootécnica pelo esclarecimento de dúvidas e preciosa ajuda nas “papeladas”.

À Herdade do Freixo do Meio, pela cedência dos animais.

Ao Professor Lopes de Castro por o carinho e a atenção, os bons momentos, as sandes da Mónica e a essencial ajuda que prestou durante todo o ensaio.

Ao Professor Paulo Duque da Fonseca, pela disponibilidade no transporte dos animais.

À Doutora Elsa Lamy e à Doutora Ana Costa por a disponibilidade e dedicação no tratamento das amostras.

Ao Professor Rui Charneca, pela disponibilidade da realização das ecografias.

Ao médico veterinário, Dr. Fragoso, por estar sempre presente quando foi necessário pelo interesse e os ensinamentos transmitidos durante todo o ensaio.

Ao Sr. Eliseu, pela gentileza e atenção que dedicou ao ensaio.

Ao Engenheiro Tiago, que prestou auxílio no ensaio e também é um grande amigo.

Às Funcionárias da Biblioteca que prestaram disponibilidade companhia nos meus momentos de isolamento social.

À minha parceira de ensaio Luísa Fialho, por toda a ajuda e mais alguma e o carinho.

Ao Courelas um grande amigo que está sempre disponível para ouvir e discutir matérias e ao Eng.º Bruno Azinheirinha que pela participação nessas discussões.

A Dora e à Vera, amigas de infância, que tiveram sempre uma palavra amiga na fase final.

Às minhas “subrinhas”, Adriana, Pinto, Madeira, que me deram muita atenção durante estes últimos anos complicados de mestrado e às minhas ex-colegas de residência onde passei os melhores anos da minha vida.

Aos serviços sociais da GNR e à GNR por o acolhimento e apoio.

Ao Miau José Mendes por o apoio e sempre por teres uma palavra amiga.

À minha querida amiga Joana Rubio e o seu futuro esposo por o apoio, conselhos e a “guarda”.

Ao meu amor de cadela Ubba

“I think using animals for food is an ethical thing to do, but we've got to do it right. We've got to give those animals a decent life and we've got to give them a painless death. We owe the animal respect.”

“Animals make us Human.”

Temple Grandin

1. Introdução

O clima Mediterrânico é caracterizado por temperaturas amenas, verões secos e quentes e Invernos chuvosos. Estas condições têm uma enorme influência sobre recursos alimentares disponíveis nas pastagens naturais, que são a base do sistema de produção para animais de produção em extensivo.

A pecuária extensiva contribuiu em 2010 com mais de metade da produção nacional de bovinos (65%) e de ovinos (56%) (Pinto-Correia et al., 2013). Neste tipo de produção os animais permanecem no campo o ano inteiro, expostos às variações climáticas e por consequência às alterações sazonais das pastagens. Na estação mais quente, as pastagens naturais, têm baixos valores nutritivos, o que compromete a gestão das necessidades de nutrientes por parte dos animais, causando carências nutricionais. Nesta estação as temperaturas são elevadas, em simultâneo com as carências alimentares, limitante à produção em regime extensivo dos animais domésticos (Lamy et al., 2012).

As raças de ovinos frequentemente usadas no sul de Portugal são mais adaptadas às condições do clima Mediterrâneo (Sevi e Caroprese, 2012). Estes animais foram selecionados de acordo com a sua adaptação, desenvolveram estratégias para lidar com os fatores limitantes, associados à variabilidade climática. São capazes de gerir a temperatura do corpo (homeostasia), sob temperaturas ambientais altas ou baixas (Lamy et al., 2012) e efetuam um comportamento adaptativo de alterar o metabolismo hormonal sob a sazonal escassez de alimentação (Silanikove, 2000).

A eficiência do conjunto de sistemas que regulam a temperatura corporal (termoregulação) depende da idade e características genéticas do animal (Sevi e Caroprese, 2012). Temperaturas inferiores à mínima suportada e superiores à máxima são condições fora da zona de conforto térmico e causam alterações do seu bem-estar.

O termo bem-estar pode ser definido como o estado do animal na sua tentativa de adaptação ao meio ambiente envolvente (Broom, 1986, citado por Morgado, 2009). Segundo Broom e Molento (2004), um animal no seu ambiente natural encontra-se em pleno bem-estar, dado que é livre de expressar os seus comportamentos naturais, satisfazer as suas necessidades, ou, as atividades biológicas normais e ainda encontra-se na ausência de: dor, medo, frustração e stress.

Quando um animal falha nas tentativas de enfrentar as dificuldades do meio envolvente, entra em stress (Broom e Molento, 2004) e isso reflete-se no seu desempenho produtivo e estado fisiológico. Finocchiaro et al. (2005) observaram ovinos e bovinos sujeitos a stress e verificaram diminuição da produtividade nas duas espécies: surgiram reduções da produção de leite nos bovinos leiteiros, assim

como diminuição da fertilidade e número de partos nas duas espécies; ocorreu desenvolvimento de patologias. Mashaly et al. (2004) demonstraram que em poedeiras expostas a temperaturas adversas houve inibição da produção de ovos. Dados os efeitos identificados os autores evidenciam o interesse em identificar quando um animal se encontra em stress. O termo stressor é o evento ou estímulo que provoca ou conduz ao stress. Estudar e reduzir esse fator é o objetivo primordial quando se trabalha nesta matéria (Starling et al., 2002). Mashaly et al. (2004), Satarling et al. (2002) e Möstl e Palme (2002) analisaram algumas variáveis fisiológicas que constituem bons indicadores de stress pois permitem avaliações objectivas, científicas, quantificáveis e resultados repetitivos. Temperatura, relação de temperaturas com a humidade (THI), observação de comportamentos e concentração de cortisol plasmático e salivar, são exemplos de variáveis fisiológicas frequentemente utilizadas no estudo do stress em animais domésticos. A concentração de cortisol plasmático, salivar ou da urina têm sido muito utilizado como um indicador de stress em muitas espécies mamíferas (Bayazit, 2009). Quando estímulos do meio causadores de stress provocam alterações no bem-estar, estes são detectados fisiologicamente via sistema hipofisário, surgindo então as respostas a esse estímulo e posteriormente a adaptação do animal. O aumento da concentração de hormonas glucocorticóides no sangue, como o cortisol, são comportamentos fisiológicos observados nos animais sujeitos a situações de stress. Os glucocorticóides (cortisol e corticosterona) são hormonas sintetizadas principalmente pela zona fasciculada do córtex supra-renal e o aumento da sua concentração nos fluidos (sangue, saliva, urina etc.) está relacionado com respostas a situações stressantes (Möstl e Palme, 2002). A libertação do cortisol é mediada pelo eixo hipotálamo-hipófise. Mesmo na ausência de stress, o cortisol desempenha funções importantes. Ao entrar na corrente sanguínea, o cortisol liga-se às proteínas plasmáticas, principalmente à albumina. A fração livre não ligada a proteínas, exerce ação a nível dos tecidos. O cortisol influencia diretamente o desempenho fisiológico dos animais, tendo ação sobre o metabolismo de proteínas, hidratos de carbono e lípidos. Pode inibir a captação de glicose pelos músculos e inibir componentes envolvidos no processo inflamatório.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Stress e bem-estar

2.1.1. Definição dos conceitos

O termo stresse, na perspetiva dos animais domésticos, é o estado gerado pela percepção de estímulos que provocam excitação emocional. Ao perturbarem a homeostasia, disparam um processo de adaptação, caracterizado por um conjunto de alterações no animal, distúrbios fisiológicos e psicológicos (Broom e Johnson, 1993).

As operações de manejo, frequentes nos animais em produção, podem ser estímulos stressores (Grandin, 1997).

O estado de um animal em relação à tentativa de se adaptar às situações de stress vai definir o seu nível de bem-estar. Broom (1986) define bem-estar como sendo o estado do animal em relação às tentativas de adaptar-se ao ambiente. Hurnik (1992) acrescenta à definição o termo “qualidade de vida” e quantifica a qualidade de vida do animal, que deve ser alta para ser considerado em pleno bem-estar.

A manutenção das funções biológicas desempenhadas pelo organismo face às adversidades das variáveis exteriores é denominada de homeostasia. Quando os mecanismos que regulam a homeostasia corporal e as respostas não conseguem originar uma adaptação e prevenir alterações de estado, além dos níveis toleráveis, existe ausência ou bem-estar pobre de um animal ou seja stress.

Aprovado na conferência da FAO “Capacitação para implementar novas as práticas de bem-estar animal” em 2009, segundo as medidas estipuladas na conferência da FAO “Capacitação para implementar novas práticas de bem-estar animal” (2009), efetuar as boas práticas de bem-estar inclui: prevenção e tratamento de doenças e lesões, prevenção e alívio da dor, prevenção do stress prejudicial e de outros estados negativos, fornecimento de alimentação e outras condições de vida que sejam adequadas às necessidades e a natureza dos animais.

Na avaliação das condições em que um determinado animal se encontra, pode definir-se uma escala de bem-estar que vai desde, bem-estar adequado (condições ótimas) a bem-estar pobre (animais em condições precárias). As boas práticas de bem-estar, são fundamentadas em livrar o animal de fome e de sede, de desconforto, ferimentos de dor e ferimentos de doença, conceder liberdade de expressar comportamentos normais e não provocar stress, medo e ansiedade.

As 5 liberdades mencionadas são obrigatórias em situação de bem-estar adequado, defendidas pela FAO e que se relacionam com termos tais como: necessidades, liberdades, felicidade, adaptação, sofrimento, dor, ansiedade, medo, saúde e stress (Broom, 1991).

O stress pode-se dividir em dois tipos: um tipo de stress chamado agudo, detetado logo após o evento que conduziu ao stress [20 minutos a 2 horas (Grandin, 1997) ou 10-12 horas segundo Möstl e Palme (2002)], este tipo de stress também pode ser identificado como stress a curto prazo, ocorre em situações de maneio como por exemplo castração, transporte etc. (Fell e Shutt, 1987; Finocchiaro et al., 2005; Bayazit, 2009); o outro tipo de stress é o chamado crónico, resulta de exposição a situações de stress por longos períodos de tempo, por exemplo uma estação do ano (3 a 6 meses), neste tipo de stress o animal deixa de realizar as funções normais de resposta a stress (Grandin, 1997), como a resposta endócrina e os comportamentos fisiológicos de adaptação.

O stress agudo é normal, ou seja, desencadeia respostas endócrinas (libertação de corticoides e catecolaminas, adrenalina etc.) e fisiológicas (fuga, aumento da ingestão etc.) que são essenciais para o animal realizar comportamentos de resposta e/ou adaptação, permitindo fazer face às situações de desconforto.

Restrições alimentares e temperaturas elevadas são usualmente os stressores presentes no maneio dos animais domésticos responsáveis por o stress crónico (Silanikove, 2000). O impacto destas situações num animal depende da duração e intensidade do estímulo stressor.

É importante estudar a influência de todos os tipos de stress em simultâneo para percebermos a capacidade de adaptação dos animais e identificar os requerimentos ideais para contornar essas condições adversas de ambiente (Mashaly et al., 2004).

Observando animais expostos a stress térmico, nutricional e que percorriam grandes distâncias em busca de água e pastagens, Sejian et al. (2012) provaram que estes agentes stressores conduzem a alterações no processo da homeostasia e metabolismo. Os autores verificaram influências na produção destes animais, nomeadamente diminuição da taxa de concepção nos grupos de animais em stress, quando comparados com um grupo de controlo não sujeito a tais factores. Também Finocchiaro et al. (2005) demonstraram impactos na produção leite em ovinos de aptidão leiteira mantidos a temperaturas elevadas, registando quebras acentuadas no rendimento de leite (diminuição até 1000g/dia), quando as temperaturas atingiam valores muito altos ($\geq 33^{\circ}\text{C}$).

Os problemas de bem-estar animal podem ser extremamente diversificados, mas segundo o relatório de especialistas, Fraser et al. (2009), os estímulos stressores mais comuns e problemáticos observados em todo o mundo, são: maneio pré-abate e abate; carência de oferta de alimentos e água; maneio dos animais pelos humanos; doença e confinamento inapropriado nas instalações.

Melhor bem-estar animal nos sistemas de produção gera benefícios práticos, económicos e sociais. Por isso, investigar e compreender os conceitos de bem-estar e stress são fundamentais para evoluir e melhorar os sistemas de produção pecuária.

2.1.2. Resposta ao stress

A “resposta ao stress” é a designação para o conjunto de alterações metabólicas e hormonais que decorrem após qualquer situação de stress, com o objetivo de permitir uma rápida recuperação ou adaptação aos estímulos.

A ativação do eixo hipotálamo-pituitária (hipófise) -adrenal está diretamente relacionada com a secreção de hormonas para o plasma sanguíneo (Christison e Johnson, 1972) e representa a primeira reação de resposta fisiológica dos animais a um estímulo stressor.

O estímulo stressor, através destes mecanismos endócrinos, provoca a ativação do córtex da glândula adrenal que, por sua vez, produz hormonas glicocorticóides. As células-alvo primárias da hormona adrenocorticotrófica (ACTH) são as células do córtex adrenal que produzem os glicocorticóides, Sendo a ACTH a principal reguladora (estimuladora) da sua secreção.

A secreção de ACTH pela adeno-hipófise é estimulada por uma hormona hipotalâmica, a hormona libertadora da corticotropina (CRH), e esta é a principal reguladora da libertação da ACTH.

Bayazit (2009) através da medição das concentrações de glicocorticóides (cortisol) de animais em cativeiro sujeitos a estímulos stressores, demonstra aumentos de ACTH e do cortisol como sinais de stress, em resposta a qualquer tipo de estímulo físico ou emocional. Os efeitos de feedback negativo da ACTH e dos glicocorticóides, são essenciais para manter níveis sanguíneos normais destas hormonas. Perante situações de stress, os efeitos de feedback negativo são superados por os estímulos stressores. Ocorre a destabilização e as funções biológicas normais do animal são afectadas (Möstl e Palme, 2002).

A redução de fertilidade, em animais expostos ao stress, pode estar relacionado com o aumento da secreção de glucocorticóides usualmente detectada em situações de stress (Tilbrook et al., 2000). Excessiva estimulação de glucocorticóides diminui a secreção da LH em roedores, humanos, primatas e animais domésticos (Daley et al., 1999), ocasionando a diminuição da função reprodutora e fertilidade nestes animais. Os autores referem que, ovelhas expostas a agentes stressores, como o

transporte e o isolamento são menos férteis, os autores apontam a causa deste facto como o bloqueio de hormonas sexuais (por exemplo o estradiol).

