



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

RELAÇÃO ENTRE TEMPERAMENTO, NÍVEIS DE CORTISOL PLASMÁTICO E CORTISOL
SALIVAR EM VITELOS À ENTRADA NA ENGORDA E SUSCEPTIBILIDADE A DOENÇA
RESPIRATÓRIA BOVINA

CÁTIA MARISA SIMÕES GOMES PEREIRA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Miguel Luís Mendes Saraiva Lima
Doutora Ilda Maria Neto Gomes Rosa
Doutor George Thomas Stilwell

ORIENTADOR

Doutor George Thomas Stilwell

2011

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

RELAÇÃO ENTRE TEMPERAMENTO, NÍVEIS DE CORTISOL PLASMÁTICO E CORTISOL
SALIVAR EM VITELOS À ENTRADA NA ENGORDA E SUSCEPTIBILIDADE A DOENÇA
RESPIRATÓRIA BOVINA

CÁTIA MARISA SIMÕES GOMES PEREIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Miguel Luís Mendes Saraiva Lima

Doutora Ilda Maria Neto Gomes Rosa

Doutor George Thomas Stilwell

ORIENTADOR

Doutor George Thomas Stilwell

2011

LISBOA

AGRADECIMENTOS

Este espaço é dedicado àqueles que deram a sua contribuição para que esta dissertação fosse realizada. A todos eles deixo aqui o meu sincero agradecimento.

Agradeço ao Doutor George Stilwell, por todo o apoio e dedicação como professor orientador. Obrigado pela paciência, simpatia e disponibilidade reveladas durante o estágio e aquando da realização desta dissertação. Agradeço ainda todos os conhecimentos transmitidos ao longo do curso.

Ao Dr. José Neves, pela disponibilidade e amabilidade com que me recebeu em Montemor-o-Velho. Obrigado pela paciência, por todos os sábios ensinamentos e principalmente pelo excelente exemplo de carácter profissional e pessoal.

Gostaria ainda de agradecer aos clínicos com quem tive oportunidade de realizar parte das actividades deste estágio curricular, sendo eles: Dr. José Alface, Dr. José Ferrão, Dra. Ana Vieira e Dr. Carsten.

À Doutora Luísa Mateus pela disponibilidade e ajuda no doseamento laboratorial de cortisol.

À minha família, um especial agradecimento, em particular ao meu pai e à minha mãe por me terem sempre educado com valores que tanto admiro, por nunca me terem faltado com nada e por me apoiarem em todos os esforços e desafios. Obrigado pelo amor, alegria e atenção sem reservas.

Às minhas colegas estagiárias, Marta Oliveira e Carla Gonçalves pelo companheirismo e amizade durante estes seis meses de estágio.

Ao Fábio Rodrigues, companheiro de tantas aventuras, obrigado pelo apoio e amizade principalmente nestes últimos meses de estágio.

Aos amigos inesquecíveis que me acompanharam durante o meu percurso dentro e fora da FMV.

Deixo também uma palavra de agradecimento ao Sr. Manuel Barata e funcionários da exploração Pinhal Gados pela simpatia e ajuda na recolha de amostras e de dados fundamentais para a elaboração do estudo desta dissertação de mestrado.

RESUMO

Título: Relação entre temperamento, níveis de cortisol plasmático e cortisol salivar em vitelos à entrada na engorda e susceptibilidade a Doença Respiratória Bovina

A Doença Respiratória Bovina (DRB) é a patologia que ocasiona maior impacto económico negativo em qualquer fase da produção primária de carne de bovino. Actualmente sabe-se que é uma síndrome de origem multifactorial, cuja etiologia pode ser dividida em três grandes grupos: factores ambientais, factores do hospedeiro e factores infecciosos. A maioria das tentativas de controlo desta importante doença, baseiam-se no combate aos factores infecciosos. Este facto faz com que muitos dos estudos procurem testar vacinas ou antibióticos cada vez mais complexos, tendo como desvantagem o facto de encarecer a engorda, afectar a qualidade e segurança do produto final e potencialmente causar resistências aos antimicrobianos. O factor hospedeiro, mais concretamente a resistência ao stress suscita assim grande interesse. A susceptibilidade à doença varia muito de indivíduo para indivíduo, e poderá estar relacionada com os seus antecedentes ou com a capacidade para resistir ao stress.

Este trabalho pretendeu avaliar a relação que pode existir entre a resistência ao stress e a susceptibilidade à DRB. Para este fim utilizou-se o cortisol como a hormona indicadora de animais em stress. A recolha de amostras de plasma e saliva para o doseamento do cortisol (CP e CS, respectivamente) foi efectuada em duas fases: no dia seguinte à entrada dos animais na exploração (D0) e após 8 dias de adaptação dos indivíduos à exploração de engorda (D8). Deste modo pretendeu-se avaliar o impacto do transporte e mudança de ambiente no animal, para além da sua capacidade de adaptação ou a manutenção de um estado de stress crónico. Verificou-se que os valores CP0 foram significativamente superiores aos valores do CP8. O comportamento dos animais foi também avaliado de forma subjectiva através do espaço de fuga, reacção à entrada na “box” individual e reacção à contenção para colheita de sangue. Procurou-se ainda averiguar se existe ou não correlação entre os níveis de cortisol, e o comportamento dos animais com a morbilidade à DRB. Não foi encontrada relação entre os níveis de cortisol e a morbilidade à DRB, mas os animais que reagiram mais violentamente à entrada na “box”, provavelmente devido ao medo, apresentaram maiores níveis de cortisol e adoeceram mais durante o período de estudo.

Palavras-chave: Cortisol, DRB, stress, temperamento.

ABSTRACT

Title: Relationship between temperament and cortisol levels in plasma and saliva in calves entering a feedlot and susceptibility to Bovine Respiratory Disease

The bovine respiratory disease (BRD) is the pathology that results in a more negative economic impact at any stage of primary beef production. It is established that is a syndrome of multifactorial origin, with the etiology being divided into three major groups: environmental factors, host factors and infectious factors. Most attempts to control this important disease are based on the combat of infectious factors. Many of the studies are on vaccines or antibiotics use, with the disadvantage of increasing the cost of fattening, affecting the quality and safety of the final product and potentially causing antimicrobials resistance. Thus the host factor is a subject in need of research. Susceptibility to disease varies widely from individual to individual and may be related to their history or to the ability to resist stress.

The purpose of this study was to evaluate the relationship that may exists between resistance to stress and susceptibility to BRD. To this end we used behavior and cortisol as indicators of stress in animals. The samples of plasma and saliva for cortisol assay (CP and CS, respectively) were performed in two phases: the day after the entry of animals on the farm (D0) and after 8 days of adaptation of individuals to the farm (D8). The objective was to assess the impact of transportation and environmental changes and the animals' ability to adapt or maintain a state of chronic stress. There were statistically significant differences ($p < 0,05$) between CP0 and CP8 values, with CP0 significantly higher than the CP8 values. The behavior of animals was also assessed subjectively by the space flight, the response to the entry of operator in the box and individual reaction to the restraint for blood sampling. We attempted to determine where there was a correlation between cortisol levels and behavior of the animals with BRD morbidity. No relationship was found between cortisol levels and morbidity to the DRB, but the animals that reacted more violently to the entry of operator in the box, probably due to fear, had higher levels of cortisol and prone to disease more during the study period.

Keywords: Cortisol, DRB, stress, temperament

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	i
RESUMO.....	ii
ABSTRACT.....	iii
ÍNDICE GERAL.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ÍNDICE DE TABELAS.....	viii
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
INTRODUÇÃO.....	1
BREVE DESCRIÇÃO DAS AVTIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO CURRICULAR	3
STRESS.....	7
1 Definição.....	7
1.1 Síndrome de emergência.....	8
1.2 Síndrome Geral de Adaptação.....	8
2 Conceitos gerais da regulação do stress	9
2.1 Regulação hipotalâmica	10
2.2 Hipófise anterior	12
2.3 Glândula adrenal: produção de glucocorticóides.....	13
2.3.1 Efeitos biológicos dos glucocorticóides.....	14
2.4 Glândula adrenal: produção de catecolamidas	15
3 Modificações funcionais e estruturais consecutivas aos ajustes neuro-hormonais.....	16
3.1 Atrasos no crescimento	17
3.2 Patologias reprodutivas	18
3.3 Aumento da sensibilidade do indivíduo aos agentes infecciosos	19
4 Factores de stress na produção intensiva.....	22
4.1 Interações entre animais.....	23
4.1.1 Mecanismos reguladores das interações sociais	23
4.2 Interações homem animal.....	25
4.2.1 Transportes	26
4.3 Interação animal Ambiente	27
5 Métodos de avaliação de stress.....	28
5.1 Variáveis fisiológicas	29
5.2 Indicadores da reacção geral ao stress: frequência cardíaca e respiratória, cortisol plasmático e glucose.....	30
5.2.1 Avaliação do cortisol plasmático.....	30

5.2.2	Avaliação do cortisol na saliva	31
5.2.3	Outros.....	32
5.3	Indicadores comportamentais de stress.....	32
	DOENÇA RESPIRATÓRIA BOVINA.....	33
6	Impacto económico da Doença Respiratória Bovina.....	33
7	Doença Respiratória Bovina e a tríade epidemiológica.....	34
7.1	Factores do hospedeiro	35
7.1.1	Predisposição anatómica e fisiológica do aparelho respiratório bovino e mecanismos de defesa pulmonar	35
7.1.2	Resposta imunitária do hospedeiro.....	36
7.1.3	Temperamento	36
7.1.4	Resistência à DRB.....	36
7.2	Factores ambientais.....	37
7.3	Factores infecciosos	38
8	Diagnóstico da Doença Respiratória Bovina.....	39
8.1	Métodos clássicos	39
8.2	Métodos laboratoriais.....	40
8.3	Outros métodos de diagnóstico	41
8.3.1	Termografia	41
8.3.2	Ecografia	41
8.3.3	Comportamento.....	42
8.3.4	Proteínas da fase aguda.....	42
8.4	Necrópsia	43
9	Prevenção e controlo da DRB.....	44
	MATERIAL E MÉTODOS.....	46
10	Relação entre temperamento, níveis de cortisol plasmático e cortisol salivar em vitelos à entrada na engorda e susceptibilidade a Doença Respiratória Bovina	46
10.1	Objectivos.....	46
10.2	Descrição da exploração	46
10.3	Recolha de dados.....	47
10.3.1	Recolha de amostras para o doseamento do cortisol plasmático e salivar.....	47
10.3.2	Avaliação do comportamento e temperamento.....	48
10.3.3	Avaliação da morbilidade.....	48
10.3.4	Doseamento do cortisol	49
10.3.5	Tratamento estatístico	49
	RESULTADOS.....	50
11	Estatística descritiva	50
11.1	Transporte dos animais: distância percorrida.....	50
11.2	Resultados do doseamento de cortisol plasmático e salivar no dia 0 e dia 8	51
11.3	Avaliação da morbilidade.....	52
11.4	Testes de temperamento	52

11.4.1	Espaço de fuga.....	53
11.4.2	Reacção à entrada do operador	53
11.4.3	Reacção à recolha de amostra de sangue.....	54
12	Análise da relação entre stress, cortisol, temperamento e morbilidade à DRB	54
12.1	Relação entre a concentração de cortisol no D0 e D8	54
12.2	Relação entre níveis de cortisol e testes comportamentais no dia 0	55
12.2.1	Espaço de fuga dia 0 (EF0) e concentração de cortisol dia 0	55
12.2.2	Reacção à entrada do operador dia 0 (RE0) e concentração de cortisol dia 0	56
12.2.3	Reacção à recolha de amostra de sangue dia 0 (R0) e concentração de cortisol dia 0	57
12.3	Relação entre níveis de cortisol e testes comportamentais no dia 8	58
12.3.1	Espaço de fuga dia 8 (EF8) e concentração de cortisol dia 8	58
12.3.2	Reacção à entrada do operador dia 8 (RE8) e concentração de cortisol dia 8	59
12.3.3	Reacção à recolha de amostra de sangue dia 8 (R8) e concentração de cortisol dia 8	61
12.4	Relação entre cortisol e morbilidade	63
12.4.1	Cortisol plasmático D0.....	63
12.4.2	Cortisol salivar D0	63
12.4.3	Cortisol plasmático D8.....	64
12.4.4	Cortisol salivar D8	64
12.5	Relação entre os testes de temperamento e morbilidade	65
	DISCUSSÃO.....	66
	CONCLUSÃO.....	70
	BIBLIOGRAFIA.....	72
	ANEXOS.....	79

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Regulação da secreção de ACTH.....	13
Figura 2 Mecanismo de regulação da secreção de glucocorticóides.....	14
Figura 3 Esquema representativo da cadeia de eventos desde a percepção dos estímulos agressivos ao aparecimento de patologia	16
Figura 4 Exemplos de hierarquias sociais na espécie bovina	23
Figura 5 Representação esquemática das consequências da sobrepopulação num grupo de animais.	25
Figura 6 Factores que contribuem para DRB em bovinos de carne e as consequências da patologia.	34
Figura 7 Ecografia pulmonar de um vitelo com pneumonia (5 MHz).	42
Figura 8 Recolha de amostra de sangue para tubo S-Monovette®.	47
Figura 9 Recolha de amostra de saliva com Salivette®.	47
Figura 10 Teste de comparação das médias entre EF0/CP0.	55
Figura 11 Teste de comparação das médias entre EF0/CS0.	56
Figura 12 Teste de comparação das médias entre RE0/CP0.	56
Figura 13 Teste de comparação das médias entre RE0/CS0.	57
Figura 14 Teste de comparação das médias entre R0/CP0.	57
Figura 15 Teste de comparação das médias entre R0/CS0.	58
Figura 16 Teste de comparação das médias entre CP8/EF8.	58
Figura 17 Teste de comparação de médias entre CS8/EF8.	59
Figura 18 Teste de comparação de médias entre CP8/RE8.	59
Figura 19 Teste de comparação de médias entre CS8/RE8.	60
Figura 20 Teste de comparação de médias entre CP8/R8.	61
Figura 21 Teste de comparação de médias entre CS8/R8.	61
Figura 22 Relação entre CP0 e morbilidade.....	63
Figura 23 Relação entre CS0 e morbilidade.....	63
Figura 24 Relação entre CP8 e morbilidade.....	64
Figura 25 Relação entre CS8 e morbilidade.....	64

INDICE DE TABELAS

Tabela 1 Resumo das actividades desenvolvidas durante o estágio curricular.	5
Tabela 2 Factores libertadores e inibidores hipotalâmicos que controlam a secreção da hipófise.	11
Tabela 3 Resultados do doseamento de cortisol plasmático no dia 0 (CP0) e dia 8 (CP8).	51
Tabela 4 Resultados do doseamento de cortisol salivar no dia 0 (CS0) e dia 8 (CS8).	51
Tabela 5 Resultado do teste t para a comparação entre CP0 e CP8.	54
Tabela 6 Resultado do teste t para a comparação entre CS0 e CP8.	55
Tabela 7 Teste de Mann-Whitney para os grupos 1 e 2.	62
Tabela 8 Teste de Mann-Whitney para os grupos 1 e 3.	62
Tabela 9 Teste de Mann-Whitney para os grupos 2 e 3.	62
Tabela 10 Proporção de animais diagnosticados com DRB e os respectivos testes de temperamento.	65

INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Distâncias percorridas pelos animais.	50
Gráfico 2 Morbilidade por DRB.	52
Gráfico 3 Espaço de fuga no dia 0 e dia 8.	53
Gráfico 4 Reacção à entrada do operador no dia 0 e dia 8.	53
Gráfico 5 Reacção à recolha de amostra de sangue no dia 0 e dia 8.	54

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH - Adrenocorticotrophic hormone

AGL - Ácidos gordos livres

BHV-1 - Herpesvirus bovino de tipo 1

BRSV - Vírus respiratório sincicial bovino

BVDV - Vírus da diarreia viral bovina

CGB - Cortisol-binding protein

CK - Creatine kinase

CP - Cortisol plasmático

CP0 - Cortisol plasmático no dia 0

CP8 - Cortisol plasmático no dia 8

CRH - Factor libertador de coriotropina

CS - Cortisol salivar

CS0 - Cortisol salivar no dia 0

CS8 - Cortisol salivar no dia 8

DAD - Deslocamento do abomaso à direita

DAE - Deslocamento do abomaso à esquerda

DRB - Doença Respiratória Bovina

D0 - Dia 0

D8 - Dia 8

EDTA - Ethylenediamine tetraacetic acid

EF0 - Espaço de fuga no dia 0

EF8 - Espaço de fuga no dia 8

FSH - Hormona folículo-estimulante

GHRH - Factor libertador da hormona do crescimento

GMD - Ganho médio diário

GnRH - Factor libertador da gonadotropina

GR - Receptor de glucocorticóides

HHA - Hipotálamo-hipofisário-adrenal

IFN- γ – Interferon gama

IHQ - Imuno-histoquímica

IL-1 - Interleucina 1

IL-6 - Interleucina 6

LH - Hormona luteinizante

MR - Receptor mineralocorticóide

NF- κ B - Factor nuclear kappa B

NK - Células natural “killer”

PCR - Polymerase chain reaction

PCV - Packed-cell volume

PI-3 - Vírus Parainfluenza do tipo 3

PIH - Factor inibidor da prolactina

POMC - Proopiomelanocortina

ppm - partes por milhão

PTH - Paratormona

R0 - Reacção à recolha de amostra de sangue no dia 0

R8 - Reacção à recolha de amostra de sangue no dia 8

RE0 - Reacção à entrada no dia 0

RE8 - Reacção à entrada no dia 8

TNF - Factor de necrose tumoral

TRH - Factor libertador de tireotropina

TSH - Hormona estimulante da tiróide

β -OBH - β -hidroxibutirato

® - Marca registada

$\mu\text{g/dL}$ – Microgramas por decilitro

I. INTRODUÇÃO

Esta Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária é o resultado do estágio Curricular, na área de Clínica e Cirurgia de Grandes Animais sob a orientação do Doutor George Stilwell. O estágio curricular teve uma duração de aproximadamente seis meses (período entre Setembro de 2010 a Março de 2011) e consistiu em saídas de campo no âmbito da disciplina de Clínica de Espécies Pecuárias para Explorações Leiteiras localizadas no distrito de Lisboa e de Santarém, incluindo a Estação Zootécnica Nacional. Durante cerca de quatro semanas tive a oportunidade de acompanhar o Dr. José Ferreira Neves que faz clínica de carácter ambulatorio na região de Montemor-o-Velho, prestando assistência médica, cirúrgica e reprodutiva a pequenas e médias explorações de bovinos principalmente de leite, mas também de algumas de carne (na sua maioria novilhos de engorda) e pequenas explorações de suínos, ovinos e caprinos.

A escolha do tema relação entre temperamento, níveis de cortisol plasmático e cortisol salivar em vitelos à entrada na engorda e susceptibilidade a Doença Respiratória Bovina foi feita com o objectivo de investigar se existe uma relação entre a resistência ao “stress” e susceptibilidade à DRB. O interesse nesta área está relacionado com o facto de a DRB ser reconhecida como uma das mais importantes causas de prejuízos na engorda de bovinos. Actualmente sabe-se que é uma síndrome de origem multifactorial, e que pode ser dividida em três grandes grupos: factores ambientais, factores do hospedeiro e factores infecciosos. A maioria das tentativas de controlo desta importante doença, baseiam-se no combate dos factores ambientais (ventilação, temperatura e humidade etc...) e infecciosos (vírus e bactérias). Este facto faz com que muitos dos estudos procurem testar vacinas ou antibióticos cada vez mais complexos, tendo como desvantagem o facto de encarecer a engorda, afectar a qualidade e segurança do produto final e potencialmente causar resistências aos antimicrobianos. Por outro lado, a abordagem reactiva e quase exclusivamente dedicada ao factor infeccioso tem-se mostrado bastante insuficiente no controlo da doença. O factor hospedeiro, mais concretamente a possibilidade de existir resistência ao “stress”, suscitou assim interesse no tema em questão. A susceptibilidade à doença varia muito de indivíduo para indivíduo, e poderá estar relacionada com os seus antecedentes ou com a sua capacidade para resistir ao “stress”. Sabendo que a resistência aos agentes infecciosos não é facilmente transmitida geneticamente, sobra a possibilidade de uma maior resistência ao “stress” explicar porque alguns animais não apresentam sinais de doença, ou exibem sintomas mais benignos, apesar de expostos aos mesmos factores dos coabitantes.

Assim, a primeira parte desta Dissertação irá tratar de uma breve descrição da actividade prática desenvolvida durante o estágio curricular, seguida da segunda parte que corresponderá à revisão bibliográfica do tema eleito. A terceira e última parte consistirá na apresentação e discussão dos resultados do estudo elaborado numa engorda intensiva de vitelos, numa exploração de engorda localizada na zona de Pegões.

II. BREVE DESCRIÇÃO DAS ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO CURRICULAR

As actividades desenvolvidas na parte prática do estágio curricular consistiram principalmente em saídas de campo no âmbito da disciplina de Clínica de Espécies Pecuárias para explorações de bovinos de leite no distrito de Lisboa e Santarém. Houve também a oportunidade de acompanhar o trabalho de diversos clínicos de espécies pecuárias. A maior parte da casuística foi realizada em duas grandes explorações de bovinos de leite no distrito de Lisboa. A primeira localizada na freguesia do Sabugo, concelho de Sintra. Aqui tive oportunidade de contactar com mais intensidade na rotina de funcionamento de uma exploração de bovinos de leite adquirindo e aprofundando os conhecimentos práticos referentes ao manejo, à clínica e reprodução. Relativamente aos aspectos práticos do manejo participei na descorna de vitelos, monotorização e tratamento dos animais nos primeiros dias pós-parto e corte funcional de cascos. No que se refere à reprodução acompanhei o trabalho do médico veterinário responsável pela reprodução nesta exploração e tive oportunidade de realizar palpações rectais e o acompanhamento de ecografias. Participei ainda em cirurgias relacionadas com a reprodução e obstetrícia: Cesariana, Sutura de Caslick e Sutura de Goetze. Nesta exploração houve a oportunidade de praticar em cadáveres de animais eutanasiados técnicas cirúrgicas, como a amputação da úngula e ablação de tetos. É importante referir que nesta mesma exploração, durante o primeiro mês de estágio surgiu um surto de diarreia em vitelos machos com aproximadamente 10 dias de idade. Como tive a oportunidade de acompanhar o surto desde o início, incluindo avaliação clínica, tratamento de alguns animais atingidos e necrópsia de animais que não resistiram, os dados recolhidos serviram para elaboração de um caso clínico para as apresentações na disciplina de Actividades Hospitalares III.

Onde decorreu outra grande parte da casuística do estágio curricular foi na segunda exploração do distrito de Lisboa, localizada no concelho da Azambuja. Aqui acompanhei o trabalho do clínico responsável pela exploração em questão, a maior parte dos procedimentos práticos aqui realizados foram cirurgias para a resolução do deslocamento do abomaso à esquerda.

Ainda no âmbito das saídas de campo da disciplina de Clínica de Espécies Pecuárias, todas as semanas durante o estágio curricular realizamos visitas à Estação Zootécnica Nacional. Aqui a principal actividade prática desenvolvida foi a avaliação do aparelho reprodutor através da palpação rectal para diagnóstico de gestação e para a identificação das estruturas ovárias. Na Estação Zootécnica Nacional foram também acompanhadas

algumas cirurgias como ablação da 3ª pálpebra com carcinoma espinocelular e resolução de deslocamento do abomaso à direita.

Parte da minha actividade prática desenvolvida durante o estágio curricular, decorreu nos concelhos da Figueira-da-Foz, Montemor-o-Velho e Pombal, onde a acompanhei actividade clínica do Dr. José Neves. Durante esta fase do estágio contactei com uma realidade em termos de assistência clínica muito diferente daquela que é praticada nas grandes explorações de bovinos leiteiros no concelho de Lisboa. O tipo de trabalho desenvolvido nesta região foi em regime ambulatorio a pequenas e médias explorações de bovinos de leite na sua maioria.

Nesta região predominam as explorações de bovinos com aptidão leiteira, no entanto é uma zona onde tradicionalmente se faz produção de animais para consumo próprio, tanto da sua carne como dos seus subprodutos. Por isso, contactei com várias espécies que necessitaram de cuidados médico-veterinários, sendo elas: bovina, suína, ovina e caprina.

Desta forma, para que se tenha uma percepção mais realista, descreverei em seguida as várias intervenções. A maioria foi realizada em bovinos de aptidão leiteira. Os casos em bovinos de aptidão de carne basearam-se em problemas respiratórios e acções de profilaxia médica. A espécie com que mais contactei foi o bovino de leite, onde a profilaxia médica foi dirigida principalmente para as mastites e doença respiratória. A componente clínica exercida nesta espécie abrangeu uma grande variedade de patologias, as intervenções realizadas foram principalmente o controlo reprodutivo, as patologias na glândula mamária, as patologias metabólicas (hipocalcémia e hipofosfatémia), no aparelho respiratório (pneumonias em animais jovens e adultos) e no aparelho músculo-esquelético. No que se refere à clinica cirúrgica a maioria das cirurgias que assisti foram realizadas ao nível do sistema digestivo, presenciei uma enterotomia, mas a grande parte das intervenções realizadas foram para a resolução de deslocamento do abomaso à esquerda. As cirurgias efectuadas ao nível do aparelho reprodutor estão todas de alguma forma relacionadas com o parto, sendo elas: cesariana em caso de parto distócico com desproporção materno-fetal e episiotomia por não haver dilatação vaginal suficiente à passagem do feto.

Outra espécie com a qual também tive algum contacto nesta região foi a suína. Realizei algumas acções de profilaxia médica como: administração de ferro e corte odontológico a três ninhadas de leitões com alguns dias de idade. Em termos de clínica as intervenções realizadas foram em fêmeas reprodutoras com síndrome metrite-mastite-agaláxia (MMA), animais com rinite atrófica e mal-rubro. A única intervenção cirúrgica efectuada em suínos foi a orquiectomia num total de três animais, em que todas foram requeridas pelos proprietários em animais destinados a consumo próprio.

Relativamente aos pequenos ruminantes, as actividades desenvolvidas foram em menor número, consistiram essencialmente em actos de profilaxia médica como a desparasitação de cabras e ovelhas. Em termos de clínica médica os casos mais observados foram diarreia em borregos, mastites, partos e prolapso vaginal.

Durante o período do estágio curricular, tive ainda a oportunidade de acompanhar e participar em acções desenvolvidas pelo Agrupamento de Defesa Sanitária da Península de Setúbal numa exploração de bovinos leiteiros no mesmo distrito.

A tabela 1 resume as intervenções desenvolvidas com a espécie bovina, a qual com que tive maior contacto durante o estágio curricular. Para uma melhor organização e compreensão este está dividido em três grandes áreas de intervenção médico-veterinária, sendo elas: profilaxia médica, clínica médica e clínica cirúrgica.

Tabela 1 Resumo das actividades desenvolvidas durante o estágio curricular.

Área de intervenção	Causas de intervenção
<p>I Profilaxia médica e sanidade animal</p> <p>II Clínica médica</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aparelho reprodutor • Controlo reprodutivo • Aparelho digestivo 	<ul style="list-style-type: none"> - desparasitação - vacinação - tuberculinização - endometrite - metrite puerperal - piómetra - quisto ovárico - retenção placentária - diagnóstico de gestação - indução do cio - sincronização do estro com PRID - DAE (deslocamento do abomaso à esquerda) - DAD (deslocamento do abomaso à direita) - úlcera do abomaso - diarreia em vitelos

<ul style="list-style-type: none"> • Patologias da glândula mamária • Aparelho respiratório • Patologias metabólicas • Aparelho músculo-esquelético 	<ul style="list-style-type: none"> - diarreia de Inverno - timpanismo gasoso - mastite - lesão do esfíncter do teto - cirurgias em cadáveres - pneumonias em vitelos, novilhos e animais adultos - hipocalcémia - hipofosfatémia - cetose - patologia podal (abcesso da sola; laminite) - fractura membro posterior - síndrome de vaca caída
<p style="text-align: center;">III Clínica cirúrgica</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aparelho digestivo • Aparelho reprodutor <p style="text-align: center;">IV Outros</p>	<ul style="list-style-type: none"> - DAE - DAD - Enterectomia parcial - cesariana - sutura de Goetze - sutura de Caslick - resolução de fístula recto-vaginal - cirurgia no teto de cadáveres - ablação da 3ª pálpebra com carcinoma espinocelular

De referir que houve também a oportunidade de apresentar os resultados preliminares deste estudo numa comunicação livre no Curso “Comportamento e Bem-Estar de Ruminantes”, realizado na FMV no dia 13 Maio de 2011.

III. “STRESS”

1 Definição

Em produção animal o conceito de “stress” é ainda abstracto, a despeito de décadas de pesquisa nesta área. Todos os animais respondem a estímulos como a manipulação física ou traumas, com diferentes componentes de ordem nervosa, humoral ou metabólica visando a manutenção ou reposição da homeostase. As alterações impostas por estes estímulos são genericamente denominadas como resposta ao “stress” (Wagner, Muir & Hinchcliff, 1991). O termo “stress” é habitualmente utilizado para indicar uma condição ambiental que é considerada adversa ao bem-estar animal. Os factores de “stress” podem ser climáticos, como o frio ou calor extremos; nutricionais, devido à privação de alimento ou água; pressão social (hierarquia); alterações fisiológicas; agentes patogénicos ou toxinas (Hafez, 1968 citado por Stott, 1981). O conceito de “stress” foi introduzido pela primeira vez pelo fisiologista alemão Hans Selye em 1936, que o definiu como o estado orgânico, em resposta às acções dos agentes de qualquer natureza, com uma série de reacções não específicas de adaptação. Mas ainda hoje é um tema controverso entre as pessoas envolvidas com os animais de produção, desde os trabalhadores até à comunidade científica, talvez pela relação que normalmente se estabelece entre o “stress” e o bem-estar animal. Desde então têm sido propostas várias definições para o termo “stress”, quando relacionado com as condições de produção animal; Lee (1965) descreveu o “stress” como as pressões ambientais que actuam sobre os indivíduos provocando um estado de tensão, definindo a “tensão” como deslocamento interno do estado de equilíbrio provocado pela aplicação de factores de “stress”; Fraser, Ritchie e Fraser (1975) propuseram que o “stress” surgia quando havia uma profunda mudança fisiológica na condição de um indivíduo, em que este necessita de fazer ajustes anormais e extremos em termos fisiológicos ou comportamentais para lidar com as adversidades do meio ambiente. Moberg em 2000 complementou a definição de Selye e descreveu o “stress” como a resposta biológica ou conjunto de reacções obtidas quando o indivíduo se apercebe da ameaça à sua homeostasia, sendo que esta ameaça constitui o agente ou estímulo que provoca “stress”.

