



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**RESPOSTA FISIOLÓGICA DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE CARNEIROS
RELACIONADA A PROCESSOS ADAPTATIVOS AMBIENTAIS EM CLIMA
TROPICAL ÚMIDO DURANTE O OUTONO E INVERNO**

ADRIANO BRAGA BRASILEIRO DE ALVARENGA

**TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS
ANIMAIS**

**BRASÍLIA/DF
JUNHO DE 2011**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**RESPOSTA FISIOLÓGICA DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE CARNEIROS
RELACIONADA A PROCESSOS ADAPTATIVOS AMBIENTAIS EM CLIMA TROPICAL
ÚMIDO DURANTE O OUTONO E INVERNO**

ADRIANO BRAGA BRASILEIRO DE ALVARENGA

ORIENTADOR: Dr. FRANCISCO ERNESTO MORENO BERNAL

TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO: NÚMERO/2011

**BRASÍLIA/DF
JUNHO DE 2011**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**RESPOSTA FISIOLÓGICA DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE CARNEIROS
RELACIONADA A PROCESSOS ADAPTATIVOS AMBIENTAIS EM CLIMA TROPICAL
ÚMIDO DURANTE O OUTONO E INVERNO**

ADRIANO BRAGA BRASILEIRO DE ALVARENGA

**TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO PROGRAMA
DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS ANIMAIS,
COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À
OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS
ANIMAIS.**

APROVADA POR:

**Dr. FRANCISCO ERNESTO MORENO BERNAL (UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA)
(ORIENTADOR)**

**Dra. ELIANA DE CÁSSIA PINHEIRO (UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA)
(EXAMINADOR INTERNO)**

**Dr. ALEXANDRE FLORIANI RAMOS (EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E
BIOTECNOLOGIA) (EXAMINADOR INTERNO)**

Dr. SÉRGIO LEME (UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA) (EXAMINADOR EXTERNO)

**Dr. IRAN BORGES (UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS)
(EXAMINADOR EXTERNO)**

BRASÍLIA, 29 de Junho de 2011.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

ALVARENGA, A. B. B. **Resposta fisiológica de diferentes genótipos de carneiros relacionada a processos adaptativos ambientais em clima tropical úmido durante o outono e inverno.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2011, 89p. Tese de Doutorado.

Documento formal, autorizando reprodução desta tese de doutorado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor e seu orientador reservam para si os outros direitos autorais de publicação. Nenhuma parte desta tese de doutorado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Alvarenga, Adriano Braga Brasileiro de. **Resposta fisiológica de diferentes genótipos de carneiros relacionada a processos adaptativos ambientais em clima tropical úmido durante o outono e inverno.** – Brasília, 2011. 89p. Tese de Doutorado (D) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2011.

1. Parâmetros hematológicos. 2. Perfil bioquímico. 3. Proteínas de choque térmico. 4. Termografia. 5. Cortisol. 6. Ovinos
I. Bernal, F. E. M., II. Doutor.

Adriano Braga Brasileiro de Alvarenga

CPF 708391661-68

Cond. Entrelagos QD 4, Conj. N, casa 8.

CEP 73255-900 - Distrito Federal - Brasil

Telefone: (61) 84597757 E-mail: alvarengaunb@gmail.com

DEDICATÓRIA

Aos meus pais pela oportunidade de colocar-me em cartaz na vida e pelo incalculável apoio em todos os aspectos possíveis, mas principalmente, por despertar em mim o gosto pelos estudos e a paixão pela pesquisa dentre os inúmeros saberes repassados.

Ao meu irmão, Andersen, pela coragem e paciência em suportar-me nos momentos conturbados e, também, por acompanhar-me em nossos momentos de descontração e prazer, obrigado pelo companheirismo.

Aos parentes que de alguma forma apoiaram, em especial madrinha Sônia pela ajuda moral e logística ofertada diariamente, semanalmente... durante toda a minha vida e, principalmente, nesta fase acadêmica.

À minha companheira Tatiana por suportar-me nos momentos de tensão e agir com sabedoria para contornar situações instáveis durante o período de elaboração da tese.

Aos amigos (irmãos) Murilo, Cláudio e Adriano que desde os tempos de Universidade acreditaram em meu potencial e dividiram comigo momentos de difíceis decisões e alegrias.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, por apostar na minha capacidade e acreditar que faríamos tanto em tão pouco tempo. Obrigado por repassar-me tamanha confiança, transparecendo sempre, sinceridade, honestidade, profissionalismo, competência e companheirismo ao ponto de considerá-lo e reconhecê-lo como um amigo.

Às doutoras e professoras da UnB, Eliana Pinheiro (Ciências Fisiológicas), Concepta MCmanus (Programa de Pós-graduação em Ciências Animais) e, Gianne Paludo (Hospital Veterinário) que sempre estiveram dispostas a auxiliar na solução de meus problemas, transferindo conhecimentos para que eu pudesse alcançar meus objetivos.

Ao Alexandre (Embrapa/Campo experimental Sucupira) por ofertar conselhos e propiciar a realização deste trabalho nas dependências da campo experimental.

Aos colegas de doutorado pelo apoio na colheita dos dados, em especial Adriana, Diego.

Aos alunos da pós-graduação do Laboratório de Biologia Molecular-Biomol/UnB (Prof^{ta}. Andréa Maranhão), Rafael, Flávia, Vanessa, Janaína e demais pelo auxílio na realização dos ELISA's.

Às residentes e estagiárias do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário (UnB), em especial Aline, pela dedicação no processamento das amostras, inclusive nos finais de semana.

Aos estagiários Aline, Patrícia, Marina, Paula e João Paulo pelo auxílio nas colheitas dos dados nas campo experimentais e trabalhos nos laboratórios, especialmente Rafaela pela dedicação e auxílio na realização dos ensaios imunoenzimáticos (ELISA).

Ao funcionário Guiomar (Japão) da Campo experimental Sucupira (Embrapa) pela ajuda, inclusive nos finais de semana, no tratamento e carinho com os animais, sem os quais este não poderia ser realizado.

Ao amigo, professor Dr. Edison Rogério Cansi, por ajudar nas etapas finais de revisão de texto e formatação e à professora Maria Menina pela revisão gramatical.

Por fim, mas não por ordem de importância, aos carneiros que, talvez inconscientes, souberam elevar o meu grau de respeito e admiração para com eles.

A Capes, pela bolsa concedida durante o último ano de estudo e FAP-DF, INCT-IGSPB pelo financiamento de parte do trabalho.

A todos que fizeram parte desta caminhada e que não foram citados aqui, minhas sinceras desculpas e muito obrigado.

INDÍCE

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	iv
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACIONES	vii
CAPÍTULO 1	1
1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
1.1 Definição de Problema	1
1.2 Justificativa	1
2 OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo Geral	4
2.2 Objetivos Específicos	4
2.3 Hipótese	5
3 REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1 Parâmetros hematológicos e perfil bioquímico sérico	5
3.2 Glicocorticóides	6
3.3 Aplicabilidade biológica de câmaras termográficas	8
3.4 Proteínas de Choque Térmico (HSP)	9
CAPÍTULO 2	11
RESUMO	11
ABSTRACT	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 MATERIAIS E MÉTODOS	15
2.1 Local do experimento	15
2.2 Colheita de dados climáticos	15
2.3 Animais e manejo implementado	15
2.4 Procedimento de pesagem e registro da temperatura retal dos animais	16
2.5 Colheita de sangue para hemograma e análises bioquímicas	16
2.6 Parâmetros hematológicos avaliados	17

2.7 Análises da bioquímica sanguínea	17
2.8 Análise estatística	18
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4 CONCLUSÕES	35
CAPÍTULO 3	36
RESUMO	36
ABSTRACT	37
1 INTRODUÇÃO	38
2 MATERIAIS E MÉTODOS	39
2.1 Local do experimento	39
2.2 Animais e manejo implementado	40
2.3 Colheita de sangue para a mensuração da concentração de cortisol sérico	40
2.4 Colheita de fezes e extração de glicocorticóides fecais	40
2.5 Mensuração de glicocorticóides séricos e fecais	41
2.6 Análise estatística	41
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4 CONCLUSÕES	46
CAPÍTULO 4	47
RESUMO	47
ABSTRACT	48
1 INTRODUÇÃO	49
2 MATERIAIS E MÉTODOS	51
2.1 Local do experimento	51
2.2 Colheita dos dados climáticos	51
2.3 Animais e manejo implementado	51
2.4 Procedimento de pesagem, registro da temperatura retal e imagens termográficas dos animais	52
2.5 Análise estatística	52
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4 CONCLUSÕES	59
CAPÍTULO 5	60

RESUMO	60
ABSTRACT	61
1 INTRODUÇÃO	62
2 MATERIAIS E MÉTODOS	63
2.1 Local do experimento	63
2.2 Colheita dos dados climáticos	64
2.3 Animais e manejo implementado	64
2.4 Colheita de sangue para quantificação de HSP70 sérica	64
2.5 Reagentes e anticorpos	65
2.6 ELISA para detecção de HSP70	65
2.7 ELISA de captura/sanduíche para detecção de HSP70	67
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
4 CONCLUSÕES	72
CONCLUSÃO GERAL	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

RESPOSTA FISIOLÓGICA DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE CARNEIROS
RELACIONADA A PROCESSOS ADAPTATIVOS AMBIENTAIS EM CLIMA TROPICAL
ÚMIDO DURANTE O OUTONO E INVERNO

Adriano Braga Brasileiro de Alvarenga¹, Francisco Ernesto Moreno Bernal¹

¹Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – FAV/UnB/DF

RESUMO

Com a introdução de raças exóticas e crescimento do rebanho nacional de ovinos, a avaliação de aspectos relacionados com a adaptação destes animais na região Centro-Oeste, Brasília - DF, podendo auxiliar no aprimoramento das técnicas de manejo, alcançar maiores índices de produtividade e garantir o bem-estar animal. Neste estudo, foram avaliados dezoito machos de seis diferentes raças de ovinos de diferentes origens em duas épocas do ano. Os parâmetros hematológicos, o perfil bioquímico sérico, a concentração sérica de glicocorticóides e as imagens termográficas resultaram em informações importantes no tocante à resposta fisiológica de raças alóctones quando submetidas às condições climáticas e ambientais do Distrito Federal, podendo as mesmas ser utilizadas como referência local. Os dados foram analisados pelo programa SAS[®]. A temperatura retal, os parâmetros hematológicos e bioquímicos séricos indicam a raça Santa Inês (deslanada), comparativamente às demais raças lanadas, como a mais bem adaptada às condições climáticas da região. De acordo com as concentrações de cortisol sérico a raça Texel é a menos adaptada e a Santa Inês a mais adequada para a criação de machos reprodutores em unidade de produção animal e essas concentrações podem ser utilizadas para o monitoramento do estresse térmico. A termografia revelou que as diferentes raças apresentam diferenças nas temperaturas retais, do olho, da cernelha, da garupa e do joelho, refletindo a termogênese, o estresse térmico sofrido e podendo as mesmas ser utilizadas como referências. Seguindo o protocolo de mensuração de proteínas do estresse (HSP70), não foi possível mensurar as concentrações de HSP70 no soro de ovinos.

PALAVRAS-CHAVE: Adaptação climática, bioquímica sérica, cortisol, ovinos, parâmetros hematológicos, proteínas do estresse (HSP70), termografia.

**PHYSIOLOGICAL RESPONSE OF DIFFERENT GENOTYPES OF RAMS
RELATED WITH ADAPTIVE ENVIRONMENTAL PROCESSES IN TROPICAL
HUMID CLIMATE DURING THE AUTUMN AND WINTER**

Adriano Braga Brasileiro de Alvarenga¹, Francisco Ernesto Moreno Bernal¹
¹Faculdade de Agronomia e Veterinária – UnB/DF

ABSTRACT

With the introduction of exotic breeds and growth of the national herd of sheep, the evaluation of aspects related to the adaptation of these animals in the Midwest, Brasília - DF, which could aid in the improvement of management techniques, to achieve higher productivity levels and ensure the animal welfare. This study evaluated eighteen rams from six different breeds of sheep from different backgrounds and two seasons of the year. Hematologic parameters, serum biochemical profile, serum concentrations of glucocorticoids and the thermographic images resulted in important information regarding the exotic breeds in terms of the physiological response when exposed to weather and environmental conditions of the Federal District and may be used as a reference in the region. Data were analyzed by SAS[®] and the rectal temperature, the hematological and biochemical parameters indicate the woolless breeds, compared to other breeds were better suited to the climatic conditions. Considering concentrations of serum cortisol, the Texel breed is less well adapted and Santa Inês the most suitable for the breeding males in the animal production unit and these concentrations can be used to monitor heat stress. Thermography revealed that different breeds have differences in rectal temperatures, eye, withers, croup and knee, reflecting thermogenesis, heat stress suffered and can be used as a references. Following the protocol used, it was not possible to measure the concentrations of HSP70 in the serum of sheep.

KEYWORDS: Climatic adaptation, cortisol, hematological parameters, serum biochemistry, sheep, stress proteins (HSP70), thermography.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Variações climáticas e do índice de temperatura e umidade durante o outono (dias 3, 4 e 5 de maio) e inverno (dias 20, 21 e 22 de agosto).	19
Figura 2	Primeiros dois autovetores do outono para a temperatura retal (TR), parâmetros hematológicos e perfil bioquímico nas diferentes raças de ovinos criados na região Centro-Oeste.	33
Figura 3	Primeiros dois autovetores do inverno para a temperatura retal (TR), parâmetros hematológicos e perfil bioquímico nas diferentes raças de ovinos criados na região Centro-Oeste.	34
Figura 4	Imagem termográfica com registro das temperaturas de quatro pontos corporais da raça SI, no outono.	54
Figura 5	Imagem termográfica com registro das temperaturas de quatro pontos corporais da raça TX, no outono.	54
Figura 6	Primeiros dois autovetores do outono para a temperatura retal (TR) e demais pontos corporais nas diferentes raças de ovinos criados na região Centro-Oeste.	58
Figura 7	Primeiros dois autovetores do inverno para a temperatura retal (TR) e demais pontos corporais nas diferentes raças de ovinos criados na região Centro-Oeste.	59
Figura 8	Curva padrão construída com proteína HSP70 purificada - 0,5µg/80µL e 1,6µg/µL (HSP e HSPmáx.), anticorpos primário camundongo (C) e secundário anti-IgG camundongo (α -C) e controles (+/-) com uso de soro (S), PBS e sem a fase bloqueio (s/bloq.).	70
Figura 9	Curva padrão construída com proteína HSP70 purificada - 0,5µg/80µL e 1,6µg/µL (HSP e HSPmáx.), anticorpos primário cabra (Cb), camundongo (C) e secundário anti-IgG camundongo (α -C) e controles (+/-) com soro ou sem (S ou s/S) e sem a fase bloq.	71
Figura 10	Curva padrão construída com proteína HSP70 purificada - 0,5µg/80µL (HSP), anticorpos primário cabra (Cb), camundongo (C) e secundário	72

	anti-IgG cabra (α -Cb), curva com diluição seriada do soro e controle com soro.	
--	---	--

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Pesos corporais, temperatura retal e eritrograma das diferentes raças no outono e no inverno.	20
Tabela 2	Comparações entre peso, temperatura retal e eritrograma das diferentes raças no outono e no inverno.	22
Tabela 3	Leucograma das diferentes raças no outono e no inverno.	24
Tabela 4	Diferenças nas células leucocitárias e plaquetas das diferentes raças no outono e no inverno.	26
Tabela 5	Perfil bioquímico sérico das diferentes raças no outono e no inverno.	27
Tabela 6	Comparação do perfil bioquímico sérico das diferentes raças no outono e no inverno.	30
Tabela 7	Correlações entre dados climáticos, temperatura retal e os parâmetros hematológicos no outono e no inverno.	31
Tabela 8	Correlações entre os dados climáticos, a temperatura retal e o perfil bioquímico sérico no outono e no inverno.	32
Tabela 9	Temperatura retal (TR), concentração de cortisol sérico (CORTS) fecal (CORTF) das diferentes raças no outono e no inverno.	44
Tabela 10	Média dos dados climáticos do índice de temperatura e umidade durante a colheita dos dados fisiológicos dos carneiros.	53
Tabela 11	Número de amostras analisadas (N), média e desvio padrão ($\bar{x} \pm DP$), valores mínimos e máximos das variáveis analisadas no outono e no inverno.	54
Tabela 12	Análise das temperaturas corporais em carneiros das diferentes raças no outono e no inverno.	55
Tabela 13	Comparações entre a temperatura retal e das regiões corporais das diferentes raças no outono e no inverno.	56
Tabela 14	Coefficiente de correlação entre temperatura retal e alguns pontos corporais no outono e no inverno.	57
Tabela 15	Hora de registro dos dados, temperatura ambiente (TA) e umidade relativa do ar (UR) durante o dia quatro de junho de 2010.	69

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

ACTH - hormônio adrenocorticotrófico
APB – tampão de fosfatase alcalina
CK – Creatina quinase
CHCM - concentração hemoglobínica corpuscular média
EDTA – ácido etilenodiaminotetracético dissódico
EIA - ensaio imunoenzimático
fl - fentolitros
GC - glicocorticóides
HB - Hemoglobina
HCl – ácido clorídrico
HSP - proteínas de choque térmico
ITU - índice de temperatura e umidade
Kd – Kilo Daltons
KH₂PO₄ – monopotássio de fosfato
MgCl₂ – cloreto de magnésio
NaCl – cloreto de sódio
Na₂CO₃ – carbonato de sódio
NaHCO₃ – bicarbonato de sódio
Na₂HPO₄ - Fosfato dissódico de hidrogênio
NaN₃ – Azida de sódio
OD – “optical density” / densidade óptica
PPT - proteína plasmática total
RIA - radioimunoensaio
UV – ultra violeta
V – volts
VCM – volume corpuscular médio
VG – Volume globular
UI – Unidade Internacional

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1.1 Definição do Problema

Nos últimos anos cresceu o interesse por produtos de origem animal que estejam garantindo o mínimo de bem-estar aos animais.

As condições climáticas/ambientais e as possibilidades alimentares do Centro-Oeste conferem um potencial da região para o desenvolvimento da ovinocultura.

Atualmente, é notável a necessidade de estudos que quantifiquem alguns aspectos relacionados com a fisiologia dos animais criados sob diferentes condições e regiões.

1.2 Justificativa

A intensificação dos meios de produção através das novas técnicas adotadas por produtores visando atingir números cada vez mais expressivos e tornar a atividade mais rentável, juntamente com a competitividade gerada por um mercado mais exigente, determina a eficiência como uma condição básica para a sobrevivência de qualquer setor (Gatto, 2007). Não obstante, a exigência de um público consumidor mais bem informado tem levado ao aparecimento de leis de proteção à saúde do consumidor e de proteção ao bem-estar animal (Jaenisch, 2000).

O Brasil está passando por uma transformação significativa que visa atender à crescente valorização do bem-estar dos animais, a demanda de conhecimento e atuação nessa área são reconhecidas em vários níveis. Os estudos dos efeitos sobre o bem-estar incluem aqueles provenientes de doença, traumatismos, fome, estimulação benéfica, interações sociais, condições de alojamento, tratamento inadequado, manejo, transporte, procedimentos laboratoriais, mutilações variadas, tratamento veterinário ou alterações genéticas provenientes de seleção genética convencional ou por engenharia genética. Quando se define bem-estar

deve-se considerar a sua relação com outros conceitos como necessidades, liberdades, felicidade, adaptação, controle, capacidade de previsão, sentimentos, sofrimento, dor, ansiedade, medo, tédio, saúde e estresse (Broom & Molento, 2004).

A utilização da definição de estresse baseada tão somente em estímulos ou eventos que ativam o córtex da adrenal não apresenta um valor científico e/ou prático. Estabelecer um critério preciso sobre o que é adverso para um animal é difícil, mas um bom indicador é a existência, real ou potencial, de um efeito na adaptação biológica. Neste contexto, o estresse pode ser definido como um estímulo ambiental sobre um indivíduo que sobrecarrega seus sistemas de controle e reduz sua adaptação, ou parece ter potencial para tanto (Fraser & Broom, 1990; Broom & Johnson, 1993; Broom, 1993).

Ainda de acordo com Broom e Johnson (1993), o estresse pode ser definido como uma situação provocada por algum efeito ambiental sobre o indivíduo, o que força seu sistema de controle e reduz o seu sucesso reprodutivo, possivelmente reduzindo as taxas de reprodução, crescimento, desenvolvimento, ganho de peso e, até mesmo, aumentando a taxa de mortalidade.

As respostas aos estímulos estressores estão diretamente relacionadas com a qualidade e quantidade do mesmo (Ladewing, 1987), ou também, segundo Hamberger & Lohr (1984) relacionar-se com as condições externas como dieta, espaço individual disponível, clima, hora do dia e com as condições internas do indivíduo como a hereditariedade e memórias de eventos anteriores.

Especificamente no caso de ovinos, a exposição ao estresse térmico é acompanhada pelas alterações nas funções biológicas que incluem uma depressão da ingestão e utilização de alimentos, distúrbios no metabolismo de proteínas, equilíbrio energético e mineral, secreções hormonais e metabólitos sanguíneos. Durante o estresse térmico verifica-se uma elevação do metabolismo da água e o aumento da sua ingestão de 50%, enquanto que a perda de água diminui aproximadamente 25% a 40% nas fezes e urina, respectivamente (Marai et al., 2007).

Em relação à função termorregulatória a evaporação representa a mais importante via de dissipação de calor já que a transpiração em ovinos é menos importante que a evaporação respiratória, devido à presença da cobertura de lã (Marai et al., 2007).

A temperatura retal tem sido frequentemente utilizada para representar a temperatura central do animal. Considerando que os ovinos são essencialmente homeotermos, ou seja, animais que buscam manter a temperatura interna dentro de uma estreita faixa de variação

mesmo quando submetidos a condições climáticas adversas. Sob condições termoneutras a temperatura retal varia entre 38,3°C e 39,9°C, sendo que um aumento de temperatura ambiente de 18 para 35°C é acompanhado de um significativo aumento da temperatura retal (Marai et al., 2000, citado por Marai et al., 2007). De acordo com Thwaites (1985) a temperatura retal acima de 42°C é considerada perigosa.

Para mensurar o grau de estresse térmico ou a eficiência das diferentes respostas fisiológicas ao estresse dos animais, alguns métodos são empregados, como por exemplo, a observação de componentes celulares do sangue uma vez que o mesmo é um importante meio para se avaliar o estado de saúde de um animal (Oduye, 1976) auxiliando no controle da temperatura corporal, manutenção da concentração de água e eletrólitos nas células, regulando a concentração do íon hidrogênio no corpo e defendendo contra microrganismos. O conhecimento dos índices sanguíneos permite aos cientistas saber de várias funções dos corpúsculos sanguíneos que contribuem para a atividade homeostática e/ou toda a fisiologia do organismo (Addass, 2010).

Adicionalmente, a análise de imagens termográficas dos animais, a quantificação de proteínas de choque térmico (HSP - *Heat Shock Protein*) e de glicocorticóides (cortisol) plasmático e fecal podem representar uma importante ferramenta na avaliação do estresse.

Nos últimos anos vem ocorrendo um crescimento da ovinocultura, principalmente no Centro-Oeste onde o rebanho atual é de, aproximadamente, 1.127.878 cabeças e o Distrito Federal contribui com uma parcela de 21.000 animais, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2009).

No Brasil, observa-se a introdução de raças exóticas como a *Hampshire Down*, *Ile de France*, *Texel*, *Sulffolk* e, mais recentemente, a *Dorper*, especializadas, principalmente, na produção de carne. Estas raças, embora se encontrem bem adaptadas às condições climáticas brasileiras, carecem de um sistema de produção coerente com suas potencialidades, assim como de programas de seleção que proporcionem às suas progênes uma avaliação produtiva, com critérios de seleção semelhantes àqueles utilizados nos seus países de origem (Gouveia et al., 2006).

Considerando o atual e significativo crescimento da ovinocultura na região Centro-Oeste e com a introdução de raças exóticas, a avaliação e o conhecimento dos parâmetros hematológicos, do perfil bioquímico sérico, das imagens termográficas, das

concentrações de glicocorticóides sérico e fecal e das proteínas de choque térmico (HSP70), podem contribuir com informações indicativas do índice de estresse e do grau de adaptabilidade de diferentes raças de ovinos criados sob as condições ambientais e climáticas do Distrito Federal.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o grau de adaptabilidade e estresse de diferentes raças de carneiros em duas épocas do ano na região Centro-Oeste por meio de análises do peso corporal, da temperatura retal, dos parâmetros hematológicos, do perfil bioquímico sérico, das imagens termográficas, das concentrações de cortisol sanguíneo e fecal e das proteínas de choque térmico com peso molecular de 70kD (HSP70)

2.2 Objetivos Específicos

Analisar o peso corporal e a temperatura retal.

Avaliar os parâmetros hematológicos: hemoglobina, hemáceas, hematócrito, volume corpuscular médio, concentração hemoglobulínica corpuscular média, plaquetas, proteína total, leucócitos, monócitos, linfócitos, eosinófilos e neutrófilos.

Avaliar o perfil bioquímico sérico: albumina; aspartato aminotransferase, fosfatase alcalina, glicose, proteína, creatinina kinase e fruttosamina.

Verificar os índices de cortisol sérico e a viabilidade do *kit* comercial em detectar glicocorticóides fecais e/ou seus metabólitos.

Verificar qual das raças de machos reprodutores avaliadas apresentam maiores concentrações de proteínas de choque térmico (HSP70);

Verificar a variação diária de HSP70 a partir de amostras sanguíneas;

Avaliar por meio de imagens termográficas a temperatura em diversos pontos do corpo do animal e construir uma curva de temperatura corporal associada à curva de HSP70;

Avaliar a temperatura retal dos animais correlacionando-a com as condições climáticas;

Correlacionar os níveis de estresse dos animais relacionados aos parâmetros bioquímicos celulares, índices de cortisol e HSP70 com imagens dos animais obtidas com uma câmera infravermelho, temperatura retal e com as condições ambientais;

Obter dados que possibilitem a otimização do bem-estar das referidas raças.

2.3 Hipótese

A capacidade adaptativa das diferentes raças de machos reprodutores é divergente, poderá ser acessada pela avaliação dos valores hematológicos e bioquímicos séricos, cortisol sérico e fecal, proteínas de choque térmico (HSP70), associados à termotolerância sob as condições climáticas e ambientais do Distrito Federal.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Parâmetros hematológicos e perfil bioquímico sérico

A importância dos índices hematológicos e bioquímicos na produção animal é bastante conhecida.