Na perspectiva da resposta endócrina, os dois tipos de stress têm diferenças antagónicas no modo como afetam o bem-estar de um animal (Bayazit, 2009). O stress agudo é uma resposta normal do animal ao efeito stressor. Neste caso a segregação dos glucorticoides provoca mobilização da glucose e fornecem energia para os músculos do animal capacitando-o a manifestar comportamentos de fuga. No tipo de stress a longo prazo (crónico) a resposta endócrina é inibida, causando diminuição da capacidade reprodutiva e das defesas imunológicas, por exemplo.

2.2. Stress Térmico

2.2.1. Definição

Os fatores climáticos podem causar stress térmico, provocando alterações de bem-estar (Lamy et al., 2012). Um animal em stress pode significar que está constantemente a tentar adaptar-se às condições exteriores. O Verão no clima mediterrâneo é caracterizado por temperaturas altas, correspondendo assim, a um possível factor de stress, dado a durabilidade do Verão (3 meses), o tipo de stress imposto é crónico. Inibição dos comportamentos normais de adaptação é um dos consequentes do stress crónico usualmente detectado nos animais de interesse zootécnico em regime extensivo.

Assim, a correta identificação do stress imposto pelas flutuações estacionais do meio-ambiente, permite ajustes nas práticas de manejo dos sistemas de produção, possibilitando aumentos na sustentabilidade e viabilidade económica das produções pecuárias. O conhecimento das variáveis climáticas, a sua interação com os animais, as respostas comportamentais, fisiológicas e produtivas são ferramentas preponderantes no estudo do stress térmico e adequação do sistema de produção aos objectivos da atividade (Neiva et al., 2004). A identificação de um determinado stress como por exemplo a excessiva exposição a radiação solar, é o caminho correto para pensar numa solução e diminuir o stress como por exemplo arranjar uma sombra.

2.2.2.Variáveis Climáticas

A estação quente dos países do mediterrâneo verifica-se durante 3 a 6 meses anuais e é caracterizada por temperaturas ambiente e radiação solar altas, humidades relativas e velocidade do vento baixas. Estas condições climáticas, nomeadamente as temperaturas altas ($\pm 40^{\circ}\text{C}$) que ocorrem nestes meses, encontram-se acima da zona termo-neutra dos animais e são fatores de stress térmico (Silanikove, 2000; Finocchiaro et al., 2005; Marai et al., 2008; Sevi e Caroprese, 2012) .

Quase todas as espécies domesticadas são homeotérmicas, possuindo a capacidade de regular a sua temperatura corporal dentro da zona de conforto térmico para se manterem saudáveis e produtivas. Para manter a sua temperatura constante, o calor produzido mais o calor ganho, eventualmente do exterior (por exemplo radiação solar direta), devem igualar-se ao calor perdido (Echevarr, 2002).

Os animais respondem às alterações do seu ambiente natural alterando a sua fisiologia e comportamentos (Echevarr, 2002). Em regime extensivo os animais encontram-se susceptíveis às variações da temperatura ao longo do ano, para manterem as suas funções biológicas equilibradas terão de se adaptar às circunstâncias, o bem-estar do animal e até sua própria sobrevivência depende da capacidade individual do animal de se ajustar às condições do meio.

A falência das funções biológicas poderá revelar-se no crescimento, saúde e eficiência de produção de um animal.

As espécies pecuárias têm sido melhoradas para maximizar, aos poucos, caracteres fenotípicos específicos, a fim de lhes facilitar a adaptação e aumentar a eficiência em ambientes, para si, desfavoráveis, como temperaturas altas e alimentação escassa.

Individualmente um animal tolera melhor ou pior um determinado valor de temperatura. Os efeitos da temperatura podem ser definidos em termos do impacto sobre as funções do animal. Portanto, a eficiência produtiva dos animais com interesse zootécnico é máxima quando se encontram numa faixa de temperatura que é ideal para os seus processos fisiológicos. A zona termoneutra de um homeotérmico endotérmico, em descanso, é a faixa de temperaturas ambientais onde a taxa metabólica é mínima, (taxa metabólica basal, ou TMB).

Se a temperatura fica abaixo da temperatura crítica inferior: aumenta a taxa metabólica do animal para aumentar a produção de calor; aumenta o consumo voluntário de alimento (Young, 1981); o animal deriva energias da conversão do alimento para a produção de calor (Young, 1988 citado em Neiva et al., 2004). Contrariamente, se as temperaturas aumentarem até à chamada temperatura

crítica superior, a taxa metabólica aumenta à medida que o animal induz respostas fisiológicas para evitar o superaquecimento. O tipo de resposta fisiológica pode variar com: o isolamento térmico e com capacidade do animal para dissipar calor por evaporação (Echevarr, 2002), da expressão do potencial genético e idade (Grandin, 1997) e condição corporal (Godfrey e Dodson, 2003).

A Figura 1 demonstra as curvas de necessidade de energia de manutenção e consumo de alimento quando um animal se encontra em condições fora da sua zona de conforto térmico e na zona de conforto térmico.

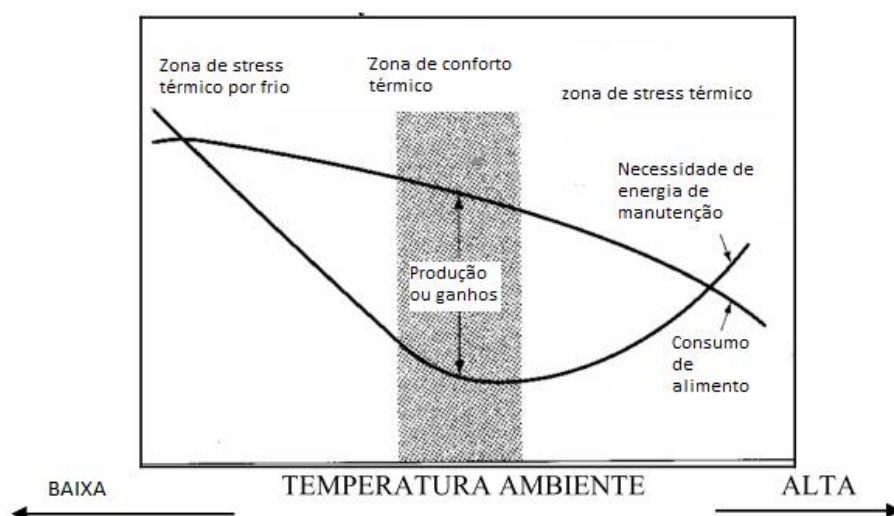


Figura 1 Zona de conforto térmico dos ruminantes (adaptado de Echevarr,2002)

Macey et al. (1998) verificaram alterações de comportamento em bovinos leiteiros, a temperaturas acima dos 23°C. Os autores observaram nestes animais: redução do consumo de alimentos, aumento do ritmo de respiração, boca sempre aberta, aumentos da sudação, produção de saliva e outros comportamentos como a procura de zonas mais frescas. Os comportamentos verificados são considerados, por os autores, evidências de stress térmico e bem-estar pobre. Estes autores reportam o limite superior da zona de conforto térmico em bovinos leiteiros de 23°C.

Segundo Curtis (1983) citado em Echevarr (2002), a zona termoneutra dos ovinos situa-se entre os 5 e 25°C. Num estudo com ovinos leiteiros expostos a temperaturas ambiente superiores a 25°C, os autores observaram alterações de comportamento semelhantes às verificadas por Macey et al. (1998) (aumento do ritmo cardíaco, sudação etc.) em bovinos leiteiros. Quando se observam bovinos e ovinos de aptidão leiteira expostos a temperaturas adversas, pode-se concluir que as duas espécies desenvolvem comportamentos similares de adaptação às condições do meio, contudo os ovinos têm uma zona de conforto térmico mais abrangente que os bovinos.

A humidade atmosférica é outra variável que influencia marcadamente o balanço calórico em ambientes quentes em que a perda de calor por evaporação é crucial à homeotermia.

Em ambientes de temperaturas muito elevadas, tanto o excesso como a carência de humidade serão prejudiciais. Se o ambiente é quente e muito seco a evaporação é rápida, podendo causar irritação cutânea e desidratação geral; no caso de o ambiente ser quente e demasiadamente húmido, a evaporação torna-se muito lenta ou nula, reduzindo a termólise e aumentando a carga de calor do animal, principalmente porque em condições de alta temperatura, a termólise por convecção é prejudicada (Starling et al., 2002).

2.2.3. Índice de Temperatura Humidade – THI

As variáveis climáticas temperatura e humidade, na perspectiva de stress térmico, são usualmente combinadas num índice de temperatura – Humidade (THI). Esta fórmula pode ser utilizada como um indicador de nível de stress térmico (Greenwood e Shutt, 1992; Ravagnolo et al., 2000; Finocchiaro et al., 2005).

Existem diferentes fórmulas, uma das mais usadas é a proposta por Kelly e Bond (1971), onde se combinam máximas Temperaturas máximas (°C) e HR= humidade relativa média (%), na seguinte expressão:

$$THI = \{T - [0.55 \times (1 - RH)] \times (T - 14.4)\}$$

Finocchiaro et al. (2005), através da fórmula a cima referida verificaram o decréscimo da produção e qualidade do leite em ovinos quando o THI ultrapassa o valor de 23. Os cientistas demonstram no estudo os valores de THI aos quais os animais entram em stress térmico.

Utilizando a mesma fórmula, Silanikove (2000) na observação de ruminantes em produção, verifica os valores para os quais entram em stress (THI > 23), e acrescentou a observação de aumentos da temperatura rectal e da frequência respiratória como prova que os animais entram em stress nestas condições. O autor ainda refere que os animais, a THI=23 e valores próximos, ainda acionam mecanismos para manter a homeostasia e conseguem-se adaptar. Contudo quando se registaram valores de THI iguais ou superiores a 30, as funções biológicas da adaptação falharam e a própria sobrevivência do animal foi posta em causa. Nestas condições o autor verifica a ocorrência da inibição da realização de funções metabólicas necessárias, como por exemplo, a ingestão.

2.2.4.Efeitos do Stress Térmico

Quando existe stress térmico, nomeadamente por via das temperaturas altas, os animais reagem, desenvolvem respostas e/ou alterações fisiológicas que podem ser: de natureza fisiológica (sudação e aumento do ritmo cardíaco e aumentos do ritmo da respiração ofegante); hormonal (cortisol, tiroide e atividade glandular) (Silanikove, 2000); distúrbios no metabolismo enzimático, proteico, sanguíneo; distúrbios no equilíbrio mineral e da água (Marai et al., 2008) e respostas de natureza comportamental (redução da ingestão, comportamentos de fuga).

As alterações fisiológicas, associadas à resposta ao stress, podem diminuir a eficiência produtiva e pôr em causa a sobrevivência do animal (Finocchiaro et al., 2005; Marai et al., 2008). O stress térmico pode causar efeitos em todo o metabolismo do animal. Por exemplo, no sistema digestivo; pode advir problemas relacionados com a redução da ruminação, comportamento usualmente observado em ruminantes sujeitos temperaturas adversas, [observado por Christopherson (1985) referido em Costa et al. (1992)]. O stress também pode alterar o metabolismo a nível do sistema imunitário, pode ocorrer diminuição do papel da imunidade e por conseqüente o aumento do risco de doenças. Temperaturas elevadas aumentam as necessidades de energia para a manutenção (7-25%); induzem a subida da temperatura corporal (Sevi e Caroprese, 2012). Sevi e Caroprese (2001) citado por Sevi e Caroprese (2012) em estudos com ovinos a temperaturas acima dos 30°C reportam a clara redução de eficiência dos animais, observando a redução da ingestão e da produção de leite.

Brasil et al. (2000) trabalhando com um grupo de caprinos submetido a temperaturas elevadas, verificaram aumentos na frequência respiratória e na sudação. Trata-se de respostas fisiológicas que os animais desenvolveram para promover a perda de calor do organismo na tentativa de manter a temperatura corporal dentro dos limites normais; pelos processos evaporativo, respiratório e cutâneo a fim de evitar a hipertermia. Os autores registaram perdas de peso, redução no consumo de matéria seca e duplicação do consumo de água, o que identificam como possíveis causas de redução da qualidade do leite (redução das percentagens gordura, proteína, lactose e sólidos totais). Também Silanikove (2000) averiguou efeitos do stress térmico, em ovinos e bovinos, tendo ocorrido a redução no consumo de alimentos e a perda de peso.

Num estudo realizado com galinhas poedeiras (Mashaly et al., 2004), verificaram a redução do consumo de alimentos e diminuição do peso vivo, num grupo expostas a temperaturas adversas a esta espécie animal. Os autores observaram a diminuição da produção de ovos, a redução da qualidade da casca, redução do peso do ovo e espessura da casca em comparação com animais controlo.

Macey et al. (1998) reportam em bovinos, submetidos a temperaturas e humidades relativas elevadas, a redução da produtividade. Observaram problemas na reprodução (redução da qualidade do sémen), menores pesos ao nascimento e comprometimento do sistema imunitário. Ainda no mesmo estudo também comprovaram quebras na produção de leite em vacas leiteiras e diminuição da resposta imunitária. Os autores concluem da existência de uma maior vulnerabilidade a doenças, da parte dos animais sujeitos ao stress térmico. Passado algumas semanas do período de ensaio observaram desenvolvimento de problemas de claudicação nos animais, aos quais afirmam ser também atribuídos ao stress.

2.3. Stress Nutricional

Estar livre de fome e sede é uma das cinco condições do bem-estar animal, anunciadas. O fornecimento de dietas adequadas e de água potável contribui para manter a saúde e a produtividade dos animais. A restrição na alimentação provoca perturbação no bem-estar dos animais domésticos.

O stress nutricional é um termo usado quando existe uma restrição, ou seja, não são satisfeitas as necessidades nutricionais essenciais, pelos animais.

Pode ser um tipo de stress indireto, que abrange a oferta e disponibilidade de alimentos, determinado por fatores climáticos e outros, que afetam o crescimento das plantas que os animais comem.

O stress nutricional ocorre normalmente associado a temperaturas ambientais adversas (Blaxter, 1958). Ambientes adversos: aumentam diretamente as exigências nutricionais, devido às respostas comportamentais dos animais, por exemplo, utilização de energia dos alimentos para funções de arrefecimento corporal, reduzem a quantidade e qualidade do alimento disponível nas pastagens.

O clima mediterrâneo na estação mais quente ostenta fatores de stress, temperaturas elevadas acompanhadas de deficiente oferta alimentar, nestas condições o bem-estar é pobre. No Verão no clima mediterrâneo ocorrem associações de fatores limitantes á produção dos animais em regime extensivo. Não ocorre mais produção de pastagem no início do Verão (Freixial e Barros, 2012), a oferta alimentar das pastagens nesta época, é a produção de primavera que não foi consumida. Os animais que pastam o ano inteiro, não conseguem repor as exigências de energia gastas em manter a temperatura corporal dentro da zona termoneutra e têm dificuldades manter o equilíbrio homeostático em tais condições. A sua eficiência produtiva e saúde são prejudicadas (Blaxter, 1958).