A maioria dos fisiologistas está de acordo com dois conceitos básicos relacionados com os mecanismos de resposta do organismo face a agressões ambientais que provoquem “stress”: Cannon em 1932 apresentou o Síndrome de emergência, que está relacionado com o sistema simpático-suprarenal, e Selye em 1936 citou o Síndrome Geral de Adaptação, que envolve o eixo hipotálamo-hipofisário-suprarenal (HHA).

1.1 Síndrome de emergência

Uma das primeiras teorias sobre gênese do “stress”, foi apresentada em 1932 pelo fisiologista Walter Cannon, ainda antes de a palavra ser utilizada com o sentido actual, e foi denominada de “teoria da luta ou fuga” (*fight-or-flight*). Estes tipos de reacção foram observados tanto em animais como em humanos.

A reacção de urgência descrita por Cannon é devida a uma acção conjunta do sistema nervoso simpático, que se traduz pela libertação de noradrenalina ao nível das terminações nervosas (e uma parte passa para a corrente sanguínea) e por hormonas libertadas ao nível da medula da glândula suprarenal (adrenalina e noradrenalina). A adrenalina e noradrenalina são do ponto de vista químico classificadas como catecolaminas, estas desencadeiam um conjunto de modificações fisiológicas que preparam o organismo para a resposta de “luta ou fuga”, como: aumento da frequência cardíaca, o que permite uma renovação sanguínea mais rápida; aumento da frequência respiratória e broncodilatação, assegurando uma melhor oxigenação sanguínea; contracção esplénica, libertando eritrócitos para a corrente sanguínea para o transporte mais eficiente de oxigénio; aumento da biodisponibilidade de glicose no sangue, concomitantemente ocorre um aumento da glicólise a nível hepático; variação no diâmetro dos vasos sanguíneos, vasoconstrição periférica e vasodilatação muscular; midríase; aumento da velocidade de coagulação sanguínea. Obviamente que estas alterações no organismo ocorrem em resposta a uma situação de perigo, e todos estes eventos desencadeiam-se num período de alguns segundos a minutos, preparando o indivíduo para a “luta ou fuga”.

1.2 Síndrome Geral de Adaptação

Segundo Selye (1936) o Síndrome Geral de Adaptação, ocorre quando o organismo reage à percepção de um factor de “stress” com uma reacção de adaptação (ou seja, o organismo adapta-se à nova situação para enfrentá-la), que gera uma breve elevação da resistência do organismo. Selye (1936) descreveu o desencadeamento e o desenvolvimento do processo em três estadios. O autor considera que o primeiro estadio, denominado de reacção de alarme corresponde à expressão de um alarme geral do organismo quando subitamente este é confrontado com uma situação crítica, nesta fase intervêm o sistema nervoso simpático e a glândula suprarenal. Após o contacto com o agente de “stress”, o organismo iniciaria um processo de adaptação a este agente, o que configuraria o segundo estadio, a fase de resistência. Se permanecesse o contacto com o factor promotor do “stress” o indivíduo perderia a capacidade de reagir e entraria no estadio de exaustão, o qual levaria a alterações orgânicas semelhantes ao primeiro estadio e que poderia levar à falência de órgãos e à morte. Como os sinais descritos representam um esforço generalizado do organismo para se adaptar à nova condição,

seria definido assim um "Síndrome Geral de Adaptação" (Selye, 1937). A principal característica do Síndrome Geral de Adaptação é activação do córtex suprarenal, esta é mais tardia do que a resposta catecolaminérgica, e alcança o máximo de libertação de hormonas cerca de 20 a 30 minutos após a exposição ao estímulo ou agressão (Dantzer & Mormède, 1992). O funcionamento do córtex suprarenal é controlado pelo eixo hipotálamo-hipofisário. O córtex suprarenal liberta para a corrente sanguínea, hormonas esteróides, os glucocorticóides (principalmente cortisol e corticosterona), que prolongam e completam a acção das catecolaminas: estímulo da neoglucogénese, mobilização de aminoácidos a partir do tecido muscular, aumento das enzimas necessárias para a conversão de aminoácidos em glicose pelas células hepáticas e facilitam as reacções nos vasos sanguíneos com adrenalina e noradrenalina. Simultaneamente os glucocorticóides têm um efeito anti-inflamatório e interferem com a resistência à infecção: retardam a cicatrização, inibem a formação de anticorpos, diminuem o número de linfócitos e eosinófilos e provocam a regressão do timo e dos órgãos linfáticos.

Segundo Borrel (2001) o termo "stress" é utilizado hoje em dia num sentido mais amplo e está muitas vezes vinculado ao bem-estar animal. Há também a controvérsia quando consideradas algumas posições de investigadores sobre o assunto, já que para alguns, o "stress" é uma situação extrema e indesejável, enquanto outros consideram-no como um parâmetro normal e desejável uma vez que representa uma reacção de adaptação do indivíduo (Fraser et al., 1975). Há algumas décadas atrás Selye (1936) distinguiu o bom e o mau "stress", definindo-os como "eustress" e "distress", respectivamente. O termos "stress" e "distress" são conceitos dissociáveis, distinguindo-se pela capacidade de o animal suportar ou adaptar-se a alterações do meio-ambiente. A resposta de um indivíduo ao "stress" constitui uma reacção normal a perturbações quer de origem ambiental quer de origem interna e pode ser considerada como um modo de adaptação. O "distress" ocorre quando o "stress" é severo, prolongado ou ambos (Committee on Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals, 2008).

No que se refere ao bem-estar animal o termo "distress" tem sido utilizado para descrever uma condição em que o animal não se consegue adaptar a um ou vários factores de "stress" ou ao meio ambiente que o envolve, comprometendo deste modo o seu bem-estar.

2 Conceitos gerais da regulação do "stress"

A compreensão do mecanismo de "stress" em animais de produção tem elevada importância, na medida em que se pretende evitar ao máximo o sofrimento dos animais e proporcionar o melhor bem-estar possível. A possibilidade de definir e de medir o

“stress” imposto aos animais, pode proporcionar um caminho para prevenir as causas de “stress” e obter melhores condições de bem-estar animal (Moberg, 1987).

A resposta ao “stress” envolve um conjunto de eventos que se iniciam com a detecção e identificação de sinais de ameaça para o animal. Estes eventos são seguidos pela activação de mecanismos neurofisiológicos e comportamentais que promovem uma resposta coordenada ao factor “stress” e asseguram a resistência do indivíduo evitando consequências prejudiciais (Ewing et al., 1999, citado por Borrel, 2001). O sistema nervoso central (SNC), o sistema endócrino e o sistema imunitário interagem de forma coordenada para responder ao estímulo de “stress”, influenciando também o comportamento do animal (Borrel, 2001).

A resposta neuro-endócrina ao “stress” baseia-se na activação do eixo hipotálamo-hipofisário-suprarenal (HHA). O estágio final desta activação é a secreção de glucocorticóides a partir do córtex suprarenal (Harbuz & Lightman, 1992; Broom & Johnson, 1993).

2.1 Regulação hipotalâmica

O hipotálamo é uma estrutura com origem embriológica no tubo neural, situada na base ventral do diencéfalo ao nível do 3º ventrículo, contribuindo para a formação das paredes inferiores e laterais deste. Apresenta numerosas conexões com diferentes áreas cerebrais e é limitado cranealmente pelo quiasma óptico, caudalmente pelos processos mamilares, lateralmente pelos lobos temporais e dorsalmente pelo tálamo. Ventralmente, o hipotálamo continua-se pelo infundíbulo, estrutura anatómica que o liga à hipófise (Getty, 1986). A nível histológico, o hipotálamo é constituído pelos corpos celulares de numerosos neurónios que se reagrupam em populações mais densas também designadas por núcleos, os quais se distinguem por 4 zonas distintas (Randall, Burggren & French, 1998):

- Hipotálamo anterior ou pré-óptico: onde se destacam os núcleos para-ventricular e supra-óptico, produtores de ocitocina e vasopressina, respectivamente. Estas hormonas são transportadas em vesículas, através de axónios, até a proximidade dos vasos sanguíneos da neuro-hipófise.
- Hipotálamo lateral: região neuronal mais dispersa, constituída pelos núcleos laterais.
- Hipotálamo médio: que contem os núcleos infundibular, ventro-medial e dorso-medial.
- Hipotálamo posterior ou mamilar: que engloba a área hipotalâmica posterior, os anéis do corpo mamilar e a substância reticular hipotalâmica, estando em continuidade com o tronco cerebral.

Além das hormonas referidas, no hipotálamo é sintetizado um vasto leque de hormonas reguladoras, as quais interagem com as células adeno-hipofisárias, ao estimular ou bloquear a produção hormonal destas. A secreção efectuada pela região posterior da hipófise é controlada por sinais neurais que têm origem no hipotálamo e terminam na região anterior da hipófise posterior. Por outro lado, a secreção da região anterior da hipófise é controlada por factores hipotalâmicos libertadores ou inibidores, secretados no interior do próprio hipotálamo e que são transportados até à região anterior da hipófise através de vasos sanguíneos chamados de vasos portais hipotalâmicos-hipofisários. Na hipófise anterior estes factores libertadores ou inibidores agem sobre as células glandulares de modo a controlar a sua secreção (Guyton & Hall, 2006).

A função dos factores libertadores ou inibidores hipotalâmicos é controlar a secreção das hormonas da hipófise anterior, como se pode constatar pela leitura da tabela 2.

Tabela 2 Factores libertadores e inibidores hipotalâmicos que controlam a secreção da hipófise. (Adaptado de Guyton & Hall, 2006).

Factor hipotalâmico	Acção primária sobre a hipófise anterior
Factor libertador de tireotropina (TRH)	Estimula a secreção de hormona estimulante da tiróide (TSH) pelos tireotrópos
Factor libertador da gonadotropina (GnRH)	Estimula a secreção de duas hormonas gonadotróficas, a hormona luteinizante (LH) e a hormona folículo-estimulante (FSH) pelos gonadotropos
Factor libertador de coriotropina (CRH)	Estimula a secreção de ACTH pelos corticotropos
Factor libertador da hormona do crescimento (GHRH)	Estimula a secreção da hormona do crescimento pelos somatotropos
Somatostatina	Inibe a secreção da hormona do crescimento pelos somatotropos
Factor inibidor da prolactina (PIH)	Inibe a secreção de prolactina pelos lactotropos

Quando surge um evento ameaçador externo, o córtex cerebral emite sinais nervosos que iniciam a libertação de CRH, principalmente ao nível do núcleo para-ventricular do

hipotálamo (Johnson et al., 1992). O CRH é transportado pelo sistema porta hipofisário para a hipófise anterior, onde aumenta a síntese e secreção de ACTH, β -endorfinas, β -lipotropina e α -melanotropina (Axelrod & Reisine, 1984).

2.2 Hipófise anterior

A hipófise, também denominada por glândula pituitária, é uma glândula endócrina, localizada na fossa pituitária (sela túrcica) do osso esfenóide. Morfologicamente, a hipófise é divisível em duas porções distintas: a hipófise anterior ou adenohipofise e hipófise posterior ou neurohipofise. Entre estas duas porções existe uma zona pequena, relativamente avascular, chamada de pars intermédia, sendo a função desta porção específica para cada espécie. Nos peixes o papel desta porção da hipófise é controlar as alterações fisiológicas da cor. Nos humanos e num pequeno número de mamíferos, a “pars” intermédia é rudimentar.

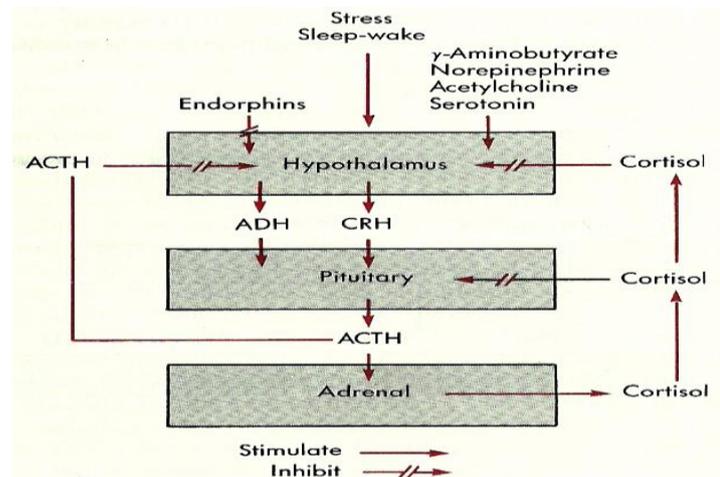
Embriologicamente, as duas porções da hipófise têm origem a partir de fontes diferentes: a hipófise posterior deriva do crescimento de um tecido neural a partir do hipotálamo, funcionalmente é apenas uma área de armazenamento de ocitocina e de vasopressina produzidas pelo hipotálamo. A síntese e a libertação de vasopressina são importantes na resposta ao “stress” (Carroll & Forsberg, 2007).

Quando a ACTH é produzida pela hipófise anterior, outras hormonas com estrutura química semelhante são secretadas simultaneamente. Isto ocorre porque o gene transcrito para a produção de ACTH provoca inicialmente a formação, de uma proteína consideravelmente maior, uma pré-pró-hormona denominada de proopiomelanocortina (POMC), que é percussora de ACTH assim como de outros péptidos como a hormona melanócito-estimulante (MSH), β -endorfina e α -endorfina. Em suínos, bovinos, ovinos e humanos, a ACTH é um polipeptídeo de cadeia simples, que consiste de 39 aminoácidos (Evans et al. citado por Carrol & Forsberg, 2007). Os aminoácidos N-terminais 1-24 são idênticos em cada uma destas espécies e correspondem à porção responsável pela actividade biológica da molécula. A acção primária da ACTH é estimular a síntese e libertação de cortisol e de outros esteróides da glândula suprarrenal. O aumento da concentração sanguínea de glucocorticóides inibe a secreção de ACTH pela glândula pituitária, através do mecanismo de “feedback” negativo, como ilustrado na figura 1. Segundo Axelrod e Reisine (1984) a libertação de ACTH depende da intensidade do factor “stress” e é modulada constantemente pelo mecanismo de feedback.

Activação do sistema Hipotálamo-hipófise depende de uma variedade de factores relacionados com o indivíduo, como as características genéticas, experiências anteriores,

capacidades cognitivas e ainda das características e intensidade dos factores de “stress” (Ladewig, 1994, citado por Borrel,2001).

Figura 1 Regulação da secreção de ACTH. CRH e ADH estimulam a produção de ACTH. O cortisol através do efeito de feedback negativo sobre a pituitária bloqueia a acção da CRH, e ao nível do hipotálamo inibe a libertação de CRH. (Adaptado de Berne & Levy, 1992).



O aumento da concentração plasmática de ACTH estimula a libertação de glucocorticóides pelo córtex suprarenal, sendo que a manutenção adequada da concentração de glucocorticóides é essencial para a manutenção da homeostase e sobrevivência do indivíduo.

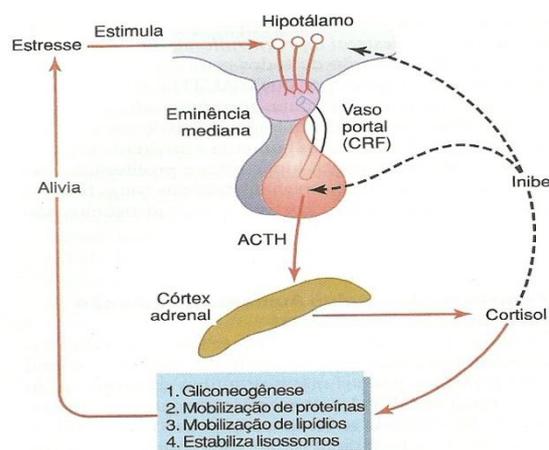
2.3 Glândula suprarenal: produção de glucocorticóides

As duas glândulas adrenais localizam-se nos polos superiores dos rins, cada glândula é composta por duas partes distintas, a medula suprarenal e o córtex suprarenal. O córtex suprarenal divide-se em três zonas: a zona glomerulosa, a zona fasciculada e a zona reticular. O córtex suprarenal é responsável pela síntese e libertação de diferentes tipos de hormonas esteróides: os mineralocorticóides, os glucocorticóides e os androgéneos. Estas hormonas são sintetizadas a partir do colesterol e apresentam características químicas semelhantes, no entanto pequenas diferenças nas suas estruturas moleculares conferem-lhe diferentes funções. A zona glomerulosa tem como principal função biológica a síntese de mineralocorticóides nomeadamente a aldosterona. A secreção desta hormona é regulada pelo sistema renina-angiotensina e pela concentração plasmática de potássio. Assim, a aldosterona é uma hormona reguladora do equilíbrio hidroelectrolítico (Randall, Burggren & French, 1998).

A zona fasciculada secreta essencialmente glucocorticóides, bem como uma pequena quantidade de androgénios (Randall et al., 1998). A zona reticular, à semelhança da zona

fasciculada, produz glucocorticóides e uma pequena percentagem de androgénios (Guyton & Hall, 2006). Na glândula suprarrenal, a ACTH liga-se aos receptores específicos das células do córtex provocando a secreção não selectiva de glucocorticóides, conforme ilustrado na figura 2.

Figura 2 Mecanismo de regulação da secreção de glucocorticóides (Guyton & Hall, 2006).



2.3.1 Efeitos biológicos dos glucocorticóides

Os glucocorticóides provocam uma série de efeitos biológicos sobre o organismo, interferem no metabolismo dos carboidratos e das proteínas, 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. Nos roedores e aves, a corticoesterona é o principal glucocorticóide, mas nos seres humanos e na maioria dos mamíferos o cortisol é o principal glucocorticóide produzido no córtex suprarrenal. Os glucocorticóides exercem um papel importante na neoglucogénese, isto é a produção de glucose a partir de moléculas como o piruvato, lactato, glicerol e aminoácidos, em resposta a uma situação de “stress” (Carrol & Forsberg, 2007). Os glucocorticóides são também responsáveis pela síntese e secreção de catecolaminas, e por sua vez, estas controlam processos fisiológicos como a frequência cardíaca, miose ou midríase, vasoconstrição periférica, vasodilatação a nível muscular e a neoglucogénese, sendo estes fenómenos fisiológicos consequentes a uma situação de “stress”, preparando o indivíduo para a “luta ou fuga”.

Existem evidências que relacionam o “stress” com a susceptibilidade a doenças (Borell, 2001). Os factores de “stress” físicos e psicológicos através da estimulação da produção de glucocorticóides suprimem a produção de linfócitos T e B, actividade dos linfócitos NK e produção de citocinas. As citocinas: factor de necrose tumoral (TNF- α), interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e IFN- γ são considerados os mediadores da resposta imunológica ao

“stress” e aos processos infecciosos (Warren et al., 1997). A citocina IL-1 não é apenas responsável pela indução de febre e anorexia, estimulando também o eixo hipotálamo-hipofisário-suprarenal (HHA) e inibindo o eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal (Dantzer & Kelly, 1989, citado por Borrel, 2001). Por outro lado, os glucocorticóides podem aumentar a resistência não específica ao “stress” e infecções (Ewing, Lay & Borrel.,1999). Um estudo realizado por Faber e Haid (1995) demonstrou que animais com comprometimento do funcionamento das glândulas suprarenais estão mais susceptíveis a morrer devido a “stress” do que aqueles com glândulas intactas.

Para além da estimulação da ACTH para a produção de glucocorticóides, a CRH e a vasopressina podem também desempenhar um papel importante na regulação e libertação de glucocorticóides, através de acções parácrinas no interior das células da glândula suprarenal. Vários estudos demonstraram que a CRH é responsável por estimular directamente a produção de glucocorticóides em seres humanos (Parker, Stankovic & Goland, 1999), em ratos e em bovinos (Carroll et al., 1996). Num estudo realizado por Carroll et al. (1996), demonstrou que a vasopressina estimulou a secreção de cortisol em células adrenocorticais bovinas *in vitro*. Uma vez que a ACTH é a principal hormona reguladora da produção de cortisol, os investigadores continuam a procurar uma possível relação entre as funções fisiológicas e a importância de outros reguladores esteróides supra-renais, tais como a angiotensina II, citocinas e vários factores de crescimento (Carroll & Forsberg, 2007).

2.4 Glândula suprarenal: produção de catecolaminas

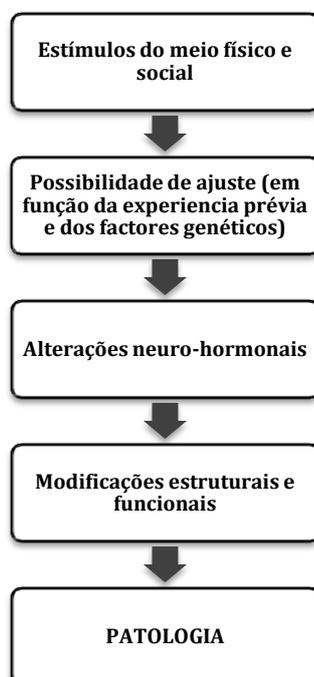
Existe uma relação entre o córtex e a medula suprarenal na regulação do eixo hipotálamo-hipofisário-suprarenal (HHA). A medula da glândula suprarenal tem origem neuro-ectodérmica e constitui 10 a 20% do volume total da glândula, estando funcionalmente relacionada com o sistema nervoso simpático; esta zona é constituída por células produtoras de catecolaminas nomeadamente a epinefrina ou adrenalina e a noraepinefrina (Guyton & Hall, 2006). Em resposta ao “stress” físico ou psicológico, as catecolaminas são secretadas directamente para a corrente sanguínea. Os principais efeitos destas catecolaminas incluem o aumento do ritmo cardíaco, a constrição dos vasos sanguíneos, a broncodilatação e o aumento do metabolismo. Mais especificamente a epinefrina está associada ao aumento da frequência e força das contracções cardíacas (possui maior acção sobre os receptores beta), aumento do fluxo sanguíneo a nível muscular e do cérebro, no relaxamento da musculatura lisa e na conversão do glicogénio em glicose a nível hepático e muscular. Por outro lado, a noraepinefrina tem um efeito mínimo sobre actividade do músculo liso, nos processos metabólicos e do débito cardíaco. No entanto, esta possui fortes efeitos vasoconstritores que levam ao aumento da pressão arterial. Nos seres

humanos cerca de 85% das catecolamidas produzidas corresponde à adrenalina, enquanto que nas outras espécies de mamíferos a noraepinefrina é a principal catecolamida produzida (Carrol & Forsberg, 2007). Além das acções biológicas acima mencionadas, as catecolamidas têm influência na regulação do eixo HHA e na resposta ao “stress”, regulando a libertação de ACTH pela pituitária anterior, e a estimulação da produção de cortisol pelo córtex suprarenal (Dinan, 1996). De acordo com Carrol e Forsberg (2007) a magnitude da resposta simpática e da activação do eixo HHA, relacionada com a resposta aos factores de “stress” é personalizada e individual, dependendo dos factores de “stress” e do estado fisiológico de cada indivíduo.

3 Modificações funcionais e estruturais consecutivas aos ajustes neuro-hormonais

Os estímulos ambientais activam o sistema neuro-endócrino (figura 3). A perda do equilíbrio fisiológico e metabólico orgânico dura desde dezenas de minutos a várias horas, ocorrendo posteriormente um retorno gradual à normalidade (Dantzer & Mormède, 1992). Contudo, em alguns casos estas modificações podem possuir um carácter irreversível e traduzem-se por patologias.

Figura 3 Esquema representativo da cadeia de eventos desde a percepção dos estímulos agressivos ao aparecimento de patologia (adaptado de Dantzer & Mormède, 1992).



O organismo dispõe de dois modos principais de reacção frente à agressão ou estímulo ambiental: a activação do sistema nervoso simpático e da medula suprarenal, que provoca a libertação de catecolaminas para a corrente sanguínea preparando o organismo para uma resposta activa; o outro modo de reacção está relacionado com o sistema hipotálamo-

hipófise-cortex suprarenal, este caracteriza-se por uma libertação de glucocorticóides que conservam e prolongam as acções metabólicas iniciadas pela resposta das catecolaminas. Os mecanismos de defesa correspondem ao modo de adaptação do indivíduo, assim a activação do córtex suprarenal é preponderante nos casos em que o animal não pode responder de forma apropriada a determinada situação de “stress” e perde progressivamente o controlo. A exposição prolongada ou demasiado intensa aos factores de “stress”, que os animais estão sujeitos, decorrente dos sistemas de produção animal, pode traduzir-se por modificações estruturais e funcionais culminando com variadas patologias. Para Costa (2005) as consequências do “stress” nos animais de produção pode caracterizar-se por uma diminuição da produção, por atrasos de crescimento, pelo aumento da susceptibilidade a diversos agentes infecciosos, por modificações na motilidade do tracto gastrointestinal, por patologias reprodutivas (esterilidade extragonadal por alteração do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, quistos ováricos, diminuição da espermatogénese), por cetose ou pode mesmo provocar patologias cardíacas como a degeneração e necrose do miocárdio.

3.1 Atrasos no crescimento

O crescimento animal é consequência da multiplicação das células e do aumento de tamanho das mesmas. A acção das hormonas responsáveis pelo crescimento e dos factores externos, principalmente a alimentação, permite que os indivíduos manifestem a sua herança genética de crescimento (Alves, 2003). O funcionamento do organismo necessita de energia, desde o nascimento à idade adulta, parte dessa energia é utilizada para satisfazer as necessidades de crescimento (anabolismo); desperdiçar energia para outras necessidades do organismo (catabolismo) vai portanto diminuir a capacidade de crescimento do animal (Dantzer & Mormède, 1992). O “stress” provoca a libertação de hormonas que possuem uma acção preponderantemente catabólica, uma vez que as catecolaminas aumentam o consumo de oxigénio e o metabolismo básico; estas acentuam a degradação do glicogénio hepático e muscular e estimulam a libertação de ácidos gordos e proteínas. A hiperestimulação do eixo hipófise-cortex suprarenal é acompanhada de uma diminuição da secreção de hormonas anabolizantes, tais como a somatotrofina (hormona do crescimento), hormonas sexuais (androgénios e estrogénios) e hormonas tiróideas. Na presença de glucocorticóides a síntese da matriz orgânica do tecido ósseo diminui, ocorre também uma diminuição da reabsorção de cálcio a nível intestinal e está favorecido a sua eliminação na urina, provocando um estado de hipocalcémia, que para compensar aumenta a secreção de paratormona (PTH), activando os processos de reabsorção óssea. Alguns trabalhos realizados com frangos demonstraram os efeitos negativos sobre o crescimento da administração repetida de catecolaminas (Freeman & Manning, 1978) ou de hormonas hipófise-adrenais [Siegel & Siegel, (1966), citado em Dantzer & Mormède (1992)]. Em

novilhos existe também uma correlação negativa entre as concentrações plasmáticas de cortisol e o rendimento da carcaça (Voisinet, Gradin, Tatum, O'Conner & Struthers, 1997).

Contudo, todas as modificações de crescimento observadas devido a causas de "stress", não são unicamente atribuíveis a desordens endócrinas, pois a redução da quantidade de nutrientes absorvidos, por diminuição do apetite ou alteração das funções digestivas, podem igualmente interferir.

3.2 Patologias reprodutivas

Já em 1939 Selye sugeriu que existe uma relação entre as hormonas do eixo hipotálamo-hipófise-suprarenal (HHA), que são libertados durante o "stress", e as hormonas do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal. O "stress" é acompanhado pelo aumento da actividade do eixo HHA e por uma redução das funções reprodutivas, uma vez que existe a necessidade de preservar a função do córtex suprarenal em detrimento da função gonadal, em casos de emergência. A hormona libertadora de corticotropina (CRH), os peptídeos derivados da proopiomelanocortina (POMC) e os corticóides adrenais desempenham uma importante função na modulação dos efeitos do "stress" sobre a função reprodutiva (Rivier & Rivest, 1991). A influência destas sobre o eixo HPG ocorre a três níveis, nomeadamente (Santos, 2003):

- a) no hipotálamo através da inibição da secreção de GnRH;
- b) na hipófise, por interferência do GnRH na libertação da hormona luteinizante (LH) e folículo estimulante(FSH);
- c) nas gónadas, por alteração do efeito de estimulação das gonadotropinas na secreção de esteróides sexuais;

O "stress" prolongado inibe a secreção de LH e FSH e bloqueia a ovulação. Na fêmea a administração de ACTH durante a fase de maturação folicular interfere com a ovulação e conduz ao aparecimento de folículos ovários quísticos, devido ao efeito de supressão da libertação da hormona hipofisária responsável pela rotura folicular, a LH (Dantzer & Mormède,1992). Este evento ocorre de forma gradual, uma vez que no início quando somente alguns folículos estão afectados o ciclo sexual continua sem que os resultados sejam modificados, mas quando existe na sua maioria folículos quísticos, a actividade ovárica cíclica e a função reprodutiva estão totalmente inibidas [Wrathall (1975) citado em Dantzer & Mormède (1992)]. Segundo o mesmo autor, no macho a administração de ACTH ou corticosteróides diminui a produção de androgénios pelos testículos.

Verificou-se que a remoção dos corticosteróides circulantes através da remoção da glândula suprarenal provoca um aumento de ACTH e possivelmente de CRH (Dallman, MaKara,

Roberts, Levin & Bloom,1985). A administração de CRH exógeno, que actua ao nível do hipotálamo inibe a secreção de GnRH e gonadotropinas alterando a actividade do eixo HHA [Rivier & Vale (1984) citado em Santos (2003)]. Aumentos dos níveis de corticosteróides podem provocar alterações ao nível da hipófise, alterando a libertação de gonadotropinas por indução do GnRH, e do hipotálamo, modulando a secreção de CRH.