As mudanças dos constituintes hematológicos são importantes indicadores do estado fisiopatológico de animais e a avaliação do sangue é também realizada para procedimentos de triagem no intuito de acessar o estado geral de saúde (Jain, 1993).

Quando a análise do histórico ou o exame físico falham no fornecimento de um diagnóstico em casos mais difíceis, os profissionais optam pelas amostras sanguíneas para uma contagem completa do sangue e perfil bioquímico, esperando que tais testes possam refletir a real condição dos animais avaliados. Caso haja alguma anormalidade nos valores sanguíneos normais, estes testes podem auxiliar no estabelecimento de prognósticos e/ou desenvolvimento de planos terapêuticos, mesmo na ausência de diagnóstico específico (Navarre, 2007, citato por Shaikat, 2010).

Adicionalmente, os valores hematológicos e o perfil bioquímico podem fornecer informações significativas do grau de estresse em que um animal se encontra (Birgel Junior et al., 2001).

3.2 Glicocorticóides

Os animais respondem fisiologicamente quando percebem eventos nocivos ou estressantes, tais como: tentativas de predação, estímulos externos nocivos ou estressantes, mudanças de *habitat*, condições meteorológicas hostis e distúrbios antropogênicos (Wingfield et al., 1997; 1998; Sapolsky et al., 2000). Durante a resposta ao estresse ocorre a ativação do eixo HPA (hipotálamo-pituitária-adrenal) com secreção de glicocorticóides (GC, cortisol ou corticosterona). Estes hormônios são secretados em resposta a uma cascata bioquímica com estimulação primária do sistema límbico, com resposta emocional de defesa e frustração prolongada (Tilbrook & Clarke, 2006; Morgan & Tromborg, 2007).

A resposta ao estresse mediada por glicocorticóides é bastante conservada em vertebrados e permite aos indivíduos lidar com estressores de curto prazo através de um conjunto de alterações fisiológicas e comportamentais que visam interromper atividades não essenciais enquanto perdura o estímulo estressante. Dentre as alterações proporcionadas pela secreção de glicocorticóides constata-se algumas mudanças adaptativas como a mobilização dos estoques de energia do corpo, gliconeogênese, dispersão de comportamentos e busca por alimentos. Ainda de acordo com Wingfield et al. (1998), a ativação do eixo HPA sob situações estressantes constitui uma “emergência” distinta na história de vida dos vertebrados.

Os glicocorticóides ainda possuem efeitos inibitórios sobre o sistema imunológico dos animais incluindo uma redução do número de linfócitos circulantes (linfopenia), um aumento do número de neutrófilos (neutrofilia), uma redução do número de eosinófilos (eosinopenia) em diversas espécies, uma queda no número total de leucócitos circulantes (leucopenia) (Griffin, 1989).

Entretanto, o tempo necessário para provocar uma resposta ao estresse difere entre as espécies, dependendo também do contexto ou fatores que a desencadearam, como por exemplo, a origem ou tipo de manejo destinado aos animais, se são provenientes de rebanhos confinados, semi-confinados ou de criações extensivas ou em último caso capturados diretamente na natureza (Treiman & Levine, 1969). É comumente aceito que em todos estes casos as concentrações basais normais de glicocorticóides são obtidas se a coleta for realizada dentro de três minutos após a captura (Place & Kenagy, 2000; Romero & Remage-Healey, 2000), porém,

as concentrações séricas de cortisol podem mudar de forma bastante dramática dentro de uma estreita janela de tempo e render concentrações séricas de menor utilidade como medida de estresse (Paramastri et al. 2007).

Baseando-se nas informações supracitadas, a realização de comparações inter-raciais ou mesmo individuais dos índices de glicocorticóides são problemáticas devido às diferenças de fatores específicos tais como o número de receptores do tecido ou concentrações de proteínas ligadoras presentes no plasma, apresentando valores diferentes (Good et al., 2003).

Diversos métodos são empregados na dosagem das concentrações de glicocorticóides, podendo ser invasivos ou não. A dosagem utilizando o plasma sanguíneo consiste em uma técnica considerada invasiva enquanto que a quantificação dos glicocorticóides utilizando fezes, urina, saliva e pêlos, são métodos não-invasivos.

As medidas de hormônios esteróides plasmáticos refletem o estado endócrino de um indivíduo em um único ponto no tempo. Portanto, alterações rápidas e de curto prazo nas concentrações de glicocorticóides como aquelas desencadeadas por situações ou ambientes novos, são melhores determinadas utilizando-se o plasma sanguíneo. No entanto, torna-se necessário verificar se as concentrações de glicocorticóides refletem as mudanças desencadeadas pela situação de interesse e não aquelas induzidas pelo tratamento e procedimento de amostras em si (Romero & Romero, 2002).

Apesar da análise de hormônio no sangue ser considerado um método convencional, os procedimentos de coleta de amostras como a captura, manipulação, contenção e venopunção, representam em si uma fonte de estresse podendo alterar os concentrações hormonais requerendo então maior rapidez no procedimento de coleta (Bentson et al., 2000). Além disso, deve-se considerar que as concentrações plasmáticas de glicocorticóides pode não ser bons indicadores, especialmente se forem utilizados para avaliar estresse a longo prazo.

De fato, o sistema regulatório por retroalimentação (*feedback*) opera no sentido de reduzir as concentrações de hormônios do estresse, ou seja, altas concentrações de glicocorticóide tendem a reduzir a produção dos mesmos agindo sobre a glândula pituitária e inibindo a síntese de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Normalmente, altas concentrações de glicocorticóides não duram mais de 90 minutos (Van de Kar et al., 1991).

Como uma alternativa à análise no sangue, o estresse pode ser avaliado através de mensurações de glicocorticóides (em alguns casos, de imunoglobulinas) na saliva, urina e

fezes. Considerando que, quase todas as espécies possuem cortisol livres detectados e medidos na saliva, o hormônio ou seus metabólitos excretados na urina e fezes podem sofrer uma variação dependendo da espécie e, também, ser excretado preferencialmente em uma ou outras vias de excreções. Em diversos estudos com animais domésticos e não-domésticos os corticosteróides radioativos são administrados para monitorar a rota de excreção (fezes ou urina), o tempo de excreção (*time lag*) e do tipo de metabólitos na urina e fezes (Paramastri et al. 2007).

A utilização de métodos não invasivos para a mensuração de cortisol mediante o uso do ensaio imunoenzimático (EIA), por exemplo, ELISA, oferece vantagens como a não utilização de isótopos radioativos como no radioimunoensaio (RIA) sendo, portanto, uma metodologia considerada precisa na obtenção de resultados e muito mais prática, embora reações cruzadas de anticorpos para outros glicocorticóides possam aparecer. O método de anticorpos policlonais para cortisol foi desenvolvido inicialmente para a mensuração a partir de amostras de sangue, contudo, pode também ser usado eficientemente em amostras de fezes (Young et al., 2004).

3.3 Aplicabilidade biológica de câmaras termográficas

A termografia por infravermelho pode ser usada para avaliação remota da temperatura cutânea (Jones & Plassmann, 2002) sem interferir no comportamento dos animais (Kastberger & Stachl, 2003).

Para se investigar aspectos correlacionados com a fisiologia, como por exemplo, a termogênese, a termografia (infravermelho) tem-se revelado cada vez mais útil e com maior aplicabilidade biológica no campo da produção animal e ambiência (Dauncey & Ingran, 1983; Banhazi et al., 2002).

A avaliação da temperatura dos animais em seu ambiente natural pode fornecer informações sobre o estado térmico dos mesmos sem a necessidade de envolvê-los em procedimentos comprovadamente estressantes como a captura e a contenção.

O registro prévio e remoto da temperatura dos animais de produção poderia antecipar na detecção de eventuais problemas de saúde apresentados pelos animais já que a elevação da temperatura corporal é um dos primeiros sinais clínicos observados e, ainda poderia auxiliar na

economia de tempo e mão-de-obra, haja vista a praticidade e agilidade na obtenção e interpretação das imagens obtidas em campo.

3.4 Proteínas de Choque Térmico (HSP)

Dentre alguns métodos que permitem acessar o nível de estresse dos animais encontra-se a mensuração de proteínas de choque térmico (*heat shock proteins* – HSP). Essas proteínas, também chamadas de proteínas de resposta ao estresse, foram descobertas por Ritossa (1962) que observou um padrão expandido em cromossomos de *Drosophila* sp. após a exposição ao calor. Desde então, diversos pesquisadores têm demonstrado que a resposta de choque térmico é muito importante em um contexto clínico. Aumento da produção de HSP, especificamente HSP70, foi relatado em algumas doenças em seres humanos (Cabin & Buchman, 1990; Deguchi & Kishimoto, 1990; Heufelder et al., 1992; Harrison et al., 1993; Moseley, 1998; Flohe et al., 1999).

O aumento da capacidade para sobreviver e adaptar-se ao estresse fisiológico é dependente da capacidade das células em estabelecer uma resposta compensatória apropriada ao estresse (Sonna et al., 2002) necessária para a regulação da expressão de HSP.

A família das proteínas de choque térmico é composta de proteínas altamente conservadas e presentes em todos os organismos. Essas proteínas são normalmente consideradas como proteínas intracelulares, embora alguns estudos tenham demonstrado que podem ser secretadas na circulação periférica (Pockley et al., 1998; Rea et al., 2001).

Sob condições fisiológicas normais, HSP são expressas em concentrações baixas (Craig & Gross, 1991) e desempenham diversas funções como chaperonas moleculares (Soti & Csermely, 2000), prevenção da desnaturação de proteína (Feder & Hofmann, 1999) ou agregações polipeptídicas inadequadas (Young, 1990). Vários estímulos estressantes, incluindo estressores fisiológicos e ambientais, induzem substanciais aumentos na síntese intracelular de HSP.

Elevadas concentrações de HSP também têm sido observadas durante situações de relevância clínica (Berberian et al., 1990; Kiessling et al., 1991; Heufelder et al., 1992; Xu & Wick, 1996; Morimoto, 1998). Vários estudos têm demonstrado a expressão de HSP, especialmente HSP70, após isquemia e reperfusão no fígado, cérebro, coração e rins (Givisiez

et al., 1999; Nowak et al. 1990; Schiaffonati et al., 1990; Knowlton et al., 1991, Simon et al., 1991; Gingalewski et al., 1996).

Exames de antígenos envolvidos na resposta imune contra bactérias e parasitas revelaram uma variedade de proteínas do estresse (Kaufmann, 1990). Além disso, a família HSP tem sido relatada a suscitar “*priming*” antígeno-específico de linfócitos T citotóxicos quando ligadas a antígenos virais ou peptídeos de tumores (Song-Dong et al., 2001). Em virtude do seu papel na inflamação e doenças infecciosas, HSP foi estudada em uma variedade de modelos clinicamente relevantes ou condições, tais como hipertermia (Li et al., 1995), hipertensão (Lovis et al., 1996), a exposição a agentes químicos e tóxicos (Witzmann et al., 1996), hipóxia (Chen et al., 1999), isquemia (Gray et al., 1999; Perdrizet et al., 1999), inflamação (Jacquier-Sarlin et al., 1994), auto-imunidade (Feige & Van Eden, 1996), câncer (Jaattela, 1999) e infecções bacterianas (Delogu et al., 1997; Nishimura et al., 1997) e virais (Kilgore et al., 1998).

As proteínas de choque térmico são proteínas muito abundantes que desempenham papel fundamental na promoção da sobrevivência celular e manutenção da função celular normal (Mayer & Bukau, 1998). A interação com componentes celulares das HSP demonstrou potenciais terapêuticos. Por exemplo, foi demonstrado que a HSP 70 interfere nas respostas inflamatórias (Muñoz et al., 1996).

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL, TEMPERATURA RETAL, PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E PERFIL BIOQUÍMICO SÉRICO DE DIFERENTES RAÇAS DE OVINOS CRIADOS SOB AS CONDIÇÕES CLIMÁTICAS DO DISTRITO FEDERAL

RESUMO

Objetivou-se neste estudo avaliar o peso, a temperatura retal, os parâmetros hematológicos, o perfil bioquímico sérico e as suas relações com as condições climáticas do Distrito Federal. Dezoito machos reprodutores de ovinos de seis raças diferentes foram investigados em três dias consecutivos em duas diferentes épocas do ano (maio e agosto), com a análise dos dados realizada pelo programa estatístico SAS[®]. As características PESO (massa corporal), TR (temperatura retal), HEM (hemáceas), VCM (volume corpuscular médio), CHCM (concentração hemoglobulínica corpuscular média) e PPT (proteína plasmática total) foram altamente significativos ($P < 0,001$) para as diferentes raças. A época (outono e inverno) influenciou significativamente ($P < 0,001$) nos fatores PESO, TR, VG (volume globular), HEM, HB (hemoglobina) e PPT e a interação da época com a raça foi significativa ($P < 0,01$) para os fatores PESO, VG, HEM, HB. Observou-se entre as raças uma diferença significativa de AST (aspartato aminotransferase), ALB (albumina) ($P < 0,001$) e FA (fosfatase alcalina) e PT (proteína total) ($P < 0,01$), enquanto que a época influenciou a GLI (glicose) ($P < 0,001$), FRUT (frutosamina) ($P < 0,01$) e PT ($P < 0,05$) e a interação raça x época apresentou diferença significativa apenas para AST ($P < 0,05$). A temperatura retal, os parâmetros hematológicos e o perfil bioquímico sérico podem ser utilizados na avaliação e na comparação da adaptabilidade dos animais em diferentes ambientes. Valores obtidos nesta investigação podem ser usados como referência local em futuros estudos e, em concordância com os valores obtidos, a raça deslanada (Santa Inês), em comparação com as raças lanadas ou com raças que apresentam pouca lã (Dorper), apresentou uma maior adaptabilidade às condições climáticas do Distrito Federal.

Palavras-chave: Adaptação; massa corpórea; parâmetros fisiológicos; ovinos; raças.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the weight, the rectal temperature, hematological parameters, serum chemistry profile and their relationship with climatic conditions in the Federal District. Eighteen rams of six different breeds of sheep were investigated on three consecutive days in two seasons (May-August), with data analysis performed using the statistical program SAS[®]. Differences in WEIGHT (body mass), RT (rectal temperature), HEM (erythrocytes), MCV (mean corpuscular volume), MCHC (mean corpuscular hemoglobin concentration) and TPP (total plasma protein) were highly significant ($p < 0.001$) for the different breeds. The season (1 and 2) significantly influenced ($p < 0.001$) by the WEIGHT, TR, VG (globular volume), HEM, HB (hemoglobin) and PPT and the effect of season on breed was significant ($p < 0.01$) for WEIGHT, VG, HEM, HB. A significant difference in AST (aspartate aminotransferase), ALB (albumin) ($p < 0.001$) and FA (alkaline phosphatase) and TP (total protein) ($p < 0.01$) was observed between breeds, while the season influenced GLI (glucose) ($p < 0.001$), FRUT (fructosamine) ($p < 0.01$) and PT ($p < 0.05$) and the interaction breed x season was significant only for AST ($p < 0.05$). The rectal temperature, haematological parameters and serum biochemical profile can be used to comparing the adaptability of animals in different environments. Values obtained in this investigation can be used as a local reference in future studies and, in agreement with the values obtained, hair breeds (Santa Inês) in comparison with the wool breeds our breeds with few wool (Dorper), showed greater adaptability to climatic conditions of the Federal District.

Keywords: Adaptation; Body weight, physiologic parameters, sheep; breeds.

1. INTRODUÇÃO

O sistema sanguíneo é essencial para manter o equilíbrio hidroelétrólítico, para o controle térmico e para o funcionamento do sistema imunológico do organismo (Voigt, 2003).

Dados sobre a hematologia são importantes para a fisiologia comparativa na tentativa de entender a adaptação dos animais ao ambiente e para monitorar a saúde da espécie (Peinado et al, 1999).

A hematologia, caracterizada pelo estudo dos constituintes do sangue, permite analisar as variações causadas por patologias no sistema sanguíneo, tecidos e órgãos, informando o estado de saúde dos animais, diagnosticando doenças, até mesmo antecedendo o aparecimento de sintomas e, possibilitando o acompanhamento da resposta a tratamentos (Garcia-Navarro & Pachaly, 1994).

Um grupo ou combinações de constituintes sanguíneos analisados em um teste de forma conjunta são denominados de perfil metabólico e as escolhas das variáveis a serem avaliadas dependem do problema investigado, do custo, da facilidade de análise e da estabilidade da amostra até o momento de processamento no laboratório (González & Scheffer, 2003).

Mesmo não sendo uma medida direta da integridade do ambiente intracelular o perfil hemato-bioquímico sérico reflete a função orgânica e a integridade celular (Lima et al., 2006). Variações nos padrões hematológicos e bioquímicos séricos podem ocorrer como resultado, por exemplo, de lesões musculares ou disfunção orgânica e ainda podem ser reflexo de extravasamento de constituintes celulares para o soro devido à regulação deficiente da absorção, excreção ou produção de constituintes séricos (Osborne et al., 2004).

Os animais respondem diferentemente quando são expostos com frequência à radiação solar, às mudanças drásticas de temperatura e outros fatores ambientais que alteram o comportamento, a produtividade e diversos fatores fisiológicos. Destes fatores, podemos destacar os parâmetros hematológicos que são considerados uma importante ferramenta na avaliação do estado de saúde do animal, bem como o grau de estresse ao qual o mesmo está submetido (Birgel Junior et al., 2001).

Várias condições podem influenciar nos valores de hematócrito dos animais, como por exemplo, a espécie, o sexo, a raça, a origem, a idade, o *habitat*, o estresse, a dieta, o nível de produção leiteira, o estado fisiológico (lactação, gestação e estado reprodutivo), a hora do dia,

a época do ano, as condições geográficas e, até mesmo o laboratório que realizou as avaliações, devido às diferentes metodologias existentes (Jain, 1993; González et al., 2001). Adicionalmente, os procedimentos laboratoriais e de manipulação das amostras não estão padronizados, possibilitando alterações entre os dados existentes (Thrall et al., 2007)

O conhecimento de valores ou intervalos de referência é de suma importância para os parâmetros hematológicos e bioquímicos sanguíneos de animais saudáveis e, também, para detectar os fatores que podem causar alterações destes valores (Pogliani & Birgel Junior, 2007).

Os valores considerados normais da série eritrocítica de ovinos (machos e fêmeas) são: eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$) entre 9 e 15, hemoglobina (g/dL) entre 9 – 15, VG (%) entre 27 – 45, MCV (fL) entre 28 – 40, MCH (pg) entre 8 – 12, e MCHC (%) entre 31 – 34. Já os valores da série leucocítica são: leucócitos totais ($/\mu\text{L}$) entre 4.000 – 8.000, neutrófilos (segmentados) entre 700 – 6.000, linfócitos entre 2.000 – 9.000, monócitos entre 0 – 750, eosinófilos entre 0 – 1.000 e basófilos entre 0 – 300. As proteínas totais (g/dL) apresentam valores entre 6,0 – 7,5 (Jain, 1993).

Diversas informações são importantes para a caracterização de uma raça, dentre elas os parâmetros hematológicos e bioquímicos, pois são indicativos de homeostase e estão associados aos fatores nutricional, sanitário e adaptativo. Essas variáveis estão sujeitas às influências causadas pela condição corporal do animal e que geralmente sofre alterações com a época do ano.

No caso de ovinos, a temperatura retal é um bom indicador de balanço térmico e pode ser usada para acessar adversidade da temperatura ambiente que afeta diversos fatores como o crescimento (West, 1999).

Sob esse ponto de vista, os animais criados sob diferentes condições climáticas podem apresentar evidentes variações dos elementos constituintes do hemograma e da composição bioquímica do sangue. Assim, a utilização de valores de referência encontrados em determinada região deve passar por uma padronização antes de serem usados como referência em outra localidade (Birgel Júnior et al., 2001).

O estudo das características fisiológicas, o estabelecimento de parâmetros hematológicos e do perfil bioquímico de raças exóticas e nativas, na região do Centro-Oeste, poderá auxiliar a determinação de genótipos mais adaptados às condições ambientais.

Assim, o presente estudo foi realizado objetivando-se analisar correlações existentes entre características fisiológicas, parâmetros hematológicos e perfil bioquímico sérico de diferentes raças de ovinos, e também as possíveis influências das condições ambientais e climáticas, mensuradas durante os períodos de colheita dos dados.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Local do experimento

O presente estudo foi realizado durante três dias consecutivos no outono (dias 03, 04 e 05 – Época I) e inverno (dias 20, 21 e 22 – Época II) de 2010 no Campo Experimental Sucupira de propriedade da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA/CENARGEN) e Hospital de grandes animais da Universidade de Brasília, localizados na cidade de Brasília. O clima predominante da região apresenta invernos secos e verões chuvosos, altitude média de 1.100m e a precipitação anual média de aproximadamente 1.493mm.

2.2 Colheita de dados climáticos

A colheita de temperatura (TA) em graus Celsius (°C) e da umidade relativa do ar UR em porcentagem (%) foi realizada em intervalos de 30 minutos pelo uso de um termohigrômetro digital (TFA), enquanto durava o experimento.

Foi calculado o índice de temperatura e umidade (ITU) de acordo com o LPHSI (1990) e modificações realizadas por Marai et al. (2001), seguindo a fórmula: $ITU = db^{\circ}C - \{(0,31 - 0,31UR)(db^{\circ}C - 14,4)\}$ onde $db^{\circ}C$ é a temperatura de bulbo seco (°C) e UR é a umidade relativa (UR%)/100.

2.3 Animais e manejo implementado

Foram utilizados 18 (dezoito) animais com idade média de 2,5 anos e de diferentes procedências, exceto do Distrito Federal, sendo três machos reprodutores de cada uma das seis diferentes raças de ovinos: Santa Inês, Bergamácia, Ile de France, Texel, Dorper e Hampshire

Down.

Os animais eram mantidos em um sistema semi-extensivo, em pasto de *Andropogon gayanus*, recebendo suplemento concentrado (400g/animal/dia), sal mineral e água a vontade.

2.4 Procedimento de pesagem e registro da temperatura retal dos animais

Todos os animais foram pesados individualmente no período de no mínimo uma semana antecedendo o experimento ou no máximo uma semana após o experimento com a utilização de uma balança comercial de uso veterinário. A temperatura retal foi aferida com o uso de termômetro veterinário digital em contato direto com o reto do animal durante 3 minutos.

2.5 Colheita de sangue para hemograma e análises bioquímicas

As colheitas iniciaram às 6 horas e trinta minutos terminando no máximo às 10 horas e posterior transferência das amostras, em caixas térmicas com gelo seco, sendo imediatamente levadas para o Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da Universidade de Brasília (Hvet/UnB) para processamento.

Cerca de 10 mL de sangue foi obtido por venopuntura jugular, utilizando-se tubos vacuolizados. Uma alíquota de 2,5 mL foi tratada com anticoagulante (ácido etilenodiaminotetracético dissódico - EDTA) para confecção dos esfregaços e realização do hemograma, os outros 2,5 mL de sangue, com anticoagulante fluoretado, sendo utilizada para dosagem de glicose. Os 5 mL restantes, sem anticoagulante, foram utilizados para obtenção do soro.

As amostras destinadas a dosagem de glicose e as utilizadas para realização do hemograma foram centrifugadas em uma centrífuga digital (Hermle[®] - Z326K) a 3.500 rpm/1.300 rcf durante 10 minutos à temperatura ambiente dentro de um prazo máximo de uma hora após a centrifugação.

O sobrenadante resultante da centrifugação do tubo desprovido de anticoagulante foi separado em alíquotas de 1,5 mL para dosagens bioquímicas e 1,5 mL estocados em *freezer* a -6°C.

2.6 Parâmetros hematológicos avaliados

Utilizou-se um contador de células sanguíneas veterinário automático (Abc[®] - *vet sheep card*) para a mensuração dos valores de eritrócitos (HEM = número x 10⁶/μL), leucócitos (LEU = número/μL), volume globular (VG = hematócrito em porcentual - %), hemoglobina (HB = concentração em g/dL), volume corpuscular médio (VCM = volume em femtolitros - fl) e a concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM = concentração em porcentual - %).

O volume globular (VG) foi obtido usando tubos capilares em centrífuga microhematócrito (CELM[®]-MH) se baseando na técnica descrita por Wintrobe (Birgel, 1982).

Os esfregaços destinados às contagens diferenciais dos leucócitos por microlitro (μL), (monócitos, linfócitos, eosinófilos e neutrófilos, respectivamente MON, LIN, EOS e NEU) foram corados por panótico rápido.

Foi mensurada também a proteína plasmática total em g/dL (PPT) através do refratômetro.

2.7 Análises da bioquímica sanguínea

As análises bioquímicas foram realizadas em até duas semanas após a colheita das amostras e estocagem do soro. Foram mensuradas as concentrações séricas de albumina (ALB) em gramas por decilitro (g/dL) pelo método do verde de bromocresol, proteína total em g/dL (PT) pelo método do biureto, glicose (GLI) em miligramas por decilitro (mg/dL) pelo método GOD-Trinder, frutamina (FRUT) em mol por litro (mol/L) pelo método de redução do NBT, fosfatase alcalina (FA) em UI por litro (UI/L) pelo método de Roy modificado, creatina quinase (CK) e aspartato aminotransferase (AST) em UI por litro (UI/L) pelo método cinético UV-IFCC.

Todos os procedimentos foram realizados utilizando kits laboratoriais de uso comercial (Labtest[®]) e as leituras usando aparelhos para análises bioquímicas (BIOPLUS[®] – Bio 2000), com luz de comprimento de onda apropriado para cada teste.

2.8 Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas utilizando o programa Statistical Analysis System SAS[®]. Utilizou-se o modelo linear geral (GLM) para determinação de efeitos fixos incluindo raça (6), dia (6), época do ano (outono e inverno) e, ainda, o efeito aleatório do reprodutor dentro da raça sobre os parâmetros avaliados.

Realizaram-se análises de variância, de correlações e de componentes principais entre as características. O valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo.

Por meio do procedimento de discriminantes e de canônicas foram avaliadas quais as características que afetam as diferenças entre as raças e a utilidade das mesmas em determinar tais diferenças. O animal dentro do grupo foi tratado como efeito aleatório.