2.3.1.Efeitos do stress nutricional

Em condições de stress nutricional a flora microbiana do rúmen não sintetiza algumas vitaminas necessárias ao desempenho fisiológico dos animais (McDowell, 2004). As carências de micronutrientes assim como as vitaminas, têm efeitos diretos no estado da saúde e balanço nutricional dos animais, e são essenciais no desempenho das suas funções produtivas tais como: produção de leite, carne, ovos e funções reprodutivas (McDowell, 2004).

Em investigações realizadas sobre o stress nutricional, Godfrey e Dodson (2003) estudaram os efeitos da alimentação durante os partos e as suas precursões na produção de leite, em ovinos. Os autores dividiram as ovelhas em dois grupos: um em restrição (limitação da forragem cedida) e outro grupo de animais bem alimentadas. Os autores constataram que animais bem alimentados, sem stress nutricional produziam mais leite. Na época seguinte de partos, os animais que anteriormente tinham sofrido o stress nutricional revelaram intervalos de pós-parto superiores e crias de menor peso.

Ainda em estudos sobre stress por via da alimentação, Schaefer et al. (2003) investigaram suínos suplementados com nutrientes, imediatamente antes e depois, de expostos a um forte agente stressor (transporte), os autores concluíram que animais bem nutridos antes de depois do transporte, conseguem-se “adaptar” melhor ao stress, realizam respostas mais eficientes, que contribuem para a sua homeostasia. Os autores apontam que os efeitos dos estímulos stressores poderão não ter tanto impacto no bem-estar em animais bem nutridos.

Uma dieta deficiente gera uma limitação na suplementação de nutrientes essenciais para o animal, tais como aminoácidos e magnésio (Caroprese et al., 2008). Caroprese et al. (2008) também demonstraram a forte relação de uma dieta deficiente com a resposta ao stress. Uma nutrição equilibrada pode contribuir para mitigar os efeitos do stress térmico e melhorar a eficiência produtiva de um animal doméstico em condições climáticas adversas.

Animais com carências alimentares não conseguem manter a sua homeostasia nem desempenhar funções de adaptação, ocorrendo danos a nível das funções biológicas e impactos económicos diretos na produção. A lactação, qualidade da carne, produção de ovos e outros, são exemplos de outputs com elevado interesse, prejudicados por o stress nutricional (Beede e Collier, 1986; Godfrey e Dodson, 2003; Sejian et al., 2012).

A restrição alimentar também foi detectada no sistema endócrino bem como o consequente impacto a nível reprodutivo, nas fêmeas. Uma inadequada nutrição atrasa ou inibe o início da puberdade e interfere no ciclo normal da fêmea. Este tipo de stress reduz os receptores de esteroides sexuais e

alteram a concentração de esteroides sexuais (Sejian et al., 2012). Os mesmos autores observaram ovelhas em stress nutricional e térmico em que os níveis de estradiol plasmático são muito inferiores. No estudo de Parr et al. (1993) citados por Sejian et al (2012) é comprovada a existência de uma relação inversa entre ingestão e concentração de progesterona no plasma, atribuída a diferenças na taxa de eliminação metabólica de progesterona.

2.4. Observação do stress

Os indicadores comportamentais são baseados na conduta anormal e no comportamento de fuga que é realizado pelos animais em ambiente natural (Pereira, 2011). O mesmo autor demonstra que o facto de uma animal evitar um determinado objecto ou situação, fornece fortes evidências dos seus sentimentos, portanto do seu bem-estar. Quanto mais evidente for o ato de fuga ou o ato de evitar, menor é o bem-estar enquanto o objecto estiver presente ou o acontecimento estiver a ocorrer (Fraser e Broom (2002) citado em Pereira (2011)).

2.4.1. Variáveis Fisiológicas

As várias ações de manejo numa exploração, implicam, podem induzir stress nos animais. Atividades muitas vezes associadas a alteração de ambiente e inclusão de experiências novas, desencadeiam uma série de respostas endócrinas e comportamentais que podem ser observadas e interpretadas como alterações do bem-estar do animal.

Para avaliar com precisão a reação de um animal, uma combinação de medidas comportamentais e fisiológicas irá fornecer a melhor medição global de desconforto animal (Grandin, 1997).

As variáveis fisiológicas constituem bons indicadores de stress, uma vez que permitem avaliações objectivas, científicas, quantificáveis e permitem resultados repetitivos (Pereira, 2011). No sangue pode-se quantificar: compostos orgânicos, hormonas, ácidos, glúcidos, proteínas, enzimas e outros compostos, (Greenwood e Shutt, 1985; Souza et al., 2006) que podem demonstrar relações diretas com respostas de adaptação de um animal a condições adversas do meio, que por sua vez servem para medição do stress.

Durante o stress, várias respostas endócrinas são ativadas para promover a adaptação do indivíduo (Möstl e Palme, 2002). Estes autores identificam glucocorticóides e catecolaminas como sendo as principais hormonas detetadas na resposta hipotalâmica ao stress. A quantificação da concentração destas hormonas pode-se conseguir em amostras de vários fluidos corporais e excrementos.

2.5. Cortisol plasmático e salivar

A medição do stress nos animais domésticos é um pré-requisito indispensável na implantação de medidas que visam aumentar o bem-estar animal. Contudo não existem definições-padrão que permitam detetar diretamente a ausência de bem-estar. Assim é necessário complementar as variáveis fisiológicas e os indicadores comportamentais com parâmetros bioquímicos e hormonais.

Daley et al. (1999) identificam as concentrações de cortisol no sangue e saliva dos animais como um indicador de ativação do eixo hipotálamo-hipófise, comum à resposta ao stress. Existe uma relação das várias respostas endócrinas com o stress, demonstrando o seu envolvimento no desempenho eficaz da adaptação de um indivíduo (Möstl e Palme, 2002), e dentro destas uma relação entre cortisol e situações de stress. Por isso os autores enunciam a medição da concentração de cortisol no plasma sanguíneo, como parâmetro essencial nas observações de stress nos animais (Tangalakis et al., 1992; Grandin, 1997; Daley et al., 1999; Long et al., 2010).

Contudo a colheita das amostras de sangue implica uma imobilização do animal que pode ser um agente stressor ao animal e por consequente pode confundir os resultados do estudo.

Os glucocorticóides provocam uma série de efeitos biológicos sobre o organismo: têm consequências sobre a taxa de crescimento; influenciam a regulação das hormonas reprodutivas; regulam a resposta ao stress e exercem efeito sobre o sistema imunitário (Pereira, 2011). Na maioria dos mamíferos o cortisol é o principal glucocorticóide produzido no córtex suprarrenal. Os glucocorticóides são também responsáveis pela síntese e secreção de catecolaminas e, por sua vez estas controlam processos fisiológicos como: frequência cardíaca, vasoconstrição periférica e outros fenómenos fisiológicos resultantes de uma situação de stress, preparando o indivíduo para comportamentos de resposta (fuga, sudação, etc.). A relação destas hormonas com a reação ao stress é evidente (Purchas, 1973; Starling et al., 2002), o que justifica a sua utilização como ferramenta em estudos relacionados com o bem-estar e stress animal.

O cortisol presente na saliva é considerado também como um indicador de ativação dos mecanismos fisiológicos ligados à resposta ao stress (Greenwood e Shutt, 1992; Bayazit, 2009; Fazio et al., 2013). Apenas 4% do total de cortisol presente no sangue é livre (Bayazit, 2009). Unicamente a fracção livre desta hormona é capacitada para efetuar ligações. As ligações da fracção livre de cortisol com células alvo permitem aos investigadores identificar as concentrações de cortisol no sangue e saliva dos animais.

A utilização da saliva como um meio de medição do cortisol, tem de ser tomada em atenção. A saliva é um fluido variável e complexo, que, após a colheita necessita de uma ruptura física ou química (centrifugação e congelamento) com a finalidade de romper as mucinas e facilitar a filtração. As amostras de saliva podem ser alteradas devido à possível presença de sangue na boca, associado a lesões orais ou entrada de hormonas de outra natureza, como por exemplo na alimentação (Elizabeth e Breslau, 2004; Chernecky e Berger, 2008 citados por Bayazit, 2008).

O uso da saliva como ferramenta tem vantagem de ser um método não invasivo, fácil de efetuar sem ser necessário técnicas especiais ou equipamento especializado (Bayazit, 2009; Pereira, 2011). Contudo necessita igualmente de contenção do animal.

Greenwood e Shutt (1992) demonstram a existência de uma correlação entre concentrações de cortisol na saliva e no plasma de caprinos. Os autores demonstram uma evidente diferença entre concentrações de saliva e cortisol em termos de volume (ng/mL), justificada por o facto que na análise de cortisol salivar os valores são obtidos do reflexo da fracção livre do cortisol. No sangue, por sua vez, é medida toda a concentração de cortisol (Bayazit, 2009). Bayazit (2009) também reporta uma correlação entre valores de concentração de cortisol medidos na saliva e no sangue, contudo, assume igualmente que a concentração de cortisol presente na saliva é substancialmente inferior à concentração de cortisol no sangue.

Greenwood e Shutt (1992), Nasifi et al. (2003) e Wojtas et al. (2013) verificam a relação da segregação de glucocorticóides como respostas das glândulas adrenais a situações que causam stress, tais como: transporte e manejo dos animais (Greenwood e Shutt, 1992); exposição a temperaturas adversas (Wojtas et al., 2013, Nasifi et al., 2003); alterações alimentares (Purchas, 1973, Murayama e Sasaki, 1986) e gestação (Bispham et al., 2003).

Após a percepção de estímulos stressores, os níveis de cortisol alteram-se, ocorrem alterações das atividades comportamentais e alterações a nível de grande parte do metabolismo. Estas alterações estão associadas ao desempenho da produção, por isso é importante estudar e identificar os estímulos stressores (Caroprese et al., 2010).

A segregação de cortisol estimula ajustes fisiológicos num animal, permitindo-lhe desenvolver comportamentos adaptativos para fazer face a um determinado fator stressante, como por exemplo temperaturas elevadas. O cortisol plasmático aumenta logo após a exposição ao agente stressor (Christison and Johnson, 1972 citado por Silanikove, 2000). Contudo as concentrações de cortisol no

plasma sanguíneo diminuem quando a duração do stress é mais prolongada e o stress torna-se crónico (Habeed et al., 1992 citado por Silanikove, 2000).

Num estudo com bovinos de raça geneticamente preparada para o frio, Muller et al. (1994) verificou que os animais à sombra sob condições de temperaturas elevadas, após um longo período (4 semanas) mantinham baixas concentrações de cortisol plasmático. Pode-se concluir que os bovinos, sensíveis a temperaturas altas, num ambiente crónico de stress térmico, quando este se torna intensivo as concentrações de cortisol no sangue podem diminuir.

A concentração de cortisol no sangue é geralmente utilizada como um indicador de stress (Greenwood e Shutt, 1992; Daley et al., 1999; Bayazit, 2009). Contudo há cientistas que demonstram que o aumento da concentração de cortisol plasmático não ocorre em todos os tipos de stress (Muller et al., 1994; Bayazit, 2009; Mostl e Palme, 2002) e que a resposta de um animal a stress varia de acordo com o tipo de stress e factores associados ao animal (Grandin, 1997).

O aumento de cortisol plasmático em situações de stress agudo, como sendo uma resposta emocional em vez de uma resposta de adaptação, como por exemplo a termoregulação em situações de stress térmico, é explicada por Silanikove (2000). O autor conclui que o declínio na atividade de cortisol plasmático, sob stress térmico crónico indica a adaptação ao stress. O aumento da concentração do cortisol sobre o nível basal, em animais que são continuamente expostos a stress térmico intenso, é uma indicação de que o animal está num estado avançado de stress e com bem-estar muito pobre.

Em estudos sobre os efeitos dos estímulos stressores e administração de ACTH, Bayazit (2009) verifica aumento dos níveis de cortisol presentes no plasma dos animais nos dois tipos de stress. O autor ainda confirma a utilização da quantificação do cortisol no sangue, saliva ou fezes como um índice de stress em animais e uma importante ferramenta na identificação de factores que afectam o bem-estar dos animais em cativeiro e compara os métodos. O autor conclui que as alterações nas concentrações de cortisol também podem depender do método de colheita. Nesta investigação contrariamente, a estudos descritos anteriormente, Bayazit (2009) refere que nos tipos de stress (crónico e agudo) aumentam igualmente as concentrações de cortisol plasmático nos animais, contudo através da análise da resposta endócrinas por via de outra metodologia (cortisol fecal), a resposta ao stress altera-se dependendo do tipo de stress (crónico ou agudo). O autor aponta para o fato que quando se mede, principalmente o tipo de stress agudo, através da análise da concentração de cortisol no sangue e saliva, não se mede os efeitos de um determinado estímulo stressor isoladamente, dado que, os próprios métodos de colheita consistem num estímulo stressor. Em conclusão o autor refere que apenas na análise da resposta endócrina por via de outra metodologia não invasiva (cortisol nas fezes), se observa as alterações das concentrações de cortisol provocadas por estímulos stressores.

Bayazit (2009), quanto aos efeitos dos dois tipos de stress (agudo e crónico) nos animais, prova o desencadeamento de uma resposta benéfica (a libertação dos glucocorticóides pode mobilizar glucose e energias para o comportamento de fuga de um predador) por parte do stress agudo, enquanto reporta a falência das funções biológicas, como por exemplo as funções reprodutivas, quando se trata de stress crónico.

O cortisol plasmático pode ser uma boa ferramenta na medição de stress (Greenwood e Shutt, 1985; Bayazit, 2009; Silanikove, 2000) porém as diferenças de resposta, entre animais, são bastante variáveis de animal para animal (Araújo, 2009), devido à influência de diversos fatores ligados à idade, condição corporal, expressão do potencial genético etc. Outro fator que pode influenciar as diferenças nas concentrações de cortisol plasmático é a concentração de globulina de ligação dos corticoides (CBG) (Bayazit, 2009). Aumentos nos níveis de globulina de ligação, significam elevados valores de cortisol plasmático. As concentrações da CBG são influenciadas por diversos estados de condição de um animal, tal como, gestação, doença, inflamações (Bayazit, 2009).

A metodologia da recolha das amostras pode provocar a libertação de cortisol plasmático no animal (Stilwell et al., 2008) e confundir a interpretação dos resultados. Contudo, estes autores num estudo realizado com bovinos jovens, sugere que se a recolha da amostra for realizada imediatamente após a contenção do animal (até 1 minuto), o stress imposto devido à recolha das amostras não é tão preponderante nos resultados.