3.3 Aumento da sensibilidade do indivíduo aos agentes infecciosos

Há décadas que os investigadores na área da produção animal, reconhecem que o “stress” pode ter efeitos prejudiciais no sistema imunitário dos animais. O “stress” agudo não é necessariamente prejudicial para a saúde e bem-estar do indivíduo, pode até ser benéfico (Galyean, Perino & Duff,1999; Duff & Galyean, 2007). Ao contrário do “stress” crónico que causa impacto negativo no ganho médio diário, na função reprodutiva e ao nível do sistema imunitário (Moberg, 1987; Silberman et al., 2003)

As consequências do “stress” agudo em comparação com o “stress” a longo prazo ou crónico são diferentes. De tal forma que, actualmente, o “stress” já não é mais considerado como uma resposta biológica do tudo ou nada, que tradicionalmente estava associado com o comportamento de “luta ou fuga”, nem considerado exclusivamente como imunodepressor (Carroll & Forsberg, 2007). Segundo os mesmos autores, o “stress” pode provocar efeitos bidireccionais no que respeita à função imune, enquanto que o “stress” agudo pode ser imunomodulador, o “stress” crónico pode provocar imunodepressão.

O efeito prejudicial do “stress” crónico sobre o sistema imunitário está associado com a estimulação contínua da produção de glucocorticóides. Inicialmente, os glucocorticóides estimulam as células do sistema imunitário visando a protecção do organismo contra a invasão de agentes patogénicos, mas quando se instala uma situação de “stress” crónico, estas células são constantemente estimuladas, preparando o organismo para uma resposta imunitária a grande escala. Activação das células imunes provoca a secreção de citocinas pró-inflamatórias, que estimulam por sua vez a produção de glucocorticóides [Besedovsky (1986) citado por Carroll & Forsberg (2007)], através do mecanismo de “feedback” imunoregulador. Nesta fase, o organismo pode eventualmente perder a capacidade de reconhecer os tecidos como próprios, e uma continua estimulação de glicocorticoides sobre as células imunitárias pode potencialmente tornar estas tolerantes a futuras estimulações por glucocorticóides, perdendo aquelas a capacidade para responder. Para evitar uma supressão imunológica total por glucocorticóides, o sistema “feedback” negativo também se encontra presente no eixo HHA, que é sensível a elevadas concentrações de glucocorticóides. O cortisol apresenta efeitos de feedback negativo directo sobre o hipotálamo, reduzindo a produção de CRH, e sobre a hipófise anterior, diminuindo a

produção de ACTH (Guyton & Hall, 2006). Ambos contribuem para a regulação plasmática do cortisol.

O cortisol, como outras hormonas esteróides, exerce inicialmente os seus efeitos por interagir com os receptores intracelulares nas células-alvo. Como o cortisol é de natureza lipossolúvel pode-se difundir facilmente através da membrana celular. Uma vez no interior da célula, o cortisol liga-se ao seu receptor proteico no citoplasma, e o complexo hormona-receptor interage então com sequências reguladoras específicas de DNA, denominadas de “elementos de resposta aos glucocorticóides”, induzindo ou reprimindo a transcrição genética. Os glucocorticóides aumentam ou diminuem a transcrição de muitos genes, alterando a síntese de RNAm que gera as proteínas que medeiam os seus múltiplos efeitos fisiológicos (Guyton & Hall, 2006).

Existem dois tipos de receptores no interior das células-alvo para os glucocorticóides: o GR (receptor de glucocorticóides) e o MR (receptor mineralocorticóide), sendo que este último possui uma melhor afinidade para o cortisol do que o primeiro (Muller, Holsboer, Keck, 2002). Quando a baixas concentrações plasmáticas, as hormonas glicocorticoides ligam-se preferencialmente aos receptores MR. No entanto, em situações em que existe elevadas concentrações de glucocorticóides em circulação, tais como as observadas numa resposta ao “stress”, há preferência para as hormonas ocuparem o GR. As células de defesa imunitária como os linfócitos, os macrófagos e os granulócitos, possuem receptores do tipo glicocorticóide, portanto são estas células que respondem mais facilmente durante períodos de tensão e “stress” [Madden & Livnat (1991) citado por Carroll & Forsberg (2007)]. Ainda segundo estes autores, a activação do receptor glicocorticóide no interior dessas células é responsável por inúmeros eventos celulares, incluindo a proliferação celular, secreção de citocinas, produção de anticorpos e actividade citolítica, interferindo com o factor de transcrição primária, o factor nuclear kappa B (NF- κ B). Nas células eucarióticas, o factor NF- κ B é responsável pela activação e regulação da proliferação celular, estando por isso envolvido nas respostas celulares a estímulos como o “stress”, citocinas, radicais livres ou bactérias e vírus. O receptor GR activado liga-se directamente ao NF- κ B, o qual previne a transmigração para o interior do núcleo da célula, interferindo com a produção de várias citocinas em macrófagos e células Th [Li & Verma (2002), Adcock & Caramori (2001) citado por Carroll & Forsberg (2007)].

Para além de regularem os receptores GR nas células-alvo e dos seus efeitos no NF- κ B, os glucocorticóides influenciam a imunidade geral através das suas acções sobre o timo, sendo que este é um órgão fundamental no desenvolvimento e funcionamento do sistema imunitário. Os glucocorticóides afectam a sobrevivência, a proliferação e a diferenciação dos timócitos, que são as células progenitoras dos linfócitos T. Os glucocorticóides endógenos regulam também o “pool” das células T bem como o ratio CD4/CD8 (Pazirandeh, Xue &

Prestegard, 2002). No entanto se ocorrer uma elevação prolongada de glicocorticoides, isto é, durante um período de “stress” crónico, as células pré-B e pré-T podem sofrer morte celular programada (apoptose, por exemplo), o que vai reduzir a formação de linfócitos e causar atrofia do timo.

Um estudo realizado por Biolatti, Bollo & Cannizzo (2005) com bovinos expostos a doses baixas de um glicocorticoide sintético (dexametasona) por longos períodos de tempo, variando entre 14 a 25 dias, demonstrou que o timo sofreu atrofia e ocorreu uma diminuição global na resposta proliferativa dos linfócitos nos animais injectados com dexametasona.

Embora a discussão referente às influências do “stress” sobre o sistema imunitário tenha sido na sua maioria limitada à acção dos glucocorticóides, não se pode eliminar a participação das catecolamidas, a epinefrina e norepinefrina como moduladores do sistema imunitário. Assim, o eixo HHA e o sistema nervoso simpático são duas vias hormonais capazes de provocar alterações ao nível do sistema imunitário (Carroll & Forsberg, 2007). Tal como as hormonas esteróides a epinefrina e norepinefrina possuem receptores específicos nas células alvo, classificados com receptores α e β adrenérgicos. Os receptores β_2 adrenérgicos, que se ligam tanto à epinefrina como à norepinefrina, têm sido identificados em todos os tipos de células do sistema imunitário com excepção das células Th2 (Madden et al., 1995). O aumento de catecolamidas em circulação após um evento de “stress” modula actividade das células do sistema imunitário como a proliferação e produção de citocinas e anticorpos, actividade citolítica e fenómenos de migração celular. Tal como acontece com os glucocorticóides os efeitos das catecolamidas sobre o sistema imunitário pode ser tanto estimulante como inibidor (Carroll & Forsberg, 2007). Em culturas celulares, Madden et al. (2005) a adição de epinefrina ou noraepinefrina no início do desenvolvimento celular, aumentou a actividade citolítica, o que significa que ocorreu um aumento de CTL (linfócitos T citotóxicos). As catecolamidas também são responsáveis pela redução da fagocitose, pela inibição da proliferação de linfócitos, de anticorpos e produção de citocinas pré-inflamatórias.

A combinação dos efeitos das hormonas glucocorticóides e das catecolamidas sobre o sistema imunitário, resultam num conjunto de eventos bem organizados, destinados a prevenir a hiperestimulação da imunidade inata e de citocinas Th₁ e, simultaneamente desencadear a resposta imunitária humoral através da estimulação das células Th₂. O tipo de resposta imunitária que prevalece no indivíduo depende do efeito das hormonas de “stress” libertadas, variando nos efeitos sobre a produção de citocinas Th₁ e Th₂. (Elenkov, Wilder & Chrousos, 1999).

4 Factores de “stress” na produção intensiva

Nos últimos anos, a organização dos métodos de produção de animais para consumo humano modificou-se profundamente, associado a três principais factores:

- êxodo rural para o meio urbano;
- redução do espaço disponível e o aumento do preço da terra;
- aparecimento de estruturas do tipo industrial no sector agrícola.

A produção de animais para consumo humano era feita de um modo mais ou menos artesanal, hoje em dia a produção intensiva está cada vez mais especializada. Esta mutação foi devida a grandes evoluções no domínio da alimentação animal, na genética e no alojamento. Hoje em dia as explorações de produção intensiva de bovinos de carne são caracterizadas pela especialização, intensificação e concentração de animais, onde o seu ciclo de engorda pode durar entre oito a dezoito meses, conforme o produto final que se pretende. Este tipo de produção utiliza principalmente animais de raças especializadas para a produção de carne ou vitelos machos provenientes de explorações de produção leiteira. É típico deste tipo de produção o confinamento e a concentração de animais, onde estes estão estabulados em “boxes” do tipo industrial, cujos lotes podem ter centenas de animais.

Todo este manejo intensivo pode criar complicações no organismo do animal (Dantzer & Mormède, 1992), sabendo-se que o ambiente em que se criam os animais e o manejo a que são submetidos exigem um reajuste excessivo da sua fisiologia e do seu comportamento, de tal forma que ambos (ambiente e manejo) podem induzir um estado de “stress”, com diferentes manifestações como o aumento da sensibilidade para doenças infecciosas, úlceras gastrointestinais, exibição de comportamentos anormais para a espécie e interferência com a capacidade de produção.

Segundo Dantzer e Mormède (1992) os factores de “stress” que afectam os animais em regime de produção intensiva podem-se agrupar em três categorias:

- as interacções entre animais (ambiente social);
- as interacções homem-animal (manipulações a que estão sujeitos os animais);
- as interacções animal-ambiente físico.

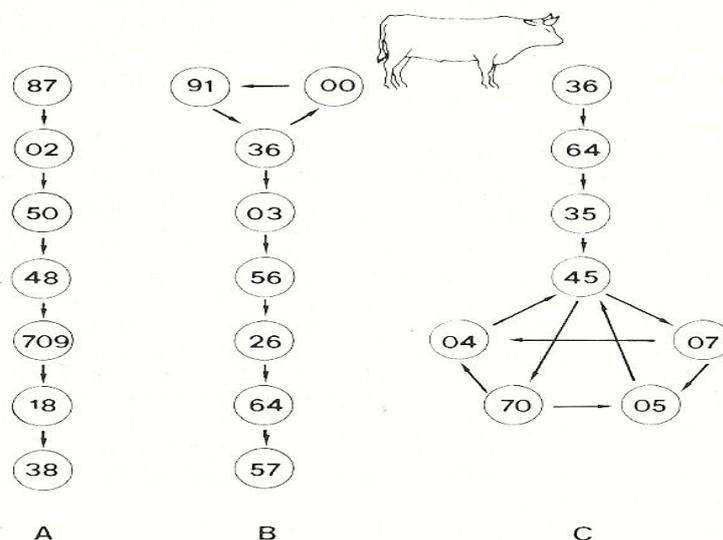
4.1 Interações entre animais

4.1.1 Mecanismos reguladores das interações sociais

Nas manifestações da conduta social dos animais domésticos são frequentes as interações entre animais pertencentes à mesma espécie. Nos ungulados em estado selvagem, a comunidade animal é constituída por indivíduos de idade e sexo diferente, que utilizam um extenso território. O comportamento maternal da mãe para com as suas crias favorece a sua socialização: estas estão integradas num grupo preexistente cuja hierarquia social depende da sua idade e da posição hierárquica da sua mãe.

Pelo contrário, na produção intensiva de ungulados domésticos, é normal a separação precoce da cria da progenitora, o agrupamento dos animais em lotes com características morfológicas semelhantes, a separação dos animais do mesmo sexo e com o mesmo estado vacinal e a restrição do espaço disponível. Na organização social de um grupo de animais domésticos há animais dominantes e dominados. Segundo o número de elementos do grupo e da espécie animal, são possíveis várias formas de organização hierárquica, desde a hierarquia estritamente linear até os triângulos ou polígonos onde um subgrupo agressivo pode dominar cada um dos restantes animais de posição hierárquica inferior à sua. Como apresentado na figura 4, o diagrama A representa uma hierarquia estritamente linear, em que o animal representado pelo número 87 domina todos os animais em posição hierárquica inferior à sua; as hierarquias lineares contêm frequentemente triângulos de dominância (esquema B) ou polígonos de dominância (esquema C), sendo que nestas situações o animal está dominado por um ou vários indivíduos, sendo eles próprios dominados pelos seus congéneres frente aos quais eles ocupam uma posição de dominância. Estes triângulos podem estar situados em diversas posições na hierarquia.

Figura 4 Exemplos de hierarquias sociais na espécie bovina (Adaptado de Hafez & Bouisson, 1975).



Os factores que determinam os graus de hierarquia entre indivíduos são o peso, a idade, a conformação física, o sexo e a raça (Dantzer & Mormède, 1992), no entanto no caso dos bovinos a presença de cornos parece ser um factor mais importante que o peso na graduação de uma hierarquia. Há trabalhos que demonstram que a hierarquia num grupo recém-formado se estabelece rapidamente: num lote de novilhas, 84% da organização hierárquica é estabelecida durante a primeira meia hora [Hafez & Bouissou (1975) citado em Dantzer & Mormède (1992)]; nos suínos pelo contrário são necessárias 48 horas para haver organização da hierarquia do grupo [Signoret et al. (1975) citado em Dantzer & Mormède (1992)].

Cada indivíduo alcança uma posição hierárquica no interior do seu grupo social, havendo também uma verdadeira identidade do grupo através da qual um indivíduo de um grupo social diferente é imediatamente reconhecido como estranho, independentemente da sua posição social. A capacidade de os animais formarem uma organização hierárquica social representa um mecanismo regulador de facilitação social e uma atitude defensiva na utilização do território, resultando em significativa economia metabólica e diminuição da intensidade dos conflitos sociais.

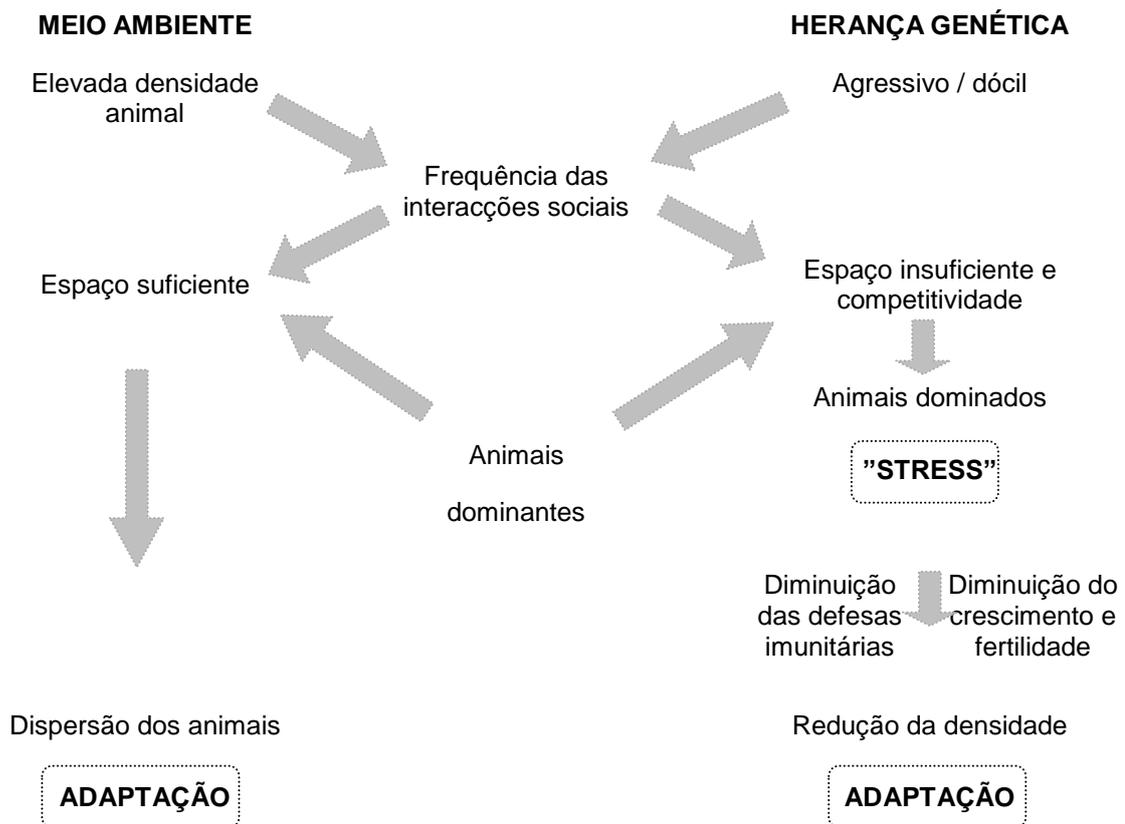
Todos os factores ou circunstâncias que impeçam a integração do indivíduo ou atrasem a hierarquização social, podem levar à perda de coesão entre animais do mesmo grupo, sendo estes potenciais fontes de alterações e “stress social”.

4.1.1.1 Consequências da sobrepopulação

Entende-se por sobrepopulação quando o número de indivíduos por unidade de superfície (densidade) é superior ao normal. Este termo pode referir-se ao espaço que ocupa cada animal ou a pontos concretos como por exemplo áreas de descanso muito estreitas, comedouros demasiado curtos ou também pode referir-se ao tempo limitado de acesso ao alimento. Alguns trabalhos realizados com roedores em laboratório evidenciaram os efeitos nocivos da sobrepopulação sobre o peso corporal, comportamento, fertilidade e susceptibilidade a doenças [Christian et al. (1965) citado em Dantzer & Mormède (1992)].

Cada animal possui o seu espaço vital e nenhum outro pode invadir este, uma vez que esta aproximação desencadearia uma reacção agressiva. A separação ou distância depende de factores genéticos, da posição hierárquica, da região do corpo aproximada e varia com o decorrer do tempo e estado fisiológico. A restrição de superfície disponível e a ausência de abrigo provocam invasões sucessivas do espaço individual que podem provocar situações de autêntico “stress” social. A figura 5 ilustra as consequências da sobrepopulação num grupo de animais.

Figura 5 Representação esquemática das consequências da sobrepopulação num grupo de animais. Adaptado de Dantzer & Mormède (1992).



Estes fenómenos ocorrem nas diversas espécies domésticas, no que se refere aos bovinos o número de interações agressivas aumenta no seio de grupos de bovinos jovens quando a área disponível de estabulação diminui [Hafez & Bouissou (1975) citado em Dantzer & Mormède (1992)]. O espaço que rodeia a cabeça é especialmente importante nesta espécie, e a ausência de protecção física ao nível do comedouro conduz a uma enorme disparidade nos tempos de alimentação entre animais dominantes e dominados. Em resumo, todos estes exemplos indiciam que uma perturbação dos mecanismos da regulação social pode ser a origem de um determinado número de modificações do estado de saúde normal numa exploração intensiva. A posição social ocupada por um indivíduo fixa os limites deste no que se refere às suas capacidades de acção em grupo e as suas possibilidades de utilização do espaço.

4.2 Interacções homem animal

Os animais estão sujeitos a manipulações cada vez que é necessário intervir sobre estes com fins zotécnicos (mudança de alojamento, transporte, formação de grupos) e por razões medico-veterinárias (descorna, vacinações, tratamentos preventivos ou curativos). Estas manipulações dirigem-se ao indivíduo ou ao grupo na sua totalidade.

4.2.1 Transportes

O transporte é por sua natureza um acontecimento estranho e ameaçador na vida de qualquer animal doméstico. Envolve uma série de factores de perturbação, como: a exposição a um novo ambiente e a novos animais, a superlotação de animais, o ruído, os movimentos do veículo de transporte, a fome e a sede. Sendo estas situações inevitavelmente stressantes, podem levar ao sofrimento, provocar ferimentos ou mesmo a morte do animal, se não for devidamente planeado e executado. As consequências e os diversos transtornos, de gravidade variável, podem sobrevir de forma imediata, ou seja durante o curso da viagem, ou de forma diferida passados alguns dias ou mesmo semanas (Dantzer & Mormède, 1992). O transporte coincide muitas vezes com uma mudança de propriedade, em que a responsabilidade pelo bem-estar do animal pode estar comprometida.

O transporte de animais faz-se por via rodoviária, ferroviária, marítima ou aérea para fins de reprodução, engorda e abate (Grandin & Tarrant, 2000). Segundo os dados disponíveis na literatura, na Europa o transporte rodoviário é o meio mais utilizado para o transporte de animais para abate.

O processo de transporte inicia-se com o agrupamento dos animais, seguindo-se o carregamento, o confinamento e a descarga. Durante todo este decurso os animais estão expostos a um “stress” ambiental devido não só ao ambiente desconhecido, como a outros factores stressantes como o calor, o frio, a humidade, o ruído e o movimento do próprio veículo. Um “stress” adicional pode ainda ser causado pelo reagrupamento social.

Uma vez que o transporte está associado a uma grande variedade de estímulos físicos e emocionais, muitos dos quais são novos e alguns chegam mesmo a ser agressivos, este é reconhecido como sendo uma importante causa de desconforto nos animais [Fraser (1979) citado em Grandin & Tarrant (2000)]. Dependendo da situação, o comportamento e atitude dos animais perante o transporte pode variar entre uma resposta de “stress” moderado e facilmente identificável, que pode não causar preocupação ao nível do bem-estar animal, a uma resposta de “stress” extrema, sendo esta motivo de alarme pois pode causar perdas quer ao nível do bem-estar animal quer a nível económico.

Segundo Grandin (1997) o medo é um factor de “stress” muito forte. Tanto a experiência anterior como os factores genéticos afectam o temperamento do indivíduo, e estas duas condições interagem de forma complexa, determinando a intensidade de “stress” que o animal pode sofrer quando é manuseado ou transportado. Deste modo a reacção e o “stress” ao transporte vai variar no indivíduo aquando do transporte, dependendo do modo de produção a que esteve sujeito: regime extensivo ou intensivo.

A Febre dos Transportes é a principal doença associada ao transporte de gado bovino, em que a causa primordial para esta patologia é atribuída ao “stress” causado pelo transporte de vitelos ou novilhos de uma região geográfica para outra. A patogénese da doença envolve uma cascata sequencial de eventos iniciada pelo “stress”, sendo que este pode provocar a diminuição da resistência do animal à infecção. Num estudo desenvolvido por Tarrant, Kenny & Murphy (1992) observou-se um aumento no número total de leucócitos e neutrófilos e uma redução na contagem de linfócitos e eosinófilos em bovinos, após uma viagem de centenas de quilómetros. A redução no número total de linfócitos pode resultar numa diminuição da resistência à infecção. Os vitelos para engorda se transportados imediatamente após o desmame têm níveis de cortisol mais elevados em comparação com vitelos que foram desmamados e colocados e agrupados em parques de confinamento por 2 semanas antes do seu transporte [Crookshank et al. (1979) citado por Grandin (2000)]. Num estudo elaborado por Mckenzie (1997) tanto o desmame como o transporte afectam a resposta humoral dos vitelos. Tem sido feita alguma pesquisa para determinar os efeitos prejudiciais do frio, do calor, da aglomeração, do ruído e do manejo e contenção de animais para o sistema imunitário. A função ruminal é prejudicada pelo “stress” causado pelo transporte. Para Galyean, Lee e Hubbard (1981) o transporte causa mais “stress” com implicações a nível da função ruminal do que a privação de água ou alimento, o que pode ser explicado por uma diminuição da ruminação durante o transporte.

Os efeitos negativos do transporte podem ser altamente variáveis, dependendo de inúmeros factores como o clima, a habilidade de condução do motorista, a densidade animal, o “stress” por medo e o estado vacinal do grupo de animais (Grandin & Tarrant, 2000).

O transporte está inevitavelmente associado a sinais fisiológicos e comportamentais de “stress”, contudo o sofrimento pode ser evitado se houver boas práticas de manejo e utilizar veículos de transporte devidamente equipados.

4.3 Interacção animal Ambiente

O factor Ambiente é muito importante na produção intensiva, uma vez que a maioria dos processos patológicos, quer sejam de origem infecciosa ou não, podem estar relacionados com a sua qualidade. As patologias respiratórias ou digestivas provocadas por agentes normalmente pouco patogénicos, desenvolvem-se tanto mais facilmente quando o organismo do indivíduo está debilitado por múltiplas agressões originadas no Ambiente.

Um Ambiente satisfatório para vitelos em crescimento deve proporcionar conforto físico, térmico, psicológico e comportamental. Cada uma dessas áreas pode ser uma fonte de “stress” para estes indivíduos, que posteriormente pode predispor os animais a um

compromisso de sua resposta imunitária, das suas taxas de crescimento, e finalmente do bem-estar propriamente dito.

O conforto térmico inclui um ambiente com temperatura amena e sem extremos de temperatura. O “stress” por frio ou calor afecta os animais mais jovens, doentes ou feridos de forma muito mais severa do que animais saudáveis e mais velhos. O conforto térmico para os animais é quantificado como a zona térmica neutra, que varia de 15° C a 25° C para vitelos jovens. Dentro da zona térmica neutra, o indivíduo mantém a temperatura corporal (homeotermia) por vasoconstricção ou vasodilatação, alterando posturas e comportamentos para conservar ou dissipar o calor, além de alterações nas propriedades isolantes da pelagem. Abaixo dos 15 ° C (temperatura crítica inferior) o animal começa a desviar a energia para manter a sua temperatura corporal, de forma que esta energia extra necessita ser incluída na dieta (Stull & Reynolds, 2008). A temperatura crítica superior (25° C) ocorre quando o vitelo é incapaz de dissipar o calor metabólico de forma suficiente para se manter em homeotermia. Geralmente, o consumo de alimento é voluntariamente reduzido, diminuindo o calor produção gerado pela digestão e absorção dos nutrientes, o que leva a menores GMD.

O conforto físico do ambiente inclui o espaço disponível, a qualidade ou as condições do espaço, e as superfícies com as quais o animal tem contacto. O espaço disponível para o animal deve ser suficiente para permitir comportamentos normais de alimentação e consumo de água, repouso e excreção, além de locomoção. A qualidade do ar constitui um factor importante para o conforto físico do vitelo. Altas concentrações de gases tóxicos tais como o amoníaco, provocam irritação das mucosas e das primeiras porções das vias respiratórias. Estes gases estão frequentemente associados à acumulação de dejectos e a uma deficiente ventilação do ar em espaços fechados. Stull e Reynolds (2008) sugerem o limite máximo de 25 ppm de concentração de amoníaco para as instalações de vitelos.

Relativamente às interacções animal-ambiente físico, estas estão de certo modo relacionadas com as instalações, as quais devem promover uma protecção contra os extremos térmicos e climáticos, um acesso adequado ao alimento, garantir a segurança no que diz respeito a ferimentos e controlar a saúde e bem-estar dos animais. Tanto os sistemas de instalação individual quanto em grupo devem ser projectados para atender a todas estas necessidades.

5 Métodos de avaliação de “stress”

Os métodos e as estratégias de manejo que são utilizados na rotina numa exploração de produção de bovinos de carne implicam quase sempre alterações no bem-estar e podem

induzir “stress” nos animais. Os factores que induzem “stress” no indivíduo podem ser físicos (fome, sede, fadiga, ferimentos) ou psicológicos (retenção, manipulação, efeito novidade), estando por isso muitas vezes associados às condições do Ambiente e às novas experiências (Grandin, 1997). Situações comuns na rotina numa exploração de engorda de bovinos como o desmame, a descorna e o transporte podem servir como modelos adequados para avaliar o bem-estar e o “stress” nos animais. O comportamento do indivíduo será determinado por uma complexa interacção entre os factores genéticos e experiências anteriores, por exemplo, animais submetidos a experiências de manejo violento, irão sempre recordar-se e podem tornar-se mais nervosos comparativamente a animais que estiveram anteriormente sujeitos a um manejo mais delicado. Um manejo incorrecto pode ser prejudicial e um enorme factor de “stress” para animais com um temperamento excitável comparando com animais com um temperamento mais calmo (Grandin, 1997). Vários estudos têm sido realizados no sentido de tentar avaliar e determinar o bem-estar e o grau de “stress” nos animais, a maioria destes trabalhos foram efectuados durante operações de manejo e transporte, permitindo avaliar o “stress” a curto prazo. A medição e avaliação do “stress” crónico imposto pelo meio-ambiente ou pelos diferentes sistemas de alojamento são muito mais complexas. Para avaliar o “stress” e o grau de desconforto nos animais, deve-se proceder a avaliações quer do comportamento quer dos parâmetros fisiológicos.

5.1 Variáveis fisiológicas

As variáveis fisiológicas constituem bons indicadores de “stress”, uma vez que permitem avaliações objectivas, científicas, quantificáveis e permitem resultados repetitivos. A seguinte tabela mostra as variáveis fisiológicas habitualmente utilizadas como indicadores de “stress” durante o transporte.

Tabela 1 Variáveis fisiológicas habitualmente utilizadas como indicadores de “stress” durante o transporte. Adaptado de Grandin, 2000.

“Stress”	Variáveis fisiológicas
Quantificação no sangue	
Privação de alimento	↑ AGL, ↑ β-OHB, ↑ ureia, ↓ glucose
Desidratação	↑ osmolaridade, ↑ proteína total, ↑ albumina, ↑ Htc
Esforço físico	↑ CK, ↑ lactato
Medo/excitação	↑ cortisol, ↑ Htc
Enjoo	↑ vasopressina

Outras quantificações	
Medo/excitação e esforço físico	↑ frequência cardíaca, ↑ frequência respiratória
Hipotermia/hipertermia	Temperatura corporal, temperatura da pele

AGL, ácidos gordos livres; β -OBH, β -hidroxibutirato; Htc, hematócrito; CK, creatino-quinase.