3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados referentes à temperatura ambiente (°C), umidade relativa do ar (%) e do índice de temperatura e umidade (ITU) durante outono (dias 3, 4 e 5 de maio) e inverno (dias 20, 21 e 22 de agosto) estão apresentados na figura 1.

Conforme pode ser observado na figura 1, houve um decréscimo da média (\pm DP) da temperatura do outono ($20,7 \pm 0,8^\circ\text{C}$) para o inverno ($8,9 \pm 2,6^\circ\text{C}$) acompanhado pela diminuição da média (\pm DP) do ITU de $21,4 \pm 1$ (outono) para $9,4 \pm 2,3$ no inverno.

De acordo com Marai e et al. (2001), o ITU com valores abaixo de 22,2 indicam ausência de estresse térmico, mas no entanto, para Yousef (1985) a temperatura ambiente ideal para ovinos é de 12°C enquanto que para Hahn (1985) a temperatura crítica superior da zona de conforto é de 30°C , lembrando que esses dados são oriundos de ovinos tosquiados de regiões temperadas e espera-se que, em ovinos nativos deslanados, este limite seja maior.

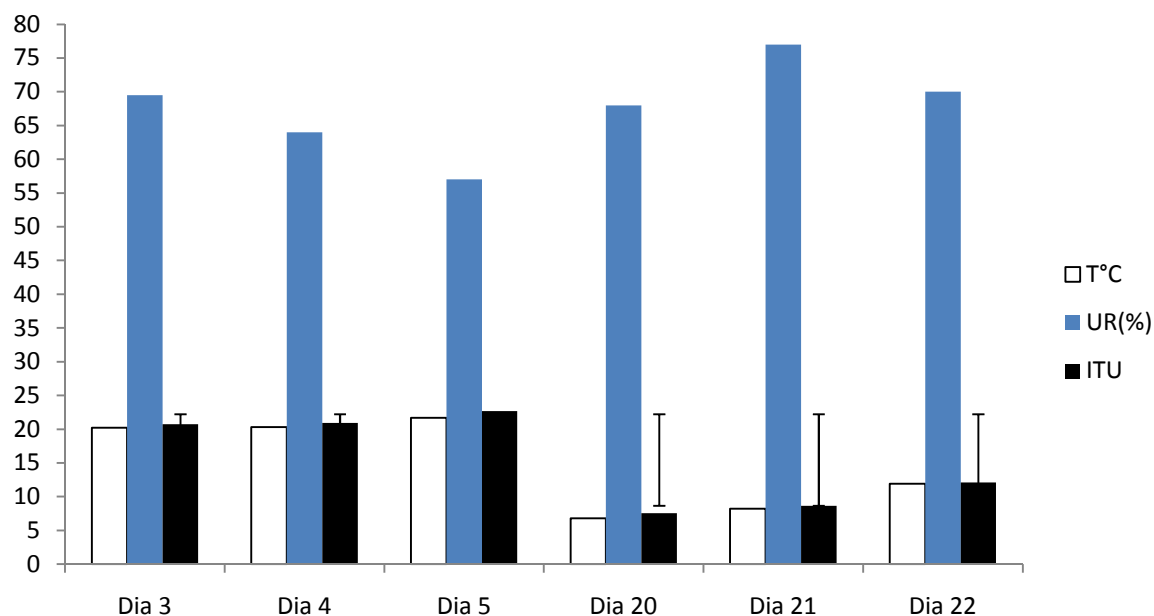


Figura 1- Variações climáticas e do índice de temperatura e umidade (ITU) durante outono (dias 3, 4 e 5 de maio) e inverno (dias 20, 21 e 22 de agosto).

Observa-se na tabela 1 que as diferenças entre os fatores PESO, TR, HEM, VCM, CHCM e PPT foram altamente significativos ($P < 0,001$) para as diferentes raças. A época (outono e inverno) influenciou significativamente ($P < 0,001$) os fatores PESO, TR, VG, HEM, HB, CHCM e PPT e a interação da época com a raça foi significativa ($P < 0,01$) para os fatores PESO, VG, HEM, HB.

Tabela 1. Pesos corporais, temperatura retal e eritrograma das diferentes raças no outono e no inverno

	PESO	TR	VG	HEM	HB	VCM	CHCM	PPT
R²	0,55	0,59	0,58	0,35	0,48	0,42	0,37	0,19
CV	12,98	1,24	11,7	13,7	11,68	4,37	10,66	9,1
Média	79,1	38,4	30,6	8,8	9,8	32,2	34,4	7,5
Raça	***	***	ns	*	ns	***	***	*
Época	*	***	***	***	***	ns	**	*
Raça x época	**	p>0,06	*	*	*	ns	p>0,09	ns
BE	65 ^c	38,5 ^{b,c}	31,1 ^a	9,1 ^{a,b}	9,9 ^a	32,5 ^{a,b}	33,3 ^b	7,36 ^{b,c}
DR	75,9 ^b	38,2 ^c	29,7 ^a	8,6 ^b	9,8 ^a	30,1 ^c	38,9 ^a	7,37 ^{b,c}
HD	96,6 ^a	38,7 ^{a,b}	31,9 ^a	9 ^{a,b}	9,9 ^a	32,9 ^{a,b}	33,3 ^b	7,42 ^{a,b,c}
IF	89,4 ^b	38,5 ^{b,c}	29,6 ^a	8,5 ^b	9,4 ^a	32,8 ^{a,b}	33,8 ^b	7,25 ^c
SI	74 ^b	37,4 ^d	31,1 ^a	9,6 ^a	10,2 ^a	31,8 ^b	32,8 ^b	7,77 ^{a,b}
TX	77 ^b	38,9 ^a	30,2 ^a	8,4 ^b	9,5 ^a	33,3 ^a	34,2 ^b	7,87 ^a
Val. R.	-	38,3-39,9 ¹	24-50 ²	8-16 ²	8-16 ²	23-48 ²	31-38 ²	6-7,5 ²

TR = temperatura retal em graus Celsius; VG = volume globular em %; HEM = eritrócitos x 10⁶/μL; HB = concentração de hemoglobina em g/dL; VCM = volume corpuscular médio em fentolitro (fl); CHCM = concentração hemoglobínica corpuscular média em % e PPT = concentração de proteína plasmática em g/dL; *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001 e ns = não significativo; coeficiente de determinação (R²); coeficiente de variação (CV); média (\bar{x}); BE = Raça Bergamácia; DR = Raça Dorper; HD = Raça Hampshire Down; IF = Raça Ile de France; SI = Raça Santa Inês; TX = Raça Texel. Médias na mesma coluna seguida de letras diferentes representam diferenças significativas (P<0,05) pelo teste de Duncan. ¹Marai et al., 2007, ²Jain, 1993.

Na época mais quente do presente estudo a média (\pm DP) da UR foi de 63,5 \pm 6,2, considerada abaixo da média ideal de 75% proposta por Nããs (1989) e a média da TA foi de 20,7°C, propiciando a termorregulação por evaporação, mas, os valores mais elevados da TR nas raças lanadas, comparativamente a raça SI (deslanada), pode indicar uma dificuldade de adaptação às condições climáticas do Distrito Federal e resultar em menores índices de produtividade já que, de acordo com McDowell (1972), um aumento de 1°C ou menos na TR é o suficiente para reduzir o desempenho da maioria dos animais domésticos.

Aparentemente, a maioria das raças apresentou um mecanismo de termorregulação eficiente já que a transpiração cutânea não é tão eficiente em ovinos com a presença de lã quando comparado com a evaporação respiratória (Silva, 2000) e a temperatura retal não alcançou valores considerados críticos que são superiores a 42°C (Thwaites, 1985).

As raças IF e TX, além de exibirem uma TR mais elevada dentre as raças estudadas no outono ainda apresentaram uma redução de TR de aproximadamente $0,8^{\circ}\text{C}$ entre outono e inverno, enquanto que as demais raças mantiveram a TR independente da temperatura do ar ou da época (tabela 2). Esta diferença pode ser atribuída a uma menor adaptação das referidas raças ao clima local, uma vez que as raças importadas expostas ao calor (radiação solar) apresentam acréscimo da transpiração e maior atividade da glândula tireóide e, conseqüentemente, taxa metabólica elevada o que justifica o incremento da TR (Rai et al., 1979; Ross et al., 1985). Tais diferenças que refletem menor tolerância ao calor das raças TX e IF também foram demonstradas em trabalho realizado por Neves e et al. (2009).

Todos os valores da série eritrocitária estavam dentro dos valores de referência (Tabela 1) e embora o VG não tenha apresentado diferença significativa para a raça, analisando-se a época e a interação raça x época, observa-se diferenças significativas ($P < 0,001$ e $P < 0,05$, respectivamente).

Tabela 2. Comparações entre peso, temperatura retal e eritrograma das diferentes raças no outono e no inverno

	PESO ¹	PESO ²	TR ¹	TR ²	VG ¹	VG ²	HEM ¹	HEM ²	HB ¹	HB ²	VCM ¹	VCM ²	CHCM ¹	CHCM ²	PPT ¹	PPT ²
R²	0,5	0,9	0,7	0,4	0,3	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	0,4	0,3	0,2	0,3	0,1	0,1
CV	17,3	3,6	0,9	1,5	10,9	12,0	9,9	15,9	9,4	12,9	4,9	3,6	6,3	13,3	9,9	8,2
Média	76,7	82,1	38,5	38,1	26,8	34,4	8,2	9,5	8,8	10,6	32,4	32	33,1	35,5	7,3	7,7
Raça	***	***	***	***	**	ns	*	*	*	ns	***	**	*	**	ns	ns
BE	58,2 ^d	71,8 ^c	38,5 ^{b,c}	38,4 ^a	26,2 ^{b,c}	36,1 ^a	8 ^{b,c}	10,2 ^{a,b}	8,6 ^b	11,2 ^a	32,5 ^{a,b}	32,4 ^a	32,8 ^b	33,7 ^b	7,1 ^{a,b}	7,6 ^a
DR	71,8 ^c	82 ^b	38,2 ^c	38,1 ^a	24,3 ^c	35,1 ^a	8,1 ^{a,b,c}	9 ^{b,c}	8,5 ^b	11 ^a	29,8 ^c	30,4 ^b	35,4 ^a	42,3 ^a	7,2 ^{a,b}	7,4 ^a
HD	87,3 ^{a,b}	93,8 ^a	38,7 ^b	38,7 ^a	29,4 ^a	34,4 ^a	8,8 ^a	9,1 ^{a,b,c}	9,6 ^a	10,1 ^a	33 ^{a,b}	32,7 ^a	32,7 ^b	33,8 ^b	7,4 ^{a,b}	7,4 ^a
IF	95,8 ^a	83 ^b	38,8 ^b	38,1 ^a	25,5 ^{b,c}	36,7 ^a	7,5 ^c	9,5 ^{a,b,c}	8,3 ^b	10,4 ^a	33,6 ^a	32 ^a	33 ^b	34,6 ^b	6,9 ^b	7,6 ^a
SI	72,1 ^c	79,5 ^b	37,4 ^d	37,4 ^b	27,7 ^{a,b}	34,4 ^a	8,7 ^{a,b}	10,6 ^a	9 ^{a,b}	11,3 ^a	31,7 ^b	32 ^a	32,4 ^b	33,1 ^b	7,4 ^{a,b}	8,1 ^a
TX	75,1 ^{b,c}	80 ^b	39,3 ^a	38,5 ^a	28 ^{a,b}	32,4 ^a	8,2 ^{a,b,c}	8,5 ^c	9 ^{a,b}	9,9 ^a	33,9 ^a	32,8 ^a	32,5 ^b	35,8 ^b	7,8 ^a	7,9 ^a
Val.	-	-	^x 38,3	-	^y 24 -	-	^y 8 -	-	^y 8 -	-	^y 23 -	-	^y 31 - 38	-	^y 6 -	-
R.	-	-	- 39,9	-	50	-	16	-	16	-	48	-	-	-	7,5	-

PESO = massa corporal em kilogramas (Kg); TR = temperatura retal em graus Celsius; VG = volume globular em %; HEM = eritrócitos x 10⁹/μL; HB = concentração de hemoglobina em g/dL; VCM = volume corpuscular médio em fentolitro (fl); CHCM = concentração hemoglobínica corpuscular média em % e PPT = concentração de proteína plasmática total em g/dL; *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001 e ns = não significativo; coeficiente de determinação (R²); coeficiente de variação (CV); média (\bar{x}); BE = Bergamãcia; DR = Dorper; HD = Hampshire Down; IF = Ile de France; SI = Santa Inês; TX = Texel. Médias na mesma coluna seguida de letras diferentes representam diferenças significativas (P<0,05) pelo teste de Duncan. ^xMarai et al., 2007, ^yJain, 1993.

Comparando o outono com o inverno (tabela 2) pode-se constatar que todos os animais apresentaram menores índices de VG e PPT no outono sugerindo que estavam mais hidratados, consequência da temperatura mais elevada nesta época, o que desencadeia o ajustamento do balanço hídrico efetuado por sensores térmicos cerebrais, sensores estes que regulam a sede e a liberação de vasopressina que estão interrelacionados no hipotálamo (Baker, 1982). Esta depressão dos valores de VG está de acordo com os resultados obtidos por El-Nouty et al. (1990), nos quais relataram o mesmo decréscimo para bovinos submetidos a estresse por calor, como resultado de um mecanismo adaptativo para propiciar água necessária ao processo de resfriamento evaporativo.

Notter et al. (2003) verificaram os valores de VG de ovinos lanados e deslanados e concluíram que animais deslanados apresentam maiores percentuais, o que não foi confirmado com os resultados obtidos neste trabalho avaliando-se os grupos raciais SI, TX e HD no outono e a raça SI e as demais (exceto TX e HD) no inverno (tabela 2). Porém, os valores referentes ao VG, HEM, HB e PPT da raça SI são maiores do que o da raça BE, assemelhando-se aos resultados obtidos por McManus et al. (2009), para as mesmas raças.

A elevação dos valores de VG, HEM e HB do outono para o inverno (tabela 2), da maioria das raças estudadas, foi proporcional aos maiores índices de VCM e CHCM, já que estes dois últimos são calculados utilizando-se valores de VG, HEM e HB, aumento que pode ser justificado pela menor ingestão hídrica no inverno devido às menores temperaturas do ar ou ainda resultado do período de aclimação ao ambiente mais quente (outono) quando ocorreu um aumento da demanda de oxigênio (Silva et al., 2006).

Em relação aos resultados da série leucocitária (Tabela 3), houve diferença significativa entre as raças investigadas ($P < 0,001$) para os valores de LEU, LIN, NEU e PLA. Entre o outono e 2 foram identificadas diferenças significativas para LIN, NEU e PLA ($P < 0,001$) e para EOS ($P < 0,05$). O efeito da época sobre a raça foi significativo para LEU e NEU ($P < 0,01$).

A raça TX foi a única a apresentar as concentrações médias de LEU e NEU acima dos valores de referência (tabela 3) para a espécie e, de acordo com Jain (1993), a leucocitose apresentada pela raça TX normalmente ocorre em animais estressados mediante a liberação de epinefrina e glicocorticóides, mas esta liberação endógena de glicocorticóides que tipicamente causa a leucocitose é acompanhada de neutrofilia e linfopenia, esta última não foi constatada. Ademais, as catecolaminas causam a contração do baço com conseqüente liberação de

eritrócitos na circulação periférica (Cross, et al., 1988) o que também não foi constatado na raça TX mas, pode ser uma explicação para os altos valores de VG, HEM e HB da raça HD durante a outono (tabela 2).

No entanto, Meyer et al. (1995) afirmaram que a leucocitose fisiológica é acompanhada de linfocitose e neutrofilia fisiológica, sendo esta última induzida pela epinefrina e de efeito temporário (durando algumas horas) podendo ser o resultado da ansiedade e esforço físico durante a contenção.

Tabela 3. Leucograma das diferentes raças no outono e no inverno

	LEU	MON	LIN	EOS	NEU	PLA
R²	0,36	0,20	0,33	0,18	0,38	0,43
CV	32,11	72,24	36,7	73,76	51,57	35,8
Média	9	241,4	3290	556,4	4959	475,9
Raça	***	ns	***	p>0,06	***	***
Época	ns	ns	***	*	***	***
Raça x época	**	ns	ns	ns	**	ns
BE	9 ^b	230,6 ^b	3441 ^{a,b}	702,8 ^a	4791 ^b	648,6 ^a
DR	8,5 ^b	244,4 ^{a,b}	2412 ^c	621,3 ^{a,b}	4980 ^b	457,4 ^b
HD	8,5 ^b	168,4 ^b	4265 ^a	549,5 ^{a,b}	3925 ^b	312,7 ^c
IF	7,3 ^b	210,6 ^b	2979 ^{b,c}	404,8 ^{a,b}	3746 ^b	415,3 ^{b,c}
SI	8 ^b	224,7 ^b	2781 ^{b,c}	368,1 ^b	4615 ^b	503,7 ^b
TX	12,4 ^a	371,7 ^a	3870 ^a	720,6 ^a	7696 ^a	517,6 ^b
Val. R.	^x 4 – 12x10 ³	^x 0 – 750	^x 2-9x10 ³	^x 0 – 1x10 ³	^x 700 – 6x10 ³	^y 250 – 750

LEU = número de leucócitos/ μ L; MON = número de monócitos/ μ L; LIN = número de linfócitos/ μ L; EOS = número de eosinófilos/ μ L; NEU = número de neutrófilos / μ L; PLA = número x 10³/ μ L; *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001 e ns = não significativo; coeficiente de determinação (R²); coeficiente de variação (CV); média (\bar{x}); BE = Raça Bergamácia; DR = Raça Dorper; HD = Raça Hampshire Down; IF = Raça Ile de France; SI = Raça Santa Inês; TX = Raça Texel. Médias na mesma coluna seguida de letras diferentes representam diferenças significativas (P<0,05) pelo teste de Duncan. ^xJain, 1993, ^yGarcia-Navarro & Pachaly, 1994.

A avaliação dos resultados encontrados no leucograma nas duas épocas (tabela 4) indica uma resposta leucocitária fisiológica de todas as raças, visto que a relação neutrófilos/linfócitos em ruminantes é da ordem de 0,5 (Jones & Allison, 2007) e a raça TX, por exemplo, apresentou relação igual a 1,9. De acordo com Batista (2009), a relação NEU : LIN pode aumentar em até

três vezes seguido de drástica redução do número de eosinófilos, indicando que estas raças poderiam apresentar um quadro de infecção, hipótese descartada uma vez que as raças não apresentaram eosinopenia.

A raça TX apresentou a maior média para o valor de LEU no outono (tabela 4) e, juntamente com a raça DR apresentaram elevados índices para relação NEU : LIF, (2,8 e 3,3, respectivamente), podendo indicar que as referidas raças estavam submetidas a algum tipo de estressor, possivelmente a elevada temperatura. No caso da raça DR, esta alta relação pode ser explicada pela linfopenia, observada em animais sob estresse severo.

Entretanto, Peinado et al. (1999) ressaltam que na maioria dos estudos com a Ordem Artiodactyla não está claro a tendência de maior frequência dos dois tipos mais abundantes de leucócitos e, possivelmente, a contagem total de leucócitos e a razão entre os tipos de células podem sofrer influência da exposição a doenças, manejo ou ser característica da própria raça.

Tabela 4. Diferenças nas células leucocitárias e plaquetas das diferentes raças no outono e no inverno

	LEU ¹	LEU ²	LIN ¹	LIN ²	EOS ¹	EOS ²	NEU ¹	NEU ²	PLA ¹	PLA ²
R²	0,40	0,17	0,28	0,24	0,13	0,12	0,39	0,10	0,41	0,24
CV	37,35	24,52	41,78	32,84	68,22	80,6	52,27	47,58	29,6	44,44
Média	9,3	8,5	2881	3691	663	453	5835	4082	556	395
Raça	***	p>0,09	**	*	ns	ns	***	ns	***	*
BE	8,3 ^b	9,8 ^a	2628 ^{a,b}	4163 ^{a,b}	821 ^a	584 ^{a,b}	4763 ^b	4820 ^a	756 ^a	541 ^a
DR	8,5 ^b	8,4 ^{a,b}	1774 ^b	3041 ^b	790 ^a	452 ^{a,b}	5863 ^b	4098 ^a	608 ^b	306 ^b
HD	8,5 ^b	8,5 ^{a,b}	3778 ^a	4751 ^a	718 ^a	359 ^{a,b}	4589 ^b	3262 ^a	322 ^c	302 ^b
IF	7,4 ^b	7,1 ^b	2708 ^{a,b}	3250 ^b	382 ^a	422 ^{a,b}	4217 ^b	3275 ^a	524 ^b	306 ^b
SI	8 ^b	8 ^{a,b}	2584 ^{a,b}	2977 ^b	469 ^a	267 ^b	4716 ^b	4515 ^a	538 ^b	469 ^{a,b}
TX	15,2 ^a	9,5 ^a	3784 ^a	3955 ^{a,b}	774 ^a	674 ^a	10865 ^a	4527 ^a	590 ^b	445 ^{a,b}
Val. R.	^x 4-12x10 ³		^x 2-9x10 ³		^x 0-1x10 ³		^x 700-6x10 ³		^y 50-750	

¹Outono e ²Inverno; LEU = número de leucócitos/ μ L; LIN = número de linfócitos/ μ L; EOS = número de eosinófilos/ μ L; NEU = número de neutrófilos/ μ L; PLA = número x 10³/ μ L e PPT = concentração de proteína plasmática total em g/dL; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 e ns = não significativo; coeficiente de determinação (R²); coeficiente de variação (CV); média (\bar{x}); BE = Bergamãcia; DR = Dorper; HD = Hampshire Down; IF = Ile de France; SI = Santa Inês; TX = Texel. Médias na mesma coluna seguida de letras diferentes representam diferenças significativas (P<0,05) pelo teste de Duncan. ^xJain, 1993, ^yGarcia-Navarro & Pachaly, 1994.

Todas as raças apresentaram o leucograma dentro dos valores de referência no inverno, mas a relação N : L de todas as raças (exceto a HD) ainda apresentava valores acima de 1,0 (tabela 4).

O número de PLA da raça BE estava acima do valor referencial no outono, enquanto que as demais raças apresentaram índices normais em ambas as épocas. A plaquetose da raça BE pode ser transitória, sendo um reflexo da mobilização esplênica ou pulmonar proporcionada pela agitação física durante a contenção (tabela 4).

Pode ser observada entre as raças (tabela 5) uma diferença significativa de AST, ALB ($P<0,001$) e FA e PT ($P<0,01$), enquanto que a época influenciou a GLI ($P<0,001$), FRUT ($P<0,01$) e PT ($P<0,05$). A interação raça x época apresentou diferença significativa apenas para AST ($P<0,05$).

Tabela 5. Perfil bioquímico sérico das diferentes raças no outono e no inverno

	AST	ALB	FA	GLI	PT	A/G	CK	FRUT
R²	0,34	0,27	0,21	0,19	0,21	-	0,14	0,16
CV	24,7	14,7	44,4	13,9	10,2	-	120,2	22,9
Média	91,5	2,7	41,4	51,6	7,5	-	148,2	208,7
Raça	***	***	**	ns	**	-	ns	ns
Época	ns	ns	ns	***	*	-	p>0,05	**
Raça x época	*	ns	ns	ns	ns	-	ns	ns
BE	87,2 ^{b,c}	2,68 ^{b,c}	55,94 ^a	53,5 ^a	7,33 ^{b,c}	0,52	112 ^{a,b}	221 ^a
DR	100,9 ^{a,b}	2,71 ^{b,c}	41,22 ^b	53 ^a	7,05 ^c	0,61	230 ^a	208 ^a
HD	75,1 ^c	3,0 ^a	41,72 ^b	50,6 ^a	7,4 ^{b,c}	0,66	95 ^b	221 ^a
IF	75,8 ^c	2,5 ^c	42,27 ^b	50,6 ^a	7,56 ^{a,b,c}	0,53	135 ^{a,b}	188 ^a
SI	107 ^a	2,93 ^{a,b}	34,66 ^b	50,05 ^a	8 ^a	0,55	123 ^{a,b}	217 ^a
TX	103,2 ^a	2,46 ^c	32,83 ^b	52,05 ^a	7,8 ^{a,b}	0,50	195 ^{a,b}	196 ^a
Val. R.	60-280 ¹	2,4-3 ¹	68-387 ¹	50-80 ¹	50-80 ¹	0,42-0,76 ¹	8,1-12,9 ¹	-

AST = aspartato aminotransferase; ALB = albumina; FA = fosfatase alcalina; GLI = glicose; PT = proteína total; A/G = relação ALB/globulinas; CK = creatina quinase; FRUT = frutamina; * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$ e ns - não significativo; coeficiente de determinação (R^2); coeficiente de variação (CV); média (\bar{x}); Val. R. = valores de referência; BE = Raça Bergamácia; DR = Raça Dorper; HD = Raça Hampshire Down; IF = Raça Ile de France; SI = Raça Santa Inês; TX = Raça Texel. Médias na mesma coluna seguida de letras diferentes representam diferenças significativas ($P<0,05$) pelo teste de Duncan. ¹Kaneko et al., 2008.

Os valores apresentados para a enzima FA (tabela 5) estão todos abaixo dos valores de referência utilizados, não evidenciando nenhum sinal clínico. No entanto, tais valores são úteis apenas para investigações realizadas sob as mesmas condições do presente estudo, pois apresentam índices divergentes de outros trabalhos, como por exemplo, Silveira (1988) com valores compreendendo de 5 a 30 UI/L e Baumgartner & Pernthaner (1994) compreendendo de 56 a 445 UI/L.

O contrário ocorre com os valores de CK que estão acima dos valores de referência podendo indicar alguma lesão ou estresse muscular. De acordo com Masek et al. (2009) os valores de referência para CK estão entre 96,4 e 368,8 UI/L. Tais diferenças de valores médios encontrados entre os trabalhos, evidencia a necessidade de utilização de valores referenciais locais. Para Bórnez et al. (2009), as diferenças na atividade da CK podem ser parcialmente atribuídas às diferenças de temperamentos/comportamentos das raças, observados em estudos com diferentes raças de cabras (Kannan et al., 2008) e também neste estudo, demonstrando limitações da atividade enzimática como indicadores de estresse.

O aumento da CK observado em todas as raças (exceto HD) no inverno (tabela 6), também pode ser resultado do esforço físico destes animais durante a contenção ou do tremor muscular (termogênese) apresentado pelos animais em resposta a baixa temperatura, bastante perceptível (observação pessoal) nas raças DR e SI.