Na observação dos efeitos da administração de ACTH em vitelos e em vacas adultas, Negrão et al. (2004) verificaram a correlação positiva entre cortisol salivar e plasmático. Contudo, contrariamente a exemplos anteriormente relatados, concluíram que a avaliação do stress por via da determinação de cortisol plasmático não é a metodologia mais eficaz, principalmente nos bovinos adultos. Os autores tiveram mais dificuldades em recolher amostras de saliva em bovinos adultos do que na colheita do sangue e o tempo despendido na saliva também foi superior, devido às necessidades de imobilização das cabeças dos animais. Ainda reportam que o volume de saliva que se obtém de um animal é reduzido (aproximadamente 2mL) o que por vezes se reflete na inutilidade de uma amostra e a falta de dados de um certo animal. Nos vitelos a colheita de saliva é fácil mas o problema do volume reduzido mantém-se.

Vários autores utilizam as duas ferramentas (medição de cortisol plasmático e salivar) como indicadores de stress (Purchas, 1973; Murayama e Sasaki, 1986; Tangalakakis et al., 1992). Os autores reportam a grande variabilidade dos valores, em diferentes espécies de ruminantes (bovinos, ovinos e

caprinos) e apontam a existência de diversas variáveis que podem também ter um papel importante na segregação do cortisol.

Por exemplo quando se estuda o stress térmico, a resposta endócrina, poderá alterar-se conforme a zona termoneutra individual de um animal. Por sua vez, a zona termoneutra também pode flutuar dependendo do estado psicológico, idade, peso, saúde e tipo de alimentação (Finocchiaro et al., 2005, Grandin, 1997). Contudo os mesmos autores afirmam que mesmo tendo em consideração as variáveis não controláveis, existe relação entre stress e concentração de cortisol presente na saliva e sangue.

Purchas (1973) encontrar relações entre cortisol e vários tipos de stress. O autor encontra relações das quantidades de cortisol presentes no sangue e saliva de ovinos sujeitos ao stress imposto por períodos de escassez alimentar e tosquia. No estudo, Puschas (1973) evidencia a variação do cortisol em relação ao tempo do acontecimento stressante e ao tipo de estímulo stressor (Quadro 1). O autor evidencia a diminuição da concentração de cortisol à medida que o animal se adapte ao tipo de stress imposto. Por exemplo numa situação de escassez de alimento, nos animais habituados a uma rotina de jejum, não é verificado no cortisol plasmático alterações muito evidenciadas como em animais não habituados ao jejum. Revela um estado menos stressado por parte dos animais habituados ao jejum (Quadro 1). Ainda o autor verifica aumentos de cortisol nos animais que sofreram stress associado à tosquia.

Quadro 1 Valores de cortisol plasmático observados em ovinos submetidos a diversas condições de stress (restrição alimentar)

Fonte :Purchas (1973)

<i>Condição do Animal</i>	<i>Acontecimento</i>	<i>Cortisol ng/mL</i>
Ovelha habituada a jejum	Alimentação	9
Ovelha alimentada <i>ad libidum</i>	Alimentação	27
Ovelha habituada a jejum	Passado 2h do final do jejum	8
Ovelha alimentada <i>ad libidum</i>	Passado 2h do final do jejum	16
Ovelha habituada a jejum	Passado 4h do final do jejum	10,1
Ovelha alimentada <i>ad libidum</i>	Passado 4h do final do jejum	9
Ovelha sem nenhum estímulo stressor	Antes da tosquia	11
	Depois da tosquia	70

Negrão et al. (2004) verificam a relação das concentrações de cortisol plasmático e salivar em bovinos, com a ordenha. Os autores verificaram aumentos de cortisol imediatamente após o início da ordenha das vacas. Observaram um pico do cortisol aos 20 minutos após o início da ordenha e ainda observaram a diminuição do cortisol 120 minutos o início da ordenha. Quando à saliva os autores verificaram as mesmas tendências mas os valores são substancialmente inferiores. Os autores sugerem que a ordenha causa alterações no estado psicológico dos animais revelando-se um estímulo stressor.

Christison e Johnson (1972) também em bovinos observaram stress em animais sujeitos a temperaturas elevadas (35°C). Contudo os autores distinguem que o cortisol basal (nível de cortisol de animais em conforto térmico) horas após a exposição às temperaturas altas (2-4horas), aumenta, mas após 7 ou 8 semanas de temperaturas elevadas consecutivamente os níveis de cortisol dos diminuem progressivamente, o que reportam como um estado de stress crónico.

3. Materiais e métodos

Este trabalho apresenta uma abordagem preliminar exploratória sobre os valores de cortisol e a sua relação com situações de stress crónico em ovelhas. Para tal utiliza algumas das amostras de sangue e saliva que foram recolhidas num ensaio que decorreu durante cerca de dois meses na sala de ambiente controlado, utilizando 16 ovelhas.

O estado de stress crónico resultará de presença de vários stressores em simultâneo: temperaturas elevadas, restrição alimentar e da fase final da gestação. Tratando-se de uma primeira abordagem de varredura, das várias amostragens utilizaram-se apenas 4 datas e das 16 ovelhas apenas foram analisadas amostras de 6 animais.

A opção por tentar cobrir um âmbito mais lato do ensaio de base, dada a sua natureza parcelar é limitante à análise estatística, o que deverá ter tida em conta.

A componente experimental deste ensaio decorreu na sala de ambiente controlado (SAC), localizada na Herdade da Mitra situada na freguesia de Valverde, Évora, Alentejo, Portugal (GPS: 38.530303, -8.017986).

3.1. Sala de Ambiente controlado

A SAC tem 40m² e um sistema de regulação de temperatura, ventilação e luz.

O pavimento é antiderrapante, com inclinação, e numa das extremidades tem uma zona de grelha (5,52 × 7cm) para se recolher os dejectos numa fossa com escoamento. Parte da sala estava coberta por tapetes de borracha de 1cm de espessura com o objectivo de melhorar o conforto dos animais e evitar problemas nas patas (Figura 3).

A SAC está equipada com um sistema de ar condicionado (Dakin, Emura), com temporizador. Durante todo o tempo de ensaio, foi considerado um ciclo de 12 horas, com diferentes temperaturas mínimas: de dia (das 8:00 h às 20:00 h), foi regulada a temperatura para 28°C; de noite (20:00 h às 8:00 h) a temperatura mínima foi regulada para 18°C. As temperaturas máximas não eram reguladas pelo ar condicionado.

Um sistema de ventilação da Copilot-system (Barcelona, Espanha), com controlo automático assegurava a renovação do ar, a fim de manter a qualidade do ar, controlando o nível de gases, como o dióxido de carbono, metano e o amoníaco. O sistema de ventilação também ajuda a manter as temperaturas dentro dos limites definidos. Entre 1 e 14 de Junho os extractores funcionaram com temperaturas de referência de 28±2°C, (ciclos de 4 minutos ligados/ 6 minutos desligados), o que

resulta num caudal de $1320\text{m}^3/\text{h}$. Sempre que a temperatura atingia 30°C os extractores interrompiam o ciclo para o qual estavam programados e passavam a funcionar continuamente até que a temperatura atingia 26°C , voltando então a funcionar como programado. A partir de 14 de Junho os ciclos de funcionamento do sistema de ventilação passaram a ser 5 minutos ligados/5 minutos desligados, o que resulta num aumento de caudal ($1650\text{m}^3/\text{h}$).

No mês de Julho efetuou-se o mesmo processo, mas corrigiu-se a temperatura de referência para $29\pm 2^\circ\text{C}$. O sistema de ventilação da SAC, fica completo com um sistema de segurança, composto pelas janelas, que abriam automaticamente se ocorre-se alguma anomalia, como por exemplo uma falha de energia, de maneira a garantir o caudal de ventilação mínimo. As janelas são 6, cobertas de plástico escuro, com a finalidade dos ciclos de luz serem controlados através da iluminação artificial. O sistema de iluminação da sala é feito com lâmpadas fluorescentes, utilizando-se um ciclo de 12 h, 8:00 h às 20:00 h, de luz/escuro regulado por um temporizador.

A sala dispõe ainda de um sistema de monitorização das condições de temperatura, humidade, da qualidade do ar e dos gases: dióxido de carbono (CO_2), Amónio (NH_3), Metano (CH_4) e Óxido Nítrico (NO_2). Os dados referentes a temperatura, humidade relativa, velocidade do ar e os gases eram registados minuto a minuto em Data Loggers HOBO (U14-002). Os dados eram depois transferidos para o computador em formato Excel. A temperatura e humidade relativa foram medidas por sensores higrométricos, localizados no centro da sala, a uma altura de 1,60m. No exterior da SAC encontra-se uma estação meteorológica onde se recolheu informação relativa às condições climáticas exteriores. Na Figura 2, consegue-se visualizar a distribuição dos sensores no interior da sala, os dois ventiladores, e as janelas. A SAC dispõe ainda de um bebedouro de nível constante, que permite aos animais acesso livre a água potável e também um ponto de água com uma mangueira para efetuar as limpezas diárias.

Todo o espaço interior da SAC foi dividido, com cancelas amovíveis, de forma a definir uma zona de repouso, uma zona de alimentação em parques e uma manga (Figuras 3,4 e 5).

O espaço de alimentação comportava 8 parques de $1\times 1\text{m}$, com comedouros e bebedouros amovíveis, que permitiam a alimentação individual.



Figura 2 Interior sala da Sala de ambiente controlado (SAC)
(1- Janelas,2-Sensores higrométricos, 3- Ventiladores 4- Ar condicionado).



Figura 3 Interior sala de ensaio – Zona de repouso

A SAC tem duas outras salas anexas onde ser armazenava o alimento, comedouros, balança, ferramentas e produtos de higiene (Figura 4).

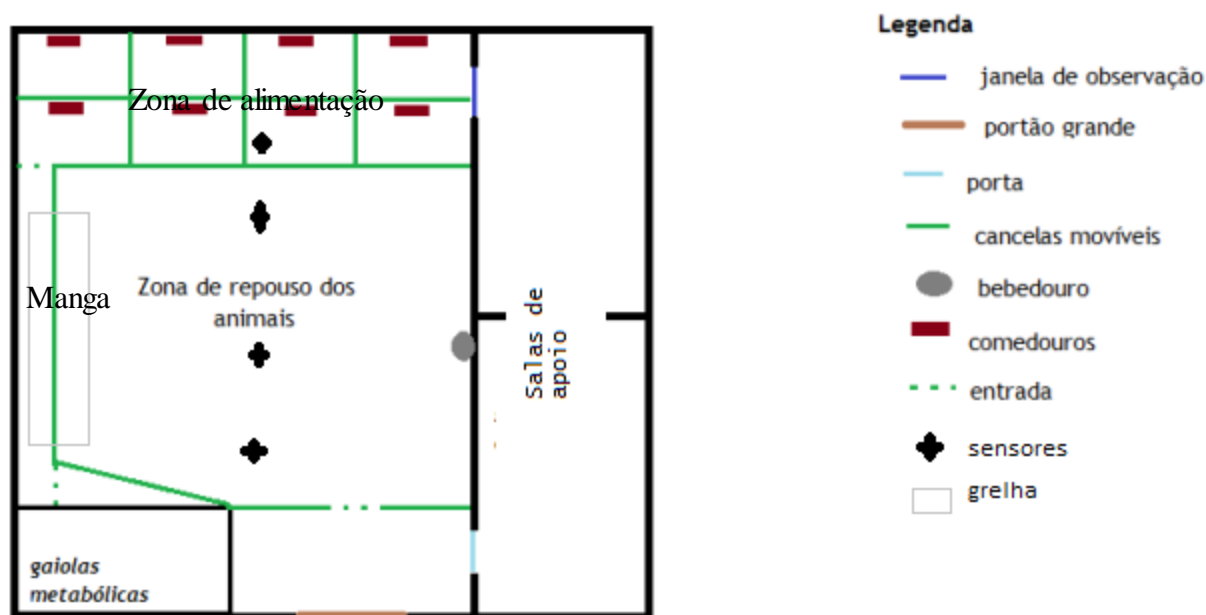


Figura 4 Representação esquemática da sala de ensaio

3.2. Os animais

a) Ensaio base:

Foram utilizadas 16 animais. As 16 ovelhas foram divididas em 3 grupos: 5 ovelhas gestantes e sujeitas a um nível alimentar de $20\text{g/kg}^{0.75}$, 5 ovelhas gestantes e sujeitas a um nível alimentar de $50\text{g/kg}^{0.75}$ e 6 ovelhas não gestantes sujeitas a um nível de alimentar de $50\text{g/kg}^{0.75}$.

b) Animais utilizados para análise do cortisol:

Dos 16 animais utilizaram-se apenas 3 animais gestantes com restrição de $20\text{g/kg}^{0.75}$ (animais 12,13 e 16) e 3 animais pertencentes ao grupo gestantes com $50\text{g/kg}^{0.75}$ (animais 1, 4 e 6).

c) Maneio dos animais

As ovelhas eram provenientes da Herdade do Freixo do Meio (Sociedade Agrícola Freixo do Meio, S.A. – Montemor- o Novo), onde se encontravam num rebanho de cerca de 200 animais a campo em pastoreio extensivo. Foram feitas ecografias no campo para selecionar os animais.

De 12 de Abril até 12 de Maio 2012, depois de transportadas para a Mitra, mantiveram-se numa folha em pastoreio. Passaram depois para uma zona exterior da SAC (Figura 5) onde se mantiveram de 12 de Maio até 20 Maio, ingerindo feno. Foram desparasitados com Seponver (15mL cada ovelhas), vacinados com Heptavac Plus (2mL/ovelha) e tosquiados.

Entraram na SAC a 20 de Maio e passaram por um período de adaptação, sendo alimentados *ad libitum* com luzerna granulada (pellets). As ecografias foram repetidas novamente. Foi feito o tratamento das patas, efetuando-se um corte das unhas corretivo e desinfecção formol. Ao longo do ensaio sempre que necessário, efetuava-se o mesmo tratamento. Todos os animais foram numerados no dorso, para identificação, e tinham coleiras coloridas. Para além destes tratamentos, utilizou-se este período para observação e treino dos animais em relação ao maneo diário e à rotina da colheita das amostras, processo que teve início a 7 de Junho, tendo-se realizado 3 amostragens neste pré-ensaio. O período do ensaio, já com restrição alimentar decorreu de 25 de Junho a 20 de Julho (Figura 5).

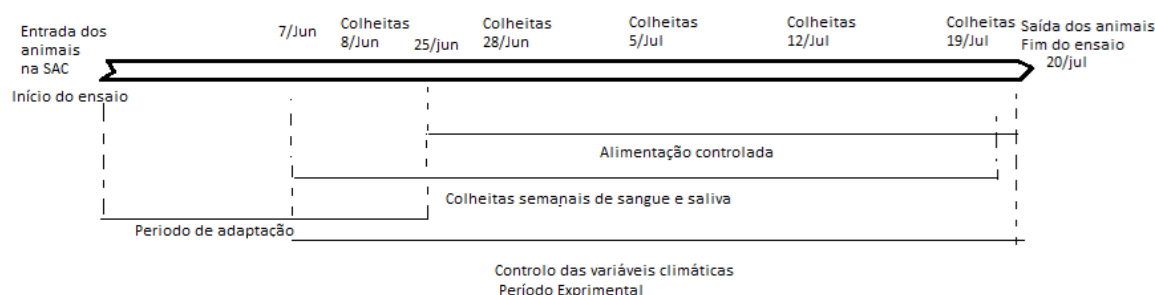


Figura 5 Cronograma dos períodos de adaptação, controlo das variáveis climáticas, alimentação e colheitas.