5.2 Indicadores da reacção geral ao “stress”: frequência cardíaca e respiratória, cortisol plasmático e glucose

A resposta inicial do organismo ao “stress” é a libertação de epinefrina e noraepinefrina para a corrente sanguínea a partir das glândulas adrenais. A noraepinefrina é também libertada a partir das terminações dos nervos do sistema nervoso simpático, onde esta actua directamente. A libertação destas catecolamidas provoca um aumento agudo da frequência cardíaca, da pressão sanguínea e da estimulação da neoglucogénese hepática, aumentando consideravelmente a concentração plasmática de glucose. Os efeitos biológicos destas hormonas no indivíduo, quando sujeito a factores de “stress”, fornecem parâmetros úteis que o permitem avaliar (Grandin, 2000). A resposta ao “stress” a longo prazo no indivíduo é mediada pelo eixo hipotálamo-hipofisário-suprarenal, sendo um sistema onde as respostas neurais e endócrinas estão integradas. As hormonas glucocorticóides, produzidas e libertadas a partir do córtex da glândula suprarenal em resposta a uma variedade extremamente ampla de factores de “stress” desempenham um papel importante na medição e avaliação da resposta fisiológica.

Convencionalmente a concentração de cortisol total é medida através de técnicas de radioimunoensaio utilizando o soro, o plasma, a saliva e ocasionalmente a urina do indivíduo. A recolha de amostras tanto de sangue como de urina têm vários problemas inerentes (Cook, Schaefer, Lepage & Steven, 1997) e que serão descritas a seguir.

5.2.1 Avaliação do cortisol plasmático

O cortisol plasmático é um indicador útil de factores de “stress” a curto prazo, ou seja permite avaliar o “stress” agudo. O doseamento do cortisol plasmático é utilizado por vários autores para avaliar a resposta ao “stress” a procedimentos comuns durante o manejo de animais de produção, como o desmame precoce, a descorna, o transporte e castração (Grandin, 1997). Stilwell, Lima & Broom (2008) utilizaram o cortisol plasmático para avaliar o “stress” e a dor provocados pela castração, com o objectivo de comparar a eficácia de diferentes anti-inflamatórios não esteróides no controlo da dor e proporcionar mais bem-estar em animais castrados. Stilwell (2009) utilizou também o cortisol plasmático para avaliar a dor em vitelos submetidos a diferentes métodos de descorna e de castração.

Contudo, a recolha de uma amostra de sangue não é possível sem imobilizar e conter o animal adequadamente, sendo que esta prática provoca activação do eixo HHA [Nyberg et al. (1988), citado por Cook et al. (1997)] podendo confundir os resultados do estudo. O uso de cateteres venosos pode conseguir contornar este problema, no entanto existe várias restrições sobre a sua utilidade: a inserção de uma cânula é uma técnica especializada, muitas vezes são difíceis de manter por longos períodos de tempo, podem causar desconforto e infecções, o seu uso está limitado a estudos que envolvem um pequeno número de animais e é difícil a sua utilização em locais sem condições de ambiente controlado.

Porém os resultados de um estudo realizado por Stilwell, Carvalho, Lima e Broom (2008) sobre o efeito da contenção manual de vitelos durante a recolha de amostras de sangue na concentração de cortisol plasmático, revelaram que os níveis de cortisol sanguíneo não são afectados se a recolha da amostra for efectuada até um minuto após a contenção do animal.

Para além dos problemas associados com a recolha de amostras, a avaliação do cortisol no sangue possui também limitações fisiológicas. Cerca de 90% do cortisol em circulação está ligado à CGB (cortisol-binding protein) e à albumina. Os restantes 10% correspondem à forma livre, sendo esta a fracção do cortisol que está disponível para ser absorvida pelas células-alvo (Cook et al., 1997). Assim, sob condições de “stress” a capacidade de ligação da CGB torna-se cada vez mais saturada, havendo um aumento desproporcional na concentração do cortisol plasmático. Deste modo, a medição da concentração total de cortisol no sangue, não reflecte necessariamente a fracção biologicamente activa da hormona.

5.2.2 Avaliação do cortisol na saliva

Vários estudos comprovam a utilidade de utilizar amostras de saliva para dosear o cortisol e avaliar deste modo a resposta do eixo HHA em várias espécies animais. Cook et al., (1997), Marko et al., (1997), utilizaram a saliva para avaliar os níveis de cortisol em porcos, Schmidt et al. (2010) avaliaram o “stress” provocado pelo transporte em cavalos através do doseamento do cortisol salivar. Segundo Schmidt et al. (2010) tanto o cortisol salivar como o plasmático servem para avaliar o “stress” agudo.

O processo de amostragem é relativamente fácil de executar, não exige uma contenção tão imobilizadora como aquela que é utilizada na recolha de amostras de sangue, e pode ser feito em condições que não são compatíveis com a recolha de sangue ou urina. O cortisol difunde-se na saliva pelo processo de difusão passiva, a concentração é independente da taxa de produção e é um reflexo directo da fracção livre no sangue (Riad et al., 1982 citado por Cook et al., 1997). Em contraste com Blackshaw & Blackshaw (1989) que afirmaram que o uso do cortisol salivar apresenta graves limitações, devido a uma baixa correlação entre a

saliva e o plasma. No entanto num estudo mais recente realizado por Cook et al. (1996), demonstrou uma boa correlação entre o cortisol plasmático e o cortisol salivar em resposta à estimulação da suprarenal pela injeção endovenosa de ACTH. Portanto esta parece ser uma técnica com o mínimo de invasão e pouco stressante, muito útil para avaliar as respostas fisiológicas a situações de “stress”.

5.2.3 Outros

Em determinadas situações quando é difícil ou mesmo impossível recolher uma amostra de sangue ou saliva, podem-se dosear os glucocorticóides e os seus metabolitos no leite, na urina ou nas fezes. Porém, o tempo que estas substâncias demoram a serem excretadas deve ser levado em consideração (Broom, 2007). Estes são métodos não invasivos, que permitem contornar o problema da contenção física dos animais, contudo este tipo de amostras são mais úteis para avaliar o “stress” crónico (Stilwell et al., 2008).

5.3 Indicadores comportamentais de “stress”

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

Segundo Grandin (1997), dentro dos indicadores comportamentais de “stress”, a avaliação do temperamento pode ser utilizada como indicativo de “stress”, dor ou desconforto. O tipo de reacção do indivíduo ao “stress” está relacionado com o seu temperamento

Para Burrow (1997), o temperamento consiste na resposta do animal às práticas de manejo pelo homem, e geralmente está associado com o medo, podendo causar mudanças comportamentais e fisiológicas, que se manifestam desde uma fraca reacção ou docilidade até à expressão de medo, à apatia, à fuga ou ao afastamento, bem como comportamentos de ataque e agressão. Para Gradin (1997) os animais com um temperamento calmo tem uma resposta comportamental fraca a estímulos físicos ou ambientais, enquanto que animais mais temperamentais exaltam-se facilmente e/ou exibem sinais de medo aos mesmos estímulos. O efeito do temperamento do animal na saúde e performance é uma área de interesse crescente.

Os métodos utilizados na tentativa de medir a reacção ao “stress” são as observações quantitativas do grau de perturbação dos animais durante as práticas de manejo, tendo por base acções como o vigor e frequência do movimento do animal, da respiração, dos movimentos da cauda, da ocorrência de coices e tentativa de fuga (Appiah et al., 1992), e

ainda a defecação ou vocalização excessiva em ambientes de contenção, associados à presença do homem.

Os testes mais usados para avaliar o temperamento animal são a velocidade de fuga (ou velocidade de saída) e o “comportamento no parque” (Burdick et al., 2010). O primeiro consiste num método de avaliação objectivo, que avalia a velocidade em m/s dos animais a percorrer uma distância conhecida, na qual os animais mais rápidos são penalizados quanto ao temperamento [Burrow et al. (1988) citado por Burdick et al. (2010)]. O “comportamento no parque” é uma avaliação subjectiva, o teste consiste no agrupamento dos animais em pequenos grupos, e através da observação visual classificar os indivíduos numa escala de 1 (animal calmo e dócil) a 5 (animal reactivo e agressivo).

Os mesmos autores realizaram um estudo em bovinos com 10 meses de idade, em que utilizaram os mesmos testes para avaliar o temperamento dos animais. O objectivo deste estudo foi relacionar o temperamento e o transporte com a temperatura rectal e as concentrações plasmáticas de cortisol e epinefrina. Os animais mais temperamentais revelaram maiores concentrações de cortisol, epinefrina e temperatura rectal mais elevada após o transporte, em comparação com os animais calmos.

IV. DOENÇA RESPIRATÓRIA BOVINA

6 Impacto económico da Doença Respiratória Bovina

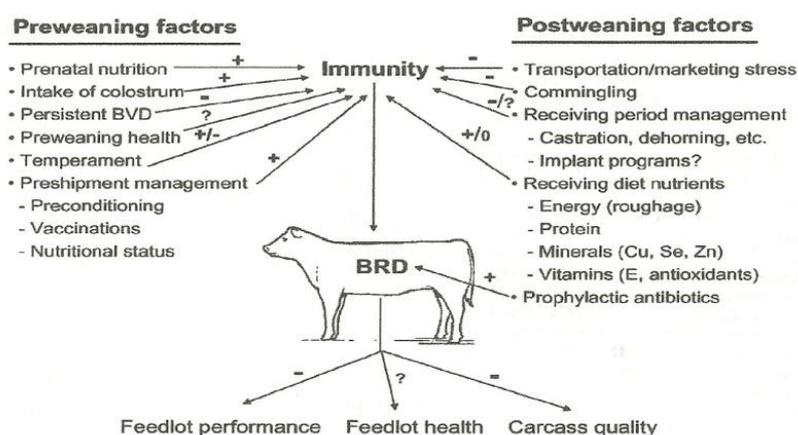
A Doença Respiratória Bovina (DRB) é a patologia que ocasiona maior impacto económico negativo em qualquer fase da produção primária (Callan & Garry, 2002), estando as perdas associadas à diminuição dos índices de conversão alimentar, perda de peso, reprovação de carcaças, honorários profissionais, custos com tratamentos e mortalidade (Farshid, Shahriar, Clark, Janzen, West & Wobeser, 2002, Snowden, Van Vleck, Cundiff & Bennett, 2005). Vários estudos têm sido realizados para determinar o impacto económico da DRB sobre a cadeia produtiva bovina. Esta é responsável por cerca de 75% de morbilidade e 50 a 70% do total de mortalidade em bovinos de carne em “feedlot” (Edwards, 1996, Loneragan, Dargatz, Morley & Smith, 2001). A USDA NAHMS (2000) considera que a DRB é a preocupação mais prevalente em termos de saúde e a patologia economicamente mais devastadora no sector primário de carne bovina. Nos Estados Unidos o custo total relacionado com a DRB foi estimado em 750 milhões de dólares por ano (Griffin, 1997). Os

custos atribuídos ao tratamento com a DRB são substanciais, sendo que o impacto negativo da DRB no rendimento da carcaça e qualidade da carne podem aumentar ainda mais os custos económicos. Os custos com tratamentos representam 21% do total das perdas económicas, enquanto que os restantes 79% são atribuídos à diminuição do peso total da carcaça (cerca de 8,4 % a menos) e a uma menor qualidade da carne (Duff & Galyen, 2007). Num estudo realizado por Fulton et al. (2002), foi determinada a eficácia de diferentes programas de tratamento subsequentes a DRB, através dos ganhos médios diários e avaliação da carcaça, demonstrando que o prejuízo relacionado com o número de tratamentos foi de 40,64 dólares para os animais tratados uma vez, de 58,35 dólares para os animais tratados duas vezes e aqueles que foram tratados mais que três vezes o prejuízo foi de 231,93 dólares. Existe, actualmente uma elevada dependência do uso de antibióticos e vacinas na abordagem à DRB, os programas profiláticos com antibióticos continuam a ser eficazes, contudo a resistência aos antibióticos constitui um grande problema de saúde pública, muitas vezes o seu uso não é racional, e negligencia-se o controlo de outros factores causais da DRB.

7 Doença Respiratória Bovina e a tríade epidemiológica

A etiologia da DRB é complexa e multifactorial, contribuindo para o seu estabelecimento, uma complexa interacção entre hospedeiro, agentes infecciosos e factores ambientais (Radostits, Gay, Blood & Hinchcliff, 2002). A interacção entre estes factores resulta numa expressão da doença extremamente variável (Martin, Meek, Davis, Johnson & Curtis, 1982, Cusack, McMeniman & Lean, 2003).

Figura 6 Factores que contribuem para DRB em bovinos de carne e as consequências da patologia. (Adaptado de Duff & Galyean, 2007).



7.1 Factores do hospedeiro

7.1.1 Predisposição anatómica e fisiológica do aparelho respiratório bovino e mecanismos de defesa pulmonar

A domesticação e a selecção genética a que os bovinos têm sido submetidos ao longo de milhares de anos, conduziram a um aumento da predisposição anatómica e fisiológica à ocorrência de DRB. São várias as características que tornaram o aparelho respiratório desta espécie particularmente susceptível a infecções (Stilwell & Matos, 2004): reduzido diâmetro da traqueia relativamente ao tamanho do animal e suas necessidades; reduzida capacidade pulmonar; fraca elasticidade dos septos interlobulares; número reduzido de capilares dos septos alveolares; estrutura óssea do tórax rígida, aumentando o esforço do diafragma durante a inspiração; o diafragma está sujeito a compressão abdominal, o que pode levar a comprometimento da respiração. Sob condições normais, é accionado um complexo de mecanismos de defesa na tentativa de proteger as vias respiratórias dos bovinos da acção lesiva dos agentes patogénicos inalados. Os mecanismos de defesa pulmonar podem ser subdivididos em três processos básicos:

- Físicos: a filtração aerodinâmica nas cavidades nasais e o aparelho muco-ciliar, que se estende até os bronquíolos terminais, têm a função de remover as partículas nocivas aerossolizadas antes que cheguem às unidades pulmonares terminais (alvéolos); o reflexo da tosse é activado para que o excesso de secreções e exsudatos inflamatórios provenientes dos pulmões e vias aéreas maiores possa ser eliminado por expectoração ou deglutição;
- Secreção: o muco do aparelho muco-ciliar e as imunoglobulinas IgA, IgG e IgM, exercem uma actividade imuno-inespecífica e específica sobre o epitélio de todo o tracto respiratório;
- Celulares: os macrófagos alveolares são a primeira linha de defesa do pulmão, responsáveis pela fagocitose e destruição de partículas (bactérias, vírus e outros) que chegam aos alvéolos e sendo posteriormente arrastados pelo aparelho muco-ciliar. São células apresentadoras de antigénio, participando na imunidade específica.

A combinação da predisposição anatómica e fisiológica do aparelho respiratório desta espécie, com outros factores de risco como condições ambientais desfavoráveis e práticas de manejo inadequadas podem provocar falhas nos mecanismos de defesa pulmonar e possibilitar a colonização de agentes infecciosos.

7.1.2 Resposta imunitária do hospedeiro

A imunidade dos animais pode ser dividida em duas categorias, a imunidade inata (natural) ou imunidade adquirida (específica). Um trabalho realizado por Wittum, Perino e Littledike (1996) demonstrou a importância da imunidade materna e do sucesso da transferência do colostro na ocorrência de DRB, neste estudo, o grupo de vitelos com maiores concentrações de imunoglobulinas plasmáticas 24 horas pós-parto, foi o que revelou menor incidência de DRB ao desmame e após o confinamento. Radostits et al. (2002) referem que o período crítico para os vitelos contraírem DRB é entre as duas e quatro semanas de idade, período em que a concentração de imunoglobulinas nas secreções nasais é mais baixa. A vacinação dos animais antes ou nos primeiros dias após a chegada à exploração de engorda pode também influenciar a imunidade dos animais. Segundo Fulton et al. (2004) a transferência passiva de anticorpos maternos através do colostro é importante para a imunidade do vitelo contra os agentes patogénicos, mas elevadas concentrações de anticorpos maternos podem interferir com a vacinação.

7.1.3 Temperamento

O temperamento é um outro factor do hospedeiro que está relacionado com a incidência de DRB. O termo é utilizado para caracterizar a resposta comportamental resultante da interacção homem-animal (Burrow, 1997). Segundo Voisinet et al. (1997) bovinos com um temperamento nervoso demonstraram menor rendimento de carcaça e de acordo com Oliphint et al. (2006) o temperamento desempenha também um papel importante na resposta à vacinação. Num estudo realizado por Fell, Colditz, Walker e Watson (1999) com dois grupos de vitelos agrupados de acordo com o seu temperamento em animais “calmos” e “nervosos”, demonstrou que os vitelos “calmos” tinham menos probabilidade de futuramente serem tratados para DRB.

Em bovinos de carne, o temperamento destes animais correlaciona-se com a concentração de hormonas do “stress”, sendo que os animais mais temperamentais ou excitáveis possuem maiores concentrações de cortisol e adrenalina (Burdick et al., 2010). Tal como o “stress”, o temperamento pode ter um impacto negativo sobre o ganho médio diário, rendimento de carcaça e a função imunitária em bovinos com um temperamento calmo (Voisinet et al., 2007; Fell et al., 1999; Oliphint et al., 2006).

7.1.4 Resistência à DRB

Segundo Snowden et al. (2005) a selecção de animais com maior resistência a doenças é uma das várias alternativas para prevenir ou reduzir as perdas económicas associadas a diversas patologias e melhorar o bem-estar animal. Por vezes existem relações genéticas indesejáveis entre a produção e a saúde animal (Rauw, Kanis, Noordhuizen-Stassen & Grommers, 1998). Por exemplo em bovinos leiteiros a selecção genética para o aumento da

produção de leite provocou um aumento da incidência de mamites, cetose e outras patologias (Simianer, Solbu & Schafer, 1991), bem como de metrites e quistos ováricos (Van Dorp, Dekkers, Martin & Noordhuizen, 1998). Em ovinos a selecção de animais com génotipos resistentes ao “scrapie” diminuiu o peso da carcaça (Brandsma, Janss & Visser, 2004).

O impacto genético sobre o risco de DRB foi alvo de investigações científicas na produção primária de carne tanto na fase de pré-desmame como na fase pós-desmame. Segundo Muggli-Cockett (1992), Snowden et al. (2005) e Schneider et al. (2009) a hereditabilidade para a resistência à DRB na fase de pré-desmame é baixa, variando de 0,00 a 0,26. Contudo, parecem existir diferenças significativas entre diferentes raças de bovinos com o risco de DRB (Muggli-Cockett 1992; Snowden et al. 2005). Num estudo realizado por Hagglund et al., (2007) demonstrou que as raças de bovinos Angus e Hereford parecem ser mais susceptíveis a DRB, comparando com outras raças; num outro estudo australiano comparando *Bos Taurus* com *Bos indicus* o primeiro grupo revelou ser mais susceptível a DRB (Cusak, McMeniman & Lean, 2007). Stilwell, Matos e Carolino (2007) avaliaram a seroprevalência a dois importantes vírus respiratórios (BRSV e PI3) em vacadas de carne de raça Mertolenga, Preta e Cruzada (Mertolenga x Charolesa ou Preta x Limousine). Os resultados da análise de seroprevalência nos vitelos demonstraram um efeito significativo da raça na probabilidade de seroprevalência de anticorpos, demonstrando uma maior susceptibilidade dos vitelos de raça Preta à DRB.

Dado que a resistência à DRB possui baixa hereditabilidade, o vigor híbrido pode ser benéfico na redução do risco associado com a DRB (Snowden et al., 2005), num estudo realizado pelos mesmos autores as raças cruzadas demonstraram menor incidência de DRB. O mapa físico do genoma bovino pode fornecer aos pesquisadores uma ferramenta útil para melhorar a saúde animal (Snowden, 2009). Recentes pesquisas evidenciaram determinados locus com características quantitativas relacionadas com a saúde dos bovinos, que inclui a resistência a DRB (Casas & Snowden, 2008). É necessário mais pesquisa sobre o impacto genético na saúde dos animais.

7.2 Factores ambientais

Na tríade epidemiológica, os factores ambientais não se referem somente ao clima, pois os factores ambientais predisponentes para a DRB incluem os factores físico, biológico e social (Martin, Meek & Willeberg, 1987). O clima parece não ter qualquer relação com a incidência de doença respiratória em vitelos (Assie et al., 2004) e em novilhos de engorda (Cusack et al., 2007). Apesar de que na América do Norte a incidência de DRB é maior durante o Outono (Ribble, Meek, Janzen, Guichon & Jim, 1995; Loneragen et al., 2001), estando provavelmente associada ao facto de esta ser tradicionalmente a época de comércio de

animais, aumentando os factores de risco para DRB como aumento da densidade de microorganismos e de factores de “stress” como o transporte, agrupamento de animais e outras operações de manejo. Na produção primária, os factores ambientais são considerados como promovedores de “stress” nos animais (Dabo, Taylor & Confer, 2007). O “stress” resultante dos múltiplos factores de produção tem um impacto directo sobre o sistema imunitário do indivíduo, uma vez que a consequente libertação de corticosteróides reduz a capacidade fagocitária pulmonar, redução da produção de anticorpos e acção negativa sobre a funcionalidade dos linfócitos (Stilwell & Matos, 2004). Os animais quando entram na exploração de engorda sofrem uma série de manipulações que lhes causam “stress”, nomeadamente alterações na dieta, o agrupamento com outros animais e o transporte, a fome, a sede e ferimentos. O agrupamento de animais provenientes de diferentes explorações é um factor de “stress” importante, uma vez que a hierarquia social é destruída, Loerch e Fluharty (2000) sugerem que inserir um animal treinado no grupo de animais recém chegados melhora a ingestão diária de alimento destes nos primeiros dias na exploração, e em alguns casos diminui a incidência de DRB. O transporte pode ser um dos períodos mais críticos na origem de DRB, o período mais problemático (carregamento/descarregamento versus transporte propriamente dito) ainda não foi bem definido pois há estudos contraditórios (Stilwell & Matos, 2004). O desenho das instalações e os factores climáticos como a temperatura, humidade e ventilação, devem ser também alvo de atenção. Temperaturas extremas (baixas ou elevadas), associadas ou não a humidades relativas elevadas e fraca ventilação, conduzem a uma elevada concentração de microorganismos no ambiente, “stress” e consequente imunossupressão (Radostits *et al.*, 2002).

7.3 Factores infecciosos

São numerosos os agentes infecciosos (bactérias e vírus) relacionados com a DRB, estes consideram-se factores etiológicos essenciais, surgindo muitas vezes associados (Stilwell & Matos, 2004). Os animais que entram numa exploração de engorda estão susceptíveis de serem expostos à maioria dos agentes patogénicos associados à DRB dentro de um curto período de tempo após a chegada (Griffin, 1998; Booker *et al.*, 1999).

Os principais agentes bacterianos envolvidos na DRB são *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus Somni*, e existem algumas indicações de que o *Mycoplasma bovis* possa ser um agente patogénico primário (Apley, 2006). Na Europa, o *Mycoplasma bovis* é responsável por pelo menos 25% a 30% dos casos de pneumonias em vitelos com DRB (Gevaert, 2006). A bactéria mais comumente isolada em animais com sintomatologia de DRB é a *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* (Rice, Carrasco-Medina, Hodgins & Shewen, 2007). Esta é uma bactéria comensal do tracto

respiratório superior, encontrada ao nível da nasofaringe. O serotipo A2 é encontrado em animais clinicamente sãos, mas na presença de “stress” e/ou infecção viral passa a predominar o serotipo A1 que possui elevada capacidade pneumopatogénica (Stilwell & Matos, 2004).

Os agentes virais incluem: Herpesvirus bovino de tipo 1 (BHV-1), Vírus respiratório sincicial bovino (BRSV), Vírus Parainfluenza do tipo 3 (PI-3), Vírus da diarreia viral bovina (BVDV) e o Coronavírus respiratório bovino. O Adenovírus Rinovírus, o Reovírus e o Enterovírus estão também associados com a DRB mas com menor importância (Callan & Garry, 2002). A infecção primária é causada por agentes virais, predispondo os pulmões à colonização bacteriana numa fase mais tardia quando os mecanismos de defesa do tracto respiratório estão comprometidos (Callan & Garry, 2002).

8 Diagnóstico da Doença Respiratória Bovina

O diagnóstico de patologia respiratória em bovinos é baseado na combinação do exame clínico, testes laboratoriais e necropsia. Para um diagnóstico definitivo dos agentes envolvidos na DRB é necessário recorrer a testes laboratoriais. Os métodos utilizados e as amostras recolhidas fornecem informações valiosas para investigar as causas de morbilidade e mortalidade num grupo de animais. Segundo Cooper e Brodersen (2010) os testes de diagnóstico devem ser seleccionados com base em vários critérios, incluindo a história clínica, a qualidade da amostra, os objectivos do produtor e factores económicos.

8.1 Métodos clássicos

A DRB caracteriza-se por elevadas taxas de morbilidade, sendo que um diagnóstico precoce e preciso é fundamental para reduzir a prevalência de DRB. Os métodos clássicos de detecção de animais doentes incluem avaliação visual dos animais uma ou duas vezes ao dia, observando-se diversos sinais clínicos característicos de patologia respiratória, como por exemplo a presença de corrimento nasal ou ocular, depressão, letargia, diminuição da condição corporal, dispneia e tosse. Os animais sintomáticos com temperatura rectal superior a 39,7°C devem receber tratamento terapêutico (Duff & Galyean, 2007). Perino e Apley (1998) definiram um sistema de classificação de sinais clínicos relacionados com DRB, elaborando uma escala numérica de 0 a 4 classificando os animais em termos clínicos de normal (0) a depressão severa (4), e de acordo com este protocolo os animais com temperatura rectal superior a 40°C e classificação clínica superior a 1 deveriam receber tratamento terapêutico. Dada a natureza subjectiva destes protocolos, a identificação de animais doentes com DRB nem sempre é precisa. Num estudo realizado por Wittum, Woollen, Perino e Littledike (1996) baseado em observações de lesões pulmonares ao

abate indicativas de DRB, os autores identificaram que estas lesões estavam presentes em 68% dos bovinos que não foram tratados para DRB. Uma ferramenta valiosa para a monitorização do diagnóstico e do tratamento da DRB é avaliar as lesões pulmonares ao abate (Galyen, et al., 1999). Algumas das falhas na detecção de animais mórbitos usando os métodos actuais para o diagnóstico de DRB podem estar relacionadas com o comportamento predador/presa, uma vez que para os animais o pessoal técnico funciona como o predador, mascarando os sinais de fraqueza, como por exemplo, doença, depressão e claudicação [Noffsinger & Locatelli (2004) citado por Duff & Galyen (2007)],

8.2 Métodos laboratoriais

Os sinais clínicos associados com a DRB raramente são patognómicos, o que torna difícil identificar o agente (s) envolvido (s) exclusivamente com base no exame clínico. Para além disso as infecções por vários agentes são comuns, portanto os testes laboratoriais são fundamentais para um bom diagnóstico no caso de DRB.

A avaliação laboratorial de exsudados e secreções provenientes do tracto respiratório constitui uma útil e valiosa ferramenta no diagnóstico de DRB. As zaragatoas nasais ou da nasofaringe e o material aspirado de lavagens bronco-alveolares permitem o isolamento de vírus, bactérias, fungos, análises citológicas e podem ainda ser submetidos a testes de sensibilidade antibióticos (Radostits et al., 2002). As zaragatoas nasais podem ser utilizadas em substituição das lavagens bronco-alveolares como método de diagnóstico ante-mortem (Cooper & Brodersen, 2010), estas podem ser úteis para o despiste de BHV-1, BRSV e micoplasmas mas não de bactérias (Stilwell & Matos, 2004). Amostras de zaragatoas da nasofaringe podem ser usadas como método de diagnóstico para infecções respiratórias em vitelos associadas com *Manheimia haemolytica* e *Mycoplasma bovis* [Godinho et al. (2007) citado por Cooper & Brodersen (2010)]. Num estudo efectuado pelos mesmos autores, revelou que os agentes isolados ao nível da nasofaringe eram altamente representativos dos agentes isolados ao nível do pulmão. A lavagem bronco-alveolar é um excelente meio de diagnóstico para afecções respiratórias inferiores permitindo uma abordagem de diagnóstico mais ampla que as zaragatoas nasais ou da nasofaringe (Cooper & Brodersen, 2010). As amostras podem ser úteis para o diagnóstico diferencial de vírus, bactérias, parasitas e fungos, recorrendo-se a diferentes meios de cultura, ao PCR (polymerase chain reaction) ou à imuno-histoquímica (IHQ). Para a recolha de material bronco-alveolar é necessário uma boa contenção do animal e anestesia local. Como esta é uma técnica asséptica é necessário evitar a contaminação pelo tecido cutâneo na zona da punção traqueal (Cooper & Brodersen, 2010).

8.3 Outros métodos de diagnóstico

8.3.1 Termografia

Recentemente surgiram abordagens tecnológicas para um diagnóstico precoce de DRB baseados na avaliação da temperatura corporal. Schaefer et al. (2007) realizou um estudo utilizando a termografia para detectar animais mórbitos. As imagens da região orbital dos vitelos, fornecidas através da termografia revelaram ser eficazes na detecção precoce de animais com DRB numa fase inicial da doença. Os resultados para sensibilidade e especificidade foram 67,6% e 86,8%, respectivamente, quando se recorre à termografia para avaliar a temperatura da região orbital como diagnóstico de DRB comparando com os métodos clássicos: temperatura rectal, corrimento nasal, tosse e aumento da contagem de células inflamatórias (Schaefer et al., 2007). Este método possui algumas vantagens, uma vez que fornece os resultados em tempo real e é um método não invasivo. Estes dados são valiosos, uma vez que permitem um tratamento mais focalizado e na fase inicial de doença, e assim diminuir o sofrimento animal, limitar as perdas económicas com tratamentos e reduzir a probabilidade de ocorrer resistência a antibióticos (Schaefer et al., 2007). Da mesma forma o uso de implantes de radiofrequência com sondas de temperatura pode permitir a detecção de doenças que provocam o aumento da temperatura corporal (Reid & Dahl, 2005).