A relação albumina/globulina (tabela 5) de cada raça dentro da época e entre as médias de outono ($\bar{x} = 0,57$) e de inverno ($\bar{x} = 0,58$), se encontraram dentro dos valores referenciais conforme as demais raças.

De um modo geral, as raças originadas ou adaptadas a clima frio possuem valores de HEM circulantes e de substratos plasmáticos (Glicose) mais elevados (Young, 1989), o que não foi constatado neste estudo, pois o aumento de HEM e GLI no inverno ocorreu em todas as raças (tabela 6), independente de serem raças autóctones ou alóctones.

Mirkena et al. (2010) apontaram que a caracterização de algumas raças como improdutivas é resultado de programas de melhoramento animal orientados erroneamente que importam raças exóticas consideradas mais produtivas baseadas em seus desempenhos nos ambientes de origem. Os mesmos autores afirmam que estudos genéticos sobre adaptação de animais de produção podem ser determinados em três níveis genéticos: espécie, raça e variação genética individual dentro da raça.

A maior adaptabilidade da raça SI e a menor adaptabilidade da raça TX são semelhantes às afirmações de Mikerna et al. (2010) de que em áreas tropicais quentes e condições climáticas estressantes, onde os patógenos e doenças epidêmicas estão espalhados e água e alimentos são escassos, raças autóctones localmente adaptadas apresentam grau de resistência e adaptação bem superiores devido às suas raízes evolucionárias, comparadas às raças importadas.

Tabela 6. Comparação do perfil bioquímico sérico das diferentes raças no outono e inverno.

	AST ¹	AST ²	ALB ¹	ALB ²	FA ¹	FA ²	GLI ¹	GLI ²	PT ¹	PT ²	CK ¹	CK ²	FRUT ¹	FRUT ²
R²	0,24	0,37	0,22	0,27	0,20	0,21	0,06	0,11	0,19	0,14	0,13	0,12	0,03	0,19
CV	18,29	30,26	12,59	16,7	46,52	41,6	15,76	12,2	11,34	8,8	38,72	136,1	23,55	22,1
Média	93,9	89,2	2,7	2,6	43,4	39,4	49	54,3	7,7	7,3	114,2	182,3	221,7	195,8
Raça	*	***	*	**	*	*	ns	ns	p>0,05	ns	ns	ns	ns	p>0,06
BE	90,5 ^{a,b}	83,9 ^{b,c}	2,6 ^c	2,8 ^{a,b}	55,4 ^a	56,4 ^a	48,2 ^a	58,7 ^a	7,5 ^{a,b}	7,1 ^a	105 ^{a,b}	120 ^a	221 ^a	221 ^a
DR	106,2 ^a	95,7 ^{a,b}	2,7 ^{b,c}	2,7 ^{a,b}	50,1 ^a	32,3 ^b	51,6 ^a	54,3 ^a	7 ^b	7 ^b	124 ^{a,b}	336 ^a	222 ^a	195 ^{a,b}
HD	83,1 ^b	67,2 ^c	3,1 ^a	2,9 ^a	45,6 ^{a,b}	37,8 ^b	46,7 ^a	54,5 ^a	7,6 ^{a,b}	7,1 ^a	110 ^{a,b}	80 ^a	231 ^a	211 ^{a,b}
IF	85,7 ^b	66 ^c	2,6 ^{b,c}	2,4 ^{b,c}	47,1 ^a	37,4 ^b	49 ^a	52,2 ^a	7,6 ^{a,b}	7,5 ^a	96,5 ^b	174 ^a	203 ^a	172 ^b
SI	91,5 ^{a,b}	122,4 ^{a,b}	3 ^{a,b}	2,9 ^a	36,3 ^{a,b}	33 ^b	47,1 ^b	53 ^a	8,4 ^a	7,6 ^a	105 ^{a,b}	142 ^a	227 ^a	208 ^{a,b}
TX	106,2 ^a	100,2 ^a	2,7 ^{b,c}	2,3 ^c	26,1 ^b	39,5 ^b	51,3 ^a	52,8 ^a	8 ^a	7,6 ^a	145 ^a	242 ^a	225 ^a	168 ^b
Val. R.	60-280 ^x	2,4-3 ^x	68-387 ^x	50-80 ^x	6-7,9 ^x	8,1-12,9 ^x	-	-	-	-	-	-	-	-

¹Outono e ²Inverno; AST = aspartato aminotransferase; ALB = albumina; FA = fosfatase alcalina; GLI = glicose; PT = proteína total; CK = creatina quinase; FRUT = frutamina; *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001 e ns - não significativo; coeficiente de determinação (R²); coeficiente de variação (CV); média (\bar{x}); Val. R. = valores de referência; BE = Bergamãcia; DR = Dorper; HD = Hampshire Down; IF = Ile de France; SI = Santa Inês; TX = Texel. Médias na mesma coluna seguida de letras diferentes representam diferenças significativas (P<0,05) pelo teste de Duncan. ^xKaneko et al., 2008.

Tabela 7. Correlações entre resultados climáticos, temperatura retal e os parâmetros hematológicos no outono e no inverno

	TA	UR	TR	VG	HEM	HB	VCM	CHCM	LEU	MON	LIN	EOS	NEU	PLA
UR	-0,69													
TR	0,51	-0,04												
VG	-0,79	0,50	-0,16											
HEM	-0,69	0,39	-0,31	0,65										
HB	-0,45	0,46	-0,25	0,77	0,87									
VCM	0,86	-0,86	0,20	0,11	0,11	0,10								
CHCM	-0,17	0,55	0,03	0,01	-0,31	0,01	-0,55							
LEU	-0,13	0,52	0,31	-0,07	-0,02	-0,02	-0,05	0,04						
MON	-0,12	0,31	0,15	0,13	0,09	0,11	0,10	-0,11	0,37					
LIN	-0,97	0,57	0,09	0,27	0,27	0,29	-0,08	0,00	0,45	0,05				
EOS	-0,06	-0,55	0,00	-0,30	-0,16	-0,22	-0,06	-0,01	0,23	0,07	0,12			
NEU	0,87	-0,31	0,31	-0,23	-0,15	-0,17	-0,08	0,03	0,89	0,35	0,05	0,08		
PLA	0,71	-0,45	0,09	-0,29	-0,19	-0,28	0,13	-0,18	-0,04	-0,01	-0,34	0,12	0,08	
PPT	-0,74	0,14	-0,04	0,18	-0,01	-0,01	-0,17	0,06	0,25	0,09	0,10	0,04	0,25	-0,02

TA = temperatura ambiente em °C; UR = umidade relativa em %; TR = temperatura retal em °C; VG = volume globular em %; HEM = eritrócitos x 10⁹/μL; HB = concentração de hemoglobina em g/dL; VCM = volume corpuscular médio em fentolitro (fL); CHCM = concentração hemoglobínica corpuscular média em %; LEU = número de leucócitos/μL; MON = número de monócitos/μL; LIN = número de linfócitos/μL; EOS = número de eosinófilos/μL; NEU = número de neutrófilos/μL; PLA = número x 10³/μL e PPT = concentração de proteína plasmática total em g/dL.

A alta correlação verificada entre a TA, LIN e NEU (tabela 7) também foi observada por estudos realizados com diferentes raças de equinos (Paludo et al., 2002) e ovinos (McManus et al., 2009) nos quais a leucocitose fisiológica ocorreu provavelmente devido a exposição ao sol ou a ação da epinefrina e cortisol liberados mediante outros agentes estressores (Jain, 1993).

A correlação da FRUT com a ALB ($P < 0,001$; $r = 0,35$) na tabela 8, se assemelha com o trabalho de Soares e et al. (2009) no qual os mesmos autores também encontraram correlações da FRUT com GLI e PT ($P < 0,05$).

No presente trabalho não houve correlação significativa (tabela 8) entre FRU e o PESO ($p = 0,3$; $r = -0,09$), mas a raça TX foi a que exibiu menor ganho de peso (comparada às demais raças) e a raça IF foi a única a perder peso do outono para o inverno (Tabela 2) acompanhado de menores índices de FRUT em ambas as épocas (Tabela 6), enquanto a raça BE permaneceu com os valores de FRUT estável independente da época. Estes resultados vão ao encontro dos achados de Stear et al. (2001), no qual foi encontrada uma correlação positiva entre a concentração de frutosamina e a massa corporal dos animais, podendo a mesma ser utilizada para o monitoramento indireto do ganho e/ou perda de peso de ovinos.

Tabela 8. Correlações entre os dados climáticos, a temperatura retal e o perfil bioquímico sérico no outono e no inverno

	TA	UR	TR	AST	ALB	FA	GLI	CK	FRUT
UR	-0,69								
TR	0,51	-0,04							
AST	-0,93	0,71	-0,12						
ALB	0,59	-0,11	-0,17	0,12					
FA	0,78	-0,29	0,09	0,25	0,22				
GLI	-0,58	-0,13	-0,04	0,14	0,09	0,17			
CK	0,56	-0,86	-0,03	0,13	-0,13	-0,14	0,08		
FRUT	-0,04	0,55	0,07	0,03	0,35	0,10	-0,13	-0,12	
PT	0,51	-0,36	-0,00	-0,01	-0,22	-0,27	-0,29	0,06	0,05

TA = temperatura ambiente em °C; UR = umidade relativa em %; TR = temperatura retal em °C; AST = aspartato aminotransferase; ALB = albumina; FA = fosfatase alcalina; GLI = glicose; PT = proteína total; CK = creatina quinase; FRUT = frutosamina.

Existe um grupo de animais com alta VG, HEM e HB e com baixa FRUT, PLA e CHCM, indicando uma possível desidratação (aumento de VG, HEM e HB) e deficiência de ferro (PLA). A baixa CHCM é consequência do aumento da HEM e da FRUT pode ser resultado de uma depleção de carboidratos.

Analisando-se os coeficientes de autovetores associados às componentes principais do outono (Figura 2), o primeiro componente indica que um alto LEU, NEU, PT e LINF está associado com um baixo ALB e GLI. Isto significa que este subgrupo de animais apresentou uma leucocitose fisiológica podendo ser um reflexo do procedimento de contenção ou estresse térmico por calor, ação da epinefrina ou cortisol, enquanto que baixa ALB pode indicar alguma insuficiência hepática e da GLI relacionada a aspectos nutricionais.

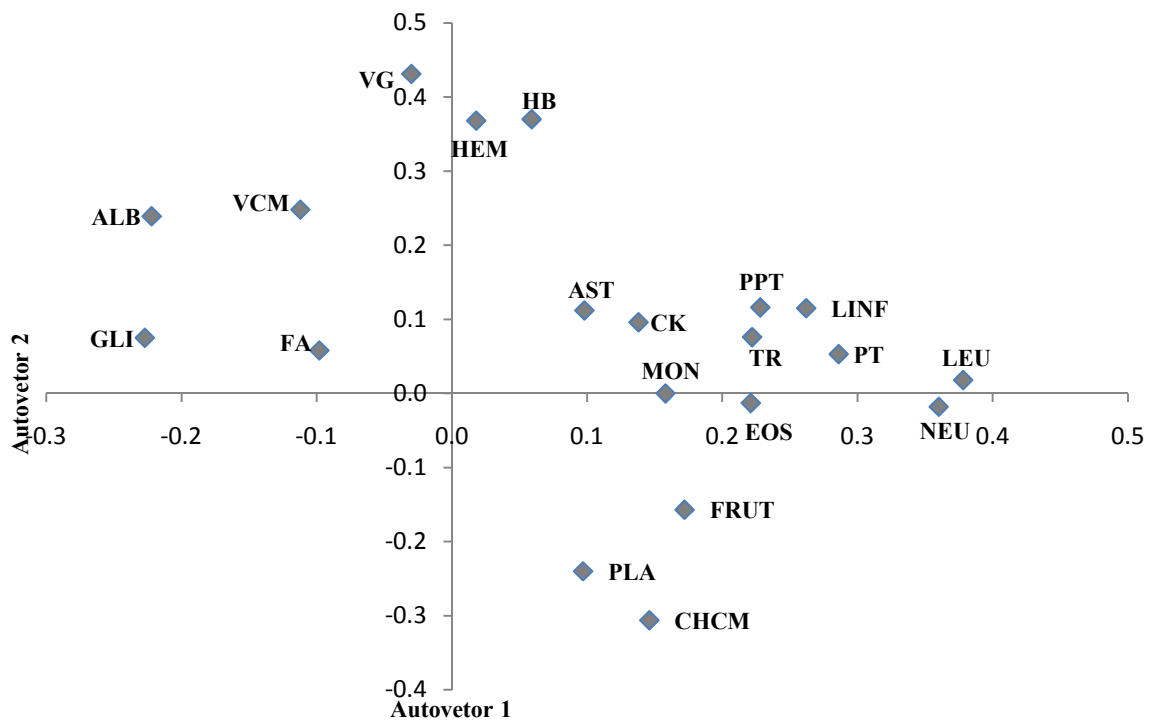


Figura 2. Primeiros dois autovetores do outono para a temperatura retal (TR), parâmetros hematológicos e perfil bioquímico nas diferentes raças de ovinos criados na região Centro-Oeste. Aspartato aminotransferase (AST), albumina (ALB), fosfatase alcalina (FA), glicose (GLI), proteína total (PT), creatina quinase (CK) e frutamina (FRUT), volume globular (VG), hemoglobina (HB), hemáceas (HEM), volume corpuscular médio (VCM), concentração hemoglobulínica corpuscular média (CHCM), leucócito (LEU), monócito (MON), linfócito (LINF), eosinófilo (EOS), neutrófilo (NEU), plaquetas (PLA) e proteína plasmática total (PPT).

Observa-se na figura 3 (inverno) que no segundo momento existem animais com altos EOS, LINF e FA, mas com baixos PT e PPT. A elevação de EOS e LINF pode estar associada a agentes estressores como o processo de contenção e a de FA com danos hepáticos e/ou musculares. A redução de PT e PPT pode ser resultado de uma maior retenção de líquidos, consequência da redução da sudorese e da transpiração na época mais fria.

No primeiro momento existem animais com alta HEM, HB e VG e baixa TR, VCM e EOS. O aumento de HEM, HB e VG pode ser explicado pela provável redução da ingestão hídrica nesta época mais fria do estudo, temperatura refletida também na baixa da TR. A redução de VCM é resultado do aumento de HEM e a de EOS pode indicar que este subgrupo apresentava algum processo infeccioso.

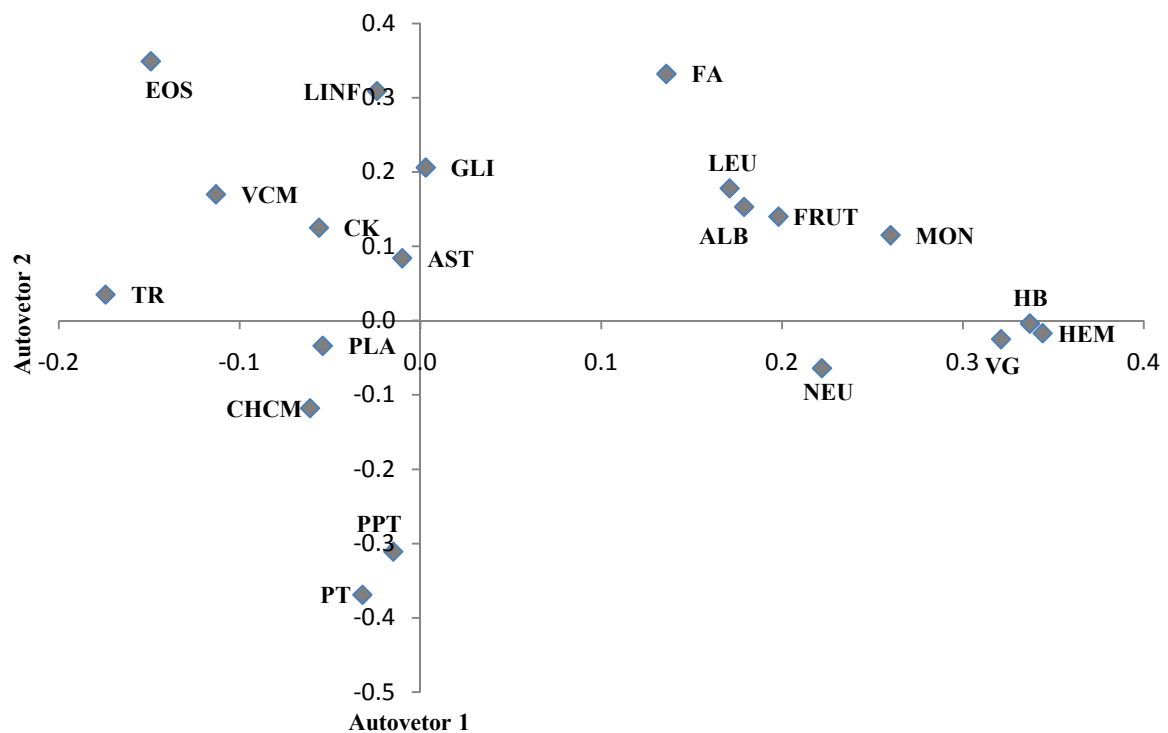


Figura 3. Primeiros dois autovetores do inverno para a temperatura retal (TR), parâmetros hematológicos e perfil bioquímico nas diferentes raças de ovinos criados na região Centro-Oeste. Aspartato aminotransferase (AST), albumina (ALB), fosfatase alcalina (FA), glicose (GLI), proteína total (PT), creatina quinase (CK) e frutamina (FRUT), volume globular (VG), hemoglobina (HB), hemáceas (HEM), volume corpuscular médio (VCM), concentração hemoglobulínica corpuscular média (CHCM), leucócito (LEU), monócito (MON), linfócito (LINF), eosinófilo (EOS), neutrófilo (NEU), plaquetas (PLA) e proteína plasmática total (PPT).

4. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho sugerem uma maior adaptabilidade às condições climáticas do Distrito Federal da raça deslanada (Santa Inês) em detrimento das demais raças investigadas.

A escassez de investigações científicas sobre os valores hemato-bioquímicos e térmico, possibilita o uso dos resultados obtidos neste estudo como uma referência em futuros estudos realizados sob as mesmas condições climáticas e ambientais.

O melhor entendimento dos resultados encontrados neste trabalho pode ser auxiliado por estudos que avaliem a velocidade do vento e demais características dos animais como a taxa de sudação, espessura, comprimento e densidade da lã.

CAPÍTULO 3

CONCENTRAÇÃO SÉRICA E FECAL DE GLICOCORTICOIDES NAS DIFERENTES RAÇAS DE OVINOS CRIADOS NO DISTRITO FEDERAL

RESUMO

Objetivou-se neste trabalho a investigação, por meio do método ELISA, das concentrações de cortisol sérico (CORTS) e fecal (CORTF) de dezoito machos reprodutores de ovinos de seis diferentes raças (n=18), criados sob as condições climáticas do Distrito Federal. Os dados foram analisados no programa estatístico SAS[®] e, embora a concentração de (cortisol sérico) esteja acima dos valores de referência para a espécie, os resultados de CORTS e de TR (temperatura retal), mostraram que a raça deslanada SI (Santa Inês) se apresenta melhor adaptada às condições climáticas do Distrito Federal, comparativamente à raça lanada TX (Texel). Referente aos valores médios de CORTF (cortisol fecal), houve uma diferença (P<0,001) entre épocas e não foram detectadas diferenças significativas para a raça e para a interação raça x época. Os achados anteriores nos permitem inferir que os *kits* comerciais utilizados não foram adequados para a mensuração de glicocorticóides fecais intra-época.

Palavras-chave: Cortisol fecal; cortisol sérico; ovinos; temperatura retal.

ABSTRACT

The objective of this work was to investigate, using ELISA, the levels of serum (CORTS) and fecal (CORTF) cortisol in eighteen rams from six different sheep breeds, raised under the climatic conditions of the Federal District. The data were analyzed with the statistical program SAS[®] and although the concentration of serum cortisol is above the reference values for the species, the results of CORTS and TR (rectal temperature), showed that hair breed SI (Santa Ines) appears to be suited to the climatic conditions of the Federal District when compared to the wool breed TX (Texel). Referring to the average values of CORTF (fecal cortisol), there was a significant difference ($P < 0.001$) between seasons and there were no significant differences between breeds or interaction breed x season. Which previous finding allows for the inference that commercial kits are not suitable for measuring fecal glucocorticoid intra-season.

Keywords: Fecal cortisol; rectal temperature, serum cortisol, sheep.

1 INTRODUÇÃO

O “estresse” é um termo geralmente utilizado para fatores ambientais que requerem dos animais um mecanismo adaptativo e uma resposta a estes desafios (Mormède et al., 2007). Os animais respondem fisiologicamente quando percebem perigo externo ou estímulo estressante incluindo tentativas de predação, climas hostis, mudanças de *habitat* e distúrbios antropogênicos, através de uma cascata rápida de secreção endócrina no eixo hipotalâmico-pituitária-adrenal (HPA) (Sapolsky et al., 2000).

O sistema nervoso autônomo (SNA) (Cannon, 1935) e o eixo HPA (Selye, 1936) são os mais explorados nos estudos sobre estresse, embora a interpretação da ativação destes sistemas ainda necessita de continuadas pesquisas (Mormède et al., 2007).

Esta resposta fisiológica ao estresse está bastante preservada em vertebrados e a elevação das concentrações de glicocorticóides possibilita ao indivíduo enfrentar estressores de curto prazo através de uma complexa rede de alterações fisiológicas e comportamentais com suspensão das atividades que não são consideradas essenciais, enquanto durar o evento estressor (Cabezas et al., 2007).

As repostas ao estresse podem ser agudas ou crônicas. Estresse agudo ocorre quando fatores ambientais de vida curta exigem do animal algum comportamento imediato ou resposta fisiológica de curto prazo para evitar o efeito negativo. Ao contrário, o estresse crônico é uma condição causada por um estressor ou uma série de eventos estressantes com magnitude e duração suficiente para deslocar recursos que seriam destinados para outras funções biológicas, como o metabolismo, o crescimento, a reprodução, ou a função imune, no intuito de enfrentar o agente estressor e, ainda, pode ser um fenômeno importante conduzindo a mudanças fisiológicas de longo prazo e à susceptibilidade a doenças (Moberg, 2000).

No que diz respeito aos mecanismos fisiológicos o estresse não é uma herança ruim. Os glicocorticóides, por exemplo, são secretados em situações que não são consideradas estressantes como a corte, a cópula e a caça e a concentração sanguínea embora seja a mais usada para indicar o estresse, requer algumas precauções já que o aumento da secreção deste hormônio pode não ocorrer com qualquer tipo de estressor (Broom & Johnson, 1993).

Ademais, a coleta de amostras de cortisol frequentemente envolve a contenção e

manipulação dos animais, podendo ser um evento estressante e confundir os resultados (Hopster et al., 1999).

Diversos pesquisadores têm optado pelo uso de métodos considerados não-invasivos colhendo amostras de corticóides (metabólitos) e determinando-as em saliva (Cooper, 1989), urina (Ray & Mormède, 1998) ou leite (Verkerk et al., 1998). No entanto, todas essas possibilidades de determinação apresentam limitações, pois a obtenção da urina e saliva exige algum tipo de manipulação e pode ser aplicado a um número limitado de animais em movimento e o leite está restrito a animais lactantes (Mormède et al., 2007)

De acordo com Mölst et al. (2002), dentre todos os métodos, a colheita de amostras fecais são as melhores pelo fato de não estressar o animal e à facilidade de obtenção.

Sob o ponto de vista da produção animal, a exposição de animais a altas temperaturas estimula receptores térmicos periféricos a transmitirem impulsos nervosos que suprimem o centro de apetite no hipotálamo reduzindo a ingestão de alimentos e, conseqüentemente, diminuindo os substratos disponíveis para as atividades enzimáticas e a produção de hormônios (Marai et al., 2007).

Neste estudo, objetivou-se avaliar o nível de estresse das raças de ovinos criados sob as condições climáticas do Distrito Federal por meio da mensuração das concentrações de cortisol sérico e de glicocorticóides fecais.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Local do experimento

O presente estudo foi realizado durante três dias consecutivos nos meses de maio (dias 04, 05 e 06) e agosto (dias 20, 21 e 22) de 2010 no Campo Experimental Sucupira de propriedade da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA/CENARGEN) e Hospital de grandes animais da Universidade de Brasília, localizados na cidade de Brasília. O clima predominante da região é do tipo Aw de Köppen (tropical chuvoso), com invernos secos, verões chuvosos, altitude média de 1.100 m e a precipitação anual média de aproximadamente 1.493 mm.

2.2 Animais e manejo implementado

Foram utilizados 18 (dezoito) animais com idade média de 2,5 anos e de diferentes procedências, exceto do Distrito Federal, sendo três machos reprodutores de cada uma das seis raças de ovinos: Santa Inês, Bergamácia, Ile de France, Texel, Dorper e Hampshire Down.

Os animais foram mantidos em um sistema semi-extensivo, em pasto de *Andropogon gayanus*, recebendo suplemento concentrado (400g/animal/dia), sal mineral e água a vontade.

2.3 Colheita de sangue para a mensuração da concentração de cortisol sérico

As colheitas do outono iniciaram às 06 horas e trinta minutos e terminaram no máximo às 09 horas. Durante o inverno as colheitas iniciaram às 06 horas e finalizaram trinta minutos após e todas as amostras foram posteriormente transferidas em caixas térmicas com gelo seco, para o Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da Universidade de Brasília (Hvet/UnB) para o processamento imediato.

Aproximadamente 5 mL de sangue foram coletados por venopuntura jugular utilizando-se tubos vacuolizados sem anticoagulante. As amostras foram centrifugadas em uma centrífuga digital (Hermle® - Z326K) a 3.500 rpm/1.300 rcf durante 10 minutos à temperatura ambiente no máximo uma hora após as colheitas, o soro foi separado em microtubos plásticos (2 mL) em alíquotas de 1,5 mL e estocadas em *freezer* a -25°C para determinações de cortisol sérico.

2.4 Colheita de fezes e extração de glicocorticóides fecais

A colheita de aproximadamente dez gramas (10 g) de fezes do reto dos animais com o auxílio de sacos plásticos transparentes foi realizada nas baias de descanso no período da manhã (entre às 7 e 8 horas). Posteriormente, as fezes foram transportadas em gelo seco, e a extração dos glicocorticóides (GC) foi realizada dentro de uma hora, segundo a metodologia sugerida a seguir.