Depois de terminado o ensaio e já fora da SAC, foi administrado um complexo multivitamínico, cálcio e propilenoglicol.

3.3. Alimento

Durante o ensaio as ovelhas eram alimentadas individualmente, enquanto as restantes aguardavam no parque de repouso. O alimento era fornecido todos os dias à mesma hora, excepto nos dias de recolha das amostras, nestes dias o alimento era distribuído no final das colheitas.

O alimento utilizado foi luzerna desidratada em pellets, com valores na matéria seca de 8.45% de proteína bruta e 65.83% de NDF. O alimento era pesado diariamente de acordo com o peso e grupo a que cada animal pertencia. Para garantir as mesmas condições de restrição alimentar ao longo do ensaio, os animais eram pesados semanalmente (Anexo 4).



Figura 6 Animais no parque de acesso à sala.



Figura 7 Interior da sala de ambiente controlado (SAC)- Zona de repouso
(1- Parques de alimentação; 2- Comedouro;3- Bebedouro; 4- Zona de repouso -Tapete de borracha).

3.4. Colheita de amostras

a) Ensaio base

De 7 de Junho a 20 de Julho, uma vez por semana, os animais eram pesados e colhiam-se as amostras de sangue e saliva. Para tal os animais passavam na manga, à qual estava associada uma balança e um tronco de contenção. Os animais foram treinados no percurso e estavam habituados a este maneo semanal. O sangue era colhido em tronco de contenção, a partir da jugular com recurso a

tubos Vacuette® K3 EDTA (Greiner Bio-One (Alemanha), duas amostras por ovelha. A saliva foi colhida por contenção manual da cabeça utilizando Salivettes® (Sarstedt (Alemanha). A colheita das amostras foi efectuada sempre durante o período da manhã, onde se espera um pico de quantidade de cortisol circulante, de modo a evitar variações relacionadas com o ciclo circadiano do cortisol nas avaliações hormonais propostas.

Cada um destes processos de recolha demorou cerca de 2 minutos, e optou-se por esta forma de maneo em vez de utilizar catéters, dada a extensão temporal do ensaio e o facto de os animais não estarem isolados, mas manterem grande nível de contacto físico.

b) Datas de colheita utilizadas para análise do cortisol

Das diferentes datas de colheita, utilizaram-se apenas 4 datas (8 e 28 de Junho e 12 e 19 de Julho). Foram seleccionadas de forma a usar 2 datas em que as temperaturas máxima estavam acima dos 25°C e outras duas datas com valores abaixo dos 25°C.

3.5. Análise das amostras de sangue e saliva

Imediatamente após o processo de colheita as amostras de sangue, eram transportadas para o laboratório do ICAAM, onde eram centrifugadas (2000 rpm durante 5 minutos). Posteriormente foram congeladas a -80°C.

O doseamento do cortisol plasmático e salivar foi determinado através de imunoensaio (ELISA), utilizando os seguintes kits comerciais (IBL ref. RE52611, Arium) que utiliza anticorpos anti-cortisol de coelho, o kit Abnova, ref. KA2317, Tebu) que utiliza anticorpos de ovelha, e o kit Salimetrics (ref. 1-3002, Salimetrics).

O princípio deste teste baseia-se na competição de ligação de cortisol. Uma amostra contendo uma quantidade desconhecida de cortisol a dosear (antigénio não marcado) é adicionado a uma quantidade padrão de um derivado da mesma substância mas marcado (antigénio marcado). Os Antígenos, marcados e não marcados são, deixados a competir por locais de ligação de alta afinidade para um número limitado de anticorpos que se encontram a revestir a placa. Após a lavagem dos antigénios não ligados aos anticorpos, a quantidade de cortisol marcada é inversamente proporcional a quantidade de cortisol presente na amostra. A densidade óptica foi lida a 450nm num leitor de placas ELISA (Diareader ELx800 G, Dialab, Austria – Figura 8).



Figura 8 Leitor de Placas Elisa (Diareader Elx 800 G, Dialad, Austria).

O doseamento do cortisol foi efectuado em duplicado e sem extracção de amostra de plasma ou saliva. Para cada amostra efetuaram-se 2 diluições, quando se utilizou o kit IBL, destinado a humanos e dado que se desconheciam os valores da concentração. O coeficiente de variação intra-ensaio foi de 3,15 % para o sangue e 2,78 % para a saliva. Este kit tem leituras entre 0,015 – 4 ng/mL para o cortisol salivar e entre 0,75 – 200 ng/mL para o cortisol plasmático. Com o kit Abnova apenas se utilizou uma diluição, tendo o coeficiente intra-ensaio sido de 13,74. Para este kit a concentração mínima detectada é calculada em 1,0 ng/mL. Com o kit Salimetrics o coeficiente inter-ensaio foi de 2,16%. Para este kit o limite de sensibilidade é de 0,007 ng/mL.

A variabilidade inter-ensaios foi de 3,09%.

Para cada kit foram efectuadas curvas de calibração, e usados os controlos de máxima e mínima fornecida com o kit. Os procedimentos laboratoriais utilizados com cada kit encontram-se em anexo (anexo 1,2,e,3). Na figura 9 exemplifica-se um dos passos do processamento laboratorial.

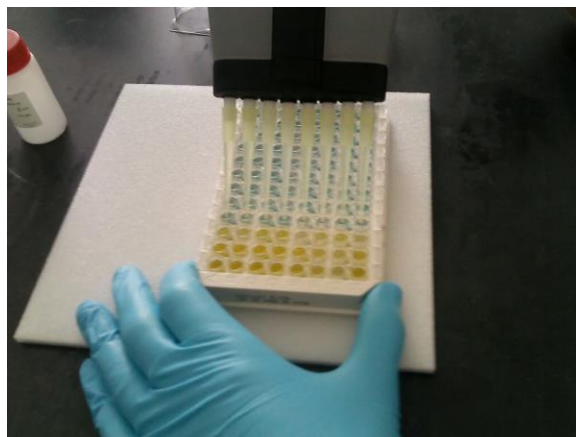


Figura 9 Tratamento das amostras de sangue e saliva EIA kit.

3.6. Tratamento estatístico

Todos os dados foram analisados com o programa estatístico SPSS, versão 21.

Dado o reduzido número de observações para cada uma das situações, o que reduz os graus de liberdade, e sendo estas variáveis quantitativas contínuas, para avaliar a relação entre a concentração de cortisol plasmático e salivar, utilizou-se um teste t.

Neste caso pretendeu-se comparar as médias entre as quatro datas de colheita, agrupando-as de acordo com o índice de temperatura e humidade (THI) em dois níveis (conforto versus stress térmico). Também os níveis de restrição alimentar (20 vs. 50 g/kg PV^{0,75}) foram comparados por teste t. O teste t permite inferir sobre a igualdade de médias de duas amostras emparelhadas, isto é, cada nível térmico e cada nível de restrição alimentar foram emparelhadas e analisados duas vezes, para cada um dos fluídos, sangue e saliva.

4. Resultados e discussão

4.1. Caracterização Climática

Desde a entrada dos animais na sala o ambiente começou a ser controlado. A temperatura, humidade relativa e os gases da atmosfera da sala foram registados continuamente.

De acordo com dados do Instituto de Meteorologia, da estação meteorológica de Valverde, nos últimos 10 anos verificou-se um período seco de 3 a 4 meses (Junho, Julho, Agosto e Setembro), sendo os meses de Julho e Agosto os mais quentes. Apesar do mês de Julho ter registado a temperatura máxima absoluta mais elevada é no mês de Agosto que a temperatura média mensal é mais elevada.

A temperatura verificada no interior da sala resulta do balanço energético em cada momento considerando os diferentes ganhos e perdas de calor e é diretamente influenciada pela temperatura exterior. Neste trabalho, embora se verifique essa relação entre a temperatura interior e exterior, ela é de algum modo atenuada o que se justifica pela utilização do sistema de ar condicionado que garantia os valores mínimos de temperatura no interior. Também todas as tarefas diárias que implicam a abertura da porta da sala, como a limpeza diária da sala, o movimento dos animais e a ventilação são factores a considerar quando se analisam os resultados obtidos.

Na Figura 10 encontra-se a variação da temperatura interior e exterior (estação meteorológica junto da sala de ensaio) ao longo do tempo de ensaio.

O papel da ventilação foi importante para o ambiente no interior da sala não só para manter uma atmosfera adequada para a saúde dos animais e operadores, mas também para o controlo da temperatura nos dias mais quentes. Por exemplo dia 26 de Julho, maior pico de temperatura (Fig. 10), em que no exterior a temperatura máxima foi de 39,7°C, no interior da sala a temperatura máxima foi 2°C mais baixa, o que não exclui o facto de ser um dia de desconforto para os animais. Este resultado pode ser explicado pelo facto dos extractores nestes dias funcionarem automaticamente em modo contínuo, o que favorecia o aumento da velocidade do ar no interior da sala e potenciou a evaporação de água, processo que contribui para que no interior da sala a temperatura seja inferior ao verificado no exterior.

Contudo, tal como esperado, as temperaturas interiores acompanharam as variações exteriores e tiveram os picos de maior temperatura nos dias coincidentes com as temperaturas na estação meteorológica.

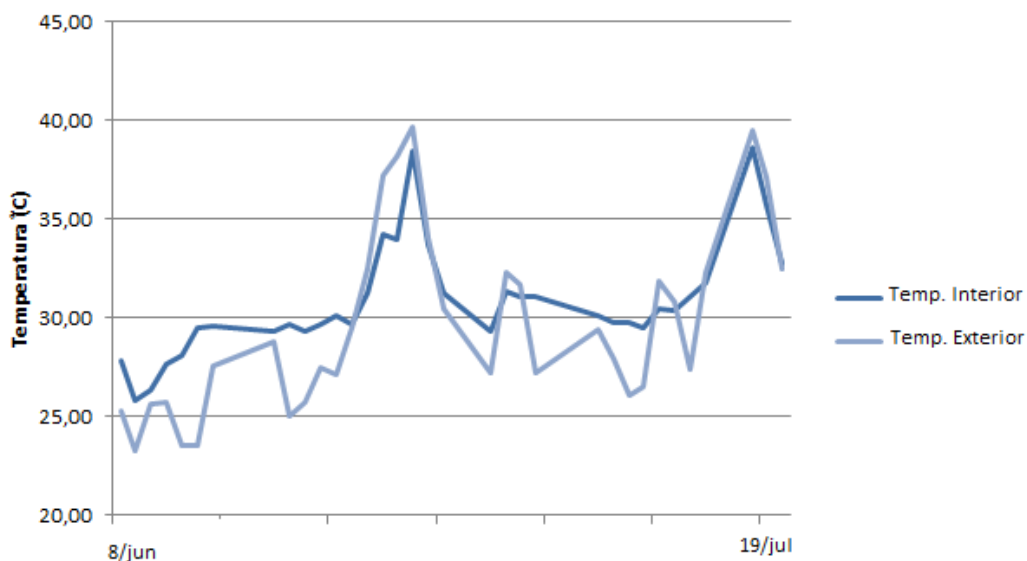


Figura 10 Variação da temperatura (°C) interior e exterior.

A ventilação e o AC contribuíram para a manutenção das condições ambientais (fundamentalmente a temperatura) previamente definidas. No entanto, como seria de esperar verificaram-se alguns desvios explicados pelo balanço térmico em cada momento (calor libertado pelos animais, condições exteriores, etc.).

O AC estava regulado para manter de dia a temperatura superior a 28°C e de noite superior a 18°C, o AC apenas garantia as temperaturas mínimas estipuladas (28°C e 18°C). Apesar de obtermos inicialmente valores nos registos da temperatura inferiores ao requerido como podemos observar na Figura 10, a temperatura interior média rondou os 26°C (Quadro 2) o que consideramos um valor razoável. A temperatura interior mínima durante o período experimental foi de 22±2°C (Quadro 2) nunca atingido valores inferiores, o que demonstra a eficiência do AC ao manter os valores de temperatura mínima requeridos durante a noite.

Quadro 2 Descrição das médias diárias dos dados climáticos: Temperatura (°C), HR (%), CO2 (ppm) e índice de THI durante o período experimental (7 Junho- 20 Julho) (média± desvio padrão)

<i>Dados climáticos</i>	<i>Média ± Desvio padrão</i>
Temperatura Interior Média	26 ± 2
Temperatura Interior Máxima	31 ± 3
Temperatura Interior Mínima	22 ±2
Humidade Relativa Média	48 ± 9
Humidade Relativa Máxima	68 ±9
Humidade Relativa Mínima	31 ±11
Concentração de CO2 interior	640 ±60
THI	27 ±2

A temperatura e humidade são parâmetros ambientais importantes nos estudos de stress (Silanikove, 2000; Marai et al., 2008).

O período experimental do ensaio realizou-se de 7 de Junho a 20 de Julho, obteve-se observações de dias muito quentes, por exemplo dia 26 de Junho e 17 de Julho, as temperaturas rondaram os 40°C. Relativamente à temperatura, segundo Caroprese et al. (2008) podemos afirmar que os animais no nosso ensaio estiveram 2 dias em desconforto térmico ($T > 25^{\circ}\text{C}$).

A humidade relativa por si só, nesta região, não atinge picos que causem stress aos animais. Por isso este parâmetro foi sempre analisado em simultâneo com a temperatura como podemos observar na Figura 11.