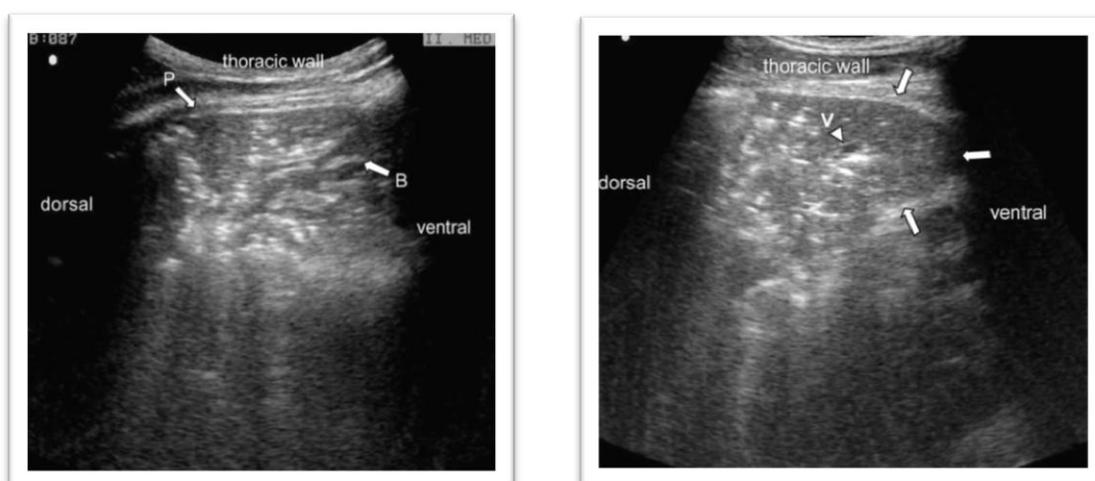
8.3.2 Ecografia

A ecografia torácica é um método de diagnóstico não invasivo e uma ferramenta muito prática que permite uma avaliação precisa da pleura e de algumas lesões pulmonares superficiais, auxiliando os clínicos no diagnóstico e tratamento de diversas patologias torácicas (Babkine & Blond, 2009). Apesar das características fisiológicas do tecido pulmonar, em que as ondas de ultra-som são incapazes de penetrar em estruturas preenchidas com ar, como é o caso dos alvéolos, a ecografia é um meio adequado para diagnosticar algumas condições patológicas da cavidade torácica (Flöck, 2004). A aparência ultra-sonográfica da superfície pulmonar e do líquido da cavidade pleural fornece informação valiosa para estabelecer um prognóstico (Scott, 1998). Como a superfície pulmonar está frequentemente afectada no caso de patologias pulmonares (Scott, 1998), através da ecografia torácica é possível diagnosticar broncopneumonia, consolidação pulmonar, derrame pleural e enfisema pulmonar e pleural (Flöck, 2004). Na maioria dos casos de DRB, as lesões pulmonares encontram-se predominantemente nos lobos craneoventais, por isso, é recomendável iniciar o exame ecográfico nessa zona (Scott, 1998). Num estudo realizado pelo mesmo autor com equinos e bovinos com patologia pulmonar, a substituição do ar alveolar por líquido torna o parênquima pulmonar hipocogénico (figura 7). A superfície da pleura visceral pode surgir irregular sendo este um sinal de consolidação pulmonar. Os artefactos hiperecogénicos, denominados cauda de cometa, são formados por pequenas

acumulações de exsudados, sangue, muco, líquido de edema, células tumorais ou por fibrose devido a lesões crônicas de pneumonia (Flöck, 2004).

Para Jung e Bostedt (2004) o recurso a este método de diagnóstico permite uma rápida avaliação e classificação da gravidade, da extensão e do tipo de lesão pulmonar, permitindo complementar o exame clínico.

Figura 7 **A**: ecografia pulmonar de um vitelo com pneumonia (5 MHz): o tecido pulmonar é hipocogénico no campo pulmonar cranial, as zonas hiperecogénicas junto às paredes brônquicas representam inclusões de ar, P representa a pleura. **B**: consolidação pulmonar no lobo pulmonar cranial (setas), com ecogeneidade hepática. Adaptado de Flöck, 2004.



8.3.3 Comportamento

A observação comportamental dos animais pode também ter valor no diagnóstico de DRB (Sowell et al., 1999). Por exemplo diferenças no comportamento de ingestão de alimento e água entre animais sãos e animais doentes pode ser uma ferramenta útil para um diagnóstico precoce de DRB. Num estudo realizado pelos mesmos autores recorrendo à utilização de sistemas com tecnologia de radiofrequência para avaliar este tipo de comportamento, demonstrou que a ingestão diária de alimento está mais correlacionada com a morbidade do que o comportamento de abeberamento. Segundo Sowell et al. (1999) há uma diminuição de 30% no tempo de alimentação em animais com sintomas clínicos de DRB comparando com animais saudáveis, e as diferenças de consumo são mais pronunciadas nos primeiros 4 dias após a chegada dos animais à exploração.

8.3.4 Proteínas da fase aguda

As proteínas da fase aguda podem igualmente ser um instrumento útil como método de diagnóstico e prognóstico em animais com patologia respiratória. Várias já foram avaliadas em bovinos com doença respiratória, incluindo o fibrinogénio, a haptoglobina, a proteína

amilóide A sérica, ceruloplasmina e proteína C-reactiva (Carter et al., 2002). A concentração de haptoglobina pode ser um indicador de morbilidade de DRB (Carter et al., 2002). Para Berry et al. (2004) a concentração de heptaglobina pode ser útil na previsão do número de tratamentos necessários em animais com sintomatologia, e Wittum et al. (1996) e Carter et al. (2002) sugerem que esta mesma proteína pode ter valor na avaliação da eficácia do tratamento de DRB. O fibrinogénio foi utilizado por Berry et al. (2004) como indicador precoce de ocorrência de DRB. A combinação do fibrinogénio com a haptoglobina apresentou uma sensibilidade de 71% e especificidade de 83% para o diagnóstico de doença respiratória, comparando com os métodos clássicos de identificação de animais mórbidos como o exame físico, lavagens bronco-alveolares, serologia e necrópsia (Humblet, Coghe, Lekeux & Godeau, 2004).

8.4 Necrópsia

A necrópsia é uma ferramenta útil quando surge um surto de doença respiratória em que o diagnóstico não é definitivo (Radostits et al., 2002). A necrópsia fornece ao clínico indicações preciosas quanto à epidemiologia e etiologia de um determinado surto, permitindo orienta-lo nas decisões terapêuticas ou profiláticas (Stilwell & Matos, 2004). O tipo e as características das lesões macroscópicas pulmonares em associação com a história clínica do grupo de animais afectados por DRB permite ao clínico estabelecer um diagnóstico diferencial e fornece orientações para a recolha de amostras adequadas para o diagnóstico anatomopatológico (Andrews & Kennedy, 1997). Para Epperson (1999) a observação e o registo de lesões pulmonares constituem instrumentos valiosos para a produção primária de bovinos, pois permite avaliar a prevalência dos casos subclínicos de DRB, que são responsáveis por perdas económicas.

As amostras para o diagnóstico pós-mortem devem ser preferencialmente de animais não tratados para DRB e em fase inicial de doença (Cooper & Brodersen, 2010). Deve-se evitar a recolha de material para diagnóstico histopatológico proveniente de animais com pneumonia crónica e que foram sujeitos a vários tratamentos com diferentes antibióticos, uma vez que poderá limitar o diagnóstico laboratorial. As lesões macroscópicas geralmente estão localizadas nos lobos pulmonares anteriores e ventrais, mesmo nos casos mais severos os lobos pulmonares dorsais podem não evidenciar lesões pulmonares macroscópicas (Radostits et al., 2002). Segundo o mesmo autor as características macroscópicas das lesões pulmonares variam bastante, dependendo do tipo de pneumonia presente: broncopneumonia, pneumonia fibrinosa e pneumonia intersticial.

9 Prevenção e controlo da DRB

O principal objectivo de um programa de prevenção é minimizar a incidência e as perdas económicas associadas com a mobilidade e mortalidade com a DRB e outras doenças, através do planeamento e gestão de programas de prevenção e controlo, permitindo aumentar o rendimento da carcaça (Edwards, 2010). Pretende-se diminuir eficazmente a exposição a uma elevada carga de agentes patogénicos, estimular a imunidade do grupo e controlar os factores de risco associados com a DRB. Segundo Edwards (1996) os primeiros 45 dias após a chegada dos animais à exploração de engorda, constituem o período de tempo mais crítico para o desenvolvimento de DRB.

Os programas de prevenção e controlo de DRB podem ser executados em duas fases distintas da produção primária de carne de bovino: na fase pré-desmame ou na fase pós-desmame; os programas pré-desmame envolvem o pré-condicionamento, vacinação na exploração de origem e controlo da dieta, e os programas pós-desmame incluem vacinação na exploração de chegada, gestão da dieta, biossegurança e programas de metafilaxia.

O termo pre-condicionamento foi introduzido pela primeira vez por John Herrick em 1695 (Miksch, 1984, citado por Edwards, 2010). Estes programas são o método mais eficaz para prevenir problemas associados com a incidência de DRB (Speer, Young & Roeber, 2001). Os principais componentes de um programa de pre-condicionamento incluem a vacinação dos animais 30-40 dias antes da comercialização, castração dos machos e manejo nutricional (White & Larson, 2009). O principal objectivo é reduzir o “stress” envolvido no processo de comercialização de carne (Cole et al., 1988). Num estudo realizado por Macartney, Bateman e Ribble (2003), os vitelos que não são submetidos a programas de pre-condicionamento têm 6,8% mais probabilidade de serem tratados para DRB.

Além dos programas de vacinação no pré-condicionamento antes da comercialização dos animais, os programas de vacinação à chegada também são amplamente utilizados. A literatura sobre a eficácia da vacinação dos animais à chegada da exploração tem sido variada ao longo dos anos. Existem vários estudos que comparam a eficácia de vacinas multivalentes com monovalentes, mas há falhas na comparação com controlos negativos (Castrucci, 2002; Perrett et al., 2008). Portanto, é difícil determinar ao certo se a vacinação à chegada diminui significativamente a incidência de DRB.

Programas de medicina preventiva como a metafilaxia há muito que são utilizados para diminuir a morbidade associada à DRB. Lofgreen (1983) demonstrou o benefício do tratamento profilático de um grupo de vitelos à chegada de um “feedlot”, através do uso de oxitetraciclina conseguindo reduzir a morbidade de 63,3% para 7,1%. Desde o trabalho desenvolvido por Lofgreen, vários outros estudos têm demonstrado a eficácia de alguns

antibióticos que usados profilaticamente diminuem a incidência de DRB (Galyen, Gunter & e Malcolm-Callis 1995; Cusack, 2004; Booker et al., 2007).

As práticas de prevenção e controlo descritas acima concentram-se na melhoria do estatuto imunitário do animal, mas através de medidas de biossegurança também é possível reduzir o impacto desta patologia numa exploração. Segundo Callan e Garry (2002) as medidas de biossegurança permitem controlar a incidência de DRB através da instituição de uma série de práticas de higiene e manejo que reduzem a exposição e a transmissão a agentes patogénicos. Mesmo com medidas de biossegurança é difícil controlar os agentes patogénicos, uma vez que os animais são provenientes de várias explorações diferentes e depois agrupados (Brandt, Sanderson, DeGroot, Thomson & Hollis, 2008) e alguns agentes de DRB são ubíquos e não podem ser eliminados da população animal. Contudo, algumas medidas de biossegurança são praticáveis como por exemplo, prevenir a exposição de animais saudáveis a agentes patogénicos separando-os dos animais doentes.

V. MATERIAL E MÉTODOS

10 Relação entre temperamento, níveis de cortisol plasmático e cortisol salivar em vitelos à entrada na engorda e susceptibilidade a Doença Respiratória Bovina

10.1 Objectivos

Este trabalho pretendeu avaliar a relação que pode existir entre a resistência ao “stress” e a susceptibilidade à Doença Respiratória Bovina (DRB). A escolha do tema prendeu-se com o facto de não estar ainda estudado esta possível relação entre animais mais sensíveis ao “stress” e a susceptibilidade à DRB. Assim num grupo de animais sujeitos às mesmas condições ambientais e de manejo, existe sempre uma percentagem de indivíduos que não apresenta sinais de DRB ou apresentam sintomas de uma forma mais benigna, e importa saber o porquê da aparente resistência. Para este fim utilizou-se o cortisol como a hormona indicadora de animais em “stress”, e as recolhas desta foram efectuadas quer ao nível do plasma quer ao nível da saliva. Pretendeu-se também avaliar se houve ou não diferenças no doseamento do cortisol por estes dois métodos de recolha, e se estes são fiáveis para utilizar na espécie bovina. O “stress” nos animais foi também avaliado de forma subjectiva através da classificação do comportamento dos indivíduos na respectiva “box”. Estatisticamente procurou-se averiguar se existe ou não correlação entre os níveis de cortisol e temperamento dos animais com a morbilidade e mortalidade à DRB.

10.2 Descrição da exploração

A exploração em causa localiza-se no concelho de Pegões, dedica-se à engorda de vitelos machos de raça predominantemente Holstein-frísia e possui um efectivo de 900 animais. Os animais que chegam a esta exploração têm idade média de 3 semanas e são provenientes de diferentes explorações de produção leiteira. Os vitelos são transportados por via rodoviária em grupos de 30 a 40 animais. Na exploração estes são alojados individualmente em “iglos” no exterior ou em “boxes” no interior de pavilhões. Os animais foram todos submetidos ao mesmo tipo de manejo, sendo a alimentação durante os primeiros 60 dias após a chegada à exploração baseada em leite de substituição (composição em anexo 1), concentrado e água *ad libitum*; os animais foram vacinados após duas semanas da sua chegada à exploração com vacina tetravalente inactivada contra BHV1, BRSV, BVD e PI-3; após os 60 dias os animais são desmamados e agrupados em lotes com cerca de 50 animais até serem posteriormente comercializados quando atingem 120 a 130 Kg de peso vivo.

10.3 Recolha de dados

Para o presente estudo utilizou-se um total de 73 vitelos para a recolha de amostras. Todos os animais foram sujeitos a um exame físico prévio, sendo excluídos do estudo animais com sinais clínicos de doença. Os dados dos animais incluem: o número de identificação individual, género, raça, exploração de origem, data de chegada, exame físico, informações da morbilidade (diagnóstico, tratamento e data (s)), informações da mortalidade (sim ou não, data), espaço de fuga, reacção à entrada do operador, reacção à recolha de amostra de sangue e doseamento do cortisol. Uma vez que os recursos financeiros para aquisição do *kit* comercial (Spectria Cortisol RIA®) foram limitados, houve necessidade de racionalizar os testes para o doseamento de cortisol. Sendo que o doseamento de cortisol plasmático foi efectuado em 66 animais e em 47 destes animais foi também avaliado o cortisol salivar.

10.3.1 Recolha de amostras para o doseamento do cortisol plasmático e salivar

A recolha de amostras para o doseamento do cortisol foi efectuada em duas fases: no dia seguinte à entrada dos animais na exploração (D0) e após 8 dias de adaptação dos indivíduos à exploração (D8). Deste modo pretendeu-se avaliar o impacto do transporte e mudança de ambiente no animal, para além da sua capacidade de adaptação ou a manutenção de um estado de “stress” crónico. A colheita das amostras foi efectuada sempre durante o período da manhã, de modo a evitar variações relacionadas com o ciclo circadiano do cortisol nas avaliações hormonais propostas.

Para o doseamento do cortisol plasmático foram colhidas amostras de sangue (5ml) da veia jugular em tubos com anticoagulante EDTA (S-Monovette®), conforme representado na figura 8. Estas foram armazenadas em refrigeração, sendo centrifugadas no prazo de 1-2 horas, e o plasma congelado a -20°C, para posterior análise de quantificação de cortisol.

As amostras de saliva foram obtidas através de um dispositivo próprio para a colheita (Salivette®), como ilustrado na figura 9.

Figura 8 Recolha de amostra de sangue para tubo S-Monovette®. (Original da autora).

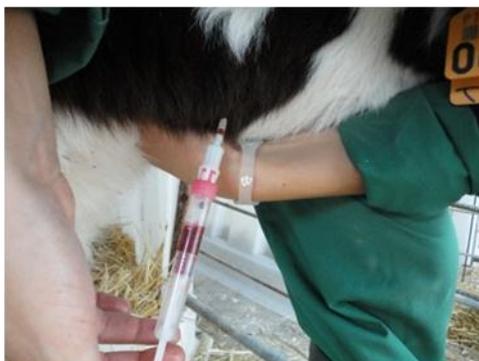
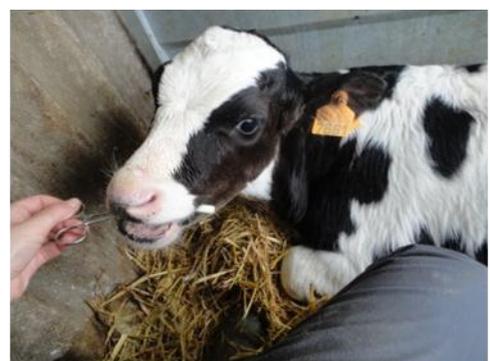


Figura 9 Recolha de amostra de saliva com Salivette®. (Original da autora).



Os animais mastigaram o rolo de algodão do Salivette® até que este ficasse embebido de saliva, sendo que este processo demorou em média menos de 2 minutos. A saliva foi posteriormente extraída dos rolos de algodão através da centrifugação durante 20 minutos. O volume recolhido variou entre 0,5 a 1 ml de saliva por amostra.

10.3.2 Avaliação do comportamento e temperamento

Para avaliar o comportamento e temperamento dos animais foram utilizados três parâmetros: o espaço de fuga, a reacção do animal à entrada do operador e a reacção à recolha de amostras de sangue. O espaço de fuga é um parâmetro de avaliação objectivo, em que os animais foram classificados consoante a distância de fuga destes ao operador em >1m, <1m e toque. Para realizar este teste, o operador aproximava-se lentamente do animal, quando estes estavam levantados e com a cabeça fora ou perto da “box”. Dependendo da distância a que os animais recuavam ou reagiam à presença do operador, estes foram classificados em >1m, <1m ou toque. Quanto à reacção de entrada, esta foi baseada na observação visual do comportamento do animal à entrada do operador. Dada a natureza subjectiva deste tipo de avaliação, esta foi sempre realizada pelo mesmo operador, que classificou a reacção dos indivíduos em pacífica, ligeira ou violenta. Para determinar a reacção à recolha de sangue, os animais foram classificados numa escala de 1 a 3, sendo 1 animais calmos que não reagiram na recolha e 3 animais muito temperamentais que se debateram durante a contenção para a colheita de amostras sanguíneas. Esta classificação dos animais foi sempre realizada pelo mesmo operador.

10.3.3 Avaliação da morbilidade

Durante o ensaio registaram-se durante um período de dois meses após a data de chegada dos animais à exploração, todos os casos de vitelos com sinais clínicos de DRB, os tratamentos efectuados e o resultado destes, as respectivas datas e a mortalidade. O diagnóstico de Doença Respiratória Bovina foi efectuado pelos funcionários da exploração em questão, baseando-se nos sinais clínicos comuns desta patologia como tosse, corrimento nasal, prostração e aumento da temperatura rectal. Os animais identificados com DRB foram tratados com diferentes antibióticos, sendo o florfenicol (Resflor®), tulatromicina (Draxxin®), enrofloxacin (Baytril®) e sulfadoxina e trimetropim (Gorban®) os mais utilizados.

10.3.4 Doseamento do cortisol

O doseamento do cortisol plasmático e salivar foi determinado através de radioimunoensaio (RIA), utilizando um *kit* comercial (Spectria Cortisol RIA®, Orion Diagnostica Oy) que utiliza anticorpos anti-cortisol de coelho. O princípio deste teste baseia-se na competição de ligação de cortisol marcado e não marcado aos anticorpos anti-cortisol. Após a lavagem dos antigénios não ligados, a quantidade de cortisol marcada é inversamente proporcional a quantidade de cortisol presente na amostra. O doseamento de cortisol foi efectuado em duplicado sem extracção de amostra de plasma e saliva. O coeficiente de variação intra-ensaio foi de 4,7% e de 4,2% para as amostras de plasma e de saliva, respectivamente. O coeficiente inter-ensaio foi de 9,6 e 4,2 para os controlos CON4 (3,9-5,5 µg/dL) e CON5 (11,0-14,2 µg/dL), respectivamente (Multivalent Control Module, Siemens Healthcare Diagnostics, EUA) (Rodbard, 1974).

Uma vez que a concentração de cortisol plasmático não é idêntica à concentração de cortisol salivar, foram efectuadas de acordo com a bula do *kit* comercial (procedimento laboratorial em anexo 2) duas curvas de calibração, uma correspondente ao doseamento de cortisol plasmático e outra para o doseamento de cortisol salivar.

10.3.5 Tratamento estatístico

Os dados foram compilados numa folha de Excel XP. No tratamento de dados efectuados utilizou-se o programa estatístico SPSS, versão 17.

Para avaliar a relação entre a concentração de cortisol no D0 e D8, utilizou-se um teste t. Neste caso pretendeu-se comparar as médias entre CP0 e CP8, e CS0 e CS8, sendo estas variáveis quantitativas contínuas, e como em qualquer das amostras a sua dimensão é superior a 30, aplicou-se este teste. O teste t permite inferir sobre a igualdade de médias de duas amostras emparelhadas, isto é, cada caso é analisado duas vezes, em momentos diferentes, pois o mesmo animal é analisado em dois instantes, D0 e D8.

A relação entre os níveis de cortisol e os testes comportamentais no D0 e D8 foi feita através de um teste não paramétrico, o teste Kruskal-Wallis. O teste estatístico paramétrico para a comparação das médias entre dois ou mais grupos é o “One-Way Anova”, que para a sua aplicação é necessário verificar previamente os seguintes pressupostos: as observações dentro de cada grupo têm distribuição normal; as observações são independentes entre si e as variâncias de cada grupo são iguais entre si. Quando se violam os pressupostos do teste paramétrico a alternativa é a aplicação de um teste não paramétrico, que no caso do “One-Way Anova”, tem como teste alternativo o teste Kruskal-Wallis, este em vez de comparar as médias compara as medianas entre os diferentes grupos.

Para estudar a relação entre cortisol e morbidade utilizaram-se dois testes estatísticos. Como as variáveis estatísticas CP0, CP8, CS0 e CS8 são quantitativas contínuas, e o tamanho dos grupos entre o animal estar ou não doente é superior a 30, para as variáveis CP0 e CP8 aplicou-se um teste-t. Para as variáveis CS0 e CS8 utilizou-se o teste de Shapiro-Wilk, pois este é mais preciso sempre que o tamanho da amostra é inferior a 30.

O teste estatístico para comparar a proporção entre animal doente e os diferentes testes de temperamento foi o teste de independência do Qui-Quadrado.

VI. RESULTADOS

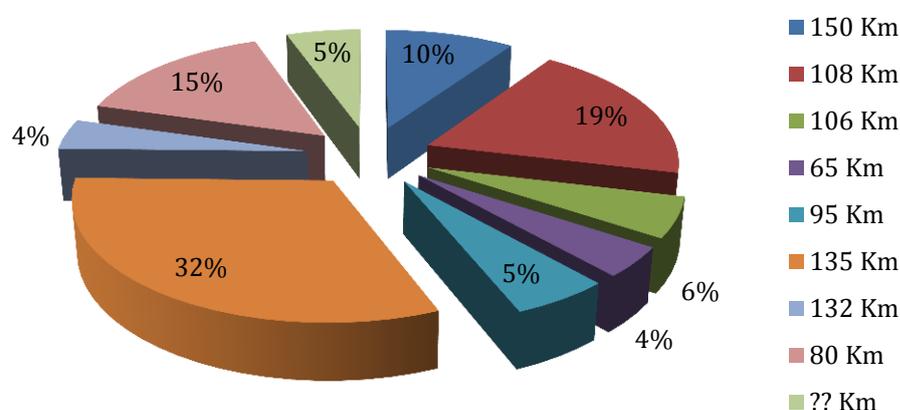
11 Estatística descritiva

Foi efectuada uma análise descritiva de todas as variáveis, sendo apresentada a frequência absoluta e relativa, em percentagem, para variáveis qualitativas e a média, desvio-padrão, máximos e mínimos para as variáveis quantitativas.

11.1 Transporte dos animais: distância percorrida

No gráfico 1 está representado a distribuição dos animais consoante a distância percorrida por via rodoviária desde a exploração de origem dos vitelos até à exploração de engorda onde foi realizado este estudo. Sendo que 10 % dos animais percorreram a distância máxima de 150 Km, 4 % percorreram a distância mínima de 65 Km e os animais percorreram em média aproximadamente 109 Km.

Gráfico 1 Distâncias percorridas pelos animais.



11.2 Resultados do doseamento de cortisol plasmático e salivar no dia 0 e dia 8

A média do cortisol plasmático e salivar no dia 0, é superior à média no dia 8. O valor máximo encontrado no dia 0 é também superior nas duas situações em comparação com o dia 8, como observado nas tabelas 2 e 3.

Tabela 3 Resultados do doseamento de cortisol plasmático no dia 0 (CP0) e dia 8 (CP8).

	CP 0	CP 8
N	66	64
Média	0,971	0,510
Desvio Padrão	1,136	0,361
Mínimo	<0,001	<0,001
Máximo	5,709	1,380

Tabela 4 Resultados do doseamento de cortisol salivar no dia 0 (CS0) e dia 8 (CS8).

	CS 0	CS 8
N	47	43
Média	0,141	0,102
Desvio Padrão	0,172	0,122
Mínimo	<0,001	0,001
Máximo	1,066	0,558

Para os resultados do cortisol plasmático no dia 8 (CP8) o número de indivíduos reduziu uma vez que dois destes morreram entre os dois momentos de colheita. No D0 os valores de cortisol plasmático para estes dois indivíduos foram 1,385 $\mu\text{g}/\text{dl}$ e 4,911 $\mu\text{g}/\text{dl}$, respectivamente.

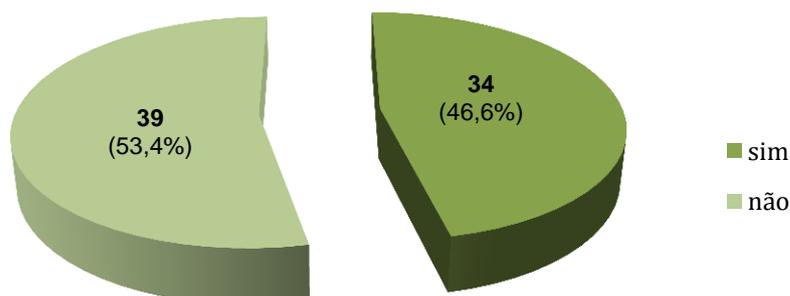
Nos resultados de cortisol salivar no dia 8 (CS8) o número de indivíduos também se reduziu em 4, sendo que 2 morreram e duas amostras não foram avaliadas porque houve necessidade de racionalizar o *kit* comercial para fazer os controlos do doseamento. Estas amostras encontram-se congeladas para serem processadas logo que houver verba disponível para o fazer.

O número de animais avaliados para o cortisol salivar não abrange todos os indivíduos da amostra populacional, uma vez que o *kit* comercial (Spectria Cortisol RIA®) não foi suficiente para dosear todas as amostras. Optou-se por fazer o doseamento do cortisol plasmático na maioria dos indivíduos do estudo, e o doseamento do cortisol salivar somente em alguns, uma vez que o o *kit* comercial (Spectria Cortisol RIA®) é mais sensível para o doseamento de cortisol plasmático.

11.3 Avaliação da morbilidade

A morbilidade foi avaliada durante um período de dois meses após a chegada dos animais à exploração de engorda. Durante este período quase metade dos indivíduos foi diagnosticado com DRB (gráfico 2).

Gráfico 2 Morbilidade por DRB.



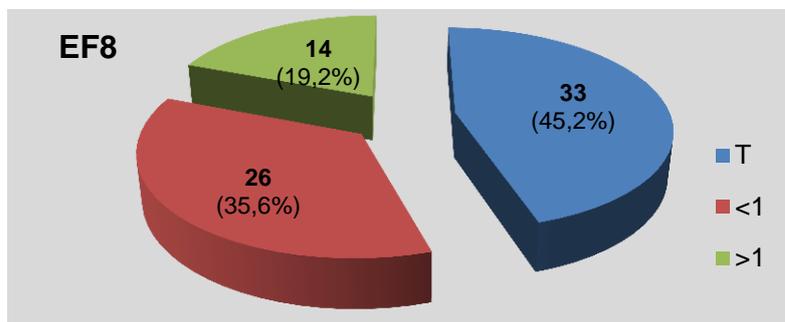
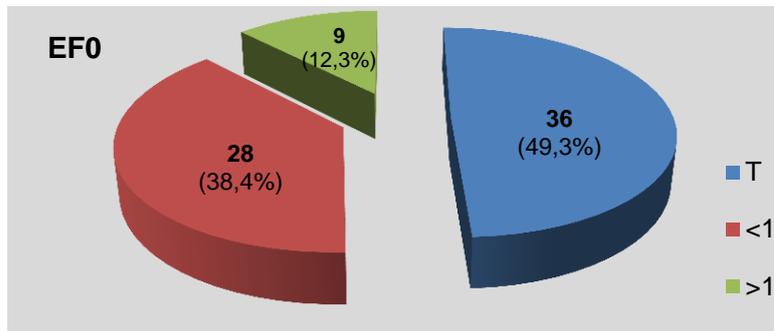
11.4 Testes de temperamento

Conforme representado nos gráficos 3, 4 e 5 aproximadamente 50% dos indivíduos apresentou um temperamento calmo no dia 0 em relação aos testes para avaliação do temperamento aos quais estiveram sujeitos: espaço de fuga, reacção à entrada do operador e reacção à recolha de amostra de sangue. Numericamente o número de indivíduos é semelhante para cada classe de classificação nos diferentes testes de temperamento.