Alíquotas de cinco gramas (5g) de fezes foram pesadas em uma balança digital (Marte® - BL3200H, N° IMETRO 6482858 em 04/04/2010) transferidas para tubos plásticos de 1,5mL com adição de etanol a 80% e submetidas ao agitador (Phoenix® - AP59) durante 30 segundos.

Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 3.500rpm/1.300rcf durante 5 minutos à temperatura ambiente (25°C) e alíquotas de 1,5mL do sobrenadante foram estocados em microtubos plásticos e congelados (-25°C).

2.5 Mensuração de glicocorticóides séricos e fecais

A mensuração dos índices cortisolêmicos foi realizada através do método imunoenzimático ELISA, utilizando-se *kit* comercial para mensuração da concentração de cortisol. A sensibilidade do *kit* para cortisol direto é de 0,4 µg/dL e a reatividade cruzada é a seguinte: cortisol, 100%; prednisolona, 13,6%; corticosterona, 7,6%; deoxicorticosterona, 7,2%; progesterona, 7,2%; cortisona, 6,2%; deoxicortisol, 5,6%; prednisona, 5,6% e dexametasona, 1,6%. A curva-padrão foi construída a partir da densidade óptica (D. O.) média dos calibradores em nanômetros (nm) e as concentrações (µg/dL) de 0, 0.5, 2, 5, 10, 30 e 60.

A absorbância foi mensurada com um comprimento de onda de 450nm através de um leitor de placas automático (Biotek Instruments[®] - USA, EL-800).

2.6 Análise estatística

Durante as duas épocas (outono e inverno), os animais (raças) foram selecionados de forma aleatória e o grupo de pesquisadores se alternava entre as raças para reduzir o efeito do pesquisador, da sequência e do tempo de colheita das amostras sobre os resultados.

Utilizou-se o modelo linear geral (GLM) para determinação de efeitos fixos incluindo raça (6), dia (6), época do ano (outono e inverno) e, ainda, o efeito aleatório do reprodutor dentro da raça sobre os parâmetros avaliados. O valor de $P < 0,05$ foi considerado como significativo.

As análises foram feitas utilizando o programa estatístico *Statistical Analysis System* (SAS[®]).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observa-se que a TR e o CORTS apresentaram diferenças significativas ($P < 0,001$) entre as raças e épocas de estudo e o CORTF somente para a época ($P < 0,001$). A interação época*raça apresentou diferença significativa ($P < 0,01$) apenas para TR (tabela 9).

Todas as raças apresentaram valores de CORTS acima dos valores utilizados como referenciais, indicando a necessidade de utilização de valores de referência por região (local).

A raça que apresentou o maior valor médio de TR foi a TX, acompanhado do maior valor médio de CORTS, enquanto que a raça IF exibiu uma TR de $0,4^{\circ}\text{C}$ abaixo da TX e com uma média das concentrações de CORTS menor, comparativamente às demais raças. Por outro lado, a raça SI que apresentou menor TR, apresentou valor de CORTS intermediário (tabela 9).

Avaliando os resultados do outono observa-se que a raça TX possui a TR e CORTS mais elevados. Baseado apenas nestes dois parâmetros fisiológicos avaliados sugere-se que a raça TX esteja enfrentando maior grau de dificuldade para adaptar-se ao clima local.

Comparando a média da TR de todas as raças entre a outono e 2, pode-se observar que houve uma redução média de apenas $0,1^{\circ}\text{C}$ nas raças BE, DR e HD e uma manutenção da média na raça SI, enquanto que nas raças IF e TX houve uma redução média de $0,7^{\circ}\text{C}$ e $0,8^{\circ}\text{C}$, respectivamente. Todas as raças sofreram uma redução dos valores médios de CORTS de aproximadamente $3,0 \mu\text{g/dL}$ com exceção da raça TX que reduziu sua concentração em $3,7 \mu\text{g/dL}$, devido ao seu alto índice de cortisol sérico no outono ($7,2 \mu\text{g/dL}$). A redução da TR e CORTS do outono para o inverno da raça TX pode indicar que a raça mencionada se adapta melhor em condições de temperatura média do ar reduzida (TA inverno, $\bar{x} = 8,9^{\circ}\text{C}$) já que a mesma possui origem em país de clima temperado, embora ainda continuasse a apresentar os maiores valores médios de CORTS em relação às demais raças.

De acordo com Young et al. (1989), animais oriundos de clima temperado possuem adaptações morfológicas como a redução do tamanho das orelhas e pernas para reduzirem o fluxo sanguíneo em tecidos periféricos, diferenças estas que podem ser observadas comparando-se, por exemplo, as raças de regiões do referido clima (TX) com as de clima tropical (SI).

Webster et al. (1969) sugerem que a exposição prévia ao frio em ovinos adultos oferece um considerável aumento (50%) na capacidade de resistir ao frio, resultando no aumento da taxa cardíaca, da capacidade de produção de calor e da taxa metabólica basal, o que poderia

justificar a manutenção da TR ou redução de $0,1^{\circ}\text{C}$ no inverno (tabela 9) de algumas raças como a BE, DR, HD e SI.

Em situações de frio, Young et al.(1989) relataram que ocorre um aumento dos hormônios relacionados ao metabolismo energético, situação esperada para as raças SI e DR (tabela 9), mas que não foi confirmada mesmo considerando o clima dos locais originários.

Com a exceção da raça TX , todas as raças reduziram o CORTS do outono para o inverno (tabela 9) e no inverno a raça IF apresentou o menor valor médio de CORTS, podendo sugerir que as oscilações climáticas não são potenciais fontes de estresse para a raça.

Os valores de TR, CORTS e CORTF no outono e no inverno (tabela 9), indicam que as raças DR e SI se encontram bem adaptadas às condições climáticas do Distrito Federal, considerando a relação existente entre a adaptabilidade e o país de origem das mesmas, onde as temperaturas ambientais são relativamente elevadas.

Os resultados do presente estudo não estão em conformidade com os encontrados por outros pesquisadores nos quais as raças mais selecionadas (produção de carne) como a TX e HD apresentaram menores índices de cortisol plasmático do que as raças menos especializadas ou selecionadas (Hall et al., 1998; Goddard et al., 2000) o que pode ser devido às diferenças climáticas entre os locais de estudo, evidenciando diferenças na adaptação em relação à origem das respectivas raças.

Tabela 9. Temperatura retal (TR), concentração de cortisol sérico (CORTS) e fecal (CORTF) das diferentes raças no outono e no inverno

	TR	CORTS	CORTF	TR ¹	TR ²	CORTS ¹	CORTS ²	CORTF ¹	CORTF ²
R²	0,6	0,9	0,9	0,7	0,3	0,5	0,1	0,5	0,8
CV	1,1	9,8	0,8	0,8	1,4	7,6	14,5	0,4	1,6
Média±DP	38,4±0,7	4,8±1,6	2,9±0,9	38,5±0,06	38,2±0,06	6,3±0,6	3,3±0,4	3,8±0,05	2,0±0,1
Raça	***	***	ns	***	***	***	ns	ns	ns
Época	***	***	***	-	-	-	-	-	-
Raça x época	**	p>0,05	ns	-	-	-	-	-	-
BE	38,5±0,4 ^{b,c}	4,7±1,4 ^{b,c}	2,9±0,9 ^a	38,5±0,3 ^{b,c}	38,4±0,6 ^a	6,1±0,5 ^c	3,4±0,5 ^{a,b}	3,8±0,04 ^a	2,1±0,1 ^a
DR	38,2±0,4 ^c	4,6±1,4 ^c	2,9±0,9 ^a	38,2±0,1 ^c	38,1±0,5 ^a	6±0,2 ^c	3,2±0,2 ^{a,b}	3,8±0,6 ^a	2,0±0,1 ^a
HD	38,7±0,2 ^{a,b}	5,0±1,7 ^b	2,9±0,9 ^a	38,8±0,2 ^b	38,7±0,2 ^a	6,7±0,6 ^b	3,3±0,4 ^{a,b}	3,9±0,3 ^a	2,0±0,2 ^a
IF	38,5±0,6 ^{b,c}	4,5±1,6 ^c	2,9±0,9 ^a	38,8±0,2 ^b	38,1±0,7 ^a	6±0,8 ^c	3,1±0,5 ^b	3,8±0,05 ^a	2,0±0,2 ^a
SI	37,4±0,5 ^d	4,8±1,6 ^{b,c}	2,9±0,9 ^a	37,4±0,6 ^d	37,4±0,3 ^b	6,3±0,3 ^c	3,2±0,2 ^{a,b}	3,8±0,05 ^a	2,0±0,2 ^a
TX	38,9±0,6 ^a	5,3±1,9 ^a	2,9±0,9 ^a	39,3±0,2 ^a	38,5±0,7 ^a	7,2±0,4 ^a	3,5±0,4 ^a	3,9±0,6 ^a	2,1±0,1 ^a
Val. R.	^x 38,3 - 39,9	^y 2,2±0,3							

¹Outono e ²Inverno; *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001 e ns = não significativo; TR = temperatura retal em °C; CORTS = concentração de cortisol sérico em µg/dL; CORTF = concentração de cortisol (µg) em 0,5g de fezes; coeficiente de determinação (R²); coeficiente de variação (CV); média (\bar{x}); BE = Raça Bergamãcia; DR = Raça Dorper; HD = Raça Hampshire Down; IF = Raça Ile de France; SI = Raça Santa Inês; TX = Raça Texel, Médias na mesma coluna seguida de letras diferentes representam diferenças significativas (P<0,05) pelo teste de Duncan. ^xMarai et al., 2007; ^yKaneko et al., 2008.

Referente aos valores médios de CORTF, não foram detectadas diferenças significativas entre raça ou na interação raça x época.

A análise de amostras sanguíneas pode oferecer não apenas a concentração total de glicocorticóides (GC), mas também a quantidade que está livre. Os GCs normalmente se encontram ligados às proteínas carreadoras, as globulinas ligantes de corticosteróides (GLC) e apenas a forma livre é biologicamente ativa, compreendendo de 5 a 10% do total (Rosner, 1990).

É comum a utilização da liberação de GCs como a resposta completa do organismo a um estressor, no entanto existem múltiplos fatores que estão associados aos efeitos dos GCs como o número de receptores e a abundância das proteínas ligantes do plasma que podem ser reguladas de acordo com as condições fisiológicas e ambientais para alterar a resposta do organismo ao estresse (Breuner & Orchinik, 2002). De acordo com os mesmos autores, essa ligação de GCs com GLCs pode servir como um tampão do tecido contra efeitos deletérios da elevação de CORT, regulador da disponibilidade de hormônio livre para os tecidos-alvos, ou alterador da taxa de purificação (*clearance*) de CORT.

Os GCs são metabolizados pelo fígado antes de serem excretados na urina e nas fezes por meio da bile (Palme et al., 2005) e de acordo com os mesmos autores, apenas os GCs livres ou os não ligados a GLC são degradados pelo fígado fazendo com que amostras fecais forneçam um perfil hormonal de longo prazo com menos interferência de estressores agudos.

Para Sheriff et al. (2010) a interpretação dos ensaios com amostras fecais reside em dois pressupostos críticos e não testados ainda: o primeiro se os metabólitos fecais de GCs refletem os níveis livres e ativos de GCs no plasma e segundo, se as diferenças nas concentrações de GCs fecais dos animais é um reflexo acurado do seu estado fisiológico e, conseqüentemente, da sua habilidade de responder ao estressor.

Para Möstl et al. (2002) através da realização de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) combinando fase direta e reversa, existem pelo menos 21 metabólitos de cortisol nas fezes de ovinos. Nesse caso, a concentração de cortisol fecal em ruminantes deverá ser mensurada utilizando o EIA-11-oxoetiocholanolone, desenvolvido por Palme & Möstl (1997), já que estes autores demonstraram que os metabólitos fecais predominantes são esteróides não conjugados e que não podem ser detectados com cortisol imunorreativo. A hidrolisação dos metabólitos de cortisol fecal conjugado durante a passagem pelo intestino pode ser devido à atividade bacteriana (Möstl & Palme, 2002).

Entretanto, estudos recentes mostram a pertinência da similaridade entre as concentrações de glicocorticóides livres e fecais, confirmando que os metabólitos fecais refletem o cortisol sanguíneo, livre e biologicamente ativo e que são excelentes para predizer a resposta do animal aos estressores (Sheriff et al., 2010).

Houve correlação significativa entre a TR e o CORTS ($r = 0,32$; $P < 0,01$) e entre TR e CORTF ($r = 0,23$; $P < 0,05$).

As concentrações de cortisol sérico de outono indicam que os animais estavam submetidos a algum tipo de estressor, possivelmente estresse agudo devido à contenção. As concentrações de cortisol fecal de outono não refletem fidedignamente as concentrações séricas do mesmo período, podendo a fecal ser uma medida de longo prazo (estresse crônico) e mais confiável na avaliação dos efeitos da temperatura sob a adaptação dos animais.

As diferenças nas concentrações de cortisol das raças investigadas podem estar refletindo o perfil cortisolêmico de cada uma das raças, podendo também ser utilizado como referência em trabalhos realizados na região.

4 CONCLUSÕES

Considerando os parâmetros analisados as raças Santa Inês e Dorper foram as que melhor se adaptaram ao clima da região, durante outono e inverno, indicando serem as mais propícias para a criação em unidades de produção animal e a raça TX a menos adequada. Ovinos criados sob estas condições climáticas podem ser monitorados em relação ao estresse refletido pelas concentrações de cortisol em diferentes épocas do ano e os resultados obtidos neste trabalho podem servir de referência para estudos posteriores.

CAPÍTULO 4

IMAGENS TERMOGRÁFICAS COMO UMA ALTERNATIVA METODOLÓGICA COMPLEMENTAR DA AVALIAÇÃO TÉRMICA EM DIFERENTES RAÇAS DE CARNEIROS CRIADOS NO DISTRITO FEDERAL

RESUMO

As imagens termográficas podem fornecer informações sobre o conforto térmico dos animais de produção possibilitando alterações no manejo implementado, visando a maximização do bem-estar animal, do desenvolvimento e do aumento da rentabilidade da atividade. Neste trabalho, objetivou-se a utilização de imagens termográficas, como uma alternativa na avaliação do estresse térmico de seis diferentes raças de ovinos machos (n=18) criados sob as condições climáticas do Distrito Federal. Os dados foram analisados no programa estatístico SAS[®]. A temperatura retal (TR), temperatura da cernelha (Tcer), temperatura da garupa (Tgar) e a temperatura do joelho (Tjoe) apresentaram diferenças significativas ($P < 0,001$) entre as raças (exceto para a temperatura do olho - Tolh) e épocas investigadas. Não houve diferenças significativas entre a interação época x raça estudada. A Tjoe pode ser utilizada como uma medida aproximada da termogênese dessas raças de ovinos sob as condições climáticas, já que apresentou o maior valor de correlação ($r = 0,38$) com a TR, considerada uma medida da temperatura central dos animais.

Palavras-chave: estresse térmico, raças de carneiros, temperatura retal, temperatura corporal.

ABSTRACT

Thermographic images can provide information on the thermal comfort of livestock allowing changes in management implemented, aiming to maximize animal welfare, development and increased profitability of the activity. This work aimed to study of use of thermographic images, as an alternative to evaluate the thermal stress of six different breeds of rams (n=18) reared under the climatic conditions of the Federal District. Data were analyzed using statistical package SAS[®]. Rectal temperature (RT), temperature of the withers (T_{cer}), temperature of the rump (T_{gar}) and the temperature of the knee (T_{joe}) differed significantly ($p < 0.001$) between all breeds, except temperature of the eye (T_{olh}), and seasons investigated. There were no significant differences in the interaction between season and breed. The T_{joe} may be used as an approximate measure of thermogenesis of these breeds of sheep under these weather conditions as they showed the highest correlation ($r = 0.38$) with RT, considered a measure of core temperature of animals.

Keywords: Body temperature, heat stress, ram breeds, rectal temperature.

1 INTRODUÇÃO

O monitoramento do estresse de animais de cativeiro, como por exemplo, os mantidos em laboratórios, zoológicos e campo experimentais é importante, especialmente sob o ponto de vista do crescimento da consciência da necessidade de melhorar o bem-estar animal e considerando-se que os animais estressados são mais suscetíveis a doenças, conforme estudos que comprovam a relação entre o sistema nervoso e o endócrino e o imunológico (Siegel et al. 1987; Herbert & Cohen, 1993). Adicionalmente, tem crescido também a consciência sobre a necessidade de se avaliar o estresse utilizando métodos válidos e confiáveis (Beerda et al. 1996).

O importante não é somente usar indicadores apropriados para o estresse, mas também reduzir o próprio estresse que, considerando o impacto do mesmo na fisiologia e comportamento, em última análise melhora a qualidade e a confiabilidade dos dados (Queyras & Carosi, 2004).

O bem-estar de animais é um assunto complexo e uma avaliação acurada envolve uma extensa investigação de parâmetros fisiológicos, endócrinos e comportamentais. Embora o estudo dos componentes do comportamento seja um meio não invasivo de avaliar o estresse, ele pode ser melhorado e realçado pelo conhecimento da resposta hormonal. É válido ressaltar que em alguns casos o estresse deve ser avaliado baseando-se em dados fisiológicos, pois estímulos estressantes nem sempre desencadeiam mudanças comportamentais (Vicent & Michell, 1992).

Diversos meios são utilizados para verificar o estresse em animais, tais como a temperatura retal, a taxa de batimento cardíaco e a taxa respiratória (Marai et al., 2007). Porém, o método mais utilizado para mensurar o estresse é a análise de hormônios sanguíneos (principalmente glicocorticóides), o qual envolve a contenção para a colheita de amostras, a manipulação e a venopunção, representando uma fonte de estresse para o animal, podendo ainda alterar os níveis hormonais (Bentson, 2000).

Uma abordagem alternativa seria a verificação do estresse térmico, que é considerado um fator limitante do desempenho para alguns animais de produção, como ovinos. Quando o animal começa a sofrer em virtude da elevada temperatura, ocorre uma redução da ingestão de alimentos, do metabolismo e da atividade da tireóide, afetando o crescimento, conversão alimentar, eficiência reprodutiva, produção leiteira e conduzindo a perdas econômicas (West,

2003).

De acordo com Pollock et al. (1994), mecanismos complexos controlam a temperatura corporal e cutânea envolvendo estimulação e inibição simpática combinada para as artérias, arteríolas, vênulas, veias e anastomoses arteriovenosas. Existe ainda a contribuição da vasoconstrição cutânea para a hipertermia do corpo (Blessing & Seaman, 2003) e evidências de que o fluxo sanguíneo cutâneo e a vasoconstrição simpática das artérias da pele alteram a temperatura da mesma (Vianna & Carrive, 2005).

A utilização de imagem térmica (infravermelho) de animais de produção e do alojamento dos mesmos permite uma avaliação objetiva do ambiente e do conforto térmico dos animais sob um manejo específico e, posteriormente, o uso destas informações para a tomada de decisões que maximizem o desenvolvimento dos animais e a rentabilidade da atividade. Ainda pode ser avaliada a variação de temperatura dos componentes estruturais dos galpões de produção, o impacto do *spray* de refrigeração e da pele molhada sobre a temperatura da superfície cutânea, a produção e acompanhamento da produção de calor pelos animais, conseqüentemente, a atividade metabólica em repouso, em atividade, ou durante e após a alimentação (Kastberger & Stachl, 2003).

O principal problema da mensuração da temperatura da pele e do corpo está associado à dificuldade de registro das mesmas sem a indução de outras reações de estresse devido à presença ou manipulação por humanos (Berz, 1998).

Neste contexto, a termografia por infravermelho pode ser usada para avaliação remota da temperatura cutânea (Jones & Plassmann, 2002) sem interferir no comportamento dos animais (Kastberger & Stachl, 2003). Técnicas termográficas têm obtido sucesso em algumas pesquisas com animais domésticos, com o intuito de avaliar a resposta ao estresse térmico, mas, no entanto, sua utilização na produção de ovinos é pouco pequena.

Partindo deste ponto de vista, a avaliação do estresse térmico ao qual o animal está submetido poderia auxiliar sinergicamente os demais meios de identificação do grau de estresse térmico em unidades de produção animal.

Objetivou-se com este estudo mensurar por meio de imagens termográficas e temperatura retal a fim de avaliar o grau de adaptação de diferentes raças de carneiros às condições climáticas do Brasil Central.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Local do experimento

O presente estudo foi realizado durante três dias consecutivos nos meses de maio (dias 04, 05 e 06) e agosto (dias 20, 21 e 22) de 2010 no Campo Experimental Sucupira de propriedade da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA/CENARGEN) e Hospital de grandes animais da Universidade de Brasília, localizados na cidade de Brasília. O clima predominante da região é do tipo Aw de Köppen (tropical chuvoso), com invernos secos, verões chuvosos, altitude média de 1.100m e a precipitação anual média de aproximadamente 1.493mm.

2.2 Colheita de dados climáticos

A colheita de temperatura ambiente (TA) e da umidade relativa do ar (UR) foi realizada em intervalos de 30 minutos com o uso de um termohigrômetro digital (TFA), enquanto durava o experimento. Foi calculado o índice de temperatura e umidade (ITU) de acordo com Marai e et al. (2001), seguindo a fórmula: $ITU = db^{\circ}C - \{(0,31 - 0,31UR)(db^{\circ}C - 14,4)\}$ na qual o $db^{\circ}C$ é a temperatura de bulbo seco ($^{\circ}C$) e UR é a umidade relativa (UR%)/100.

2.3 Animais e manejo implementado

Foram utilizados 18 (dezoito) animais com idade média de 2,5 anos e de diferentes procedências, exceto do Distrito Federal, sendo três machos reprodutores de cada uma das seis diferentes raças de ovinos: Santa Inês, Bergamácia, Ile de France, Texel, Dorper e Hampshire Down.

Os animais foram mantidos em um sistema semi-extensivo, em pasto de *Andropogon gayanus*, recebendo suplemento concentrado (400g/animal/dia), sal mineral e água a vontade.

2.4 Procedimento de pesagem, registro da temperatura retal e imagens termográficas dos animais

Todos os animais foram pesados no mínimo uma semana antes do experimento ou no máximo uma semana após o experimento com a utilização de uma balança digital.

A temperatura retal foi aferida simultaneamente às demais coletas (período matutino) com o uso de termômetro veterinário digital (PetQuality[®]) em contato direto com o reto do animal durante 3 minutos.

As imagens termográficas foram obtidas com uma câmera portátil infravermelho (Flir Systems[®] – i50/b50). Este tipo de câmera converte a radiação, com comprimento de onda de 8-12 μm , emitida naturalmente por um objeto (neste caso a superfície da pele ou lã dos animais) em um sinal elétrico que é processado em um padrão térmico. O valor de emissividade utilizado foi de 0,98, conforme as orientações do fabricante para os tecidos biológicos.

Todas as imagens foram registradas a uma distância máxima de dois metros de cada animal. Posteriormente, foi selecionada a imagem que compreendia completamente toda a lateral esquerda do animal para que a temperatura externa dos seguintes pontos fosse registrada uniformemente: olho, cernelha, garupa e membro ou pata anterior esquerda, região do joelho.

As imagens foram selecionadas, arquivadas e, posteriormente, analisadas em um programa computacional específico (ThermaCam[®]– QuickReport, versão 1.1) fornecido pelo fabricante da câmera termográfica.

2.5 Análise estatística

As análises foram feitas utilizando o programa Statistical Analysis System SAS[®]. Utilizou-se o modelo linear geral (GLM) para determinação de efeitos fixos incluindo raça (6), época do ano (outono e inverno) e, ainda, o efeito aleatório do reprodutor dentro da raça sobre os parâmetros avaliados. Os valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

Através do procedimento de discriminantes e de canônicas foram avaliadas quais as características que afetam as diferenças entre as raças e a utilidade das características em determinar diferenças. O animal dentro do grupo foi tratado como efeito aleatório.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados referentes a temperatura ambiente, umidade relativa do ar e o índice de temperatura e umidade (ITU) durante o período de colheita dos dados podem ser observados na tabela 10.

O número de amostras, a média e desvio padrão ($\bar{x} \pm DP$), valores mínimos e máximos dos pesos, das temperaturas retal (TR) e do ambiente (TA) e da umidade relativa do ar (UR) estão apresentados na tabela 11.

Tabela 10. Médias dos dados climáticos e do índice de temperatura e umidade durante a colheita dos dados fisiológicos dos carneiros.

DIA	TA (°C)	UR (%)	ITU*
03/05/10	20,2	69,5	20,75
04/05/10	20,3	64	20,95
05/05/10	21,7	57	22,67
20/08/10	6,8	68	7,55
21/08/10	8,2	77	8,64
22/08/10	11,9	70	12,13

*ITU = índice de temperatura e umidade.

Tabela 11. Número de amostras analisadas (N), média e desvio padrão ($\bar{x} \pm DP$), valores mínimos e máximos das variáveis analisadas no outono e no inverno

	N	($\bar{x} \pm DP$)	MÍN.	MÁX.
TR	107	38,3 \pm 0,7	36,4	39,7
PESO	96	79,0 \pm 14,3	52,7	125,3
TA	108	14,8 \pm 6,6	6,8	21,7
UR	108	67,5 \pm 6,6	57	77

PESO = massa dos animais em kilogramas (kg); TA = temperatura ambiente em graus Celsius (°C); UR = umidade relativa do ar em porcentual (%).

Podem ser observados dois exemplares das imagens termográficas (figuras 4 e 5) registradas no outono de duas diferentes raças de ovinos (SI e TX).

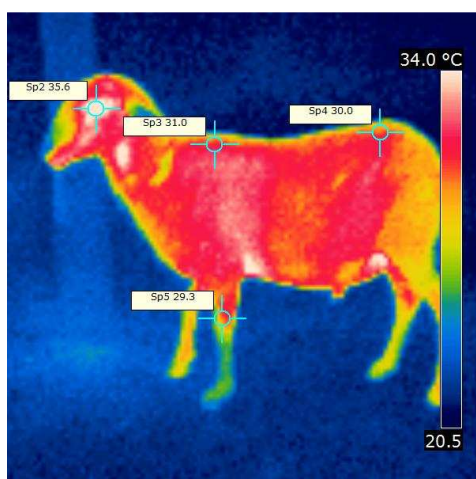


Figura 4 - Imagem termográfica com registro das temperaturas de quatro pontos corporais da raça SI, no outono.

