UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ANA LUISA SILVA LONGO

Cortisol fecal em ovinos: curva de excreção e estabilidade

Pirassununga

2016

ANA LUISA SILVA LONGO

Cortisol fecal em ovinos: curva de excreção e estabilidade

Versão corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências do programa de Pós-Graduação em Biociência Animal.

Área de Concentração: Biociência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Evaldo Antonio Lencioni Titto.

Pirassununga

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

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

S532c Silva Longo, Ana Luisa
Cortisol fecal em ovinos: curva de excreção e estabilidade / Ana Luisa Silva Longo ; orientador Evaldo Antonio Lencioni Titto. -- Pirassununga, 2016.
80 f.
Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.
1. Indicadores de estresse. 2. Cordeiros. . I. Lencioni Titto, Evaldo Antonio , orient. II. Título.

Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte - autor.

DEDICATÓRIA

À Deus e a todas as pessoas que amo, por acreditarem em mim, pela amizade, companheirismo e apoio.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela dádiva da vida, pela saúde e oportunidades a mim concedidas.

Aos meus amados pais, Severino e Lia, por todo suor e sacrifício necessário para que eu chegasse até aqui, pelo apoio e por sempre acreditarem em mim.

Ao meu irmão, Guilherme, pelo carinho, zelo e amizade.

Ao meu namorado Danilo, pessoa com a qual amo partilhar a vida, pelo companheirismo, carinho e paciência durante todos os momentos, fossem estes de paz ou dificuldade.

À minha família, em especial meus avôs Heber e Waldo (em memória), que sempre torceram e de certa forma batalharam junto a mim rumo a mais essa conquista.

Ao meu orientador Prof. Dr. Evaldo Antonio Lencioni Titto, pela oportunidade, apoio e confiança depositados em meu trabalho.

À Prof.^a Dr.^a Cristiane Gonçalves Titto, pelo convívio, amizade e auxílio durante toda a execução do projeto.

Ao Prof. Dr. Alfredo Manuel Franco Pereira, pelas ideias e toda a ajuda e disposição durante o desenvolvimento do projeto.

Aos meus amigos, pelo carinho, paciência e companheirismo, que às vezes mesmo distantes nunca deixaram de demonstrar, sequer por um minuto, o valor inestimável de uma amizade verdadeira.

As minhas companheiras de república ao longo de todos esses anos de graduação e mestrado, por terem se tornado muito mais que irmãs, minha segunda família.

À todos os “Labeanos”, fundamentais durante a execução do projeto, em especial àqueles os quais posso chamar de irmãos, Lina, Fábio, Henrique, Thuanny e nossa técnica Thays, pelo comprometimento e profissionalismo durante o tempo que estivemos juntos, além de todo apoio e amizade dentro e fora do laboratório.

Aos amigos do CEBER, pelos momentos de descontração e amizade durante estes dois anos.

Ao Laboratório de Fisiologia (FZEA/USP), em especial ao Prof. Dr. João Negrão e a técnica Sandra, pela disponibilidade e atenção dispendida durante minhas análises.

Ao Laboratório Multiusuário de Saúde Animal e Segurança Alimentar, em especial à Prof.^a Dr.^a Ana Maria e a técnica Andrea, pela confiança durante a utilização dos equipamentos necessários para realização das etapas do projeto.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos FZEA/USP e à todos os funcionários envolvidos, pelo cooperativismo e paciência.

E meu “muito obrigada” também àqueles que não foram citados, mas que contribuíram de alguma forma em meu desenvolvimento.

“Você nunca sabe que resultados virão da sua ação. Mas se você não fizer nada, não existirão resultados.”

Mahatma Gandhi

RESUMO

LONGO, A. L. S. **Cortisol fecal em ovinos: curva de excreção e estabilidade.** 2016. 80 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

O presente estudo foi dividido em dois experimentos, tendo como objetivo determinar a curva de excreção do cortisol fecal e sua estabilidade nas fezes perante exposição à diferentes períodos de tempo e temperatura entre as colheitas e análises, correlacionando os níveis de cortisol fecal com o pico de cortisol sanguíneo. No experimento 1, seis fêmeas mestiças (Dorper x Santa Inês) tiveram suas fezes totais colhidas durante 24 horas após a aplicação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), além de colheitas de sangue realizadas antes da aplicação do ACTH, 60, 120 e 300 minutos depois; durante as quais foram atribuídos escores de reatividade para cada animal. Logo após as análises foi iniciado o experimento 2, no qual 9 cordeiros mestiços (Dorper x Santa Inês) foram submetidos a uma situação de estresse térmico durante os horários das 11 às 15 horas da tarde, tendo suas fezes colhidas às 23 horas do mesmo dia. Após a colheita, as fezes foram agrupadas e homogeneizadas em três grupos distintos, de onde retiraram-se alíquotas referentes aos tratamentos propostos: três temperaturas (15°, 25° e 35°) e quatro tempos (1, 3, 6 e 12 horas). Os dados da curva de excreção foram analisados por ANOVA, bem como pela correlação entre os valores de cortisol sanguíneo, fecal e reatividade. Para análise da estabilidade foi utilizada ANOVA multifatorial com dois fatores (temperatura e intervalo de tempo). Para avaliação das variáveis comportamentais foi realizada a transformação de escala dos dados para “arco-seno raiz de porcentagem”, procedendo-se à análise de variância. O modelo estatístico contemplou os efeitos de dia (1, 2 e 3) com análise individual por animal. Os parâmetros de cortisol sanguíneo, frequência respiratória e temperatura retal foram analisados pelo teste t e correlação de Pearson. Todas as comparações de médias foram realizadas por teste F e teste t (PDIFF). A reatividade durante a colheita não exerceu efeito significativo sobre os valores de cortisol sanguíneo, os quais demonstraram médias maiores 60 minutos após a aplicação do ACTH e, após 300 minutos as ovelhas apresentaram níveis de cortisol considerados normais para ovinos sem estresse. Por outro lado, o pico de cortisol nas fezes foi verificado aproximadamente 10 a 12 horas após o pico de cortisol no sangue, não sendo verificadas diminuições significativas nas concentrações que