Para o dia 8 os resultados dos testes de avaliação do temperamento dos animais revelam uma maior variação em comparação com o dia 0. A percentagem de animais mais temperamentais manteve-se mais ou menos idêntica ao dia 0, mas no dia 8 o número de animais com reacção do tipo ligeira para o teste de reacção à entrada do operador e o número de indivíduos com reacção do tipo 3 para o teste de reacção à recolha de amostra de sangue aumentou em comparação com o dia 0.

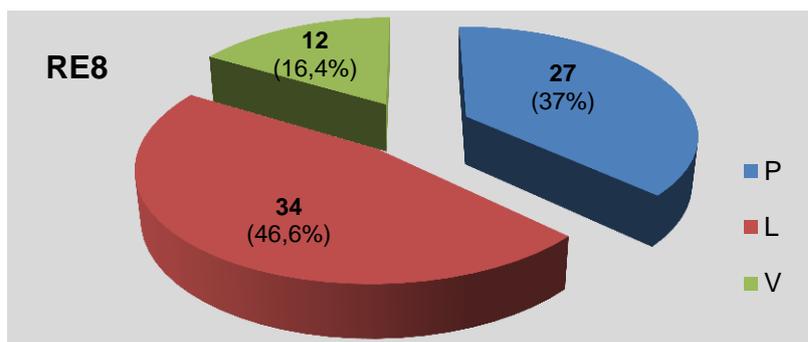
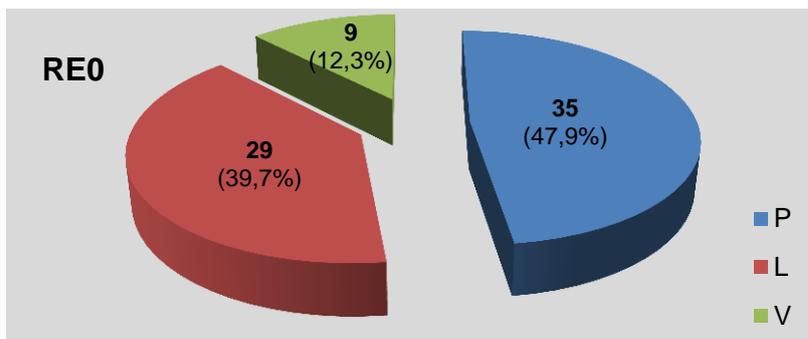
11.4.1 Espaço de fuga

Gráfico 3 Espaço de fuga no dia 0 e dia 8. Em que T (toque), <1 (<1metro) e >1 (>1metro).



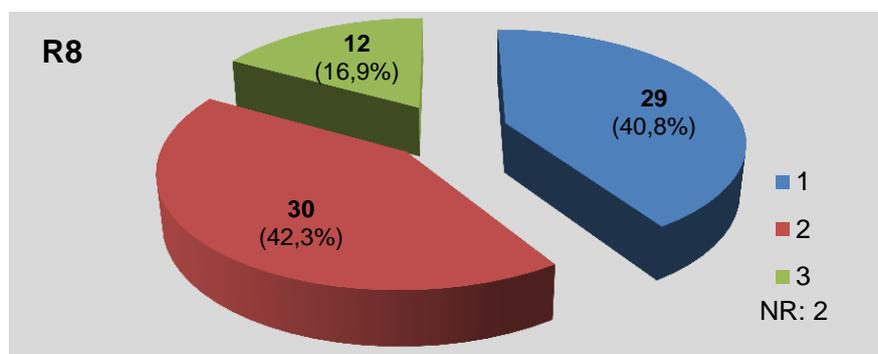
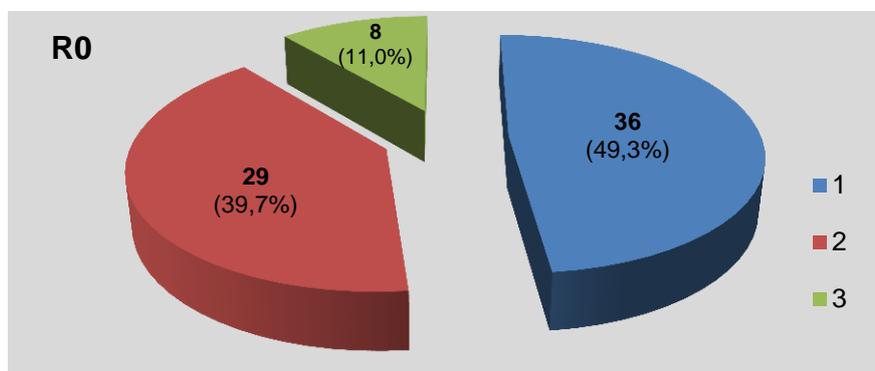
11.4.2 Reacção à entrada do operador

Gráfico 4 Reacção à entrada do operador no dia 0 e dia 8. Em que P (pacífica), L (ligeira) e V (violenta)



11.4.3 Reacção à recolha de amostra de sangue

Gráfico 5 Reacção à recolha de amostra de sangue no dia 0 e dia 8. A escala da variável 'Reacção à colheita' é de 1 a 3, onde 1 representa a reacção mais pacífica



12 Análise da relação entre “stress”, cortisol, temperamento e morbidade à DRB

12.1 Relação entre a concentração de cortisol no D0 e D8

Tabela 5 Resultado do teste t para a comparação entre CP0 e CP8.

	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Pair 1 CP_0 - CP_8	,393281	,940163	,117520	,158435	,628127	3,346	63	,001

Como Sig.=0,001, inferior a 0,05, pode-se afirmar com um grau de confiança de 95% que os valores de CP0 são significativamente superiores aos valores de CP8. Sendo

estatisticamente significativo a diferença da concentração de cortisol plasmático entre o dia 0 e o dia 8.

Tabela 6 Resultado do teste t para a comparação entre CS0 e CS8.

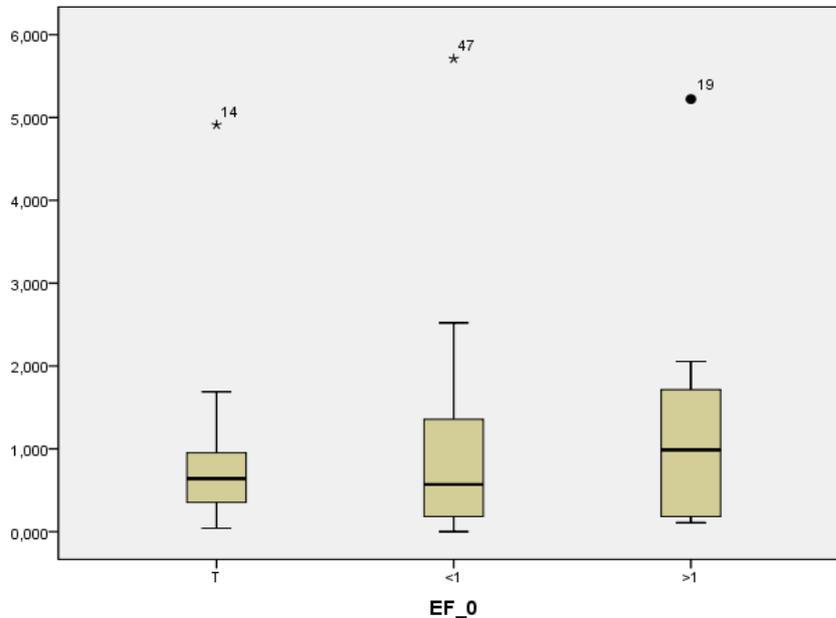
		Paired Differences							
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference		t	df	Sig. (2-tailed)
					Lower	Upper			
Pair 1	CS_0 - CS_8	-,016905	,142342	,021964	-,027452	,061262	,770	41	,446

Como Sig.=0,446, superior a 0,05, pode-se comprovar com um grau de confiança de 95% que os valores de CS0 não são significativamente diferentes aos valores de CS8.

12.2 Relação entre níveis de cortisol e testes comportamentais no dia 0

12.2.1 Espaço de fuga dia 0 (EF0) e concentração de cortisol dia 0

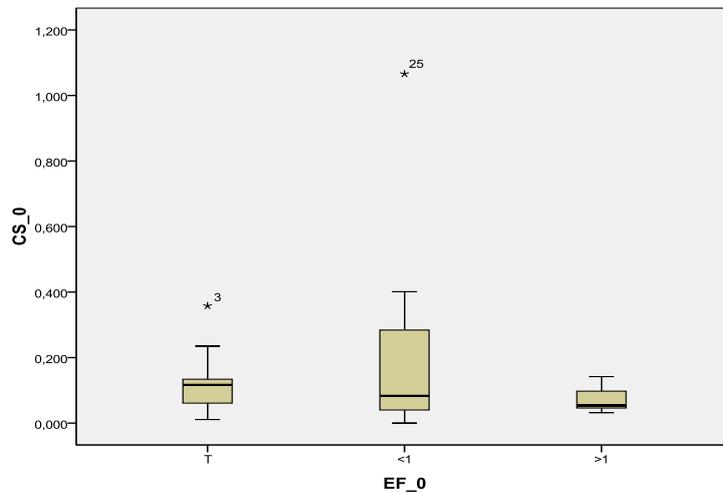
Figura 10 Teste de comparação das médias entre EF0/CP0.



Na figura 10 verifica-se que, a mediana de CP0 é superior nos animais classificados com espaço de fuga >1metro, sendo também os indivíduos deste grupo que apresenta maiores variações na concentração de cortisol plasmático no dia 0. No entanto, não se verificaram

diferenças estatisticamente significativas entre a CP0 e o EF toque, EF <1metro e EF >1metro (anexo 3).

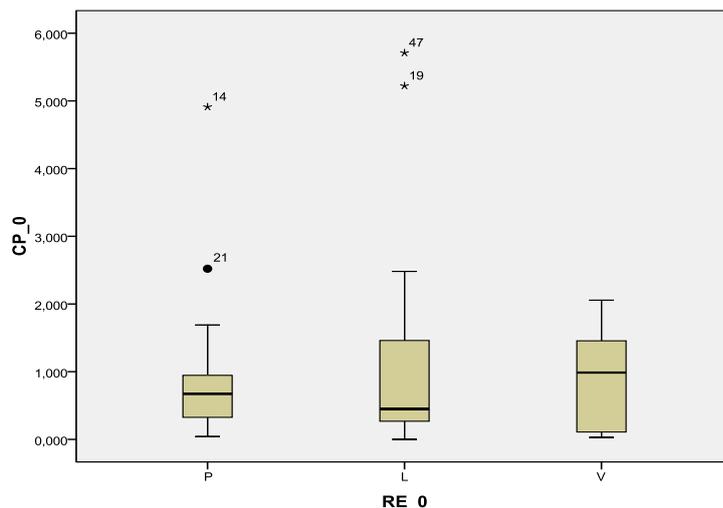
Figura 11 Teste de comparação das médias entre EF0/CS0.



Na figura 11 a maior variação da concentração de cortisol salivar encontra-se no grupo de animais com EF <1metro, por outro lado são os indivíduos do grupo EF Toque que possuem a mediana de cortisol salivar mais elevada. Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre a concentração de cortisol salivar no dia 0 e os diferentes grupos (anexo 4).

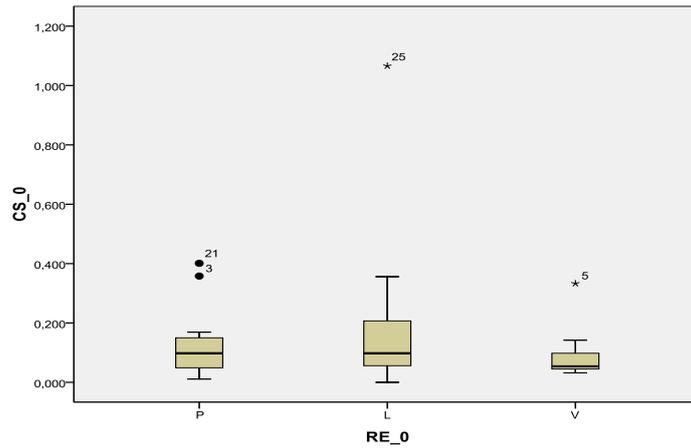
12.2.2 Reacção à entrada do operador dia 0 (RE0) e concentração de cortisol dia 0

Figura 12 Teste de comparação das médias entre RE0/CP0.



Os animais classificados com RE violenta (figura 12) são os que possuem maior concentração de cortisol plasmático, sendo também os indivíduos deste grupo que apresentam maior variação na concentração de cortisol plasmático no dia 0. Verifica-se que não há diferenças estatisticamente significativas na comparação de CP0 e os diferentes grupos de RE0 (pacífica, ligeira e violenta) (anexo 5).

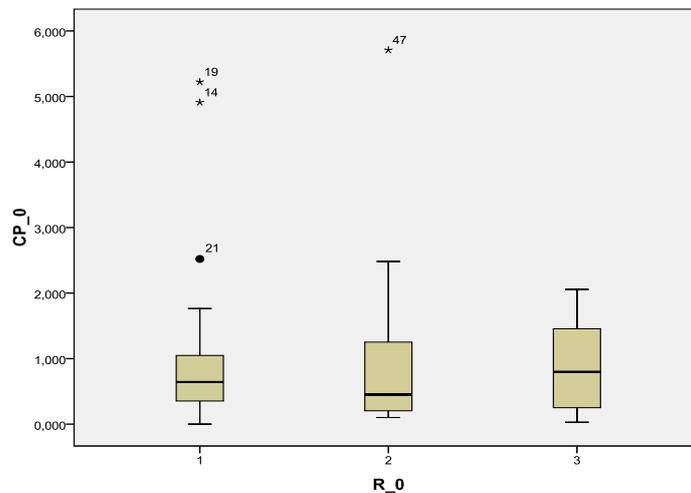
Figura 13 Teste de comparação das médias entre RE0/CS0.



Na figura 13 verifica-se que, a mediana de CS₀ é ligeiramente superior nos indivíduos classificados com RE pacífica, e o grupo de RE ligeira é o que revela maior variação na concentração de cortisol salivar no dia 0. Nesta análise também não se verificaram diferenças estatisticamente significativas (anexo 6).

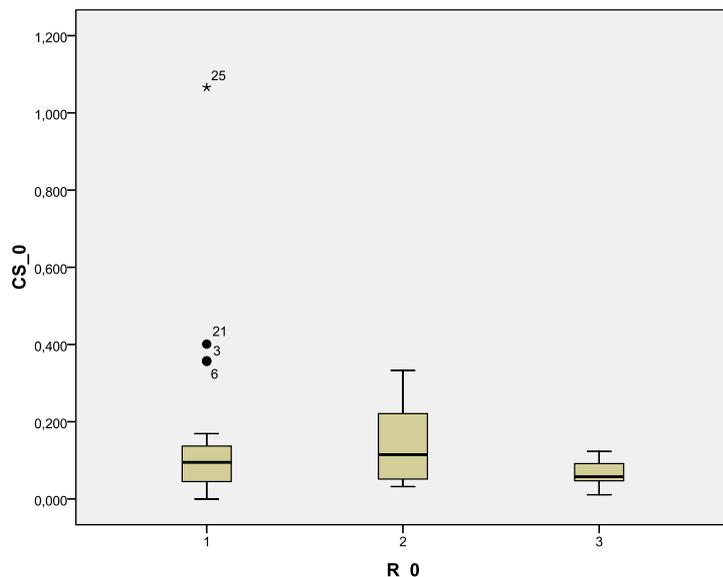
12.2.3 Reacção à recolha de amostra de sangue dia 0 (R0) e concentração de cortisol dia 0

Figura 14 Teste de comparação das médias entre R0/CP0.



Na figura 14 são os animais classificados como 3 no teste de reacção à recolha, isto é, que não colaboraram com a recolha de amostra de sangue que possuem maior mediana de concentração de cortisol plasmático. Contudo como P é superior a 0,05 não existem diferenças nos grupos em estudo (anexo 7).

Figura 15 Teste de comparação das médias entre R0/CS0.

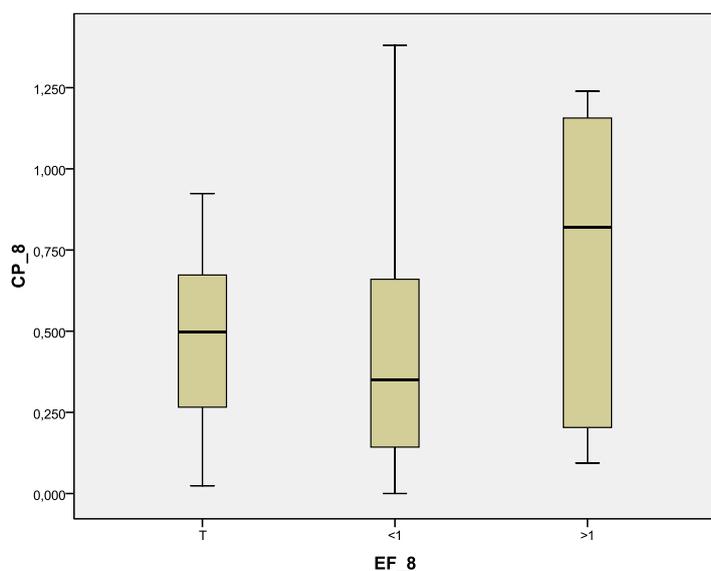


Na figura 15, o grupo de animais classificados como 2 no teste reacção à recolha de amostra de sangue são os que possuem maior variação na concentração de cortisol salivar. Por outro lado, são os animais que menos colaboram na recolha de sangue, grupo 3 que possui menor concentração de cortisol salivar. Nesta situação o valor de P é superior a 0,05 e não existe diferenças entre os grupos em estudo (anexo 8).

12.3 Relação entre níveis de cortisol e testes comportamentais no dia 8

12.3.1 Espaço de fuga dia 8 (EF8) e concentração de cortisol dia 8

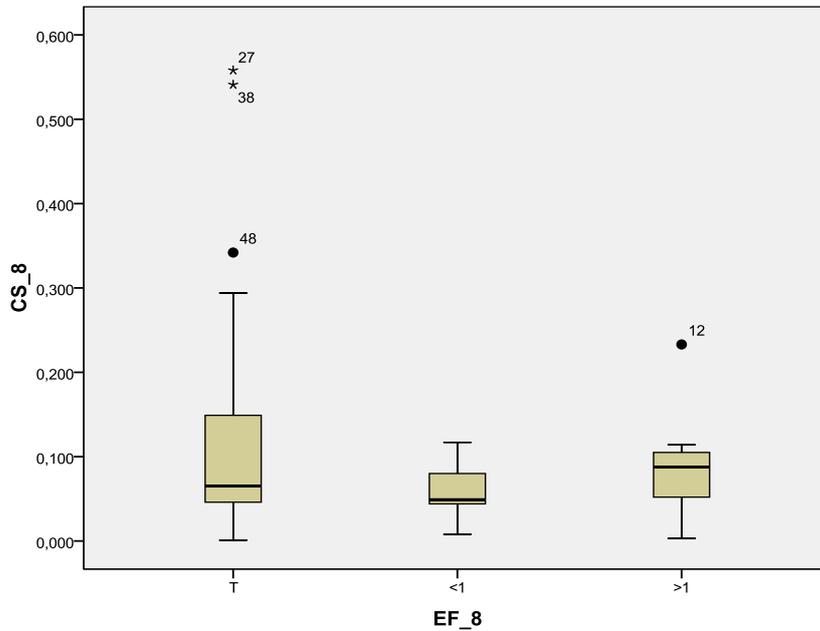
Figura 16 Teste de comparação das médias entre CP8/EF8.



Na figura 16 os animais classificados com espaço de fuga >1metro são os que apresentam o valor médio de cortisol plasmático mais elevado no dia 8, em comparação com os

restantes dois grupos. É também neste mesmo grupo onde existe maior variação dos valores da concentração de cortisol plasmático no dia 8. Uma vez que nesta situação o valor de P é superior a 0,05 não existem diferenças estatisticamente significativas entre CP8 e EF8 (anexo 9).

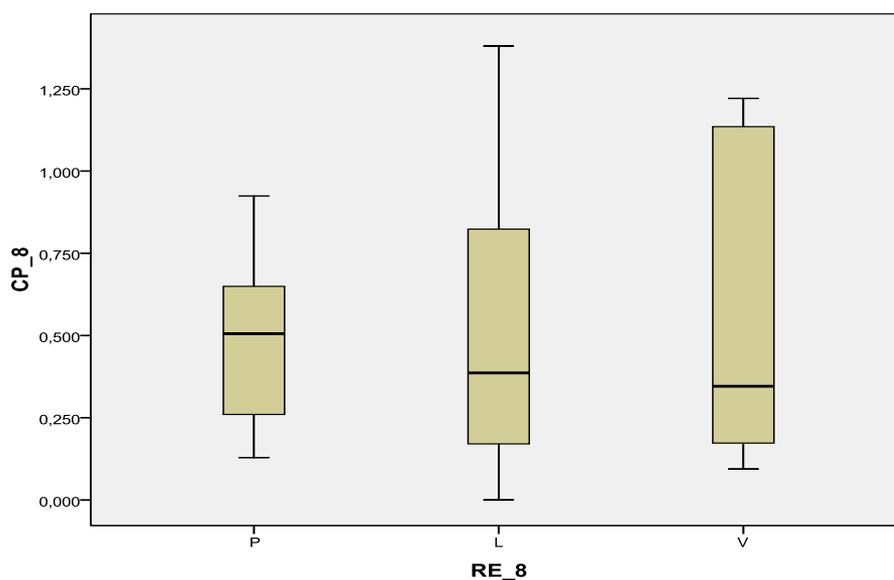
Figura 17 Teste de comparação de médias entre CS8/EF8.



Pode-se verificar na figura 17 que o valor da mediana de cortisol salivar é mais elevado no grupo de indivíduos com espaço de fuga >1metro, mas o valor de P =0,301, logo superior a 0,05, pelo que não existem diferenças entre os grupos em estudo (anexo 10).

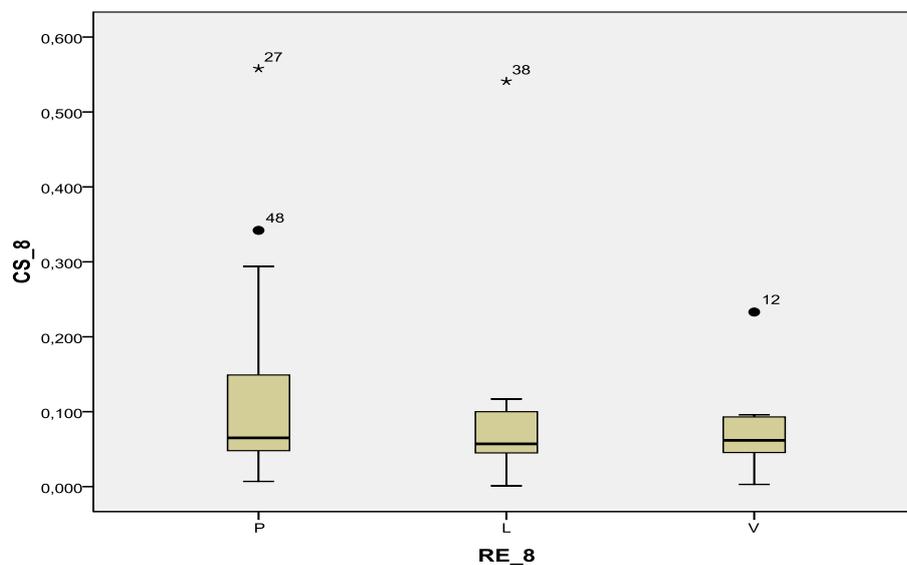
12.3.2 Reacção à entrada do operador dia 8 (RE8) e concentração de cortisol dia 8

Figura 18 Teste de comparação de médias entre CP8/RE8.



Para o dia 8 (figura 18) os animais classificados como pacíficos na reacção à entrada do operador no interior da “box” são os que apresentam um valor médio de cortisol mais elevado, sendo este valor menor no grupo de indivíduos classificados como violentos. É também neste último grupo de animais que se verifica uma maior variação da concentração de cortisol plasmático no dia 8. Não se verificam diferenças estatisticamente significativas entre CP8 e RE8 (anexo 11).

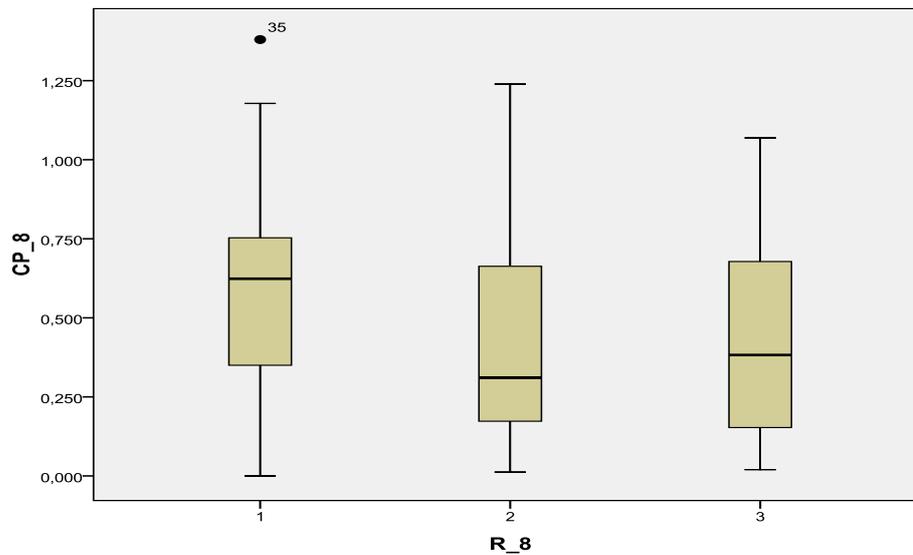
Figura 19 Teste de comparação de médias entre CS8/RE8.



Na figura 19 verifica-se que os valores da mediana do cortisol salivar no dia 8, nos diferentes grupos de animais classificados quanto à reacção à entrada do operador para o mesmo dia não diferem muito entre si. Como pudemos verificar em anexo (anexo 12) o valor de significância é superior a 0,05, pelo que não existem diferenças em tendência central entre os grupos em estudo.

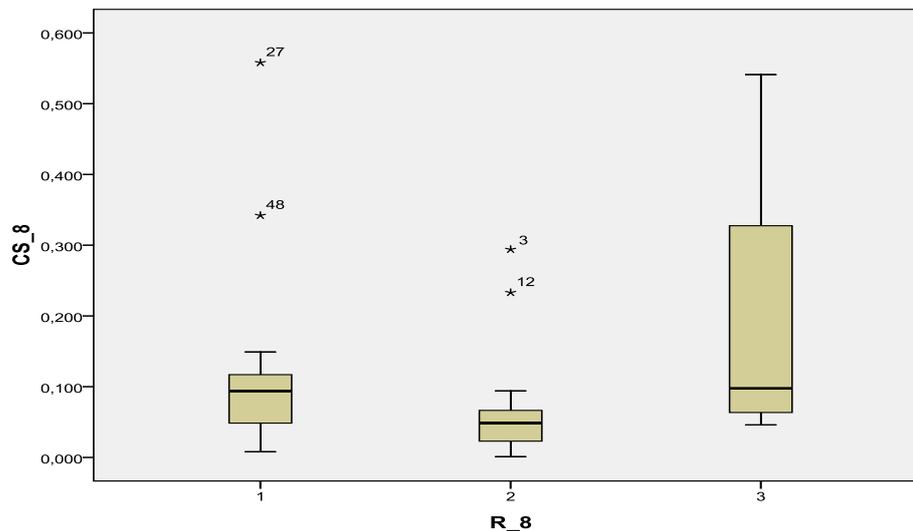
12.3.3 Reacção à recolha de amostra de sangue dia 8 (R8) e concentração de cortisol dia 8

Figura 20 Teste de comparação de médias entre CP8/R8.



De acordo com a figura 20, para o dia 8 o grupo de animais categorizados como 1 no teste de reacção à recolha de amostra de sangue, ou seja aqueles que colaboraram com a recolha da mesma, são os que demonstram o valor de cortisol plasmático mais elevado comparando com os outros grupos. O valor de Sig. =0,202, pelo que não existem diferenças entre os grupos em estudo (anexo 13).

Figura 21 Teste de comparação de médias entre CS8/R8.



Na figura 21 o grupo de animais classificado como 3 na reacção à recolha de amostra de sangue, isto é animais que não colaboraram na recolha desta amostra são os que apresentam maior variação da concentração de cortisol salivar no dia 8. Neste caso verificou-se um valor de $P=0,031$, logo inferior a 0,05, existindo diferenças significativas entre os grupos em estudo (anexo 14). Como existem diferenças significativas entre os três

grupos, determinou-se entre que grupos existem essas diferenças, através do teste de Mann-Whitney.

Tabela 7 Teste de Mann-Whitney para os grupos 1 e 2.

Test Statistics ^b	CS_8_transf
Mann-Whitney U	82,000
Wilcoxon W	253,000
Z	-2,533
Asymp. Sig. (2-tailed)	,011
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,011 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: R_8

Tabela 8 Teste de Mann-Whitney para os grupos 1 e 3.

Test Statistics ^b	CS_8_transf
Mann-Whitney U	30,000
Wilcoxon W	201,000
Z	-,511
Asymp. Sig. (2-tailed)	,609
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,652 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: R_8

Tabela 9 Teste de Mann-Whitney para os grupos 2 e 3.

Test Statistics ^b	CS_8_transf
Mann-Whitney U	13,000
Wilcoxon W	184,000
Z	-1,960
Asymp. Sig. (2-tailed)	,050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,053 ^a

a. Not corrected for ties.