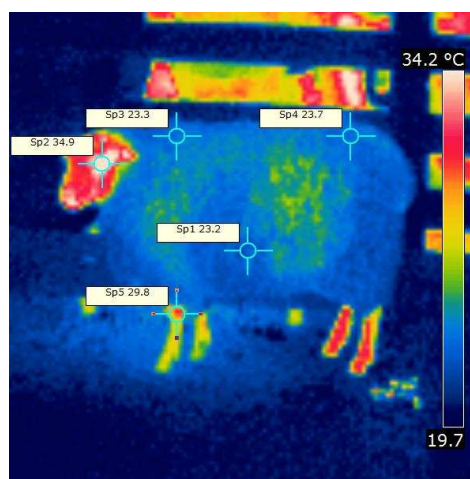


Figura 5 - Imagem termográfica com registro das temperaturas de quatro pontos corporais da raça TX, no outono.

A TR, Tolh, Tcer, Tgar e Tjoe apresentaram diferenças significativas ($P < 0,001$) para todas as raças (exceto Tolh) e épocas investigadas (tabela 12). Não houve diferenças significativas para o efeito da época sobre as raças estudadas.

Tabela 12. Análise das temperaturas corporais em carneiros das diferentes raças no outono e no inverno.

	TR	Tolh	Tcern	Tgar	Tjoe
R²	0,6	0,9	0,9	0,9	0,9
CV	1,2	4,9	8,0	8,3	7,8
Média	38,4	30,5	20,4	20,6	25,5
Raça	***	p>0,05	***	***	***
Época	***	***	***	***	***
Raça x época	p>0,06	ns	ns	ns	ns
BE	38,5 ^{b,c}	31,2 ^a	20,1 ^c	20,4 ^{b,c}	25,4 ^a
DR	38,2 ^c	29,9 ^b	21,3 ^b	21,5 ^b	25,8 ^a
HD	38,7 ^{a,b}	30,4 ^{a,b}	19,1 ^{c,d}	19,2 ^{c,d}	26,1 ^a
IF	38,5 ^{b,c}	30,7 ^{a,b}	19,1 ^{c,d}	19,7 ^{c,d}	26,3 ^a
SI	37,4 ^d	29,6 ^b	24,1 ^a	24,1 ^a	22,5 ^b
TX	38,9 ^a	31,2 ^a	18,5 ^d	18,6 ^d	26,9 ^a
Val. R.	38,3 – 39,9 ¹	-	-	-	-

TR = temperatura retal; Tolh = temperatura externa do olho; Tcer = temperatura da cernelha; Tgar = temperatura da garupa e Tjoe = temperatura externa do joelho esquerdo. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001 e ns = não significativo; coeficiente de determinação (R²); coeficiente de variação (CV); média (\bar{x}); BE = Bergamácia; DR = Dorper; HD = Hampshire Down; IF = Ile de France; SI = Santa Inês; TX = Texel. Médias na mesma coluna seguida de letras diferentes (a,b,c,d) representam diferenças significativas (P<0,05) pelo teste de Duncan. ¹Marai, 2007.

Tabela 13. Comparações entre a temperatura retal e das regiões corporais dos carneiros das diferentes raças no outono e no inverno.

	TR ¹	TR ²	Tolh ¹	Tolh ²	Tcern ¹	Tcern ²	Tgar ¹	Tgar ²	Tjoe ¹	Tjoe ²
R²	0,74	0,38	0,30	0,11	0,56	0,67	0,55	0,60	0,30	0,50
CV	0,94	1,49	3,7	7,4	6,7	12,2	6,5	14,3	6,3	11,6
Média	38,5	38,1	35	23,9	26,2	11,7	26,4	11,9	30,6	17,9
Raça	***	***	**	ns	***	***	***	***	**	***
BE	38,5 ^{b,c}	38,4 ^a	35,9 ^{a,b}	24,2 ^a	26 ^{b,c}	11,3 ^{b,c}	26,3 ^{b,c}	11,5 ^{b,c}	29,8 ^{a,b}	20 ^a
DR	38,2 ^c	38,1 ^a	34,3 ^c	23,5 ^a	27,3 ^b	12,5 ^b	27,6 ^b	12,5 ^b	31,2 ^a	17,8 ^a
HD	38,7 ^b	38,7 ^a	34,8 ^{b,c}	23,9 ^a	24,9 ^c	10,5 ^c	25 ^{c,d}	10,5 ^{b,c}	31,1 ^a	18,5 ^a
IF	38,8 ^b	38,1 ^a	34,6 ^c	25 ^a	24,8 ^c	10,7 ^c	25,4 ^{c,d}	11,1 ^{b,c}	31,4 ^a	18,8 ^a
SI	37,4 ^d	37,4 ^b	34 ^c	23,2 ^a	29,8 ^a	15,6 ^a	29,6 ^a	15,8 ^a	28,3 ^b	13,8 ^b
TX	39,3 ^a	38,5 ^a	36,2 ^a	23,8 ^a	24,3 ^c	9,9 ^c	24,4 ^d	10 ^c	31,7 ^a	19,8 ^a
Val.	38,3 –	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R.	39,9 ¹									

¹Outono e ²Inverno; TR = temperatura retal; Tolh = temperatura externa do olho; Tcer = temperatura da cernelha; Tgar = temperatura da garupa e Tjoe = temperatura externa do joelho esquerdo. **P<0,01; ***P<0,001 e ns = não significativo; coeficiente de determinação (R²); coeficiente de variação (CV); média (\bar{x}); BE = Raça Bergamácia; DR = Raça Dorper; HD = Raça Hampshire Down; IF = Raça Ile de France; SI = Raça Santa Inês; TX = Raça Texel. Médias na mesma coluna seguida de letras diferentes (a,b,c,d) representam diferenças significativas (P<0,05) pelo teste de Duncan. ^xMarai, 2007.

A Tjoe pode ser utilizada como uma medida aproximada para a produção de calor por estes animais já que outro trabalho com a aplicação da termografia infravermelho (Montanholi et al., 2008) demonstrou uma alta correlação ($r^2=0.88$; P<0.001) da temperatura do membro anterior com a produção de calor em ruminantes, indicando esta região como a mais apropriada para predizer a produção de calor. De acordo com os estudos de Van den Heuvel et al. (2004) as extremidades corporais são reconhecidos como os principais locais de armazenamento e produção de calor sendo responsável pela explicação da melhor relação entre a produção de calor e a curva de temperatura das patas ao longo do dia em comparação com outras medidas termográficas (Montanholi et al., 2008).

Tabela 14. Coeficiente de correlação entre a temperatura retal e alguns pontos corporais no outono e no inverno

	TR	Tolh	Tcer	Tgar
Tolh	0,31			
Tcer	0,07	0,91		
Tgar	0,09	0,90	0,99	
Tjoe	0,38	0,92	0,85	0,86

TR = temperatura retal; Tolh = temperatura externa do olho; Tcer = temperatura da cernelha; Tgar = temperatura da garupa e Tjoe = temperatura externa do joelho esquerdo.

A maior correlação verificada entre os pontos corporais e a temperatura retal foi o da região do joelho (Tjoe) demonstrando ser este o local mais apropriado para o estabelecimento de uma estimativa da temperatura interna destas raças de ovinos (machos reprodutores) criados sob as condições climáticas do Distrito Federal.

Embora o valor do coeficiente de correlação entre a TR e a Tolh ($r = 0,31$) estivesse próximo do valor do coeficiente entre TR e Tjoe ($r = 0,38$), existem indicações de que no cérebro de ovinos opera um sistema de resfriamento por contracorrente onde o sangue venoso frio que retorna da cavidade nasal banha a rede carotídea contida em um seio cavernoso, removendo calor do sangue arterial que flui para o círculo de *Willis* e então para o cérebro (Randall et al., 2000). Esta informação sugere que a região do olho pode apresentar uma oscilação de temperatura influenciada pelo resfriamento do cérebro, não sendo, portanto, adequada para estimar a temperatura corporal interna de ovinos.

Ambos os coeficientes de autovetores associados às componentes principais do outono (Figura 6), apresentam animais com alta TR e Tolh, mas baixos Tcer e Tgar, significando que o aumento da TR é acompanhado pelo aumento da Tolh. A redução da Tcer e Tgar pode representar a termorregulação dos animais pela transpiração, reduzindo assim a temperatura cutânea ou sendo reflexo da menor temperatura nas extremidades corporais.

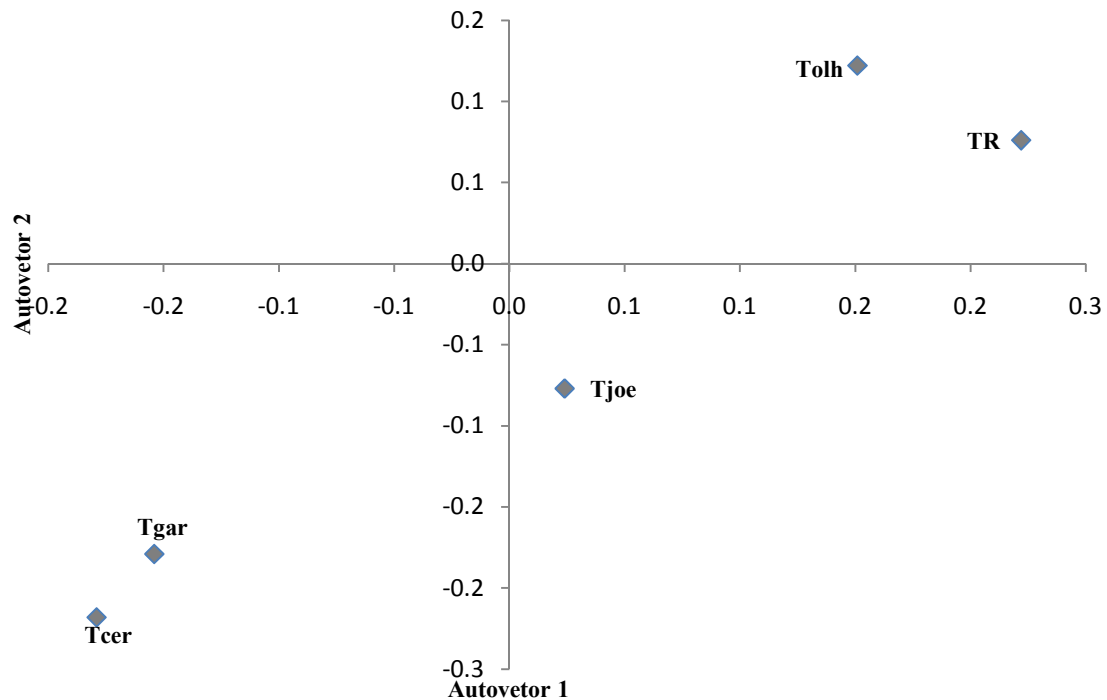


Figura 6. Primeiros dois autovetores do outono para a temperatura retal (TR) e demais pontos corporais nas diferentes raças de ovinos criados na região Centro-Oeste. Temperatura da cernelha (Tcer), temperatura da garupa (Tgar), temperatura do olho esquerdo (Tolh) e temperatura do joelho esquerdo (Tjoe).

No primeiro momento verifica-se na figura 7 (inverno) que o aumento da TR está associado ao aumento de Tjoe acompanhada de baixas Tcer e Tgar, demonstrando que a Tjoe mesmo sendo uma região com pouco isolamento térmico (pêlo ou lã) é a que mais representa a temperatura corpórea central (TR), enquanto que as baixas Tcer e Tgar refletem a temperatura externa da cobertura de lã (independente da espessura), sendo, portanto, próxima da temperatura ambiente.

No segundo momento observa-se que Tcer e Tgar mais altos foram acompanhados de TR e Tjoe mais baixos. Neste caso quando a Tcern e Tgar aumentam, refletindo uma perda de calor por transpiração cutânea, ocorre uma redução de TR e Tjoe.

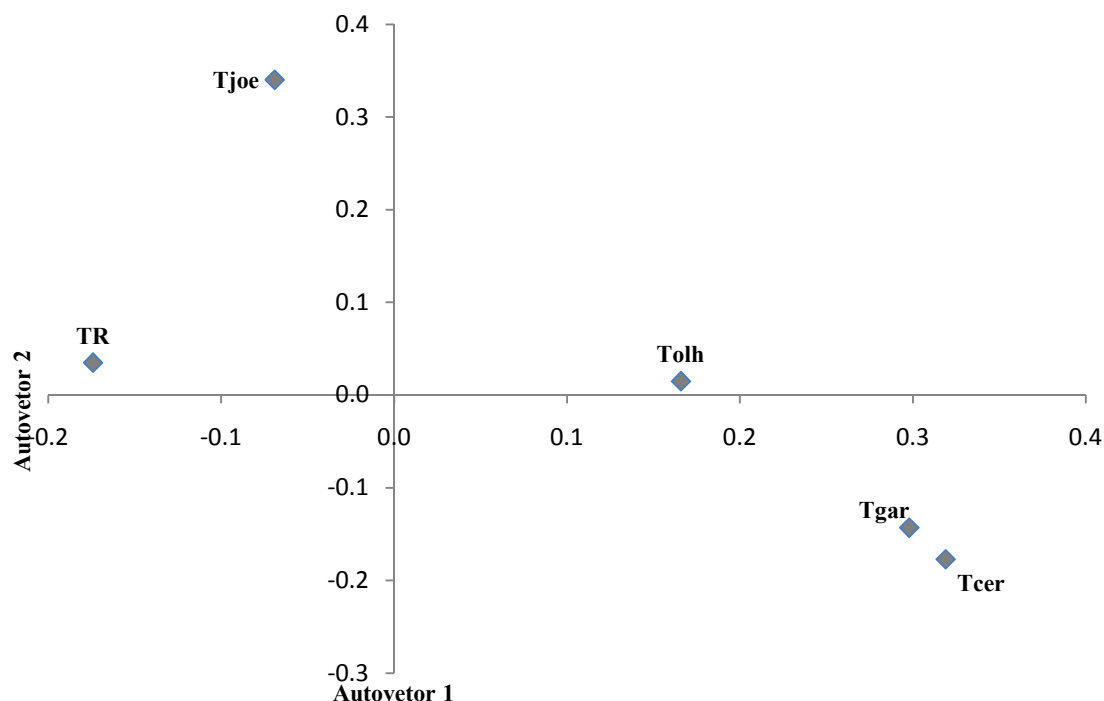


Figura 7. Primeiros dois autovetores do inverno para a temperatura retal (TR) e demais pontos corporais nas diferentes raças de ovinos criados na região Centro-Oeste. Temperatura da cernelha (Tcer), temperatura da garupa (Tgar), temperatura do olho esquerdo (Tolh) e temperatura do joelho esquerdo (Tjoe).

4 CONCLUSÕES

As diferentes raças carneiros, criados no Distrito Federal, apresentam diferenças na TR e em alguns pontos do corpo (exceto Tolh), observadas também em diferentes épocas do ano. Sendo a temperatura retal considerada uma medida de temperatura central de animais, as temperaturas de outras regiões como, por exemplo, a temperatura do joelho, a temperatura da cernelha, a temperatura da garupa e a temperatura do olho podem ser utilizadas como uma alternativa para estimar a temperatura central e, conseqüentemente, as imagens termográficas obtidas com câmeras infravermelho podem ser utilizadas como um método adicional para o monitoramento da termogênese e zoneamento térmico corporal de ovinos.

CAPÍTULO 5

AVALIAÇÃO DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA QUANTIFICAR PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO EM DIFERENTES RAÇAS DE CARNEIROS CRIADOS SOB AS CONDIÇÕES CLIMÁTICAS DO DISTRITO FEDERAL

RESUMO

As proteínas de choque térmico (HSP- *heat shock protein*) ou proteínas do estresse são conhecidas e classificadas de acordo com o seu peso molecular (70, 90, 110 Kd) e podem ser encontradas em diversos organismos. Neste estudo, objetivou-se quantificar as concentrações séricas de HSP70 e a sua possível correlação com dados climáticos e temperatura retal em seis diferentes raças de carneiros (n=18), criados sob as condições climáticas do Distrito Federal. Cada animal teve o sangue coletado em intervalos de duas horas entre às 6 horas e 50 minutos e às 18 horas e 50 minutos, totalizando sete amostras/animal. Para a mensuração das concentrações de HSP70 foi utilizado o método imunoenzimático (ELISA), testando-se protocolos com e sem o procedimento de captura, aplicando testes com diferentes concentrações e diluições de dois anticorpos primários e secundários. De acordo com a metodologia seguida, não foi possível a detecção e/ou mensuração das concentrações de HSP70, provavelmente devido à sua reduzida concentração ou reação cruzada dos anticorpos com imunoglobulinas G (IgGs) presentes no soro de ovinos.

Palavras-chave: Elisa, HSP70; ovinos.

ABSTRACT

The heat shock proteins (HSP) or stress proteins are known and classified according to their molecular weight (70, 90, 110KD) and can be found in many organisms. This study aimed to determine serum levels of HSP70 and their possible correlation with climatic data in six different breeds of rams (n=18) reared under the climatic conditions of the Federal District. Each animal had blood collected at intervals of two hours between 6:50 am and 18:50 pm totaling seven samples/animal. To measure the levels of HSP70 the immunoassay method (ELISA) was used, testing protocols with and without the capture procedure, applying tests with different concentrations and dilutions of primary and secondary antibodies. It was not possible to detect and / or measure the levels of HSP70, probably due to their low concentration or cross-reactivity of antibodies with immunoglobulin G (IgG) in serum of sheep.

Keywords: Elisa, HSP70; sheep.

1 INTRODUÇÃO

O primeiro modo conhecido para a indução da formação das proteínas do estresse foi por meio da exposição ao calor, o que as tornou conhecidas também como proteínas do choque térmico (*Heat Shock Protein* – HSP) (Lindquist & Craig, 1988). A utilização da terminologia “proteínas do estresse” na descrição de eventos biológicos assume um caráter genérico já que diversos estímulos induzem o mesmo mecanismo de defesa celular (Welch, 1993).

As proteínas de choque térmico pertencem a um grupo de proteínas altamente conservadas e que representam entre 2% e 15% da proteína total presente nas células e expressada por todos os organismos vivos (Morimoto et al., 1994)

As proteínas de choque térmico são classificadas em famílias e divididas de acordo com o seu peso molecular (60, 70, 90 e 110KD) e pelo fato de serem encontradas em diversos organismos são consideradas principais (Kiang & Tsokos, 1998). Os outros dois grupos são as HSPs de baixo peso molecular (inferior a 20KD) e as HSPs secundárias, grupo ao qual pertence à família da HSP40, que tem importância essencial para a regulação gênica da HSP70.

As HSPs são expressas constitutivamente em células não estressadas, mas além do quadro de hipertermia, diversos estados de alterações homeostáticas podem desencadear uma resposta *heat shock* de todas as células, como a exposição a metais pesados, elevação da concentração de cálcio, diminuição de glicose para fornecimento de energia para as células, infecções virais e bacterianas, hipóxia, análogos de aminoácidos, estresse oxidativo, presença de toxinas, ataques de radicais livres, exposição a luz ultravioleta e ozônio (Schlesinger, 1986; Bienz & Pelham, 1987; Welch, 1992; Yellon, Marber, 1994).

Estas proteínas são também conhecidas como “chaperones” moleculares, um grupo de proteínas originalmente definido por promover o agrupamento de proteínas de forma correta, mas não pertencem ao componente final da estrutura funcional (Hendrick & Hartl, 1993; Hartl, 1996). As HSPs, atuando como "chaperones" celulares participam da síntese protéica e transporte através de vários compartimentos celulares e existem indicações de que essas proteínas de estresse têm a habilidade de modular a resposta imune celular (Moseley, 2000).

Em ovinos os genes de HSP70 ainda não estão bem caracterizados mas, a presença de um gene de HSP70 na região *Ovar-Mhc* (*Ovine major histocompatibility complex*) do cromossomo 20 foi publicada (Dukkipati et al., 2006). A expressão protéica e mRNA de

HSP70 foi verificada em células epiteliais de pulmões (Kramer et al., 2002), miocárdio (Scharte et al., 2001), cérebro (Andrews & Matthews, 2000) e tecido do útero (Wu et al., 1996) de ovinos.

A resposta rápida e transitória de indivíduos submetidos à hipertermia, tanto em nível transcricional quanto traducional, é o mecanismo considerado o responsável pela sobrevivência das células durante a fase de estresse, segundo Burdon (1986). Das HSPs existentes, a HSP70 é a que se encontra em maiores concentrações em situações estressantes e a aquisição de termotolerância se relaciona com o aumento das concentrações de HSP70 (Parsell & Lindquist, 1995).

Parte da energia metabolizável usada para a produção de subprodutos de origem animal (carne, leite, lã e etc) é direcionada para assegurar o equilíbrio térmico sob condições ambientais desconfortáveis, particularmente condições que estão fora do limite da zona termo-neutra do animal e, conseqüentemente, animais sob estresse térmico apresentam índices de produtividade reduzidos (Patir & Upadhyay, 2010).

Considerando que o estresse térmico altera a produtividade de ovinos, o presente estudo teve como objetivo disponibilizar informações de como as diferentes raças de ovinos respondem às condições climáticas e ambientais do Distrito Federal, através da avaliação da influência das condições climáticas na adaptabilidade dos carneiros através da análise das concentrações de HSP70, durante 12 horas de um único dia.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Local do experimento

O presente estudo foi realizado no dia 04 de junho de 2010 no Campo Experimental Sucupira de propriedade da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA/CENARGEN) e Hospital de grandes animais da Universidade de Brasília, localizados na cidade de Brasília. O clima predominante da região é do tipo Aw de Köppen (tropical chuvoso), com invernos secos, verões chuvosos, altitude média de 1.100m e a precipitação anual média de aproximadamente 1.493mm.

2.2 Colheita de dados climáticos

A colheita de temperatura (TA) em graus Celsius (°C) e da umidade relativa do ar UR em porcentagem (%) foi realizada em intervalos de 30 minutos através do uso de um termohigrômetro digital (TFA), das 6 horas e 50 minutos até 18 horas e 50 minutos.

2.3 Animais e manejo implementado

Foram utilizados 18 (dezoito) animais com idade média de 2,5 anos e de diferentes procedências, exceto do Distrito Federal, sendo três machos reprodutores de cada uma das seis diferentes raças de ovinos: Santa Inês, Bergamácia, Ile de France, Texel, Dorper e Hampshire Down.

Os animais eram mantidos em um sistema semi-extensivo, em pasto de *Andropogon gayanus*, recebendo suplemento concentrado (400g/animal/dia), sal mineral e água a vontade, sendo transferidos ao curral para colheita das amostras com 10 minutos de antecedência e logo em seguida retornavam ao pasto.

2.4 Colheita de sangue para quantificação de HSP70 sérica

Cada animal teve o sangue coletado em intervalos de duas horas entre às 6 horas e 50 minutos e às 18 horas e 50 minutos, totalizando sete amostras/animal. As amostras foram mantidas em caixas térmicas com gelo seco e no final da colheita foram transferidas para o Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da Universidade de Brasília (Hvet/UnB) onde foram processadas.

Um total de, aproximadamente, 2 mL de amostra de sangue/animal/amostragem foi obtido por venopuntura jugular, utilizando-se tubos vacuolizados desprovidos de anticoagulante. Após a centrifugação em centrífuga digital (Hermle[®] - Z326K) a 3.500rpm/1.300rcf durante 10 minutos à temperatura ambiente, o soro foi separado em alíquotas de 1mL para serem estocados em *freezer* a -6°C para posterior mensuração da concentração de HSP70 sérica.

2.5 Reagentes e anticorpos

Para a realização do ensaio imunoenzimático (ELISA) foram utilizados os seguintes anticorpos: anticorpo primário monoclonal - camundongo anti HSP70 - (Santa Cruz-SC-66048; C92F3A-5), anticorpo primário policlonal - cabra anti HSP70 (Santa Cruz - SC - 1060), anticorpo secundário bovino anti-IgG (imunoglobulina G) camundongo conjugado com fosfatase alcalina (Santa Cruz-SC-2377) e anticorpo secundário coelho anti-IgG cabra conjugado com fosfatase alcalina (Pierce - 31337). Para a construção da curva padrão foi utilizada a proteína HSP70 de calibração (Assay Designs - NSP 555).

De acordo com o fabricante, os anticorpos primários são específicos para a forma de HSP70 induzível e não apresenta reação cruzada com a forma constitutiva HSC70.

O substrato utilizado para detectar a fosfatase alcalina foi o pNPP (p-nitrofenil fosfato) (Sigma-Aldrich - S0942).

O tampão carbonato consistiu de 15 mM Na_2CO_3 , 35 mM NaHCO_3 e 3 mM NaN_3 . O tampão fosfato salino (PBS) consistiu de 135 mM NaCl , 40 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - 2\text{H}_2\text{O}$, 1 mM KH_2PO_4 , 3 mM HCl e o tampão de fosfatase alcalina (APB) consistiu de 100mM NaCl , 100mM Tris-HCl (pH = 9,5) e 5mM MgCl_2 .

A solução de lavagem (PBS/T) foi elaborada com PBS e água destilada (1:9) com adição de 0,1% de polisorbato 20 (Tween 20, Sigma-Aldrich). A solução de bloqueio foi preparada com leite bovino liofilizado (5%) diluído em PBST.

2.6 ELISA para detecção de HSP70

Todos os procedimentos para a detecção de HSP70 sérica foram realizados conforme o descrito previamente por Njemini et al. (2003) com algumas modificações. A concentração de HSP70 no soro seria determinada pela comparação da absorbância de referência da proteína HSP70 recombinante purificada com a absorbância das amostras de soro, com uma margem de detecção variando de 0,2 a 0,001 $\mu\text{g/mL}$.

O processo de sensibilização das placas foi realizado em triplicata, utilizando-se para o revestimento a proteína HSP70 de calibração (80 μl ; 0,0062 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) diluída em 0,1M de tampão carbonato (pH = 9,6) e o soro dos animais (80 μl /poço).

Após incubação durante 1 hora e 30 minutos a 4°C, a placa revestida foi lavada seis vezes com 100µL de PBS contendo 0,1% de Tween 20 (PBS/T) e os sítios de ligações inespecíficas foram bloqueados com 120µL de PBS/T contendo 5% de leite bovino (Itambé®) por um período de 1 hora e 30 minutos.