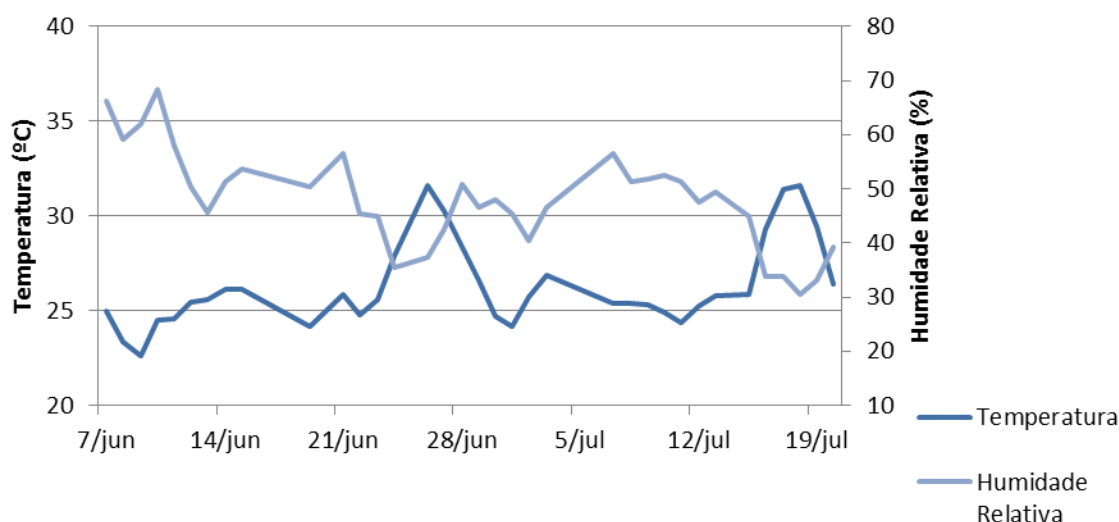


Figura 11 Temperatura (°C) e Humidade relativa (%) interior médias.

A ventilação da sala contribuía para arrefecer um pouco a sala e permitia manter as condições de qualidade do ar, ou seja, os níveis de gases como o CO₂ dentro dos limites aconselhados para instalações pecuárias, e que se pode considerar como limite máximo valores entre 1500 e 1800 ppm. O teor de CO₂ médio diário (Figura 12) verificado esteve sempre dentro dos limites aconselhados para as condições de segurança e saúde dos animais e tratadores. Quando se verificaram os picos de temperatura, o valor de CO₂ baixou devido à maior taxa de ventilação, que tal como já foi referido, era superior nos dias de temperatura mais elevada. O valor máximo de CO₂ foi ligeiramente superior a 700 ppm (Figura 12).

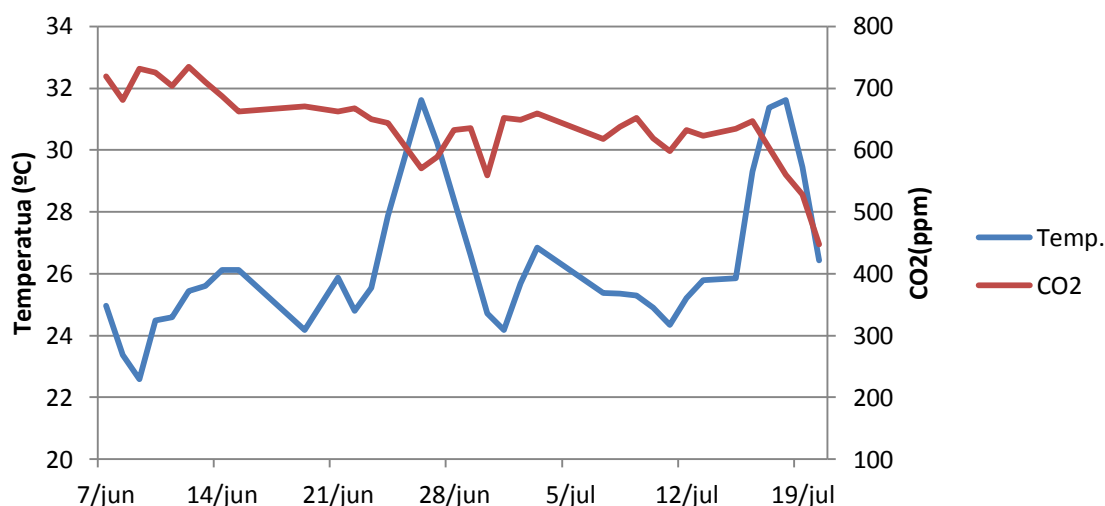


Figura 12 Variação do CO₂ médio e temperatura máxima ao longo do período de ensaio.

No presente caso não existem registos de HR alta associada a elevada temperatura (Fig. 11). De facto, o valor de humidade média mais elevado observado em todo o ensaio, 68% corresponde a um dia em que a temperatura média foi de cerca de 23°C. O oposto foi observado, nos dias de maior calor, com 40°C e humidade relativa inferior a 30%, o que na realidade é característico do nosso clima e permite que os animais usem as trocas de calor latente como meio de controlo da sua temperatura corporal. De acordo com Starling et al. (2002), os valores de humidade registados durante o ensaio não causam desconforto às ovelhas. Costa et al. (1992) verificou que valores de Humidade Relativa superiores a 85% associados a temperaturas altas são stressantes para as ovelhas. A divisão dos dias em níveis térmicos foi feita com base nas observações da temperatura do ensaio, segundo Starling et al. (2002), acima de 25°C ovinos alteram a sua frequência respiratória isto é um sinal da entrada dos animais em stress térmico, por isso no nosso trabalho fundamentado com as

observações de Starling et al. (2002) considerou-se os níveis da seguinte forma: i) Stress térmico – Temperatura média > 25°C; ii) Conforto térmico- Temperatura média < 25°C (Quadro 3).

Quadro 3 Valores de Humidade Relativa (HR) e Temperatura (T) máxima, média e mínima e THI por níveis térmicos (stress e conforto).

<i>Dia</i>	<i>T Média</i> (C°)	<i>HR Média</i> (%)	<i>T</i> <i>Máxima</i> (°C)	<i>HR</i> <i>Máxima</i> (%)	<i>T</i> <i>Mínima</i> (°C)	<i>HR</i> <i>Mínima</i> (%)	<i>THI</i>
<i>Stress térmico</i>							
28 Junho	28.39	50.96	31.29	67.53	24.58	25.92	27.34
19 Julho	29.45	33.14	35.76	51.78	24.11	15.84	30.73
<i>Conforto térmico</i>							
8 Junho	23.38	59.07	25.85	80.05	21.12	41.53	23.05
12 Julho	25.21	47.43	30.43	68.98	20.03	31.38	26.46

4.2. Cortisol plasmático e salivar

Quando se observam os resultados (Quadro 4 e 5) a enorme variabilidade é evidente, sendo difícil evidenciar um padrão. Quer as amostras de sangue (Figura 13) quer as de saliva (Figura 14) apresentaram concentrações de cortisol muito variadas entre animais.

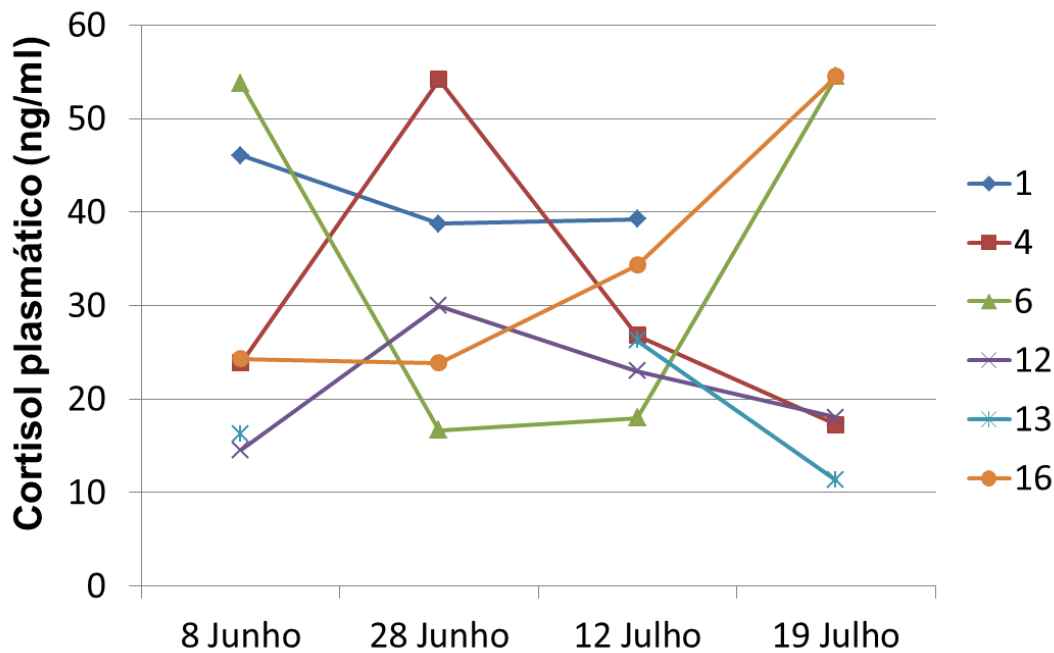


Figura 13 Resultados do doseamento de cortisol plasmático por animal e por data.

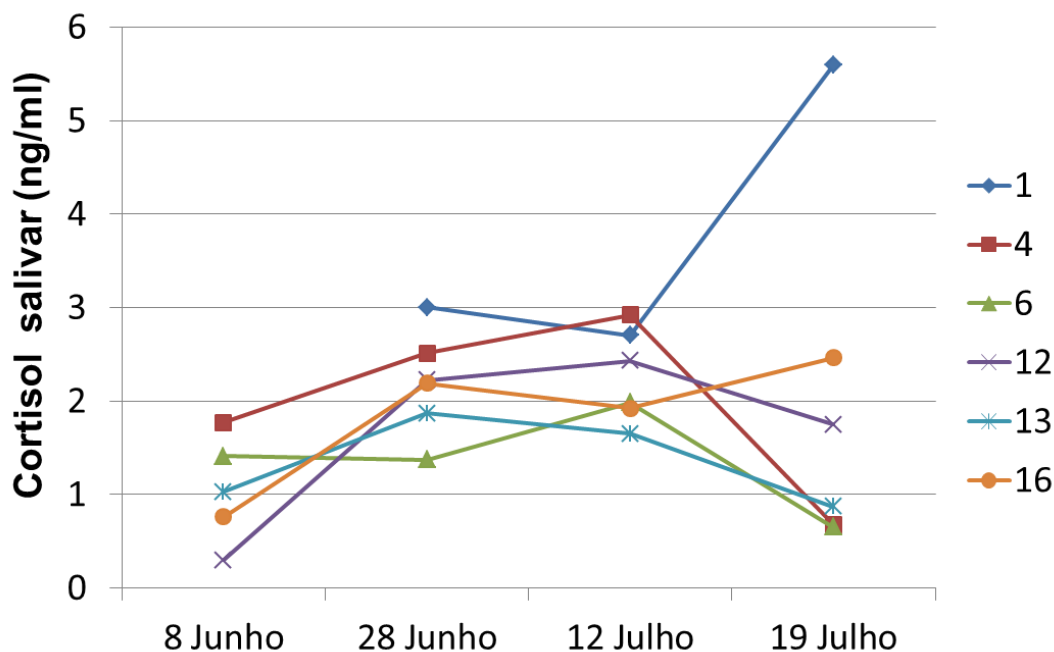


Figura 14 Resultados do doseamento de cortisol salivar por animal e por data.

A título de exemplo, no Quadro 5 pode verificar-se que um dos animais que apresentou maior variação individual entre datas de colheita foi o animal 6 (maior desvio padrão no cortisol plasmático), quando se analisa o cortisol plasmático, representa igualmente um dos animais que

maior concentração apresenta. No entanto, em relação à concentração de cortisol salivar o mesmo animal apresenta o valor mais baixo.

Outro animal muito variável foi o animal 4 (maior desvio padrão no cortisol salivar). No início do ensaio o animal 4 correspondia a um dos animais com menos condição corporal do ensaio (45,2kg), em comparação com a média dos animais do ensaio (± 50 kg) (Anexo 4). No final do ensaio (19 de Julho) o peso do animal 4 também se revelou o mais baixo de todo o ensaio (36,3kg). A condição corporal do animal 4 pode ser a justificação para o decréscimo tão acentuado do cortisol plasmático após a alteração de alimentação, este animal estaria com uma condição corporal baixa o que poderia afectar a produção de cortisol devido à falta de energia, como verificado por Möstl e Palme (2002). A variação individual pode ser devido à experiência prévia, à idade, estado fisiológico ou genótipo (Grandin, 1997) e apesar de todos os animais provirem do mesmo rebanho, tinham idades, pesos, condições corporais e períodos de gestação diversos. A hora do dia é outra das conhecida possíveis influências na variação das concentrações de cortisol, mas procurou-se minimizar esta variação efetuando as colheitas sempre à mesma hora. No entanto todo o maneio de recolha demorava cerca de uma hora, e a ordem de amostragem dos animais não era sempre a mesma. Outras alterações verificadas podem ter ocorrido devido a outros estímulos stressores, presentes no ensaio e que não foram possíveis de controlar, por exemplo alguma ferida ou infecção (Bispham et al., 2003) ou situação de medo que poderá ter ocorrido (Fell e Shutt, 1987).

Quadro 4 Médias totais e desvio padrão de cortisol plasmático e salivar (ng/mL) por animal

Ovelhas	Cortisol Plasmático (ng/mL)	CV	Cortisol salivar (ng/mL)	CV
1	35,50 \pm 12,15	34,21	3,70 \pm 1,13	30,56
4	30,57 \pm 14,08	46,06	2,26 \pm 1,04	45,84
6	35,73 \pm 21,25	59,47	1,33 \pm 0,47	35,67
12	21,37 \pm 6,71	31,39	1,70 \pm 0,33	19,28
13	17,93 \pm 7,63	42,56	1,36 \pm 0,37	27,43
16	33,62 \pm 12,50	37,19	2,04 \pm 0,37	18,37

Em relação às datas de colheita (Quadro 5) a última colheita, no fim do ensaio, foi a que apresentou maior variação (maior desvio padrão).

Em média, as concentrações de cortisol salivar foram mais homogéneas, apresentando menores coeficientes de variação, 29,52 vs. 41,81 para as determinações por animal, e 32,26 vs 43,03 para as determinações por data de colheita.

Quadro 5 Médias totais desvio padrão e coeficiente de variação de cortisol plasmático e salivar (ng/mL) por data

Ovelhas	Cortisol Plasmático (ng/mL)	CV	Cortisol salivar (ng/mL)	CV
8 Junho	29,78±14,23	47,79	1,05±0,51	48,39
28 Junho	32,69±14,09	43,12	2,19±0,39	17,88
12 Julho	27,92±5,42	19,41	2,27±0,45	19,74
19 Julho	31,12±19,24	61,81	2,00±0,77	38,47

Esta variabilidade entre animais reflete-se nos perfis de concentrações de cortisol ao longo das várias datas de colheita (Figura 15 a e b).