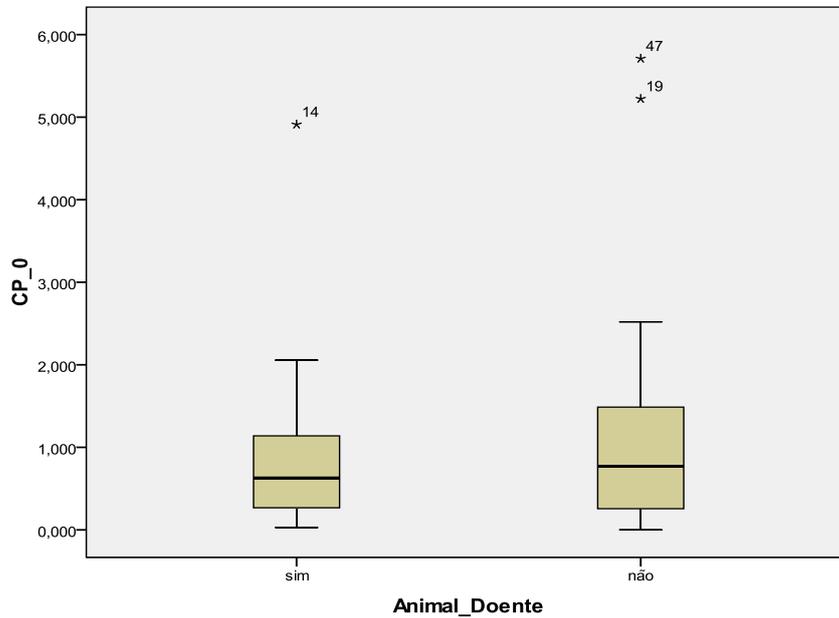
b. Grouping Variable: R_8

Na tabela 7 o valor de Sig.< 0,05, pelo que existem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos 1 e 2. Não existem diferenças entre os grupos 1 e 3 (tabela 8). Como se pode verificar na tabela 9, o valor de Sig.=0,050, logo é igual a 0,05, não existem diferenças entre os grupos em estudo (2 e 3), mas é de salientar que este valor está no limite que define a região de rejeição.

12.4 Relação entre cortisol e morbilidade

12.4.1 Cortisol plasmático D0

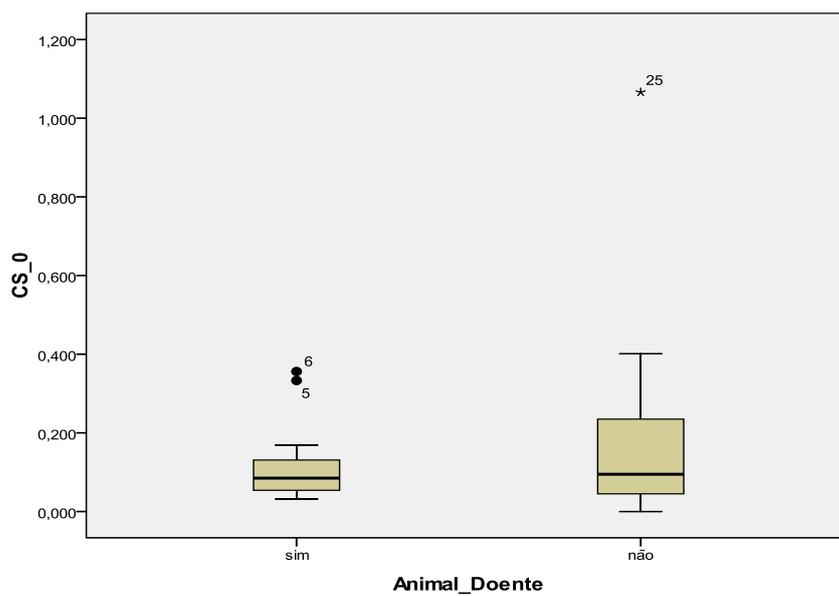
Figura 22 Relação entre CP0 e morbilidade.



A média de cortisol plasmático no dia 0 no grupo de animais não doentes é ligeiramente superior à média dos animais doentes (figura 22) mas não são significativamente diferentes (anexo 15).

12.4.2 Cortisol salivar D0

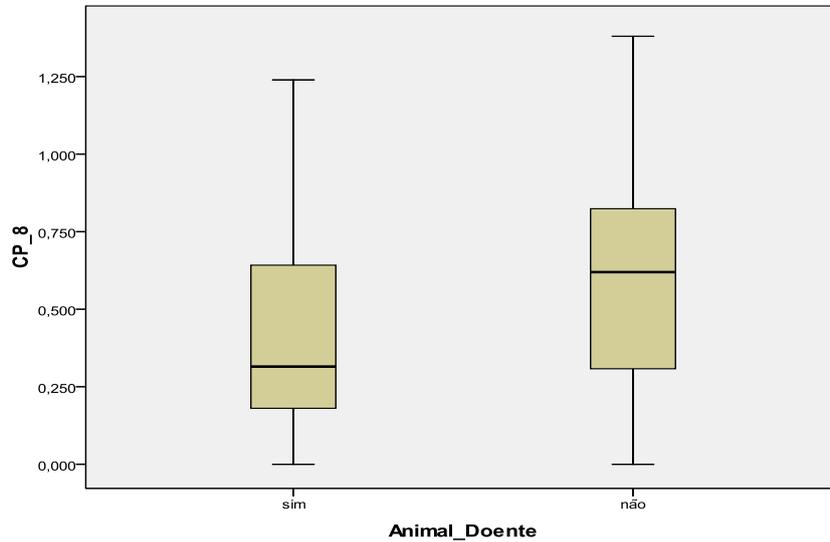
Figura 23 Relação entre CS0 e morbilidade



Não existem diferenças estatisticamente significativas entre concentração de cortisol salivar e os grupos animal doente e animal não doente, uma vez que $P > 0,05$ (anexo 16).

12.4.3 Cortisol plasmático D8

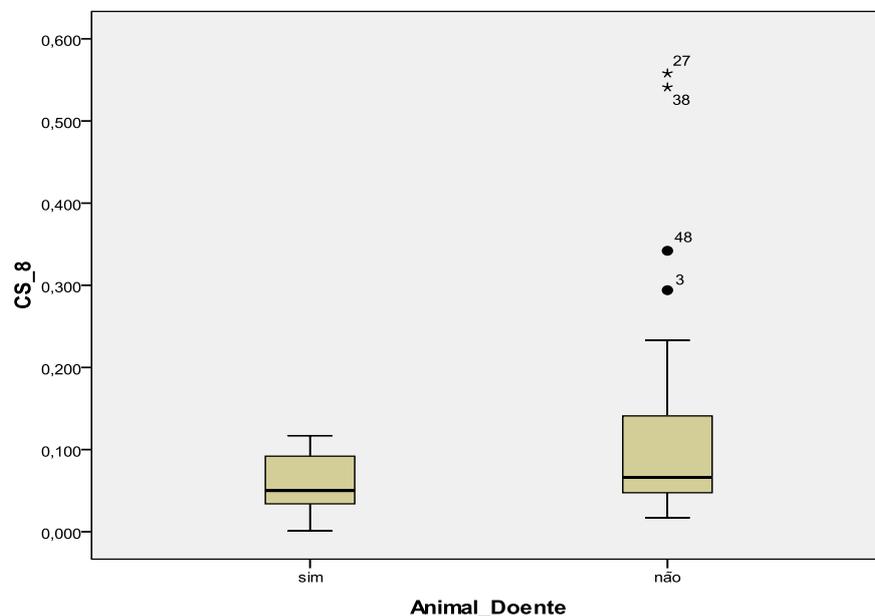
Figura 24 Relação entre CP8 e morbilidade.



Na figura 24 verifica-se que a média de cortisol plasmático no dia 8 é inferior nos animais com DRB, o valor de P para este teste foi igual a 0,054 (anexo 17), por isso superior a 0,05, isto é, as médias entre os dois grupos não são significativamente diferentes. No entanto parece existir uma tendência para os animais com cortisol mais baixo serem mais susceptíveis à DRB.

12.4.4 Cortisol salivar D8

Figura 25 Relação entre CS8 e morbilidade.



Na figura 25 pode-se verificar que existe uma maior variação dos valores de cortisol salivar no dia 8 no grupo de animais não doentes e que a média do valor de cortisol salivar no dia 8 é ligeiramente superior no mesmo grupo de animais. Neste caso também não se verificaram diferenças significativas entre os grupos em estudo (anexo 18).

12.5 Relação entre os testes de temperamento e morbilidade

A tabela 10 resume o número e percentagem de indivíduos diagnosticados com DRB e os respectivos resultados dos testes de temperamento dos mesmos animais.

Tabela 10 Proporção de animais diagnosticados com DRB e os respectivos testes de temperamento

Doente	Espaço de fuga D0			Espaço de fuga D8			Reacção à entrada D0			Reacção à entrada D8		
	> 1 m	< 1 m	toque	> 1 m	< 1 m	toque	pacífica	ligeira	violenta	pacífica	ligeira	violenta
S	18	10	6	14	13	7	18	9	7	12	16	6
%	52,9	29,4	17,6	41,2	38,2	20,6	52,9	26,5	20,6	35,3	47,1	17,6
N	18	18	3	14	13	7	17	20	2	15	18	6
%	46,2	46,2	7,7	48,7	33,3	17,9	43,6	51,3	5,1	38,5	46,2	15,4

No dia 0 cerca de 50% dos animais que posteriormente ficaram doentes demonstraram um espaço de fuga >1 metro mas uma reacção do tipo pacífica à entrada do operador na “box”. Para o dia 8 os resultados dos testes de temperamento variam, sendo que para o teste EF8 a maioria dos indivíduos afastou-se do operador a mais de 1 metro de distância e para o teste RE8 cerca de 50% dos animais que ficaram doentes foram classificados de ligeira.

O valor de Sig. para RE0/animal doente foi 0,034, por isso estas duas variáveis não são independentes, ou seja há relação entre morbilidade e o temperamento do animal quando avaliado quanto à reacção à entrada do operador. Sendo a percentagem de animais doentes e violentos (20,6%) muito superior aos animais não doentes classificados como violentos (5,1%) no dia 0.

Para todas as outras variáveis em estudo os valores de Sig. foram superiores a 0,05, sendo portanto independentes, não havendo relação entre morbilidade e os testes de temperamento.

VII. DISCUSSÃO

Na primeira parte da análise estatística procurou-se encontrar uma relação entre a concentração de cortisol nos dias 0 e 8. A diferença entre os valores de cortisol plasmático no dia 0 foi significativamente superior aos valores de cortisol plasmático no dia 8. No dia 0 do estudo, que corresponde a 16 horas após a chegada dos animais à exploração, os níveis de cortisol plasmático encontravam-se elevados. Se estas concentrações de cortisol correspondem a um possível estado de “stress”, então a adaptação e possivelmente o transporte poderão ser os factores responsáveis por este valor elevado. Por isso, é de salientar o efeito do “stress” do transporte nos animais, que inclui diversos factores como o confinamento, o carregamento, o calor, o frio, a humidade, o ruído e o movimento do próprio veículo e a descarga dos animais (Grandin & Tarrant, 2000). Após o transporte os vitelos estão ainda sujeitos a um “stress” relacionado com o ambiente desconhecido na exploração de destino, tendo que se adaptar às novas instalações e tipo de manejo. Pelos resultados estatísticos a maioria dos indivíduos estava mais adaptado após 8 dias na exploração, uma vez que os valores de cortisol plasmático no dia 8 eram significativamente inferiores ao dia 0.

Em contraste, os valores da concentração de cortisol salivar no dia 0 apesar de serem numericamente superiores ao dia 8, não mostram diferença estatisticamente significativa. O facto de o número de animais avaliados para o cortisol salivar não abranger todos os indivíduos da amostra populacional, uma vez que houve necessidade de racionalizar o *kit* comercial para além do facto de este ser menos sensível para o doseamento de cortisol salivar, pode explicar os resultados obtidos.

A estatística descritiva dos testes de temperamento no dia 0 demonstra que cerca de 50% dos animais revelaram um temperamento calmo, sendo que a maioria dos vitelos apresentou um espaço de fuga ao toque, uma reacção à entrada pacífica e colaboraram na recolha de amostra de sangue. Este tipo de temperamento, sugere que os animais estavam sob um estado de fadiga e possivelmente desidratados ou em hipoglicemia devido ao transporte no dia anterior. No dia 8 a percentagem de indivíduos com temperamento intermédio aumentou. Esta diferença pode ser devida ao facto de no dia 8 a fadiga devido ao transporte já não estar presente, por outro lado, os vitelos já estavam adaptados ao ambiente e o factor medo já não era tão evidente em alguns dos animais. Existem estudos com suínos e roedores que demonstram que animais que adoptam a reacção passiva a factores de “stress” – apresentam uma maior activação do eixo hipófise-suprarrenal – com elevadas concentrações de cortisol e uma reacção fraca. Enquanto que aqueles que reagem

de forma mais violenta, geralmente possuem maior concentração de adrenalina e menor concentração de cortisol.

Quando se comparou o temperamento dos animais com os níveis de cortisol obtiveram-se resultados que coincidem com a bibliografia, apesar de não serem estatisticamente significativos. Num estudo realizado por Burdick et al. (2010), que relacionou o temperamento (teste de velocidade de fuga e comportamento no parque) e o transporte com a temperatura rectal e as concentrações plasmáticas de cortisol e adrenalina em novilhos, foi demonstrado que os animais mais temperamentais revelaram maiores concentrações de cortisol e temperatura rectal mais elevada após o transporte, em comparação com animais calmos ou medrosos. No presente estudo, os resultados do EF0/CP0 demonstram que a concentração de cortisol plasmático no dia 0 é superior no grupo de animais com espaço de fuga >1 metro, apesar de não ser estatisticamente significativo. Mas quando se fez a comparação entre EF0/CS0 os valores de cortisol salivar mais elevados foram encontrados nos animais com espaço de fuga menor. Os resultados não são idênticos entre o plasma e a saliva, e esta diferença poderá estar relacionada com o facto de o comportamento de fuga ter sido avaliado antes da recolha de amostras de sangue e de saliva, sendo que os animais mais nervosos aumentaram os níveis de cortisol devido à presença do operador. Os valores de cortisol foram mais elevados no plasma primeiro e não na saliva porque provavelmente não houve tempo para aumentar os níveis de cortisol na saliva. Para o teste RE0/CP0 e RE0/CS0 os resultados foram semelhantes aos anteriores, onde a maior concentração de cortisol plasmático encontra-se no grupo de animais classificados com reacção à entrada violenta e a maior concentração de cortisol salivar encontra-se no grupo de vitelos classificados como pacíficos no teste reacção à entrada do operador, a razão apontada anteriormente pode também explicar estes resultados.

Para o dia 8 os resultados dos testes de comparação entre concentração de cortisol e espaço de fuga revelaram-se semelhantes ao dia 0, apesar de que neste caso os níveis de cortisol tanto plasmático como salivar serem inferiores no dia 8, pois os animais após 8 dias já estavam adaptados ao novo ambiente. Sendo os animais classificados com EF>1 metro os que apresentaram maior concentração e variação da concentração de cortisol plasmático.

Quando se avaliou o temperamento no dia 8 com o teste entrada do operador no interior da box verificou-se que os animais classificados com reacção à entrada de pacífica possuíam maiores níveis de cortisol plasmático, o que pode evidenciar que os animais apesar de estarem em “stress” (maior concentração de cortisol) reagiram com um comportamento mais pacífico à entrada do operador uma vez que esta era a segunda vez que estavam nesta condição. Por outro lado, as “boxes” de alojamento dos animais possuem uma área inferior a 2m², e o facto de concentrações altas de cortisol poder surgir em animais que adoptam

um comportamento mais medroso e de fuga quando podem, nestas condições os animais estavam limitados e por isso pareceram calmos.

Os mesmos resultados repetem-se para o teste recolha de amostra de sangue no dia 8 e concentração de cortisol plasmático, e provavelmente devido à mesma causa.

De salientar que foram encontradas diferenças significativas entre a concentração de cortisol salivar no dia 8 e reacção à recolha de amostras de sangue para o mesmo dia entre os grupos 1, que colaboraram na recolha de amostras, e o grupo 2. A possibilidade de que os animais do grupo 1, que reagiram pouco à colheita, serem os animais mais medrosos e sujeitos a “stress” crónico deve ser posta. Um estudo realizado por Ruis et al. (2000) mostrou que porcas, com reacção passiva ao “stress” são as que apresentam maiores níveis de cortisol enquanto que as porcas com reacção activa geralmente não têm grandes aumentos desta hormona.

Estudando a relação entre os níveis de cortisol e a morbilidade a DRB, verificou-se que os valores de cortisol tanto plasmáticos como salivares (dias 0 e 8) dos animais doentes e não doentes não foram estatisticamente significativos, por isso parece não haver relação entre concentração de cortisol e morbilidade. Segundo Silberman et al. (2003) o “stress” crónico causa impacto negativo no ganho médio diário, na função reprodutiva e ao nível do sistema imunitário, por isso os animais com maiores concentrações de cortisol deveriam estar mais susceptíveis à DRB. Esta ausência de diferença poderá estar relacionada com o facto de a amostra de animais avaliados quanto às concentrações de cortisol ser reduzida, às condições ambientais da exploração em questão ou outros factores que se sobrepõem relacionados com a origem e estado imunitário dos animais.

Por último avaliou-se a relação entre os diferentes testes de temperamento com a morbilidade. Encontraram-se diferenças estatisticamente significativas no teste reacção à entrada no dia 0 (RE0) e morbilidade, pois 78% dos animais que reagiram mais violentamente à entrada do operador no interior da “box” ficaram doentes. Este poderá ser um bom método para identificar animais mais susceptíveis a DRB. No entanto, esta possibilidade necessita de mais investigação. De salientar também que os resultados da comparação do cortisol plasmático com o teste RE0, o grupo de animais classificados como reacção violenta à entrada do operador apresentou os valores mais elevados de cortisol.

É necessário referir que este estudo apresentou algumas limitações, primeiro devido à restrição dos recursos financeiros para adquirir o *kit* comercial (Spectria Cortisol RIA®), reduzindo o número de animais avaliados quanto à concentração do cortisol plasmático como salivar nos dias 0 e 8. Por outro lado, a avaliação do temperamento através do teste espaço de fuga, não pode ser estimado do modo mais correcto, uma vez que os animais

encontravam-se no interior de boxes com uma área inferior a 2m^2 , o que limitou a sua distância de fuga. Para além destas limitações já referidas, houve um conjunto de outros factores que poderão ter influenciado a morbilidade dos animais. Estes não estão relacionados com o manejo e condições ambientais da exploração uma vez que todos os animais estiveram sujeitos às mesmas condições. Esses factores podem estar relacionados com estado imunitário dos animais (ingestão ou não do colostro na exploração de origem) e com as condições e duração do transporte dos vitelos até à exploração de engorda.

VIII. CONCLUSÃO

Desde os primeiros estudos sobre o “stress” realizados por Walter Cannon e Hans Selye, muitas descobertas têm sido feitas sobre a fisiologia do “stress”, as hormonas de resposta ao “stress” e os múltiplos efeitos deste sobre o sistema imunitário. De facto, o “stress” está inerente à vida e não é necessariamente mau, tanto que todas as formas de vida animal desenvolveram mecanismos mais ou menos complexos que permitissem reagir e lidar com situações de “stress”. Porém, actualmente existe uma crescente consciencialização e uma grande preocupação com as doenças humanas associadas com uma vida preenchida de “stress”, e um crescente interesse e preocupação do público pelo bem-estar e pelos factores de “stress” a que os animais de produção estão sujeitos, desde o processo e modo de produção, o transporte até os métodos de abate dos animais.

Na produção primária de carne de bovino, existe uma série de factores promotores de “stress” nos animais como o agrupamento de animais, alterações bruscas na dieta, intervenções profiláticas e o transporte. O transporte de animais parece ser o factor de “stress” mais relevante, pois trata-se de um acontecimento estranho e ameaçador na vida de qualquer animal doméstico, envolvendo uma série de factores de perturbação. Neste estudo demonstrou-se o impacto do transporte e mudança de ambiente nos animais, através do doseamento de cortisol, em que as concentrações desta hormona foram significativamente mais elevadas no dia após o transporte dos animais do que após uma semana de adaptação dos animais à exploração de engorda. Provavelmente este facto demonstra que após o transporte/chegada à exploração, estes indivíduos estão em maior risco e susceptíveis a doenças. O agrupamento de animais provenientes de diferentes explorações e os factores de “stress” do transporte para além de aumentam a exposição dos animais a vários agentes infecciosos, aumentam a susceptibilidade dos animais a doença.

A DRB continuará a ser a causa de morbilidade que maior impacto económico negativo origina em qualquer fase da produção primária de bovinos de carne, sendo essas perdas associadas com a diminuição na produção, elevadas taxas de mortalidade e custos em tratamentos. A sua etiologia multifactorial (com uma complexa interacção entre hospedeiro, agentes infecciosos e factores ambientais) obriga ao controlo das várias vertentes. Uma possibilidade de controlo desta importante patologia seria seleccionar raças de animais mais resistentes a DRB, contudo segundo a bibliografia a hereditabilidade para resistência a DRB parece ser baixa. Mas segundo alguns autores o vigor híbrido pode ser benéfico na redução do risco associado com a DRB. Por outro lado, sendo o “stress” um dos factores relacionados com a patogénese da DRB, uma outra possibilidade para controlo desta doença estaria na selecção de animais resistentes ao “stress”. Vários estudos têm sido

realizados na tentativa de relacionar a morbidade com o “stress”, envolvendo pesquisas com animais mais resistentes ao “stress” e por isso com menor libertação de cortisol e com um temperamento mais calmo. Porém, segundo o presente estudo a morbidade não parece estar relacionada com as concentrações de cortisol, mas há indício de que animais com mais medo são mais susceptíveis à doença respiratória. Mais estudos serão necessários, para compreender como seleccionar animais mais resistentes a DRB ou ao “stress”.

Certamente que existem outros factores com elevado impacto no desenvolvimento e prevenção da DRB, mas a complexidade desta doença torna difícil definir o papel de cada um desses factores. É imperativo reconhecer que muito mais pode ser feito no sentido de controlar esta dispendiosa e persistente doença.

BIBLIOGRAFIA

- Andrews, G.A. & Kennedy, G.A. (1997). Respiratory diagnostic pathology. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 13, 515-547.
- Alves, D. D., (2003). Compensatory growth in beef cattle. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* 98, 61-67.
- Apley, M. (2006). Bovine respiratory disease: pathogenesis, clinical signs, and treatment in lightweight calves. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 22, 399-411.
- Axelrod, J. & Reisine, T. D. (1984). Stress hormones: Their interaction and regulation. *Science* 224, 452–459.
- Babkine, M. & Blond, L. (2009). Ultrasonography of the bovine respiratory system and its practical application. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 25, 633-49.
- Berne, R.M. & Levy, M.N. (1992). *Physiology*. (3rd ed.). Missouri: Mosby – Year Book.
- Berry, B. A., Confer, A. W., Krehbiel, C. R., Gill, D. R. Smith, & Montelongo, M. (2004). Effects of dietary energy and starch concentrations for newly received feedlot calves: Acute phase protein response. *J. Anim. Sci.* 82, 845–850.
- Biolatti, B., Bollo, E. & Cannizzo, F. T.(2005). Effects of low-dose dexamethasone on thymus morphology and immunological parameters in veal calves. *Journal of Veterinary Medicine series a-physiology pathology clinical medic*, 52, 202–208.
- Blackshaw, J. K., Blackshaw, A. W. (1989). Limitations of salivary and blood cortisol determinations in pigs. *Veterinary Research Communications*, 13, 265-271.
- Booker, C.W., Abutarbush, S.M., Schunicht, O.C., Jim, G.K., Perrett, T., Wildman, B.K., Guichon, P.T., Pittman, T.J., Jones, C. & Pollock, C.M. (2007). Evaluation of the efficacy of tulathromycin as a metaphylactic antimicrobial in feedlot calves. *Vet. Ther.* 8, 183-200.
- Booker, C.W., Guichon, P.T., Jim, G.K., Schunicht, O.C., Harland, R.J. & Morley, P.S. (1999). Seroepidemiology of undifferentiated fever in feedlot calves in western Canada. *The Canadian Veterinary Journal*, 40, 40-48.
- Borrel, E. H. (2001). The biology and its application to livestock housing and transportation assessment. *Journal of Animal Science*, 79, 260-267.
- Brandsma, J. H., Janss, L. L. G. & Visser, A. H. (2004). Association between PrP genotypes and litter size and 135 days weight in Texel sheep. *Livestock Production Science*, 85, 59–64.
- Brandt, A.W., Sanderson, M.W., DeGroot, B.D., Thomson, D.U. & Hollis, L.C. (2008). Biocontainment, biosecurity, and security practices in beef feedyards. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 232, 262-269.
- Broom, D.M. & Johnson K.G. (1993). *Stress and animal welfare*. London: Chapman & Hall.
- Burdick, N.C, Carroll, J.A, Hullbert, L.E, Dailey, J.W, Willard, S.T, Van, R.C. (2010). Relationships between temperament and transportation and serum concentrations of cortisol and epinephrine in bulls. *Livestock Science*, 129, 166-172.
- Burrow, H.M.(1997). Measurements of temperament and their relationships with performance traits carcass of beef cattle. *Animal Breeding Abstracts*, 75, 477-495.

- Callan, R. J. & Garry, F. B. (2002). Biosecurity and bovine respiratory disease. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 18, 57–77.
- Carroll, J. A. & Forsberg, N. E. (2007). Influence of stress and nutrition on cattle immunity. *Veterinary Clinics Food Animal Practice*, 23, 105-149.
- Carroll, J.A., Willard, S.T., Bruner, B.L., et al. (1996). Mifepristone modulation of ACTH and CRH regulation of bovine adrenocorticosteroidogenesis in vitro. *Domestic Animal Endocrinology* 13, 339–49.
- Carter, J. N., Meredith, G. L., Montelongo, M., Gill, D. R. Krehbiel, C. R. Payton, M. E. & Confer, A. W. (2002). Relationship of vitamin E supplementation and antimicrobial treatment with acute-phase protein responses in cattle affected by naturally acquired respiratory tract disease. *American Journal of Veterinary Research*, 63, 1111– 1117.
- Casas, E. & Snowden, G.D. (2008). A putative quantitative trait locus on chromosome 20 associated with bovine pathogenic disease incidence. *Journal of Animal Science*, 86, 2455-2460.
- Castrucci, G. (2002). Vaccination of calves against bovine herpesvirus-1: assessment of the protective value of eight vaccines. *Comp Immunol, Microbiol Infect Dis*, 25, 29-41
- Cole, N.A., Camp, T.H., Rowe, L.D., Stevens, D.G. & Hutcheson, D.P. (1988). Effect of transport on feeder calves. *American Journal of Veterinary Research*, 49, 178-183
- Cook, N. J., Schaefer, A. L., Lepage, P. & Steven D. (1997). Radioimmunoassay for Cortisol in Pig Saliva and Serum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 395-399.
- Cook, N. J., Schaefer, A. L., Lepage, P., Morgan Jones, S. D. (1996). Salivary cortisol for the assessment of adrenal activity in swine. *The Canadian Veterinary Journal*, 76, 329-335.
- Cooper, V.L. & Brodersen, B.W. (2010). Respiratory disease diagnostics of cattle. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 26, 409-416.
- Cusack, P. M., McMeniman, N. P. & Lean, I. J. (2007). Feedlot entry characteristics and climate: their relationship with cattle growth rate, bovine respiratory disease and mortality. *Australian Veterinary Journal*, 85, 311-316.
- Cusack, P., McMeniman, N. & Lean, I., (2003). The medicine and epidemiology of bovine respiratory disease in feedlots. *Australian Veterinary Journal*, 81, 480-487.
- Cusack, P.M.V. (2004). Effect of mass medication and antibiotics at feedlot entry on the health and growth rate of cattle destined for the Australian domestic market. *Australian Veterinary Journal*, 82, 154-156.
- Dabo, S.M., Taylor, J.D. & Confer, A.W. (2007). *Pasteurella multocida* and bovine respiratory disease. *Animal Health Research Reviews*, 8, 129-150.
- Dallman, M. F., MaKara, G. B., Roberts, J. L., Levin, N., Bloom, M. (1985). Corticotrope response to removal of releasing factors and corticosteroids in vivo . *Endocrinology*, 117, 2190-2197.
- Dantzer, R. & Mormède, P. (1992). *El stress en la cria intensiva del ganado*. Zaragoza: Editorial Acribia.
- Dinan, T.G. (1996). Serotonin and the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function. *Life Science*, 58, 1683–94.

- Duff, G.C. & Galyean, M.L. (2007). Board-Invited Review: Recent Advances in Management of Highly Stressed, Newly Received Feedlot Cattle. *Journal of Animal Science*, 85, 823-840
- Edwards, A.J. (1996), *Bovine Practice*, 30, 5.
- Edwards, A.J. (1996). Respiratory Diseases of Feedlot Cattle in the Central USA. *Bovine Practitioner*, 30, 5-7.
- Edwards, T. A. (2010). Control methods for bovine respiratory disease for feedlot cattle. *Veterinary Clinics Food Animal Practice*, 26, 273-284.
- Elenkov I.J, Wilder R.L, Chrousos G.P. (2000) The sympathetic nervedan integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacological Reviews*, 52, 595–638.
- Epperson, B. (1999). Lifetime effects of respiratory and liver disease on cattle. Lincoln: Range beef cow symposium - University of Nebraska, South Dakota State University
- Ewing, S. A., Lay, D. C. & Borell, E. (1999). *Farm Animal Well-Being—Stress Physiology, Animal Behavior, and Environmental Design*. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, USA.
- Farshid, M., Shahriar, F.M., Clark, E.G., Janzen, E., West, K. & Wobeser, G. (2002). Coinfection with bovine viral diarrhea virus and *Mycoplasma bovis* in feedlot cattle with chronic pneumonia. *Canadian Veterinary Journal*, 43, 863–868.
- Fell, L. R., Colditz, I. G., Walker, K. H. & Watson, D. L. (1999). Associations between temperament, performance and immune function in cattle entering a commercial feedlot. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 39, 795-802.
- Flöck, M. (2004). Diagnostic ultrasonography in cattle with thoracic disease. *The Veterinary Journal*, 167, 272–280
- Fraser, A.F., Broom, D.M.(2002). *Farm Animal Behavior and Welfare*. 3rd edition, London: Reprinted, CABI.
- Fraser, D., Ritchie, J.S.D & Fraser, A.F. (1975). The term stress in veterinary context. *Brazilian Journal of Veterinary Research*, 131, 653-662.
- Fulton R.W., Cook B.J., Step D.L., Confer, A.W., Saliki, J.T., Payton, M.E., Burge, L.J., Welsh, R.D. & Blood, K.S. (2002). Evaluation of health states of calves and the impact of feedlot performance: assessment of retained ownership program for postweaning calves. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 173–180.
- Fulton, R. W., Briggs, R. E., Payton, M. E., Confer, A. W., Saliki, J. T., Ridpath, J. F., Burge, L. J. & Duff, G. C. (2004). Maternally derived humoral immunity to bovine viral diarrhea virus (BVDV)1a, BVDV1b, BVDV2, bovine herpesvirus-1, parainfluenza-3 virus, bovine respiratory syncytial virus, Mannheimia haemolytica and Pasteurella multocida in beef calves, antibody decline by half-life studies and effect on response to vaccination. *Vaccine* 22, 643–649.
- Galyean, M.L, Lee, R.W & Hubbard, M.W. (1981). Influence of fasting and transit on rumen function and blood metabolites in beef steers. *Journal of Animal Science*, 53, 7-18.
- Galyean, M.L., Gunter, S.A. & Malcolm-Callis, K.J. (1995). Effects of arrival medication with tilmicosin phosphate on health and performance of newly received beef cattle. *Journal of Animal Science*, 73, 1219-1226.