Após a lavagem (6 X), foi adicionado 80µL do anticorpo primário monoclonal - camundongo anti HSP70 (diluído em PBS, 1:1000) e incubado por 1 hora e 30 minutos a temperatura ambiente. A placa foi novamente lavada (seis vezes) e adicionou-se 80µL de anticorpo secundário bovino anti-IgG camundongo conjugado com fosfatase alcalina (diluído em PBS, 1:5000) e incubado por 1 hora e 30 minutos a temperatura ambiente.

Após lavagem por 3 vezes com PBS/T e uma vez com APB, adicionou-se à cada poço da placa 80µL de solução reveladora (0,03g pNPP/15mL APB) e após 10, 15 e 20 minutos as leituras foram realizadas em um leitor de microplacas automático (Biotek® – EL800) com absorvâncias de 405nm e 450nm, para a definição do tempo e absorvância ideais.

Nesta etapa, seguindo o protocolo citado acima, com exceção dos poços destinados a construção da curva padrão, realizou-se alguns controles (+/-) em duplicatas, com o mesmo volume (poço) e anticorpos primário (camundongo anti - HSP70) e secundário (bovino anti – IgG camundongo), sendo eles:

- a) revestimento com soro e adição de anticorpos primário e secundário;
- b) revestimento com soro e HSP70 (500ng) seguido de adição de anticorpos primário e secundário;
- c) revestimento com apenas PBS com adição dos anticorpos primário e secundário;
- d) revestimento com HSP70 (500ng) e adição somente do anticorpo secundário;
- e) revestimento com soro e adição somente do anticorpo secundário;
- f) revestimento com HSP70 (500ng), desprovido da etapa de bloqueio;
- g) revestimento com soro, desprovido da etapa de bloqueio;
- h) revestimento com soro e HSP70 (1,6µg/µL) com adição dos anticorpos primário e secundário.

O controle (h) realizado com a concentração máxima de HSP70 possuía o intuito de verificar uma possível competição dos anticorpos pelos constituintes do soro dos ovinos.

2.7 ELISA de captura/sanduiche para detecção de HSP70

O procedimento realizado nesta etapa, para mensuração sérica de HSP70, também foi baseado no trabalho de Njemini et al. (2003) com pequenas modificações. A concentração de HSP70 no soro seria determinada pela comparação da absorbância de referência da proteína HSP70 recombinante purificada com a absorbância das amostras de soro, com uma margem de detecção variando de 0,2 a 0,001 μ g/mL.

Inicialmente, a placa foi revestida em triplicatas com anticorpo primário policlonal – cabra anti HSP70 (100 μ L; 100 μ g/mL) diluído em PBS e, incubada durante toda a noite (“*overnight*”) a 4°C.

Após a incubação a placa foi lavada seis vezes com 120 μ L de PBS contendo 0,1% de Tween 20 (PBS/T) e os sítios de ligações inespecíficas foram bloqueados com 150 μ L de PBS/T contendo 5% de leite bovino (Itambé) por um período de 1 hora e 30 minutos.

A placa foi lavada seis vezes e adicionou-se a HSP70 de calibração (100 μ L; 0,0062 μ g/ μ L) diluída em 0,1M de tampão carbonato (pH = 9,6) e o soro dos animais (100 μ l/poço), conforme o esboço da placa (triplicatas), permanecendo incubada por mais 1 hora e 30 minutos.

Após seis lavagens, adicionou-se 100 μ L de anticorpo primário monoclonal – camundongo anti HSP70 (diluído em PBS, 1:1000) e incubou por 1 hora e trinta minutos a temperatura ambiente. Lavou-se novamente seis vezes e adicionou 100 μ L de anticorpo secundário bovino anti-IgG camundongo conjugado com fosfatase alcalina (diluído em PBS, 1:2500) e incubou por 1 hora e 30 minutos a temperatura ambiente.

A placa foi lavada três vezes com PBS/T e uma vez com APB, adicionou-se 100 μ L de solução reveladora (0,03g pNPP/15mL APB) e após 10, 15 e 20 minutos as leituras (leitor de microplacas automático) foram realizadas com absorbâncias de 405nm e 450nm, para a definição do tempo e absorbância ideais.

Nesta placa, seguindo o protocolo mencionado acima, além da construção da curva padrão, foram realizados alguns controles (+/-) em duplicatas com os mesmos anticorpos

primários (policlonal – cabra anti HSP70 e monoclonal - camundongo anti HSP70) e secundário (bovino anti-IgG camundongo):

- a) revestimento com 1º cabra, adição de soro, adição de 1º camundongo e 2º camundongo;
- b) revestimento com 1º cabra, adição de soro e HSP70 (500ng), adição de 1º camundongo e 2º camundongo;
- c) revestimento com 1º cabra, desprovido de soro, adição de 1º camundongo e 2º camundongo;
- d) revestimento com 1º cabra, adição de HSP70 (1,6µg/µL), desprovido de 1º camundongo e adição de 2º camundongo;
- e) revestimento com 1º cabra, adição de soro, desprovido de 1º camundongo e adição de 2º camundongo;
- f) revestimento com 1º cabra, adição de soro, sem a fase de bloqueio e adição de 1º camundongo e 2º camundongo;
- g) revestimento com 1º cabra, adição de HSP70 (500ng), sem a fase de bloqueio e adição de 1º camundongo e 2º camundongo;

Estes mesmos controles foram repetidos utilizando-se para o revestimento o anticorpo primário monoclonal - camundongo anti HSP70, seguidos da adição de primário policlonal – cabra anti HSP70 e secundário coelho anti-IgG cabra.

Para averiguar a eficácia e adequado funcionamento dos anticorpos supracitados, realizou-se um teste suplementar para detecção de anticorpos denominado de *immunoblot* com a utilização de dois papéis filtro separados, ambos com deposição de 5 e 10µL de HSP70 na concentração máxima e testando o anticorpo com diferentes diluições (1:500 e 1:1000). O resultado do teste (não apresentado) confirmou a eficácia do referido anticorpo.

Durante a efetuação dos controles foram testadas diferentes concentrações da proteína de calibração para o revestimento dos poços, como 50ng/80µL, 100ng/80µL, 200ng/80µL e 500ng/80µL. No caso dos anticorpos utilizados para a revelação, aplicaram-se diferentes diluições como 1:500, 1:1000, 1:2500 e 1:5000.

Foram testados dois diferentes tipos de placas comercializadas (Nunc[®] e Greiner[®]) e para garantir que as amostras congeladas (< 3 meses) não haviam sido degradadas devido à ação das proteases, foram repetidos alguns controles com soro fresco (≤ 2 horas após colheita).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados referentes ao horário, temperatura ambiente (°C) e umidade relativa do ar (%) durante o período de realização do experimento, estão apresentados na tabela 15.

Tabela 15. Hora de registro dos dados, temperatura ambiente (TA) e umidade relativa do ar (UR) durante o dia quatro de junho de 2010

MATUTINO			VESPERTINO		
HORA	TA (°C)	UR (%)	HORA	TA (°C)	UR (%)
06:50	16,3	68	12:20	25,8	57
07:20	16,4	77	12:50	26,3	55
07:50	16,7	78	13:50	27	50
08:20	17,3	80	14:20	28,1	42
08:50	18,3	79	14:50	-	-
09:20	19,3	77	15:20	27,8	42
09:50	20,6	70	15:50	27,7	43
10:20	21,6	67	16:20	-	-
10:50	23,1	62	16:50	26,7	46
11:20	23,9	62	17:20	24,7	50
11:50	24,8	60	17:50	22,2	56
			18:20	21,1	58
			18:50	20,8	60

Os resultados da construção da curva padrão e dos controles (+/-) do ELISA (405nm) realizado sem o procedimento de captura ou sanduíche estão apresentados na figura 8, na qual se observa a curva de proteína HSP70, reflexo do decréscimo na concentração da mesma em função da diluição, porém, não foi verificado o resultado esperado para os controles, sugerindo

uma reduzida concentração de HSP70 nas amostras analisadas ou incapacidade de ligação dos anticorpos (α -HSP70) na HSP70 sérica, sob estas condições, uma vez que o último controle com soro e HSP70 em sua concentração máxima (S+HSPmáx.+C+ α -C) resultou em um valor de densidade ótica desconsiderável.

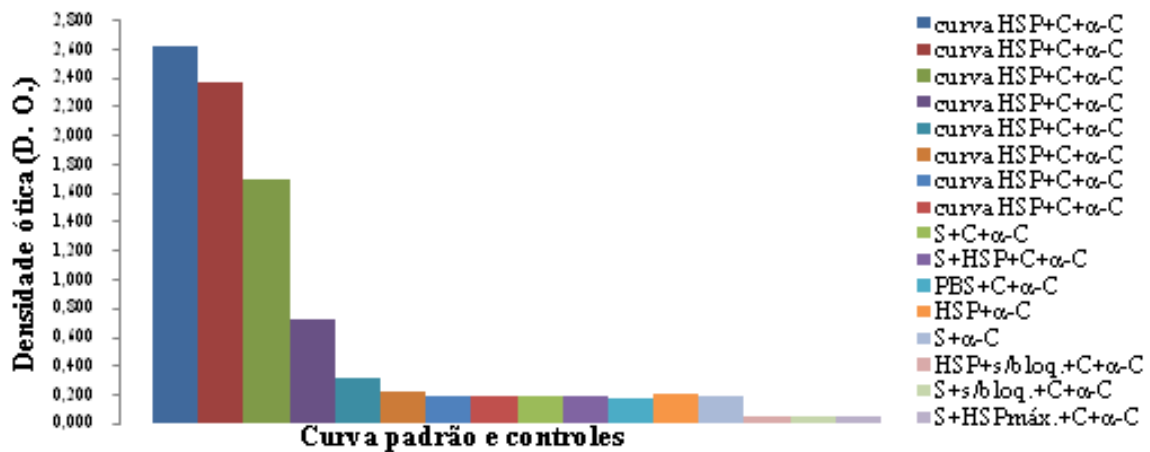


Figura 8. Curva padrão construída com proteína HSP70 purificada - 0,5 μ g/80 μ L e 1,6 μ g/ μ L (HSP e HSPmáx.), anticorpos primário camundongo (C) e secundário anti-IgG camundongo (α -C) e controles (+/-) com uso de soro (S), PBS e sem a fase bloqueio (s/bloq.).

Os resultados do ELISA conforme o protocolo de captura ou sanduíche estão apresentados na figura 9. Embora os pontos iniciais da curva juntamente com a nona coluna (verde, Cb+S+C+ α -C) tenham sugerido que o processo de captura estivesse funcionando, já que apresentaram valores de D.O. aproximados, percebe-se na antepenúltima coluna (azul claro, Cb+S+ α -C) que o anticorpo secundário anti-IgG camundongo provavelmente apresenta uma reação cruzada com IgGs presente nas amostras de soro de ovinos ou com o anticorpo primário de cabra, já que apresentou um significativo valor de D.O. na décima primeira coluna (preto), etapa esta desprovida de soro.

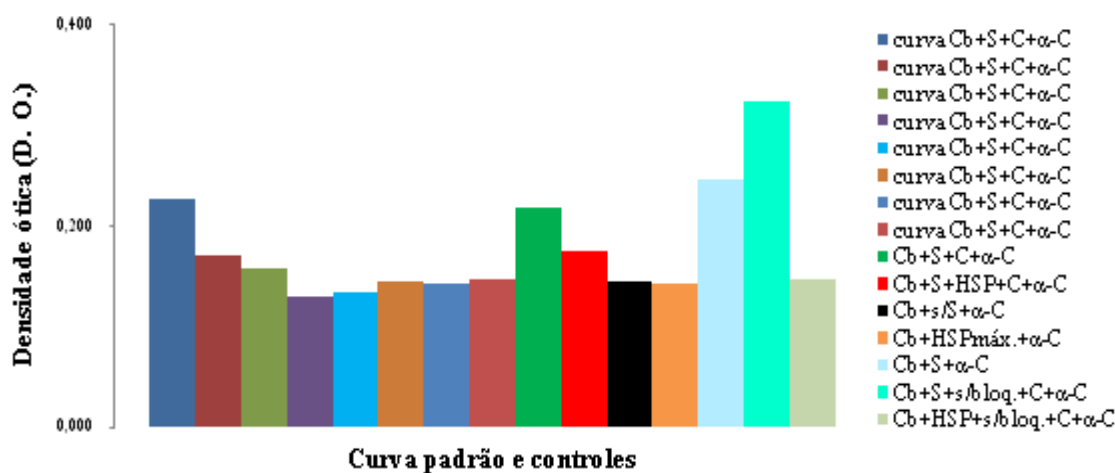


Figura 9. Curva padrão construída com proteína HSP70 purificada - 0,5µg/80µL e 1,6µg/µL (HSP e HSPmáx.), anticorpos primário cabra (Cb), camundongo (C) e secundário anti-IgG camundongo (α-C) e controles (+/-) com soro ou sem (S ou s/S) e sem a fase bloq.

O fato de que o controle com adição de somente soro (coluna verde, Cb+S+C+α-C) apresentou um valor de D.O. superior ao controle com adição de soro e HSP70 (coluna vermelha, Cb+S+HSP+C+α-C), evidenciando uma competição dos anticorpos empregados por sítios de ligação inespecíficos.

A tentativa de confecção de uma nova curva padrão seguindo o esboço C+HSP+Cb+α-Cb e Cb+HSP+C+α-C, novamente não surtiu os resultados esperados.

Optou-se, então, por uma construção de curva padrão sem o processo de captura (HSP+Cb+α-Cb), uma tentativa de construção de uma curva a partir da diluição seriada do soro (1:2) com o procedimento de captura (C+S+Cb+α-Cb) e, por fim, foi repetido o controle seguindo a metodologia de captura ou sanduíche adicionando-se soro e retirando-se o anticorpo secundário (α-Cb), resultados estes apresentados na figura 10.

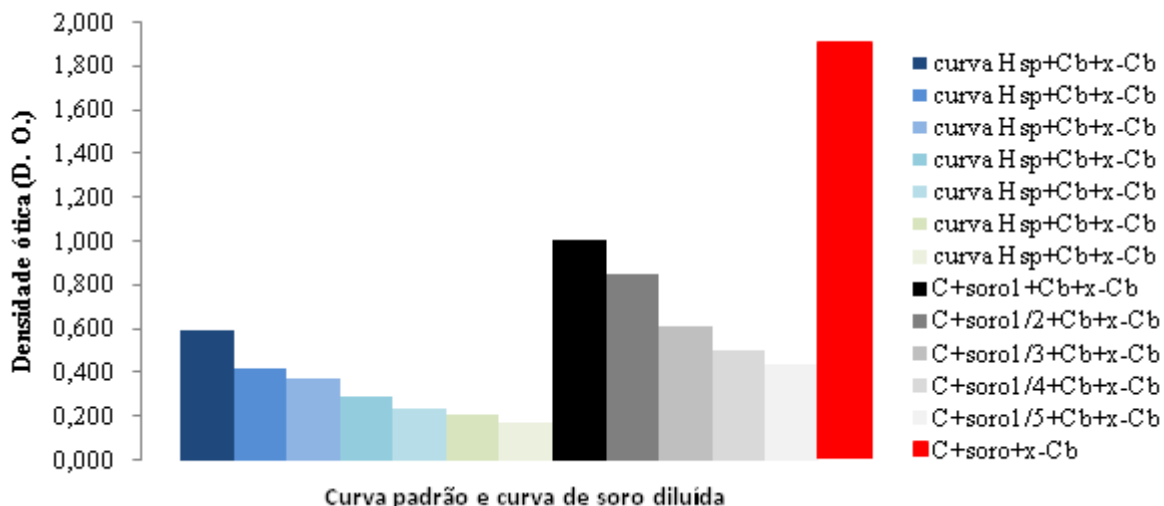


Figura 10. Curva padrão construída com proteína HSP70 purificada - 0,5 μ g/80 μ L (HSP), anticorpos primário cabra (Cb), camundongo (C) e secundário anti-IgG cabra (α -Cb), curva com diluição seriada do soro e controle com soro.

Na figura 10 observa-se que ambas as curvas responderam conforme o esperado, porém, o controle (C+S+ α -Cb) mostrou novamente alguma interferência na propriedade ligante dos anticorpos, como já mencionado, uma reação cruzada entre o anticorpo secundário (α -Cb) e IgGs provenientes do soro ou, possivelmente, a concentração sérica de HSP70 foi suficientemente reduzida tornando-a incapaz de ligar-se aos anticorpos.

4 CONCLUSÕES

O protocolo de ensaio, com ou sem o procedimento de captura ou sanduíche, não detectou e não quantificou a concentração sérica de HSP70 em ovinos. Sugere-se a realização de um tratamento prévio das amostras, submetendo-as a uma coluna de cromatografia de afinidade de proteína G com o intuito de retirar as IgGs e repetição dos ensaios (ELISA) com a amostra resultante, ou seja, o *flow through*.

Alternativamente, poderá ser realizada uma mensuração por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR-RT).

CONCLUSÃO GERAL

CONTRIBUIÇÕES, IMPACTOS ESPERADOS, EVENTUAIS IMPLICAÇÕES E IMPORTÂNCIA PARA O DISTRITO FEDERAL.

O estudo revelou uma maior adaptação da raça Santa Inês ao clima da região, confirmando sua maior resistência às elevadas temperaturas conferidas em países de climas tropicais comparados aos de regiões de clima temperado. Foi possível identificar por meio dos parâmetros avaliados uma dificuldade adaptativa de raças exóticas, introduzidas nas últimas décadas, sem um adequado e necessário monitoramento prévio das respostas fisiológicas das referidas raças quando foram submetidas às características climáticas e ambientais da região, resultando, provavelmente, em índices de produtividade inferiores aos atingidos em seus respectivos países de origem.

A preocupação com o futuro do consumo interno e exportações para os países consumidores mais exigentes, como a Comunidade Econômica Européia, nos conduz à comercialização de produtos que atendam aos requisitos mínimos de Saúde Pública e de bem-estar animal, e também a emissão de certificados de qualidade que nos permitam o rastreamento dos produtos até a sua origem. Este estudo pode contribuir fornecendo subsídios aos produtores de raças exóticas já estabelecidos e auxiliando aos que se encontram em fase de implantação resultando em maiores níveis de produtividade e rentabilidade do setor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADDASS, P.A.; PEREZ, I.K.A.; MIDAU, A. et al. Haemato-biochemical findings of indigenous sheep breeds in Mubi Adamawa state, Nigeria. **Global veterinária**, v. 4, n. 2, p. 164-67, 2010.
- ANDREWS, M.H.; MATTHEWS, S.G. Regulation of glucocorticoid receptor mRNA and heat shock protein 70 mRNA in the developing sheep brain. **Brain Research**, v. 878, p. 174–182, 2000.
- BAKER, M.A. Brain cooling in endotherms in heat and exercise. **Annual Review of Physiology**, v. 44, p. 85–96, 1982.
- BATISTA, M.C.S.; CASTRO, R.S.; REGO, E.W. et al. Hemograma, proteinograma, ionograma e dosagens bioquímicas e enzimáticas de ovinos acometidos por conidiobolomiose no Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 1, p. 17-24, 2009.
- BAUMGARTNER, W.; PARNTHANER, A. Influence of age, season and pregnancy upon blood parameters in Austrian Karakul sheep. **Small Ruminant Research**, v. 11, p. 147-151, 1994.
- BEERDA, B.; SCHILDER, M. B. H.; JANSSEN, N. S. et al. The use of saliva cortisol, urinary cortisol, and catecholamine measurements for a noninvasive assessment of stress responses in dogs. **Hormones and Behavior**, v. 30, p. 272-9, 1996.
- BENTSON, K. L.; CAPITANIO, J. P.; MENDOZA, S. P. Effects of blood sampling, telazon and ketamine on cortisol in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). **American Journal of Primatology, supplement**, v. 51, n. 43, 2000.
- BERBERIAN, P.A., MYERS, W., TYTELL, M. et al. Immunohistochemical localization of heat shock protein- 70 in normal-appearing and atherosclerotic specimens of human arteries. **American Journal of Pathology**, v. 136, n. 71, 1990.
- BERZ, R. Regulation Thermography-a survey. **QIRT 4-Medical**, p. 18-25, 1998.

- BANHAZI T.M., KITCHEN, J., TIVEY, D. Evaluating the effectiveness of infrared thermography for determination of skin wetness in pigs. **Australian Journal of Multi-disciplinary Engineering**, v. 7, n. 1, p. 47-54, 2009.
- BIENZ, M.; PELHAM, H.R. B. Mechanisms of heat-shock gene activation in higher eukaryotes. **Advances in Genetics**, v. 24, p. 31-72, 1987.
- BIRGEL, E.H. Hematologia clínica veterinária. In: BIRGEL, E.H.; BENESI, F.J. **Patologia clínica veterinária**. São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1982. p. 2-34.
- BIRGEL JUNIOR, E.H.; D'ANGELINO, J.L.; BENESI, F.J. et al. Valores de referência do eritrograma de bovinos da raça Jersey criados no Estado de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 53, n. 2, p. 164-171, 2001.
- BLESSING, W.W.; SEAMAN, B. 5-Hydroxytryptamine_{2A} receptors regulate sympathetic nerves constricting the cutaneous vascular bed in rabbits and rats. **Neuroscience**, v. 117, p. 939-948, 2003.
- BÓRNEZ, R.; LINARES, M. B.; VERGARA, H. Haematological, hormonal and biochemical blood parameters in lamb: effect of age and blood sampling time. **Livestock Science**, v. 121, p. 200 – 206, 2009.
- BREUNER, C.W.; ORCHINIK, M. Plasma binding proteins as mediators of corticosteroid action in vertebrates. **Journal of Endocrinology**, v. 175, p. 99-112, 2002.
- BROOM, D.M. A usable definition of animal welfare. **Journal of Agriculture and Environmental Ethics**, Guelph, v. 6, p. 15-25, 1993.
- BROOM, D.M.; JOHNSON, K.G. **Stress and Animal Welfare**. London: Chapman and Hall, 1993.
- BROOM, D.M.; MOLENTO, C.F.M. Bem-estar animal: conceitos e questões relacionadas – revisão. **Archives of Veterinary Science**. Curitiba, v. 9, n. 2, p. 1-11, 2004.
- BURDON, R.H. Heat shock and the heat shock proteins. **Biochemistry Journal**, v. 240, n. 2, p. 313-324, 1986.

- CABEZAS, S.; BLAS, J.; MARCHANT, T.A. et al. Physiological stress levels predict survival probabilities in wild rabbits. **Hormones and Behavior**, v. 51, p. 313–320, 2007.
- CABIN, D.E.; BUCHMAN, T.G. Molecular biology of circulatory shock: Part III. Human hepatoblastoma (HepG2) cells demonstrate two patterns of shock-induced gene expression that are independent, exclusive, and prioritized. **Surgery**, v. 108, n. 902, 1990.
- CANNON, W. B. Stresses and strains of homeostasis. **American Journal of Medical Science**, v. 189, p. 1–14, 1935.
- CHEN, H.C.; GUH, J.Y.; TSAI, J.H.; LAI, Y.H. Induction of heat shock protein 70 protects mesangial cells against oxidative injury. **Kidney International**, v. 56, p. 1270, 1999.
- COOPER, T.R.; TRUNKFIELD, H.R.; ZANELLA, A.J. et al. An enzyme-linked immunosorbent assay for cortisol in the saliva of man and domestic farm animals. **Journal of Endocrinology**, v. 123, p. 13–6, 1989.
- CRAIG, E.A.; GROSS, C.A. Is HSP70 the cellular thermometer? **Trends in Biochemical Science**, v. 16, n. 135, 1991.
- CROSS, J.P.; MACKINTOSH, C.G.; GRIFFIN, J.F.T. Effects of physical restraint and xylazine sedation on haematological values in red deer (*Cervus elaphus*). **Research Veterinary Science**, v. 45, p. 281–286, 1988.
- DAUNCEY, M.J.; INGRAM, D.L. Evaluation of the effects of environmental temperature and nutrition on growth and development. **Journal of Agricultural Sciences**, v. 101, p. 351–358, 1983.
- DEGUCHI, Y.; KISHIMOTO, S. Enhanced expression of the heat shock protein gene in peripheral blood mononuclear cells of patients with active systemic *lupus erythematosus*. **Annual Rheumatism Disease**, v. 49, n. 893, 1990.
- DELOGU, G.; LO BOSCO, L.; MARANDOLA, M. et al. Heat shock protein (HSP70) expression in septic patients. **Journal Critical Care**, v. 12, n. 188, 1997.
- DUKKIPATI, V.S.R.; BLAIR, H.T.; GARRICK, D.J. et al. ‘Ovar-Mhc’—ovine major histocompatibility complex: structure and gene polymorphisms. **Genetic and Molecular Research**, v. 5, p. 581–608, 2006.

- EL-NOUITY, F.D.; AL-HAIDARY. A.; SALAH, M.S. Seasonal variations in hematological values of high – and average – yielding Holstein cattle in semi-arid environment. **Journal of King Saudi University**, v. 2, p. 173 – 182, 1990.
- FEDER, M.E., HOFMANN, G.E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. **Annual Review of Physiology**, v. 61, n. 243, 1999.
- FEIGE, U.; VAN EDEN, W. Infection, autoimmunity and autoimmune disease, **Experientia**. v. 77, p. 359 - 373, 1996.
- FLOHE, S.; DOMINGUEZ FERNANDEZ, E.; ACKERMANN, M. et al. Endotoxin tolerance in rats: expression of TNF-alpha, IL-6, IL-10, VCAM-1 AND HSP 70 in lung and liver during endotoxin shock. **Cytokine**, v. 11, n. 796, 1999.
- FRASER, A.F.; BROOM, D.M. **Farm Animal Behaviour and Welfare**. Wallingford: CAB International, 1990.
- GARCIA-NAVARRO, C.E.K.; PACHALY, J.R. **Manual de hematologia veterinária**. São Paulo: Livraria Varela, 1994, 169p.
- GATTO, E.G. **Reatividade ao manejo de novilhos Nelore confinados e suas relações com cortisol plasmático, temperatura corporal e desempenho**. Pirassununga, Universidade de São Paulo, 2007. 42p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, 2007.
- GIVISIEZ, P.E.N.; FERRO, J.A.; FERRO, M.I.T. et al. Hepatic concentration of heat shock protein 70 kD (HSP70) in broilers subjected to different thermal treatments. **British Poultry Science**, v.40, p.292-296, 1999.
- GINGALEWSKI, C., THEODORAKIS, N.G., YANG, J. et al. Distinct expression of heat shock and acute phase genes during regional hepatic ischemia – reperfusion. **American Journal of Physiology**, v. 271, n. R634, 1996.
- GODDARD, P.J.; FAWCETT, A.R.; MACDONALD, A.J. et al. The behavioural, physiological and immunological responses of lambs from two rearing systems and two genotypes to exposure to humans. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 66, p. 305-321, 2000.