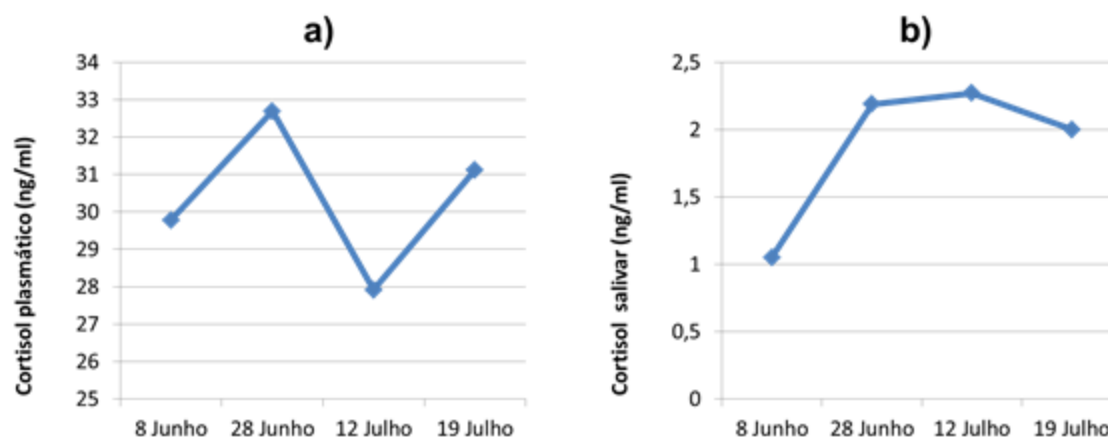


Figura 15 Perfis de cortisol plasmático (a) e salivar (b) por data.

Enquanto o cortisol plasmático apresenta valores mais elevados nas 3 últimas datas de colheita, por referência ao início do ensaio em que o alimento era distribuído *ad libitum*, o cortisol plasmático apresenta os menores valores a 12 de Julho, refletindo o decréscimo nas concentrações individuais dos animais 4 e 12.

Do mesmo modo, uma vez que as concentrações de cortisol salivar foram diferentes dos valores de cortisol plasmático, a correlação entre estas concentrações é muito baixa ($r= 0,35$) (Figura 16).

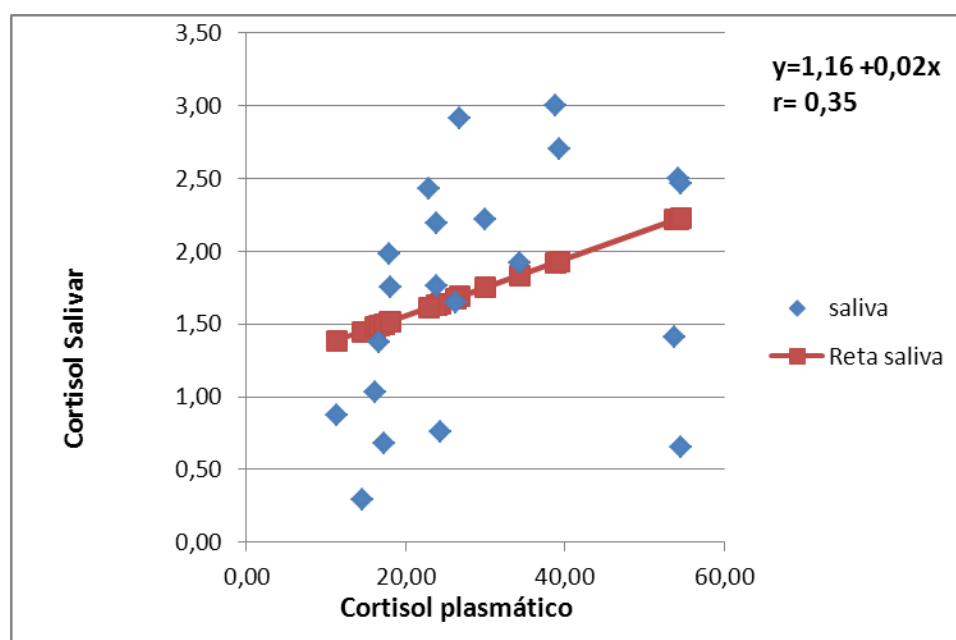


Figura 16 Cortisol plasmático versus salivar (ng/mL).

Na análise de concentrações de cortisol plasmático e salivar de animais em cativeiro sujeitos a factores de stress, Bayazit (2009) afirma que ao analisar-se cortisol presente no sangue, apenas se analisa uma fracção de cortisol (cortisol livre) devido à ligação da hormona do cortisol no sangue com proteínas, nomeadamente albumina, e essa poderá ser a razão porque as concentrações de cortisol salivar são menos variáveis. Essa poderá representar uma vantagem na utilização da saliva como fluido para análise de cortisol que, juntamente com um possível menor efeito stressante devido ao tempo necessário à recolha das amostras, e ao facto de não necessitar de mão-de-obra especializada. Outra das vantagens apresentadas está associada ao preço dos kit para análise de cortisol salivar, que é aproximadamente metade do preço de um kit para análise de cortisol plasmático.

4.3. Stress térmico e nutricional

Os valores registados, a análise descritiva e os resultados da comparação por teste t entre as concentrações de cortisol plasmático para as duas condições de conforto térmico (valores médios de 24,5 e 28,5) são apresentadas no quadro 6. No quadro 7 apresentam-se os resultados relativos às

concentrações de cortisol salivar. Em nenhum dos fluídos se verificaram valores significativos em função das condições ambientais de humidade de temperatura.

Quadro 6 Resultado do teste t para a comparação de cortisol plasmático entre níveis de conforto térmico (BTHIc X=24,5; BTHIs X=28,5).

BTHI c	BTHIs	t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances	
		BTHI c	BTHIs
46,06	38,74		
23,85	54,15	Mean	28,36 31,90
53,74	16,68	Standard Deviation	12,16 17,30
14,51	29,99	Variance	159,47 299,46
16,22	23,87	Observations	11 10
24,29	17,25	Pooled Variance	225,78
39,21	54,51	Hypothesized Mean Difference	0,00
26,81	18,04	df	19
17,99	11,3	t Stat	-0,54
22,96	54,51	P(T<=t) two-tail	0,595
26,27			
34,31			

Quadro 7 Resultado do teste t para a comparação de cortisol salivar entre níveis de conforto térmico (BTHIc X=24,5; BTHIs X=28,5).

STHIc	STHIs	t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances	
		STHIc	STHIs
1,77	3,00		
1,41	2,51	Mean	1,72 2,10
0,30	1,37	Standard Deviation	0,81 1,34
1,03	2,22	Variance	0,65 1,79
0,76	1,87	Observations	11 12
2,70	2,19	Pooled Variance	1,25
2,92	5,59	Hypothesized Mean Difference	0,00
1,98	0,68	Df	21
2,43	0,65	t Stat	-0,82
1,65	1,75	P(T<=t) two-tail	0,423
1,92	0,87		
	2,46		

Com uma Sig.=0,595 para o cortisol plasmático e de Sig=0,423 para o cortisol salivar, ambos superiores a 0,05, os valores de cortisol em relação às condições de temperatura e humidade não são significativamente diferentes com um grau de confiança de 95%.

No entanto as médias de cortisol, quer plasmático quer salivar, foram mais elevadas nos animais em condições ambientais mais desfavoráveis quando comparados com os animais os animais nas datas em que existiram condições de temperatura e humidade mais perto do conforto térmico.

Em relação às comparações efectuadas entre grupos com diferente nível de restrição alimentar também não se verificaram diferenças estatisticamente significativas, tendo os níveis de significância sido de 0,096 para os níveis de cortisol plasmático (Quadro 9) e de 0,191 para o cortisol salivar.

Quadro 8 Resultado do teste t para a comparação de cortisol plasmático entre níveis de restrição alimentar (BRA20= 20 g/kg 0,75; BRA50= 20 g/kg 0,75).

BRA20	BRA50	t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances	
		BRA20	BRA50
14,51	46,06		
16,22	23,85	Mean	25,12
24,29	53,74	Standard deviation	11,89
22,96	39,21	Variance	141,31
26,27	26,81	Observations	238,26
34,31	17,99	Pooled Variance	11
29,99	38,74	df	189,78
23,87	54,15	t Stat	20
54,51	54,51	P(T<=t) two-tail	-1,74
			0,096

Quadro 9 Resultado do teste t para a comparação de cortisol salivar entre níveis de restrição alimentar (BRA20= 20 g/kg 0,75; BRA50= 20 g/kg 0,75).

SRA20	SRA50	t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances	
		SRA20	SRA50
0,30	1,77		
1,03	1,41	Mean	1,62
0,76	2,70	Standard deviation	0,70
2,43	2,92	Variance	1,39
1,65	1,98	Observations	0,51
1,92	3,00	Pooled Variance	12
2,22	2,51	df	11
1,87	1,37	t Stat	1,18
2,19	5,59	P(T<=t) two-tail	21
1,75	0,68		-1,35
0,87	0,65		0,191
2,46			

Uma situação que merece discussão refere-se ao facto de os animais do grupo com um maior nível de restrição terem tido médias de cortisol inferiores aos animais com o nível de restrição mais

elevado. O cortisol é uma hormona esteróide sintetizada a partir do colesterol, e para o fabricar é preciso gordura o que é precisamente o que os animais perderam com a restrição alimentar, podendo ser essa uma das razões para que, níveis continuados de stress não se refletirem em valores mais elevados de cortisol.

Os impactos dos níveis de stress são demonstrados a nível de eficiência da produção dos animais domésticos. Por exemplo, no presente ensaio a restrição alimentar levou à perda de peso e de condição corporal em todos os animais. Outras hormonas, como por exemplo a leptina também devem ter sido alteradas (Bispham et al., 2003; Schoenberg et al., 2012). Os valores encontrados para os animais com maior nível de restrição alimentar são parecidos com o descrito por Purchas (1973) em ovinos habituados a longos períodos sem alimentação. O autor também verificou que o cortisol aumenta em animais quando se aumenta os quilogramas de alimento por animal, o que está em acordo com os valores encontrados neste ensaio, mais elevados em animais melhor nutridos.

5. Conclusões

Este foi um ensaio preliminar, não tendo sido possível analisar todas as datas e animais envolvidos no ensaio base, devido aos custos associados aos kits comerciais utilizados nas determinações de cortisol. Esse facto reduziu os graus de liberdade, o que associado à grande variabilidade inter animais e à variabilidade entre colheitas para o mesmo animal, que aumentam o erro experimental, refletiu-se nos níveis de significância observados e limita a utilização de métodos estatísticos mais poderosos.

Observou-se, no entanto, que condições térmicas e de humidade desfavoráveis aumentaram os níveis de cortisol, quer plasmático quer salivar. Observa-se ainda que a maior restrição alimentar diminuiu as concentrações de cortisol, quer plasmático quer salivar. Apesar da correlação entre concentrações de cortisol plasmático e salivar não ser significativa ($r=0,35$), as determinações no plasma e na saliva mostraram a mesma tendência, sendo ambas simultaneamente mais altas ou mais baixas entre grupos.

Com frequência o aumento do cortisol reflete a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-glândulas adrenais, associado a situações de stress. O presente estudo evidenciou a necessidade de ter cuidado em relação à generalização deste metabolito como indicador de bem-estar em situações de stress crónico. Nomeadamente em situações de restrição alimentar, estando os animais subnutridos, o que afecta o bem-estar, os níveis de cortisol decrescem em vez de aumentar.

Um segundo objectivo deste estudo era comparar kit comerciais e obter valores de referência que possibilitem no futuro rentabilizar as placas dos kits, reduzindo o número de poços ocupados com diluições das amostras. O kit que demonstrou piores resultados (Abnova, ref. KA2317) foi curiosamente o mais caro e o que era específico para ovelha. Para além de ter apresentado maior coeficiente de variação intra-ensaio (13,37%), vários poços não deram leitura, devido a estarem fora da zona de sensibilidade analítica, o que implicaria, neste caso ter de recorrer a concentrações. Um dos kits que pareceu mais promissor, foi o kit Salimetrics ref. 1-3002, quer pelo seu custo ser cerca de metade do preço dos outros, quer pela facilidade de recolha das amostras (pelo menos no que se refere a ovelhas), quer ainda porque foi o que apresentou menor coeficiente de variação intra-ensaio (2,16%).

Outra dos contributos deste estudo é a de permitir valores de referência, médios, quer plasmáticos quer salivares para ovelhas, respectivamente de 30,24 ng/mL ($\pm 14,4$) para concentrações de cortisol no sangue e de 1,91 ng/mL ($\pm 1,1$) para concentrações de cortisol na saliva, o que poderá auxiliar em estudos futuros.

6. Bibliografia

- Araújo, C. A. S. C. (2009). *Estudo comparativo do perfil metabólico e hormonal de ovelhas com gestação única, gemelar e não gestantes alimentadas com dieta de alta densidade energética*. Universidade de São Paulo.
- Bayazit, V. (2009). Evaluation of Cortisol and Stress in Captive Animals, *3*(2), 1022–1031.
- Beede, D. K. and Collier, R. J. (1986). Potential Nutritional Strategies for Intensively Managed Cattle during Thermal Stress. *Journal of Animal Science*, *62*, 543–554.
- Bispham, J., Gopalakrishnan, G. S., Dandrea, J., Wilson, V., Budge, H., Keisler, D. H., Symonds, M. E. (2003). Maternal endocrine adaptation throughout pregnancy to nutritional manipulation: consequences for maternal plasma leptin and cortisol and the programming of fetal adipose tissue development. *Endocrinology*, *144*(8), 3575–85. doi:10.1210/en.2003-0320
- Blaxter, K. L. (1958). Nutrition and climatic stress in farm animals. *The Proceedings of the Nutrition Society*, *17*(2), 191–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13578949>
- Brasil, L.H., Wechesler, F.S., Bonassi, I.A. (2000). Efeitos do Estresse Térmico sobre a produção, composição química do leite e Respostas termorreguladoras de cabras da raça Alpina. *Ver. Bras. Zootec.*, *29*(6): 1632-1641.
- Broom, D.M., (1991). Animal Welfare: Concepts and measurement, *Journal of Animal Science*, *69*, pp.4167-4175.
- Broom, D.M. and Johnson, K. G. (1993). Stress and Animal Welfares. *Chapman & Hall*, London.
- Broom, D.M; Molento, C. F. M. (2004). Bem-estar animal: conceito e questões relacionadas – revisão (Animal welfare: concept and related issues – Review). *Archives of Veterinary Science*, *9*, 1–11.
- Caroprese, M., Albenzio, M., Marino, R., Muscio, A., Santillo, A., & Sevi, A. (2008). Strategies to reduce heat stress in sheep housing. Conference: “*Innovation Technology to Empower Safety, Health and Welfare in Agriculture and Agro-food Systems*”.