- Galyean, M.L., Perino, L.J., Duff, G.C. (1999). Interaction of cattle health/immunity and nutrition. *Journal of Animal Science*, 77, 1120-1134.
- Getty R.G. (1986) Sisson/Grossman Anatomia dos animais domésticos (5ª edição) W.B.Saunders RJ: Editora Guanabara Kooga.
- Gevaert, D. (2006). The importance of *Mycoplasma bovis* in respiratory disease in calves. *Tijdschr. Diergeneeskd.* 131, 124–126.
- Grandin, T. (1997). Assessment of stress during handling and transport. *Journal of Animal Science*, 75, 187-201.
- Griffin, D. (1997). Economic impact associated with respiratory disease in beef cattle. *Veterinary Clinics Food Animal Practice*, 367–377.
- Griffin, D. (1998). Feedlot Diseases. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 14, 199-231.
- Guyton, A.C. & Hall, J.E. (2006). *Tratado de fisiologia médica*. (11ª edição). Rio de Janeiro: Elsevier Editora.
- Harbuz, M.S. & Lightman, S.L. (1992). Stress and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis: acute, chronic and immunological activation. *Journal of Endocrinology*, 134, 327-339.
- Humblet, M.F., Coghe, J., Lekeux, P. & Godeau, J.M. (2004). Acute phase proteins assessment for an early selection of treatments in growing calves suffering from bronchopneumonia under field conditions. *Research in Veterinary Science*, 77, 41–47.
- Johnson, E. O., Kamilaris T. C, Crousos, G. P. & Gold P. W. (1992). Mechanisms of stress: A dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 16,115–130.
- Jung, C. & Bostedt, H. (2004). Thoracic ultrasonography technique in newborn calves and description of normal and pathological findings. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 45, 331-5.
- Lee, D.H.R. (1965). Climatic stress indices for domestic animals. *International Journal of Biometeorology*, 9,29.
- Loerch, S. C. & Fluharty. F. L. (2000). Use of trainer animals to improve performance and health of newly arrived feedlot calves. *Journal of Animal Science*, 78, 539–545.
- Lofgreen, G. (1983). Mass Medication in Reducing shipping fever bovine respiratory disease complex in highly stressed calves. *Journal of Animal Science*, 56, 529-536.
- Loneragan, G.H., Dargatz D.A., Morley, P.S. & Smith, M.A. (2001) Trends in Mortality Ratios mong Cattle in US Feedlots. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 219, 1122-1127
- Macartney, J.E., Bateman, K.G. & Ribble, C.S. (2003). Health performance of feeder calves sold at conventional auctions versus special auctions of vaccinated or conditioned calves in Ontario. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 223, 677-683.
- Martin, S.W., Meek, A.H., Davis, D.G., Johnson, J.A. & Curtis, R.A. (1982). Factors associated with mortality and treatment costs in feedlot calves: the Bruce County Beef Project, years 1978, 1979, 1980. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 46, 341-349.

- Martin, S.W., Meek, A.H., Willeberg, P. (1987). *Veterinary Epidemiology principles and methods*. Iowa State University Press Ames, IA.
- Moberg, G. P. (2000). When does stress become distress? *Lab Animal*, 28, 22-26.
- Moberg, G.P (1987). A model for assessing the impact of behavioral stress on domestic animals. *Journal of Animal Science*, 65, 1228-1235.
- Muggli-Cockett, N.E. (1992). Genetic Analysis of Bovine Respiratory Disease in Beef Calves During the First Year of Life. *Journal of Animal Science*, 70, 2013-2019.
- Muller M., Holsboer F., Keck M.E. (2002). Genetic modification of corticosteroid receptor signaling: novel insights into pathophysiology and treatment strategies of human affective disorders. *Neuropeptides*, 36, 117–31.
- NAHMS (2000). Feedlot '99 Part II: Baseline Reference of Feedlot Health and Health Management. USDA, APHIS, National Animal Health Monitoring System. Acedido em Abr. 7, 2011, em http://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/feedlot/index.shtml
- Oliphint, R., Burdick, N., Laurenz, J., Curley, K., Vann, R., Randel, R., & Welsh T. (2006). Relationship of temperament with immunization response and lymphocyte proliferation in Brahman bulls. *Journal of Animal Science*, 84, 32. (Abstr.)
- Parker, C.J., Stankovic, A.K. & Goland, R.S. (1999). Corticotropin-releasing hormone enhances steroidogenesis by cultured human adrenal cells. *Molecular Cell Endocrinology*, 155, 19–22.
- Pazirandeh, A., Xue, Y., Prestegard, T.(2002). Effects of altered glucocorticoid sensitivity in the T-cell lineage on thymocyte and T-cell homeostasis. *FASEB J*, 16, 727–729.
- Perino, L. J. & Apley, M. D. (1998). Clinical trial design in feedlots. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 14(2), 343-65
- Perrett, T., Wildman, B.K., Abutarbush, S.M., Pittman, T.J., Jones, C., Pollock, C.M., Schunicht, O.C., Guichon, P.T., Jim, G.K. & Booker, C.W. (2008). A comparison of two *Mannheimia haemolytica* immunization programs in feedlot at high risk of developing undifferentiated fever/bovine respiratory disease. *Bovine Practice*, 42, 64-75.
- Radostits, O. M., Gay, C. C., Blood, D. C. & Hinchcliff, K. W. (2002). *Clínica veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos*, 9ª edição. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro
- Randall D., Burggren W., French K. (1998) *Eckert Animal Physiology* (4th edition), New York: W.H.Freeman and Company.
- Rauw, W. M., Kanis, E., Noordhuizen-Stassen E. N. & Grommers, F. J. (1998). Undesirable side effects of selection for high production efficiency in farm animals: A review. *Livestock Production Science*, 56, 15–33.
- Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals. (2008). *National Research Council (US) Committee on Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals*. Washington (DC): National Academies Press (US).
- Reid, E. D. & Dahl. G. E. (2005). Peripheral and core body temperature sensing using radio-frequency implants in steers challenged with lipopolysaccharide [abstract]. *Journal of Animal Science*, 83, 352.
- Ribble, C.S., Meek, A.H, Janzen, E.D, Guichon, P.T. & Jim, G.K. (1995). Effect of time of year, weather, and the pattern of auction market sales on fatal fibrinous pneumonia

- (shipping fever) in calves in a large feedlot in Alberta (1985–1988). *Canadian Journal of Veterinary Research*, 59, 167–172.
- Rice, J.A., Carrasco-Medina, L., Hodgins, D.C. & Shewen, P.E. (2007). Mannheimia haemolytica and bovine respiratory disease. *Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases*, 8, 117-128.
- Rivier, C. & Rivest, S. (1991). Effects of stress on the activity of hypothalamic-pituitary-gonadal axis: peripheral and central mechanisms. *Biology of reproduction*, 45, 523-532.
- Rodbard, D. (1974). Statistical quality control and routine data processing for radioimmunoassay and immunoradiometric assays. *Clinical Chemistry*, 20, 1255–70.
- Ruis, M., Brake, J. H. A., Burgwal, J., De Jong, I. C., Blokhuis, H. J, Koolhaas, J. M. (2000). Personalities in female domesticated pigs: behavioural and physiological indications. *Applied Animal Behaviour Science*, 66, 31– 47.
- Santos, V. P. (2003). *O stress e a reprodução*. Seminário apresentado na disciplina de Endocrinologia da Reprodução do programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da UFRGS.
- Schaefer, A.L., Cook, N.J., Church, J.S., Basara, J., Perry, B., Miller, C. & Tong A.K.W. (2007). The use of infrared thermography as an early indicator of bovine respiratory disease complex in calves. *Research in Veterinary Science*, 83, 376–384
- Schmidt, A., Möstl, E., Wehnert, C., Aurich, J., Müller, J. & Aurich, C. (2010). Cortisol release and heart rate variability in horses during road transport. *Hormones and Behavior*, 57, 209–215.
- Schneider, M.J., Tait, R.G., Ruble, M.V., Busby, W.D. & Reecy, J.M. (2009). Evaluation of fixed sources of variation and estimation of genetic parameters for incidence of bovine respiratory disease in prewean calves and feedlot cattle. *Journal of Animal Science*, 88, 1220-1228.
- Scott, P.R. (1998). Ultrasonographic examination of the bovine thorax. *Cattle Practice*, 6, 151–153.
- Selye, H. (1936). Syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*, 138, 32-38.
- Selye, H. (1937). Studies on adaptation. *Endocrinology*, 21, 169-188.
- Simianer, H., Solbu, H. & Schaeffer, L. R. (1991). Estimated genetic correlations between disease and yield traits in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 74, 4358–4365.
- Snowder, G. (2009). Genetics, environment and bovine respiratory disease. *Animal health research reviews*, 10, 117-119
- Snowder, G. D., Van Vleck, L.D., Cundiff, L. V. & Bennett, G. L. (2007). Bovine respiratory disease in feedlot cattle: environmental, genetic and economic factors. *Journal of Animal Science*, 84, 1999-2008.
- Snowder, G.D., Van Vleck, L.D., Cundiff, L.V. & Bennett, G.L. (2005). Influence of breed, heterozygosity, and disease incidence on estimates of variance components of respiratory disease in preweaned beef calves. *Journal of Animal Science*, 83, 1247-1261
- Sowell, B. F., Branine M. E., Bowman J. G. P, Hubbert M. E., Sherwood H. E. & Quimby W., (1999). Feeding and watering behavior of healthy and morbid steers in a commercial feedlot. *Journal of Animal Science*, 77, 1105–1112.

- Speer, N. C., Young, C. & Roeber, D. L. (2001). The importance of preventing bovine respiratory disease: A beef industry review. *Bovine Practice*, 35, 189-196.
- Stilwell, G. & Matos, M. (2004). Doença Respiratória Bovina. Pfizer Saúde Animal. Bélgica.
- Stilwell, G., Carvalho, C., Lima, M. S. & Broom, D. M. (2008). The effect of duration of manual restraint during blood sampling on plasma cortisol levels in calves. *Animal Welfare*, 17, 383-385.
- Stilwell, G., Lima, S. & Broom, D. M. (2008). Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on long-term pain in calves castrated by use an external clamping technique following epidural anesthesia. *American Journal of Veterinary Research*, 69, 744, 750.
- Stilwell, G., Matos, M. & Carolino, N. (2007). A seroprevalência de anticorpos contra quatro vírus respiratórios em vacadas de carne do Ribatejo. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 102 (561-562), 97-105.
- Stoot, G.H. (1981). What is animal stress and how is it measured? *Journal of Animal Science*, 52, 150-153.
- Stull, C. & Reynolds, J. (2008). Calf Welfare. *Veterinary Clinical Food Animal*, 24, 191-203.
- Tarrant, P.V., Kenny, F.J. & Murphy, M., (1992). Long distance transportation of steers to slaughter: effect of stoking density on physiology, behavior and carcass quality. *Livestock Production Science*, 30, 209-230.
- Tarrant, V. & Grandin, T. (2000). Cattle Transport. In: Grandin, T. (Ed.), *Livestock Handling and Transport*. (2nd ed.). (pp. 151–174). New York: CABI Publishing.
- Van Dorp, T. E., Dekkers, J. C. M., Martin, S. W. & Noordhuizen. J. P. T. M. (1998). Genetic parameters of health disorders and relationships with 305-day milk yield and conformation traits of registered Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 81, 2264–2270.
- Voisinet, B. D., Grandin, T., Tatum, T.D., O'Connor, S. F. & Struthers, J. J. (1997). Feedlot cattle with calm temperaments have greater average daily gains than cattle with excitable temperaments. *Journal of Animal Science*, 75, 892–896.
- Wagner, A. E., Muir, W. W., Hinchcliff, K. W. (1991). Cardiovascular effects of xilazine and detomidine in horses. *American Journal of Veterinary Research*, 52, 651-657.
- Warren, E. J., Finck, B. N., Arkins, S., Kelley, K.W., Scamurra, R. W., Murtaugh, M. P. & Johnson, R. W. (1997). Coincidental changes in behavior and plasma cortisol in unrestrained pigs after intracerebroventricular injection of tumor necrosis factor- α . *Endocrinology*, 138, 2365–2371.
- White, B.J. & Larson, R.L. (2009). Preconditioned calves in the feedyard. In: Anderson, D.E., Rings, D.M. (Eds.), *Food animal practice*. Saunders Elsevier, St. Louis, MO, 628-632.
- Wittum, T. E., Woollen, N. E., Perino, L. J. & Littledike, E. T. (1996). Relationships among treatment for respiratory tract disease, pulmonary lesions evident at slaughter, and rate of weight gain in feedlot cattle [abstract]. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 209, 814-818.

ANEXOS

ANEXO 1**Leite de substituição para vitelos Celtaït S.E®****Composição**

Lactosoro em pó, farinha de soja, óleo de palma, farinha de ervilha, óleo de copra, carbonato de cálcio, óleo de colza, amido de trigo, fosfato bicálcio, sulfato de magnésio, cloreto de sódio.

Constituintes analíticos (%)

Proteína bruta	20 %
Gordura bruta	15 %
Fibra bruta	0,75 %
Cinza bruta	9,50 %
Cálcio	1 %
Sódio	0,50 %
Fósforo	0,70 %

Aditivos (por Kg)Antioxidante:

E321 B.H.T	28 ppm
------------	--------

Vitaminas:

E 672 Vitamina A	50 000 UI
E 671 Vitamina D3	10 000 UI
3a700 Vitamina E	30 UI
Vitamina K3	2 mg
Vitamina B1	3 mg
Vitamina C	50 mg

Oligoelementos:

E1 Ferro	40 mg
E4 Cobre	10 mg
E6 Zinco	70 mg
E5 Manganês	40 mg
E2 Iodo	0,1 mg
E3 Cobalto	1,2 mg
E8 Selénio	0,1 mg

ANEXO 2

Procedure for direct measurement of serum and urine cortisol

1. Bring all reagents, samples and controls to room temperature.
2. Label coated tubes in duplicate for calibrators, controls and patient samples. Set up normal, uncoated test tubes for total counts.
3. Pipette 20 µl of calibrators, controls and patient samples into the appropriate tubes. Total tubes remain empty.
4. Add 500 µl of cortisol tracer (red) to all tubes.
5. Mix all tubes briefly on a vortex mixer
6. Cover the tubes with paraffin film and incubate for 2 hours in a 37 °C water bath. *)
7. Decant and tap the head of each tube except the totals firmly against absorbent paper.
8. Wash once with 1 ml of distilled water.
9. Shake the rack by hand.
10. Decant and tap the head of each tube except the totals firmly against absorbent paper. Leave the tubes standing upside down for at least 5 minutes. Tap again until the tubes are empty.
- 11 Count each tube using a gamma counter for at least 1 minute or until 10 000 counts per tube have accumulated.

Procedure for salivary cortisol

Since the concentration of cortisol in saliva is very low, the routine method cannot be used directly. Instead the following procedure should be adopted. This application is not routinely tested in the Quality Assurance of Orion Diagnostica. Using the 2000 nmol/l calibrator, prepare the following dilutions in buffer (0.1 M Tris-HCl, pH 7.4, 0.2% BSA): 0, 1.0, 4.0, 20 and 100 nmol/l.

1. Label coated tubes in duplicate for calibrators and patient samples. Set up normal, uncoated test tubes for total counts.
2. Pipette 150 µl of calibrators and patient samples into appropriate tubes. Total tubes remain empty.
3. Add 500 µl of cortisol tracer (red) to all tubes.

4. Mix all tubes briefly on a vortex mixer.
5. Cover the tubes with paraffin film and incubate for 30 minutes in a 37°C water bath.
6. Decant and tap the head of each tube except the totals firmly against absorbent paper.
7. Wash once with 1 ml of distilled water, shake the rack by hand.
8. Decant and tap the head of each tube except the totals firmly against absorbent paper. Leave the tubes standing upside down for at least 5 minutes. Tap again until the tubes are empty.
9. Count each tube using a gamma counter for at least 1 minute or until 10 000 counts per tube have accumulated.

ANEXO 3

Teste de comparação das médias entre EF0/CP0

Case Processing Summary

		Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
EF_0							
CP_0	T	29	80,6%	7	19,4%	36	100,0%
	<1	28	100,0%	0	,0%	28	100,0%
	>1	9	100,0%	0	,0%	9	100,0%

Tests of Normality

EF_0		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
CP_0	T	,227	29	,001	,613	29	,000
	<1	,199	28	,006	,746	28	,000
	>1	,224	9	,200*	,766	9	,008

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Test of Homogeneity of Variance

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
CP_0	Based on Mean	2,195	2	63	,120
	Based on Median	1,727	2	63	,186
	Based on Median and with adjusted df	1,727	2	56,470	,187
	Based on trimmed mean	2,113	2	63	,129

Test Statistics^{a,b}

	CP_0
Chi-Square	,204
df	2
Asymp. Sig.	,903

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: EF_0

ANEXO 4

Teste de comparação das médias entre EF0/CS0

Case Processing Summary

EF_0		Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
CS_0	T	16	44,4%	20	55,6%	36	100,0%
	<1	24	85,7%	4	14,3%	28	100,0%
	>1	7	77,8%	2	22,2%	9	100,0%

Tests of Normality

EF_0		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
CS_0	T	,232	16	,022	,861	16	,020
	<1	,258	24	,000	,665	24	,000
	>1	,258	7	,177	,896	7	,310

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variance

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
CS_0	Based on Mean	4,467	2	44	,017
	Based on Median	1,801	2	44	,177
	Based on Median and with adjusted df	1,801	2	25,917	,185
	Based on trimmed mean	3,091	2	44	,055

Test Statistics^{a,b}

	CS_0
Chi-Square	1,489
df	2
Asymp. Sig.	,475

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: EF_0

ANEXO 5Teste de comparação das médias entre RE0/CP0**Case Processing Summary**

RE_0		Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
CP_0	P	31	88,6%	4	11,4%	35	100,0%
	L	26	89,7%	3	10,3%	29	100,0%
	V	9	100,0%	0	,0%	9	100,0%

Tests of Normality

RE_0		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
CP_0	P	,255	31	,000	,668	31	,000
	L	,224	26	,002	,706	26	,000
	V	,255	9	,094	,874	9	,137

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variance

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
CP_0	Based on Mean	1,731	2	63	,185
	Based on Median	1,004	2	63	,372
	Based on Median and with adjusted df	1,004	2	45,034	,374
	Based on trimmed mean	1,560	2	63	,218

Test Statistics^{a,b}

	CP_0
Chi-Square	,177
df	2
Asymp. Sig.	,916

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: RE_0

ANEXO 6

Teste de comparação das médias entre RE0/CS0

Case Processing Summary

RE_0		Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
CS_0	P	12	34,3%	23	65,7%	35	100,0%
	L	26	89,7%	3	10,3%	29	100,0%
	V	9	100,0%	0	,0%	9	100,0%

Tests of Normality

RE_0		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
CS_0	P	,253	12	,033	,797	12	,009
	L	,276	26	,000	,606	26	,000
	V	,275	9	,048	,695	9	,001

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variance

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
CS_0	Based on Mean	,846	2	44	,436
	Based on Median	,412	2	44	,665
	Based on Median and with adjusted df	,412	2	33,435	,666
	Based on trimmed mean	,477	2	44	,624

Test Statistics^{a,b}

	CS_0
Chi-Square	,936
df	2
Asymp. Sig.	,626

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: RE_0

ANEXO 7Teste de comparação das médias entre R0/CP0**Case Processing Summary**

		Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
CP_0	1	35	97,2%	1	2,8%	36	100,0%
	2	25	86,2%	4	13,8%	29	100,0%
	3	6	75,0%	2	25,0%	8	100,0%

Tests of Normality

R_0		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
CP_0	1	,241	35	,000	,669	35	,000
	2	,229	25	,002	,699	25	,000
	3	,164	6	,200*	,961	6	,825

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Test of Homogeneity of Variance

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
CP_0	Based on Mean	,179	2	63	,836
	Based on Median	,131	2	63	,878
	Based on Median and with adjusted df	,131	2	59,407	,878
	Based on trimmed mean	,167	2	63	,846

Test Statistics^{a,b}

	CP_0
Chi-Square	,018
df	2
Asymp. Sig.	,991

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: R_0

ANEXO 8Teste de comparação das médias entre R0/CS0**Case Processing Summary**

R_0		Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
CS_0	1	21	58,3%	15	41,7%	36	100,0%
	2	19	65,5%	10	34,5%	29	100,0%
	3	7	87,5%	1	12,5%	8	100,0%

Tests of Normality

R_0		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
CS_0	1	,312	21	,000	,608	21	,000
	2	,188	19	,077	,854	19	,008
	3	,174	7	,200*	,984	7	,976

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Test of Homogeneity of Variance

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
CS_0	Based on Mean	2,363	2	44	,106
	Based on Median	,972	2	44	,386
	Based on Median and with adjusted df	,972	2	23,585	,393
	Based on trimmed mean	1,270	2	44	,291

Test Statistics^{a,b}

	CS_0
Chi-Square	2,075
df	2
Asymp. Sig.	,354

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: R_0

ANEXO 9

Teste de comparação das médias entre EF8/CP8

Case Processing Summary

		Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
CP_8	T	27	81,8%	6	18,2%	33	100,0%
	<1	25	96,2%	1	3,8%	26	100,0%
	>1	12	85,7%	2	14,3%	14	100,0%

Tests of Normality

EF_8		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
CP_8	T	,156	27	,090	,948	27	,193
	<1	,165	25	,077	,915	25	,040
	>1	,200	12	,200	,847	12	,034

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variance

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
CP_8	Based on Mean	5,587	2	61	,006
	Based on Median	4,079	2	61	,022
	Based on Median and with adjusted df	4,079	2	43,277	,024
	Based on trimmed mean	5,252	2	61	,008

Test Statistics^{a,b}

	CP_8
Chi-Square	3,440
df	2
Asymp. Sig.	,179

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: EF_8

ANEXO 10

Teste de comparação das médias entre EF8/CS8

Case Processing Summary

		Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
EF_8							
CS_8	T	18	54,5%	15	45,5%	33	100,0%
	<1	17	65,4%	9	34,6%	26	100,0%
	>1	8	57,1%	6	42,9%	14	100,0%

Tests of Normality

EF_8		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
CS_8	T	,286	18	,000	,725	18	,000
	<1	,184	17	,128	,915	17	,121
	>1	,239	8	,198	,894	8	,254

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variance

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
CS_8	Based on Mean	8,283	2	40	,001
	Based on Median	2,603	2	40	,087
	Based on Median and with adjusted df	2,603	2	19,099	,100
	Based on trimmed mean	6,319	2	40	,004

Test Statistics^{a,b}

	CS_8
Chi-Square	2,400
df	2
Asymp. Sig.	,301

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: EF_8

ANEXO 11

Teste de comparação das médias entre RE8/CP8**Case Processing Summary**

RE_8		Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
CP_8	P	24	88,9%	3	11,1%	27	100,0%
	L	31	91,2%	3	8,8%	34	100,0%
	V	9	75,0%	3	25,0%	12	100,0%

Tests of Normality

RE_8		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
CP_8	P	,173	24	,061	,939	24	,152
	L	,142	31	,116	,930	31	,044
	V	,241	9	,139	,819	9	,033

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variance

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
CP_8	Based on Mean	7,928	2	61	,001
	Based on Median	3,467	2	61	,037
	Based on Median and with adjusted df	3,467	2	42,130	,040
	Based on trimmed mean	7,410	2	61	,001

Test Statistics^{a,b}

	CP_8
Chi-Square	,042
df	2
Asymp. Sig.	,979

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: RE_8

ANEXO 12

Teste de comparação das médias entre RE8/CS8

Case Processing Summary

RE_8		Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
CS_8	P	14	51,9%	13	48,1%	27	100,0%
	L	22	64,7%	12	35,3%	34	100,0%
	V	7	58,3%	5	41,7%	12	100,0%

Tests of Normality

RE_8		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
CS_8	P	,254	14	,015	,757	14	,002
	L	,339	22	,000	,521	22	,000
	V	,282	7	,097	,845	7	,111

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variance

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
CS_8	Based on Mean	2,091	2	40	,137
	Based on Median	,892	2	40	,418
	Based on Median and with adjusted df	,892	2	32,369	,420
	Based on trimmed mean	1,756	2	40	,186

Test Statistics^{a,b}

	CS_8
Chi-Square	1,222
df	2
Asymp. Sig.	,543

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: RE_8

ANEXO 13Teste de comparação das médias entre R8/CP8**Case Processing Summary**

R_8		Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
CP_8	1	25	86,2%	4	13,8%	29	100,0%
	2	30	100,0%	0	,0%	30	100,0%
	3	9	75,0%	3	25,0%	12	100,0%

Tests of Normality

R_8		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
CP_8	1	,121	25	,200*	,966	25	,544
	2	,204	30	,003	,839	30	,000
	3	,195	9	,200*	,907	9	,298

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Test of Homogeneity of Variance

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
CP_8	Based on Mean	,953	2	61	,391
	Based on Median	,451	2	61	,639
	Based on Median and with adjusted df	,451	2	55,964	,639
	Based on trimmed mean	,785	2	61	,461

Test Statistics^{a,b}

	CP_8
Chi-Square	3,201
df	2
Asymp. Sig.	,202

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: R_8

ANEXO 14Teste de comparação das médias entre R8/CS8**Case Processing Summary**

		Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
CS_8	1	19	65,5%	10	34,5%	29	100,0%
	2	20	66,7%	10	33,3%	30	100,0%
	3	4	33,3%	8	66,7%	12	100,0%

Tests of Normality

R_8		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
CS_8	1	,302	19	,000	,643	19	,000
	2	,285	20	,000	,705	20	,000
	3	,387	4		,740	4	,031

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variance

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
CS_8	Based on Mean	3,800	2	40	,031
	Based on Median	1,381	2	40	,263
	Based on Median and with adjusted df	1,381	2	20,742	,274
	Based on trimmed mean	3,222	2	40	,050

Test Statistics^{a,b}

	CS_8
Chi-Square	6,935
df	2
Asymp. Sig.	,031

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: R_8

ANEXO 15

Teste de comparação das médias entre Animal Doente/CP0

Group Statistics

Animal_ Doente	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
CP_0 sim	34	,81624	,883120	,151454
não	32	1,13631	1,349893	,238630

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
								95% Confidence Interval of the Difference	
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
CP_0 Equal variances assumed	3,230	,077	-1,147	64	,256	-,320077	,279171	-,877785	,237631
Equal variances not assumed			-1,132	52,936	,263	-,320077	,282635	-,886987	,246832

ANEXO 16

Teste de comparação das médias entre Animal Doente/CS0

Group Statistics

Animal_ Doente	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
CS_0 sim	22	,10932	,085334	,018193
não	25	,16924	,221059	,044212

Tests of Normality

Animal_ Doente	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
CS_0 sim	,215	22	,010	,751	22	,000
não	,242	25	,001	,662	25	,000

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variance

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
CS_0	Based on Mean	5,504	1	45	,023
	Based on Median	2,788	1	45	,102
	Based on Median and with adjusted df	2,788	1	29,322	,106
	Based on trimmed mean	3,763	1	45	,059

Ranks

Animal_ Doente	N	Mean Rank	Sum of Ranks
CS_0 sim	22	23,64	520,00
não	25	24,32	608,00
Total	47		

Test Statistics^a

	CS_0
Mann-Whitney U	267,000
Wilcoxon W	520,000
Z	-,171
Asymp. Sig. (2-tailed)	,865

a. Grouping Variable: Animal_Doente

ANEXO 17

Teste de comparação das médias entre Animal Doente/CP8

Group Statistics

Animal_ Doente	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
CP_8 sim	32	,42344	,319413	,056465
não	32	,59681	,382936	,067694

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
								95% Confidence Interval of the Difference	
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
CP_8 Equal variances assumed	1,303	,258	-1,967	62	,054	-,173375	,088152	-,349588	,002838
Equal variances not assumed			-1,967	60,066	,054	-,173375	,088152	-,349701	,002951

ANEXO 18

Teste de comparação das médias entre Animal Doente/CS8**Case Processing Summary**

Animal_Doente	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
CS_8 sim	20	58,8%	14	41,2%	34	100,0%
não	23	59,0%	16	41,0%	39	100,0%

Tests of Normality

Animal_Doente	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
CS_8 sim	,116	20	,200*	,935	20	,192
não	,262	23	,000	,707	23	,000

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Test of Homogeneity of Variance

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
CS_8 Based on Mean	11,355	1	41	,002
Based on Median	3,675	1	41	,062
Based on Median and with adjusted df	3,675	1	22,964	,068
Based on trimmed mean	8,117	1	41	,007

Ranks

Animal_Doente	N	Mean Rank	Sum of Ranks
CS_8 sim	20	18,18	363,50
não	23	25,33	582,50
Total	43		

Test Statistics^a

	CS_8
Mann-Whitney U	153,500
Wilcoxon W	363,500
Z	-1,864
Asymp. Sig. (2-tailed)	,062

a. Grouping Variable: Animal_Doente