- GONZÁLEZ, F.H.D.; BARCELLOS, J.; PATIÑO, H.O. et al. **Perfil metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000.
- GONZÁLEZ, F.H.D.; CARVALHO, V.; MÖLLER, V. et al. Perfil bioquímico sanguíneo de cães e gatos na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Arquivo da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v. 29, p. 1-6, 2001.
- GONZÁLEZ, F.H.D.; SCHEFFER, J.F.S. Perfil sanguíneo: uma ferramenta de análise clínica, metabólica e nutricional. In: González, F. H. D., Campos, R. (eds.): **Anais do I Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do País**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003, p. 73 – 89.
- GOOD, T., KHAN, M.Z., LYNCH, J.W. Biochemical and physiological validation of a corticosteroid radioimmunoassay for plasma and fecal samples in oldfield mice (*Peromyscus polionotus*). **Physiology and Behavior**, v. 80, p. 405– 411, 2003.
- GOUVEIA, A.M.G.; ARAÚJO, E.C.; SILVA, G.J. **Criação de ovinos de corte nas regiões Centro-Oeste e Sudeste do Brasil (raças e cruzamentos)**. Brasília (DF): LK Editora e Comunicação, 2006.
- GRAY, C.C.; AMRAN, M.; YACOUB, M.H. Heat stress proteins and myocardial protection: experimental model or potential clinical tool? **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 31, n. 559, 1999.
- GRIFFIN, J.F.T. Stress and immunity: A unifying concept. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 20, p. 263-312, 1989.
- HAFEZ, E. S. E. **Reproduction in Farm Animals**. 5th Ed. Lea & Febiger, Philadelphia, USA. 1987, p. 160.
- HAHN, G.L. Management and housing of farm animals in hot environments. In: YOURSEF, M.K. **Stress physiology in livestock**, v. 2. Ungulates. Boca Raton: CRC Press, Inc., 1987, p.151-174.
- HALL, S.J.G.; FORSLING, M.L.; BROOM, D.M. Stress responses of sheep to routine procedures: changes in plasma concentrations of vasopressin, oxytocin and cortisol. **Veterinary Records**, v. 142, p. 91-93, 1998.

- HARRISON, P. J., PROCTE, A. W., EXWORTHY, T. et al. Heat shock protein (HSP70) mRNA expression in human brain: effects of neurodegenerative disease and agonal state. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 19, n. 10, 1993.
- HARTL, F.U. Molecular chaperones in cellular protein folding. **Nature**, v. 381, p. 571-580, 1996.
- HAY, M.; MORMÈDE, P. Urinary excretion of catecholamines, cortisol and their metabolites in Meishan and Large White sows: validation as a non invasive and integrative assessment of adrenocortical and sympathetic activity. **Veterinary Research**, v. 29, p. 119-128, 1998.
- HENDRICK, J.P.; HARTL, F.U. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 62, p. 349-384, 1993.
- HERBERT, T.B.; COHEN, S. Stress and immunity in humans: a meta-analytic review. **Psychosomatic Medicine**, v. 55, n. 4, p. 364-79, 1993.
- HEUFELDER, A.E., GOELLNER, J.R., WENZEL, B.E., BAHN, R. S. Immunohistochemical detection and localization of a 72-kilodalton heat shock protein in autoimmune thyroid disease. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 74, n. 724, 1992.
- HOPSTER, H.; VAN DER WERF, J.T.N.; ERKENS, J.H.F. et al. Effects of repeated jugular puncture on plasma cortisol concentrations in loose-housed dairy cows. **Journal of Animal Science**, v. 77, p. 708-14, 1999.
- IBGE. **Produção Pecuária Municipal**. Sistema IBGE de recuperação automática – SIDRA. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/>, acesso em 16/03/2011.
- JAATTELA, M. Escaping cell death: survival proteins in cancer. **Experimental Cell Research**, v. 248, n. 30, 1999.
- JACQUIER-SARLIN, M.R.; FULLER, K.; DINH-XUAN, A.T. et al. Protective effects of HSP70 in inflammation. **Experientia**, v. 50, n. 1031, 1994.
- JAENISCH, F. R. F. Procedimentos de biossegurança na criação de frangos no sistema agroecológico. **CT/258/ Embrapa Suínos e Aves**, p. 1-5, 2000.
- JAIN, N.C. **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea e Febinger, 1993, 417p.
- JONES, M.L.; ALLISON, R.W. Evaluation of the ruminant complete blood cell count.

- Veterinary Clinics Food Animal Practice**, v. 23, p. 377-402, 2007
- JONES, F.; PLASSMANN, P. Digital infrared thermal imaging of human skin. **Engineering in Medicine and Biology Magazine**, v. 21, p. 41-48, 2002.
- KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of domestic animals**. 6ed. Elsevier, 2008.
- KANNAN, G.; TERRILL, T.H.; KOUAKOU, B. et al. Blood metabolite changes and live weight loss following brown seaweed extract supplementation in goats subjected to stress. **Small Ruminant Research**, v. 73, p. 228–234, 2008.
- KASTBERGER, G.; STACHL, R. Infrared imaging technology and biological applications. **Behavior Research Methods, Instruments & Computers**, n. 35, v. 3, p. 429 – 439, 2003.
- KAUFMANN, S.H. Heat shock proteins and the immune response. **Immunology Today**, v. 11, n. 129, 1990.
- KIANG, J.G.; TSOKOS, G.C. Heat Shock Protein 70kDa: Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 80, p. 183-201, 1998.
- KIESSLING, R.; GRONBERG, A.; IVANYI, J. et al. Role of HSP60 during autoimmune and bacterial inflammation. **Immunology Review**, v. 121, n. 91, 1991.
- KILGORE, J.L.; MUSCH, T.I.; ROSS, C.R. Physical activity, muscle, and the HSP70 response. **Canadian Journal of Applied Physiology**, v. 23, n. 245, 1998.
- KNOWLTON, A.A.; BRECHER, P.; APSTEIN, C.S. Rapid expression of heat shock protein in the rabbit after brief cardiac ischemia. **Journal of Clinical Investigation**, v. 87, n. 139, 1991.
- KRAMER, B.W.; KRAMER, S.; IKEGAMI, M. et al. Injury, inflammation, and remodeling in fetal sheep lung after intraamniotic endotoxin. **American Journal of Physiology: Lung Cells and Molecular Physiology**, v. 283, p. 452–459, 2002.
- LADWING, J. Endocrine aspects of stress: evaluation of stress reaction in farm animals. **Biology of stress in farm animals: an integrative approach**. P. R. Wiepkema & Adrichem, P. W. M. Netherlands: Martinus Nijhoff Publishers, 115p., 1987.
- LI, G.C., MIVECHI, N.F., WEITZEL, G. Heat shock proteins, thermotolerance, and their

- relevance to clinical hyperthermia. **International Journal of Hyperthermy**, v. 11, n. 459, 1995.
- LIMA, E.R.; VASCONCELOS, A.T.; REIS, J.C. et al. Perfil bioquímico sérico em gatos domésticos (*Felis domesticus*, Linnaeus, 1758) submetidos a diferentes tipos de dietas industrializadas. **Ciência Veterinária Tropical**, v. 9, n. 2/3, p. 54-62, 2006.
- LINDQUIST, S.; CRAIG, E. A. The heat shock proteins. **Annual Review of Genetics**, v. 22, p. 631 – 677, 1988.
- LOVIS, C., MACH, F., DONATI, Y. R. et al. Heat shock proteins and the kidney. **Renal Fails**, v. 16, n. 179, 1994.
- LPHSI, 1990. *Livestock and Poultry Heat Stress Indices*, (Agriculture Engineering Technology Guide, Clemson University, SC, USA.
- MARAI, I.F.M.; BAHGAT, L.B.; SHALABY, T.H. et al. Fattening performance, some behavioural traits and physiological reactions of male lambs fed concentrates mixture alone with or without natural clay, under hot summer of Egypt. **Annual of Arid Zone**, v. 39, n. 4, p. 449–460, 2000.
- MARAI, I.F.M.; AYYAT, M.S.; ABD EL-MONEM, U.M. Growth performance and reproductive traits at first parity of New Zealand White female rabbits as affected by heat stress and its alleviation under Egyptian conditions. **Tropical Animal Health and Production**, v. 33, p. 457–462, 2001.
- MARAI, I.F.M.; EL-DARAWANY, A.A.; FADIEL, A. et al. Physiological traits as affected by heat stress in sheep—A review. **Small Ruminant Research**, v. 71, p. 1–12, 2007.
- MASEK, T.; KONJEVIC, D.; SEVERIN, K. et al. Hematology and serum biochemistry of European mouflon (*Ovis orientalis musimon*) in Croatia. **European Journal of Wildlife Research**, n. 55, p. 561 – 566, 2009.
- MAYER, M.P., BUKAU, B. HSP70 chaperone systems: diversity of cellular functions and mechanism of action. **Biology Chemistry**, v. 379, n. 261, 1998.
- MCDOWELL, R.E. **Improvement of livestock production in warm climates**. San Francisco: Freeman, 1972. 711 p.

- MCMANUS, C.; PALUDO, G.R.; LOUVANDINI, H. et al. Heat tolerance in Brazilian sheep: physiological and blood parameters. **Tropical Animal Health and Production**, v.41, n.1, p.95-101, 2009.
- MEYER, D.; COLES, E.; RICH, L. **Medicina de laboratório veterinária: interpretação e diagnóstico**. São Paulo: Editora Roca, 1995, 308p.
- MIKERNA, T.; DUGUMA, G.; HAILE, A. et al. Genetics of adaptation in domestic farm animals: a review. **Livestock Science**, v. 132, p. 1 – 12, 2010.
- MOBERG, G. P. **Biological response to stress: implications for animal welfare**. In: MOBERG, G.P.; MENCH J. A., editors. The biology of animal stress. CABI, New York, New York, USA, 2000, Pages 1–21.
- MONTANHOLI, Y.R.; ODONGO, N.E.; SWANSON, K.C. et al. Application of infrared thermography as an indicator of heat and methane production and its use in the study of skin temperature in response to physiological events in dairy cattle (*Bos Taurus*). **Journal of Thermal Biology**, v. 33, p. 468-475, 2008.
- MORGAN, K.N.; TROMBORG, C.T. Sources of stress in captivity. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 102, p. 262- 302, 2007.
- MORIMOTO, R.I.; TISSIERES, A.; GEORGOPOULOS, C. Progress and perspectives on the biology of heat shock proteins and molecular chaperones. In: MORIMOTO, R.I., TISSIERES, A., GEORGOPOULOS, C. (Eds.). **The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones**. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, 1994, p. 1–30.
- MORIMOTO, R.I. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. **Genes Development**, v. 12, n. 3788, 1998.
- MORMÈDE, P.; ANDANSON, S.; AUPÉRIN, B. et al. Exploration of the hypothalamic–pituitary–adrenal function as a tool to evaluate animal welfare, **Physiology & Behavior**, v. 92, p. 317–339, 2007.
- MOSELEY, P.L. Heat shock proteins and the inflammatory response. **Annuary of New York Academy Science**, v. 856, n. 206, 1998.

- MOSELEY, P.L. Exercise, stress, and the immune conversation. **Exercise and Sport Science Review**, v. 28, p. 128–132, 2000.
- MÖSTL, E.; PALME, R. Hormones as indicators of stress. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, p. 67-74, 2002.
- MUÑOZ, M.G.; JEREMIAS, J.; WITKIN, S.S. The 60 kDa heat shock protein in human semen: relationship with antibodies to spermatozoa and *Chlamydia trachomatis*. **Human Reproduction**, v. 11, n. 2600, 1996.
- NÄÄS, I.A. **Princípios de conforto térmico na produção animal**. São Paulo:Editora Ícone, 1989, 183p.
- NEVES, M.L.M.W.; AZEVEDO, M.; COSTA, L.A.B. et al. Níveis críticos do índice de conforto térmico para ovinos da raça Santa Inês criados a pasto no agreste do Estado de Pernambuco. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 31, n. 2, p. 169 – 175, 2009.
- NISHIMURA, H.; EMOTO, M.; KIMURA, K. et al. HSP70 protects macrophages infected with *Salmonella choleraesuis* against TNF-alpha-induced cell death. **Cell Stress Chaperones**, v. 2, n. 50, 1997.
- NJEMINI, R.; LAMBERT, M.; DEMANET, C. et al. Elevated serum heat-shock protein 70 levels in patients with acute infection: use of an optimized enzyme-linked immunosorbent assay. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 58, p. 664, 2003.
- NOTTER, D.R.; ANDREWA, S.A.; ZAJAC, A.M. Responses of hair and wool sheep to a single fixed dose infective larvae of *Haemonchus contortus*. **Small Ruminant Research**. v. 47, p. 221 – 225, 2003.
- NOWAK JR., T.S.; BOND, U.; SCHLESINGER, M.J. Heat shock RNA levels in brain and other tissues after hyperthermia and transient ischemia. **Journal of Neurochemistry**, v. 54, n. 451, 1990.
- ODUYE, O.O. Haematological values of Nigerian goats and sheep. **Tropical Animal Health and Production**, v. 8, p. 131-36, 1976.
- OSBORNE, C.A.; KRUGER, J.M.; LULICH, J.P. Doenças do trato urinário inferior dos felinos. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de medicina interna veterinária: doenças do cão e do gato**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v. 2,

cap. 175, 2004, p. 1802 – 1841.

- PALME, R.; MÖSTL, E. Measurement of cortisol metabolites in faeces of sheep as a parameter of cortisol concentration in blood. **Mammalian Biology, supplement II**, v. 62, p. 192–197, 1997.
- PALUDO, G.R.; MCMANUS, C.; MELO, R.Q. et al. Effect of heat stress and exercise on physiological parameters of horses of the Brazilian army, **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, p. 1130–1142, 2002.
- PARAMASTRI, Y.; ROYO, F.; EBEROVA, J. et al. Urinary and fecal immunoglobulin A, cortisol and 11-17 dioxoandrostanes, and serum cortisol in metabolic cage housed female cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). **Journal of Medical Primatology**, v. 36, n. 6, p. 355-64, 2007.
- PARSELL, D.A.; LINDQUIST, S. Heat shock proteins and stress tolerance. In: **The biology of heat shock proteins and molecular chaperones**. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995, p.457-495.
- PATIR, H.; UPADHYAY, R.C. Purification, characterization and expression kinetics of heat shock protein 70 from *Bubalus bubalis*. **Research in Veterinary Science**, v. 88, p. 258–262, 2010.
- PEINADO, V.I.; CELDRÁN, J.F.; PALOMEQUE, J. Basic haematological values in some wild ruminants in captivity. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 124A, p. 199–203, 1999.
- PERDRIZET, G.A.; SHAPIRO, D.S.; REWINSKI, M.J. Surgical stress and the heat shock response: in vivo models of stress conditioning. **Annual of New York Academy Science**, v. 874, n. 320, 1999.
- PLACE N. J; KENAGY G. J. Seasonal changes in plasma testosterone and glucocorticoids in free-living male yellow-pine chipmunks and the response to capture and handling. **Journal of Comparative Physiology - B**, v. 170, p. 245– 51. 2000.
- POCKLEY, A. G.; SHEPHERD, J.; CORTON, J. M. Detection of heat shock protein 70 (HSP70) and anti-HSP70 antibodies in the serum of normal individuals. **Immunological Investigation**, v, 27, n. 367, 1998.

- POGLIANI, F.C.; BIRGEL JÚNIOR, E. Valores de referência do lipidograma de bovinos da raça holandesa, criados no Estado de São Paulo. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 44, n. 5, p. 373 – 383, 2007.
- POLLOCK JR. F.E.; SMITH T.L.; KOMAN L. A.; HOLDEN M.B.; SMITH B.P. Decreased microvascular perfusion in the rabbit ear after six hours of ischemia. **Journal of Orthopedic Research**, v. 12, p. 48-57, 1994.
- RAI, A.K.; SINGH, M.; MORE, T. Cutaneous water loss and respiration rates of various breeds of sheep at high ambient temperatures. **Tropical Animal Health and Production**, v.11, p.51-56, 1979.
- RANDALL, D.; BURGGREN, W.; FRENCH, K. **Fisiologia animal: mecanismos e adaptações**, 4ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, 729p.
- REA, I.M.; MCNERLAN, S.; POCKLEY, A.G. Serum heat shock protein and anti-heat shock protein antibody levels in aging. **Experimental in Gerontology**, v. 36, n. 341, 2001.
- RITOSSA, F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. **Experimentia**, v. 18, n. 571, 1962.
- ROMERO L.M.; REMAGE-HEALEY, L. Daily and seasonal variation in response to stress in captive starlings (*Sturnus vulgaris*): corticosterone. **General Comparative Endocrinology**, v. 119, p. 52– 9, 2000.
- ROMERO, L.M.; ROMERO, R.C. Corticosterone responses in wild birds: the importance of rapid initial sampling. **Condor**, v. 104, p. 129 – 35, 2002.
- ROSNER, W. The functions of corticosteroid-binding globulin and sex hormone-binding globulin: recent advances. **Endocrine Review**, v. 11, p. 80–91, 1990.
- ROSS, T.T.; GOODE, L.; LINNERUD, A.C. Effects of high ambient temperature on respiration rate, rectal temperature, fetal development and thyroid gland activity in tropical and temperate breeds of sheep. **Theriogenology**, v. 24, n. 2, p. 259-269, 1985.
- SAS Institute. **User's Guide**. Version 9. Cary: 1999. 295p.
- SAPOLSKY, R.M.; ROMERO, L.M.; MUNCK, A.U. How do glucocorticosteroids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory and preparative actions. **Endocrine Review**, v. 21, p. 55–89, 2000.

- SCHARTE, M.; BABA, H.A.; VAN AKEN, H. et al. Alanyl-glutamine dipeptide does not affect hemodynamics despite a greater increase in myocardial heat shock protein 72 immunoreactivity in endotoxemic sheep. **Journal of Nutrition**, v. 131, p. 1433–1437, 2001.
- SCHIAFFONATI, L.; RAPPOCCIOLO, E.; TACCHINI, L. et al. Reprogramming of gene expression in postischemic rat liver: induction of proto-oncogenes and HSP 70 gene family. **Journal of Cells Physiology**, v. 143, n. 79, 1990.
- SCHLESINGER, M.J. Heat shock proteins: the search for functions. **Journal Cell Biology**, v. 103, p. 321-325, 1986.
- SELYE, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. **Nature**, v. 138, p. 32–3, 1936.
- SHAIKAT, A.H. A comparative study on hematology and serum biochemistry in lactating cows and their calves. Disponível em: <http://www.articlesbase.com/science-articles/a-comparative-study-on-hematology-and-serum-biochemistry-in-lactating-cows-their-calves-3001398.html>. Acesso em: 13/09/2010.
- SHERIFF, M.J.; KREBS, C.J.; BOONSTRA, R. Assessing stress in animal populations: Do fecal and plasma glucocorticoids tell the same story? **General and Comparative Endocrinology**, v. 166, p. 614–619, 2010.
- SIEGEL, R.A.; DUKER, E.M.; PAHNKE, U. et al. Stress-induced changes in cholecystokinin and substance P concentrations in discrete regions of the rat hypothalamus. **Neuroendocrinology**, v. 46, n. 1, p. 75-81, 1987.
- SILVA, G.A.; SOUZA, B.B.; ALFARO, C.E.P. et al. Efeito da época do ano e período do dia sobre os parâmetros fisiológicos de reprodutores caprinos no semi-árido paraibano. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 10, n. 4, p. 903-909, 2006.
- SILVA, R.G. **Introdução à Bioclimatologia Animal** São Paulo: Ed. Nobel, 2000, 286 p.
- SILVEIRA, J.M. (Ed). **Patologia clínica veterinária: teoria e interpretação**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. 196p.

- SIMON, R.P.; CHO, H.; GWINN, R. et al. The temporal profile of 72-kDa heat-shock protein expression following global ischemia. **Journal of Neuroscience**, v. 11, n. 881, 1991.
- SOARES, F.A.P.; NETO, A.V.B.; GUIMARÃES, J.A. Metabolismo de indicadores preditivos da toxemia da prenhez em ovelhas dorper no terço final da gestação, parto e pós-parto. **Ciência Animal Brasileira – Suplemento 1, 2009 – Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria**.
- SONG-DONG, M.; TONG, G.; GAO, G.F. et al. HBV-specific peptide associated with heat-shock protein gp96. **Lancet**, v. 357, n. 528, 2001.
- SONNA, L.A.; FUJITA, J.; GAFFIN, S.L. et al. M. Molecular biology of thermoregulation. Invited review: effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. **Journal of Applied Physiology**, v. 92, p. 1725, 2002.
- SOTI, C.; CSERMELY, P. Molecular chaperones and the aging process. **Biogerontology**, v. 225, 2000.
- STEAR, M.J.; ECKERSALL, P.D.; GRAHAM, P.A. et al. Fructosamine concentration and resistance to natural, predominantly *Teladorsagia circumcincta* infection. **Parasitology**, v. 123, p. 211–218, 2001.
- THRALL, M. A.; BAKER, D.C.; CAMPBELL, T.W. et al. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Roca, 2007, 583 p.
- THWAITES, C.J. Physiological responses and productivity in sheep. In: YOUSEF, M.K. (Ed.), **Stress Physiology in Livestock**. Florida: CRC Press, USA, 1985, p. 25–39,
- TILBROOK, A.J.; CLARKE, I.J. Neuroendocrine mechanisms of innate states of attenuated responsiveness of the hypothalamopituitary adrenal axis to stress. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 27, p. 285-307, 2006.
- TREIMAN, D.M.; LEVINE, S. Plasma corticosteroid response to stress in four species of wild mice. **Endocrinology**, v. 84, p. 676– 80, 1969.
- VAN DE KAR, L.D.; RICHARDSON-MORTON, K.D.; RITTENHOUSE, P.A. Stress: neuroendocrine and pharmacological mechanisms. In: JASMIN, G; ANTIN, M. (Ed.). **Stress revisited. 1. Neuroendocrinology of stress**. New York: Karger, 1991, p. 133-73.

- VAN DE HEUVEL, C.J.; FERGUNSON, S.A.; GILBERT, S.S. et al. Thermoregulation in normal sheep and insomnia: the role of peripheral heat loss new applications for digital thermal infrared imaging (DITI). **Journal of Thermal Biology**, v. 29, p. 457-461, 2004.
- VERKERK, G.A.; PHIPPS, A.M.; CARRAGHER, J. F. et al. Characterisation of milk cortisol concentrations as a measure of short-term stress responses in lactating dairy cows. **Animal Behaviour**, v. 7, p. 77–86, 1998.
- VIANNA, D.M.L.; CARRIVE, P. Changes in cutaneous and body temperature during and after conditioned fear to context in therat. **European Journal of Neuroscience**, v. 21, p. 2505-2512, 2005.
- VINCENT, I.C.; MICHELL, A.R. Comparison of cortisol concentrations in saliva and plasma of dogs. **Research in Veterinary Science**, v. 53, p. 342-5, 1992.
- VOIGT, G.L. **Conceptos y Técnicas Hematológicas para Técnicos Veterinarios**. Zaragoza: Acribia, 2003, 144p.
- WEBSTER, A.J.F.; HICKS, A.M.; HAYS, F.L. Cold climate and cold temperature induced changes in the heat production and thermal insulation of sheep. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 47, n. 6, p. 553, 1969.
- WELCH, W.J. Mammalian stress response: cell Physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. **Physiology Review**, v. 72, p. 1063–1081, 1992.
- WELCH, W. J. How cells respond to stress. **Scientific American**, v. 268, p. 34- 41, 1993.
- WEST, J.W. Nutritional strategies for managing the hepattite 12, 163–170. stressed dairy cow. **Journal of Animal Science**, v. 77 (Suppl. 2), p. 21–35, 1999.
- WEST, J.W. Effects of heat stress on production in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 2131–2144, 2003.
- WINGFIELD, J.C.; BREUNER, C.; JACOBS, J. Corticosterone and behavioral responses to unpredictable events. In: Harvey, S.; Etches R.J. (Eds.), *Perspectives in avian endocrinology*. **Journal of Endocrinology**, p. 267–278, 1997.
- WINGFIELD, J.C.; BREUNER, C.; JACOBS, J. et al. Ecological bases of hormone-behavior interactions: The “emergency life history stage.” **American Zoologist**, v. 38, p.

191–206, 1998.

WITZMANN, F.A.; FULTZ, C.D.; LIPSCOMB, J.C. Toxicant-induced alterations in two-dimensional electrophoretic patterns of hepatic and renal stress proteins. **Electrophoresis**, v. 17, n. 198, 1996.

WU, W.X.; DERKS, J.B.; ZHANG, Q. et al. Changes in heat shock protein-90 and -70 messenger ribonucleic acid in uterine tissues of the ewe in relation to parturition and regulation by estradiol and progesterone. **Endocrinology**, v. 137, p. 5685–5693, 1996.

XU, Q.; WICK, G. The role of heat shock proteins in protection and pathophysiology of the arterial wall. **Molecular Medicine Today**, v. 2, n. 372, 1996.

YELLON, D.M.; MARBER, M.S. HSP70 in myocardial ischaemia. **Experimentia**, v. 50, p. 1075–1083, 1994.

YOUNG, B.A.; WALKER, B.; DIXON, A.E. et al. Physiological adaptation to the environment. **Journal of Animal Science**, v. 67, p. 2426–2432, 1989.

YOUNG, R.A. Stress proteins and immunology. **Annual Review of Immunology**, v. 8, n. 401, 1990.

YOUNG, K.M.; WALKER, S.L.; LANTHIER, C. et al. Noninvasive monitoring of adrenocortical activity in carnivores by fecal glucocorticoid analyses. **General Comparative Endocrinology**, v. 137, p. 148–165, 2004.

YOUSEF, H.M. **Studies on some environmental factors affecting production and reproduction in some farm animals**. M.Sc. thesis. Faculty of Agriculture, Zagazig University, Zagazig, Egypt. 1985.