- Daley, C. A., Sakurai, H., Adams, B. M., & Adams, T. E. (1999). Effect of stress-like concentrations of cortisol on gonadotroph function in orchidectomized sheep. *Biology of Reproduction*, 60(1), 158–63. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9858500>
- Echevarr, A. I. (2002). El ambiente en la producción animal. FAV UNRC. Retrieved from www.produccion-animal.com.ar
- Fazio E., Manera M., Mignacca S., P. M. and A. F. (2013). Cortisol Changes in Pregnant and Post-Partum Ewes: Effects of Single or Twin Births. *Trends in Veterinary Sciences*.
- Fell L.R. and Shutt D.A. (1987). Salivary cortisol and behavioural indicators of stress in sheep. *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.*, 17, 186–189.
- Finocchiaro, R., Portolano, B., & Misztal, I. (2005). Effect of heat stress on production of Mediterranean dairy sheep. *Journal of Dairy Science*, 88(5), 1855–64. doi:10.3168/jds.S0022-0302(05)72860-5
- Frase, D., M. Thornber, P. Song, W. (2009) Capacitação para implementar boas práticas de Bem-estar animal. Relatório de especialistas da FAO (Roma).
- Freixial, Ricardo M. C., B. J. (2012). *Pastagens- Texto de apoio para as Unidades Curriculares de Sistemas e Tecnologias Agropecuários, Noções Básicas de Agricultura e Tecnologia do Solo e das Culturas*.
- Godfrey, R. W., & Dodson, R. E. (2003). Effect of supplemental nutrition around lambing on hair sheep ewes and lambs during the dry and wet seasons in the U . S . Virgin Islands. *Journal of Animal Science*, 81, 587–593.
- Grandin, T. (1997). Assessment of stress during handling and transport. *Journal of Animal Science*, 75(1), 249–57. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9027573>
- Greenwood, P. L. & Shutt, D. A. (1985). Effects of management practices on cortisol, b-endorphin and behaviour in young goats. *Proc. Aust, Soc, Anim. Prod.*, 18, 224–227.
- Greenwood, P.L. & Shutt, D.A. (1992). Salivary and plasma cortisol as an index. *Australian Veterinary Journal*, 69, 161–163.

- Lamy, E., Harten, S. Van, Sales-baptista, E., & Manuela, M. (2012). Environmental Stress and Amelioration in Livestock Production. In V. Sejian, S. M. K. Naqvi, T. Ezeji, J. Lakritz, & R. Lal (Eds.), *Environmental Stress and Amelioration in Livestock Production* (pp. 19–45). Lisbon: Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-29205-7
- Long, N. M., Nijland, M. J., Nathanielsz, P. W., & Ford, S. P. (2010). The effect of early to mid-gestational nutrient restriction on female offspring fertility and hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to stress. *Journal of Animal Science*, 88(6), 2029–37. doi:10.2527/jas.2009-2568
- Marai, I. F. M., Darawany, A. A. E., & Fadiel, A. (2008). Reproductive performance traits as affected by heat stress and its alleviation in sheep, 8, 209–234.
- Mashaly, M. M., Hendricks, G. L., Kalama, M. a, Gehad, a E., Abbas, a O., & Patterson, P. H. (2004). Effect of heat stress on production parameters and immune responses of commercial laying hens. *Poultry Science*, 83(6), 889–94. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15206614>
- McDowell, L. R. Vitamin Nutrition of Livestock Animal: Overview From Vitamin Discovery to today (2004).
- Morgado, C. (2009). *Deficiências no Bem-Estar Animal Repercussões sobre as carcaças de suínos abatidos para consumo*. Universidade de Tás-o-Montes e Alto Douro.
- Möstl, E., & Palme, R. (2002). Hormones as indicators of stress. *Domestic Animal Endocrinology*, 23(1-2), 67–74. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19388668>
- Muller, C.J.C.; Botha, J. A., & Smith, W. A. (1994). Effect of shade on various parameters of Friesian cows in a Mediterranean climate in South Africa . 1 . Feed and water intake , milk production and milk composition, 24(2).
- Neiva, J., Teixeira, M., Turco, S., & Oliveira, S., Moura, A. (2004). Efeito do Estresse Climático sobre os Parâmetros Produtivos e Fisiológicos de Ovinos Santa Inês Mantidos em Confinamento na Região Litorânea do Nordeste do Brasil. *R. Bras. Zootec.*, 33, 668–678.

- Pereira, C. M. S. G. (2011). *Relação entre temperamento, níveis de cortisol plasmático e cortisol salivar em vitelos à entrada na engorda e susceptibilidade a doença respiratória bovina*. Universidade técnica de lisboa.
- Purchas, R. W. (1973). The response of circulating cortisol levels in sheep to various stresses and to reserpine administration. *Australian Veterinary Journal*, 26, 477–89.
- Rattray, P. V., Garrett, W. N., N. E. and N. H. (1974). Efficiency of Utilization of Metabolizable Energy during Pregnancy and the Energy Requirements for Pregnancy in Sheep. *Journal of Animal Science*, 38, 383–393.
- Ravagnolo, O., Misztal, I., & Hoogenboom, G. (2000). Genetics and breeding Genetic Component of Heat Stress in Dairy Cattle, Development of Heat Index Function, (12), 2120–2125.
- Schaefer, A. L., Dubeski, P. L., Aalhus, J. L., & Tong, A. K. W. (2001). Role of nutrition in reducing antemortem stress and meat quality aberrations. *Journal of Animal Science*, 79.
- Sejian, V., Maurya, V. P., Kumar, K., & Naqvi, S. M. K. (2012). Effect of multiple stresses (thermal, nutritional, and walking stress) on the reproductive performance of malpura ewes. *Veterinary Medicine International*, 2012, 471760. doi:10.1155/2012/471760
- Sevi, A., & Caroprese, M. (2012). Impact of heat stress on milk production, immunity and udder health in sheep: A critical review. *Small Ruminant Research*, 107(1), 1–7. doi:10.1016/j.smallrumres.2012.07.012
- Shinji M., Y. S. (1986). Circadian Variation in the Blood Cortisol Level Formed dy Feeding Sheep. *Japn. J. Zootech. Sci*, 58(4), 333–340.
- Silanikove, N. (2000). Effects of heat stress on the welfare of extensively managed domestic ruminants. *Livestock Production Science*, 67(1-2), 1–18. doi:10.1016/S0301-6226(00)00162-7
- Souza, M., Velásquez, L., Ramos, A., Oba, E. (2006). Níveis plasmáticos de colesterol total, lipoproteínas de alta densidade (hdl) e cortisol, e sua biorritmicidade, em carneiros ideal-polwarth. *Ciência Animal Brasileira*, 7, 433–438.
- Starling, J., Silva, R., Muñoz, M., Barbosa, G., Costa, M. (2002). Análise de Algumas Variáveis Fisiológicas para Avaliação do Grau de Adaptação de Ovinos Submetidos ao Estresse por Calor

1 Analysis of Some Physiological Variables for the Evaluation of the Degree of Adaptation in Sheep Submitted to Heat Stress. *Rev. Bras. Zootec.*, 31, 2070–2077.

Tangalakis, K., Lumbers, E. R., Moritz, K. M., Towstoles, M. K., & Wintour, E. M. (1992). Effect of cortisol on blood pressure and vascular reactivity in the ovine fetus. *Experimental Physiology*, 77(5), 709–17. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1418954>

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 Reproduction*, 5(2), 105–13. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10864855>

West, J. W. (2003). Effects of heat-stress on production in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 86(6), 2131–44. doi:10.3168/jds.S0022-0302(03)73803-X

Wojtas, K., Cwynar, P., Kolacz, R., & Kupczynski, R. (2013). Effect of heat stress on acid base balance in Polish Merino sheep, 0–8. doi:10.7482/0003-9438-56-092

Young. (1981). Cold Stress as it Affects Animal Production. *Journal of Animal Science*, 52, 154–163. Retrieved from <http://www.journalofanimalscience.org/content/52/1/154>

Metzger, M., *Avoid heat stress in your sheep and goats* [Disponível em:

http://msue.anr.msu.edu/news/avoid_heat_stress_in_your_sheep_and_goats; acedido em 06 de Fevereiro de 2014]

7. Anexos

Anexo 1. Procedimento do ensaio e método de cálculos do Kit IBL (RE52611, Arium) – Anticorpos anti-cortisol coelho

Instruções Pré-teste:

Preparação de componentes concentrados

Diluir / dissolver	Componente		Diluyente	Relação	Observações	Armazenamento	Estabilidade
10 mL	WASHBUF	juntar 100 mL	agua bidest.	1:10	Misturar energicamente.	2-8 °C	4 semanas

10.2. Diluição de Amostras

Amostra	diluir	com	Relação	Observações
Saliva	não	-	-	-
Soro	geralmente	Padrão A	1:50	p.ex. 5 µL + 245 µL

As amostras que contenham concentrações superiores à do padrão mais elevado têm que ser novamente diluídas até 1:32 com Padrão A e re-analisadas.

Procedimento do ensaio

1. Pipetar 50 µL de cada Padrão, Controlo e amostra para os respectivos poços da microplaca.
2. Pipetar 100 µL de Conjugado Enzimático para cada poço. Tapar a placa com nova película aderente.
3. Incubar 2 h à TA (18-25°C) num agitador orbital (400-600 rpm).
4. Remover a película adesiva. Rejeitar a solução de incubação. Lavar a placa 4 x com 250 µL de Tampão de Lavagem diluído. Remover o excesso de solução batendo com a placa invertida numa toalha de papel.
5. Pipetar 100 µL de Solução de Substrato TMB para cada poço.
6. Incubar 30 min à TA (18-25°C) num agitador orbital (400-600 rpm).
7. Parar a reação de substrato adicionando 100 µL de Solução Stop TMB a cada poço. Misturar rapidamente os conteúdos, agitando cuidadosamente a placa. A cor muda de azul para amarelo.
8. Medir a densidade óptica com um fotómetro a 450 nm (Comprimento de onda de referência: 600-650 nm) nos 15 min seguintes à pipetagem da Solução Stop.

Cálculo de resultados

Todos os kits têm um procedimento idêntico de cálculo de resultados, apenas diferenciando-se as respectivas curvas cedidas com os kits.

Constrói-se um gráfico com os padrões (eixo dos yy, linear) em função da sua concentração (eixo dos xx, logarítmico), quer em papel gráfico semi-logarítmico quer usando um método computadorizado. Uma boa curva é fornecida optando por interpolação cubic spline, ajustamento 4PL (4 parameter logistics) ou modelo logit-log. Para o cálculo da curva de calibração, deve usar cada sinal dos padrões (se um dos duplicados apresentar um valor claramente diferente do esperado pode ser omitido e o valor mais razoável pode ser usado). A concentração das amostras pode ser lida diretamente a partir da curva de calibração. Devido à diluição das amostras de soro, os valores obtidos para soro têm que ser multiplicados pelo factor Amostras que apresentem concentrações acima do padrão mais elevado, têm que ser diluídas como descrito em **instruções pré-teste** e testadas novamente. No caso de amostras diluídas os valores têm que ser multiplicados pelo factor de diluição correspondente. Amostras de saliva com valores consideravelmente elevados devem ser novamente verificadas relativamente a contaminações com sangue.

Conversão:

$$\text{Cortisol (ng/mL)} \times 2.76 = \text{nmol/L}$$

$$\text{Cortisol (}\mu\text{g/dL)} \times 27.6 = \text{nmol/L}$$

Anexo 2. Procedimento do Kit Abnova (ref: KA2317, Tebo) Anticorpos de Ovelha.

Procedimento do ensaio

1. Pipetar 25 μL de padrão (pronto a usar não necessita diluição).
2. Colocar 25 μL de amostra nos poços apropriados.
3. Colocar 100 μL Cortisol solução conjugado enzimático em cada poço (excepto nos brancos).
4. Incubar por 1 hora a 37°C.
5. Terminar a reação e lavar a placa 4-5 times com a solução de lavagem (250-300 μL) por poço. Inverter a placa sobre papel absorvente e remover todos os residuo-os.
6. Colocar 100 μL de TMB color reagente em cada poço (incluindo os bancos). Relembrar a ordem de pipetagem.
7. Incubar a placa por 20 minutes sem agitar.
8. Parar a reação através da adição de 50 μL de Solução de paragem (um gota) a cada poço na mesma sequência que a solução substrato foi colocada, misturar por 1-2 minutos.
9. Ler a absorvância a 450 nm num agitador orbital.

Anexo 3. Procedimento kit salimetrics (ref 1-3002, Salimetrics) – Cortisol salivar

1. Determinar o esquema da placa
2. Pipetar 24 mL de solução substrato para um tubo descartável. Guardar para o Passo 5.
3. Pipetar 25 mL de amostra, controlos e brancos nos respectivos poços. Padrões, controlos e brancos devem ser testados em duplicado.

Pipetar 25 μ L de solução substrato para dois poços para servir como o valor branco

Pipetar de 25 mL de solução substrato em cada NSB bem

4. Fazer uma diluição de 1:1600 do conjugado através da adição de 15 μ L do conjugado aos 24 mL de solução substrato preparados no Passo 3. Centrifugar durante alguns minutos. Misturar imediatamente a solução conjugado diluído e pipetar 200 μ L em cada poço utilizando uma pipeta de canais múltiplos. Tome nota de quaisquer poços com as mudanças amarelas ou roxas escuras.
5. Misturar num agitador orbital durante 5 minutos a 500 rpm e incubar à temperatura ambiente durante um período adicional de 55 minutos.
6. Lavar a placa 4 vezes com tampão de lavagem. No entanto, a lavagem pode ser feita por esguichar delicadamente em tampão de lavagem de cada poço com uma garrafa de esguicho, ou por pipetagem de 300 μ L de tampão de lavagem em cada poço, e em seguida, se eliminar o líquido invertendo a placa sobre uma pia. Após cada lavagem, a placa deve ser minuciosamente seca em papel absorvente para eliminar todos os resíduos.
7. Adicionar 200 μ L de solução de TMB a cada poço com uma pipeta de multicanais.
8. Misturar por 5 minutos a 500 rpm e incubar a placa no escuro à temperatura ambiente durante um adicional 25 minutos
9. Adicionar 50 μ L de solução STOP com uma pipeta de multicanais.
10. Misturar por 3 minutos a 500 rpm.

Anexo 4. Tabelas pesos (kg) dos animais intervenientes no ensaio

<i>Datas</i>	4	6	1	12	13	16
	Ovelhas sem restrição			Ovelhas com restrição		
24/mai.	48,9	54,6	52,4	61,8	53,4	49,1
31/mai.	46,6	47,7	45,8	49,4	44,9	49,8
06/jun.	45,5	51,2	49,1	54	52,4	51,6
Período de Ensaio						
08/jun.	45,2	50,4	49,1	54,2	51,8	50,8
14/jun.	48,4	51,6	51,6	54,6	52,6	50,6
21/jun.	47,7	52,4	49,3	54,6	52	51,8
28/jun.	44,8	49,5	48,7	50,4	49,4	47,1
05/jul.	44,4	49,8	48,4	49,9	47,2	44,8
12/jul.	45,8	51	49,4	50,2	47,7	44,2
19/jul.	36,3	51	48,5	48,7	46,7	44,6
25/jul.	38,3	54	46,3	53,4	50,8	46,8