indicassem o retorno aos níveis basais durante o período de 24 horas ($P>0,05$). Não foram observadas diferenças significativas entre os tempos e temperaturas aos quais as amostras de fezes foram submetidas ($P>0,05$), verificando-se uma tendência a manutenção da concentração do cortisol fecal em ovinos durante o período de 12 horas após a colheita.

Palavras – chave: indicadores de estresse; cordeiros.

ABSTRACT

LONGO, A. L. S. **Fecal cortisol in sheep: excretion curve and stability**. 2016. 80 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

This present study was divided into two experiments, aiming to determine the excretion curve of faecal cortisol and its stability over different periods of time and temperature between harvest and analyzes, correlating the fecal cortisol levels with peak blood cortisol. The project was developed in Biometeorology and Ethology Lab, Faculty of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Pirassununga - SP. In the first experiment, six crossbred (Dorper x Santa Inês) females sheep had their total feces collected during 24 hours after the application of adrenocorticotrophic hormone (ACTH), beyond the blood samples taken before the application of ACTH, and one, two and five hours after application; in which was attributed reactivity scores to each animal. Soon after the analysis was started the second experiment, in which nine crossbred lambs (Dorper x Santa Inês) underwent a situation of thermal stress from 11 to 15 pm, and their feces were collected at 23 hours the same day. After harveting, the feces were pooled and homogenized in three different groups, where aliquots were withdrawn relating to the treatments proposed: three temperatures (15, 25 and 35°C) and four times (1, 3, 6 and 12 hours). The excretion curve data were analyzed by ANOVA, as well as the correlation between blood cortisol levels, faecal and reactivity. For stability analysis were used multifactor ANOVA with two factors (temperature and time range). To evaluate the behavioral variables was performed the transformation of the data range for "arc sine percentage root", proceeding to the analysis of variance. The statistical model included effects of day (1, 2 and 3) with individual analysis by animal. The blood cortisol parameters, respiratory rate and rectal temperature were analyzed by t test Pearson correlation. All comparisons of means were performed by F and t test (pdiff). The reactivity during harvest did not exert significant effect on blood cortisol levels, which showed higher averages 60 minutes after the application of ACTH, and after 300 minutes, the sheep showed cortisol levels considered normal to them, without stress. On the other hand, the peak of cortisol in the feces was observed approximately 10-12 hours after the

peak of cortisol in the blood, not being observed significant decreases that indicate the return to the basal levels during the 24 hour period ($P > 0,05$). Were not observed no significant differences between the time and temperature in which the faecal samples were subjected ($P > 0.05$), verifying a tendency on the maintenance of the concentration of faecal cortisol in sheep during the 12 hour period after harvest.

Keywords: stress indicators; lambs.

Lista de figuras

Figura 1 - Esquema geral dos tipos de respostas biológicas que os animais dispõem durante o estresse.....	22
Figura 2 - Esquema dos principais componentes e reações do eixo Hipotálamo Pituitária Adrenal (HPA) após a percepção de estímulo estressor.....	25
Figura 3 - Esquema da distribuição do experimento 1.	33
Figura 4 - A: Animais selecionados para o projeto; B: Animais se alimentando nas gaiolas metabólicas com bebedouros e comedouros instalados.....	34
Figura 5 - Etograma de trabalho para observação da postura e atividades (5 em 5 minutos).....	35
Figura 6 - Etograma de trabalho para observação das demais atividades (contínuo).	35
Figura 7 - Escores de reatividade atribuídos aos ovinos durante as colheitas de sangue.	36
Figura 8 - Coletor de fezes coberto com papel cartão; B - Utilização de luva durante a colheita.	37
Figura 9 - Animais nos piquetes.	56
Figura 10 - A: Fezes maceradas com auxílio de gral e pistilo; B: Pesagem das amostras em balança analítica.....	57
Figura 11 - A: Adição de solução padrão de cortisol; B: Amostras submetidas aos tratamentos dentro da incubadora.....	58
Figura 12 - Esquema para determinação da estabilidade do cortisol fecal.	58
Figura 13 - A: Amostras centrifugadas por 30 minutos; B: Transferência do sobrenadante para tubo limpo.....	59
Figura 14 - A: Evaporação do reagente com Nitrogênio; B: Montagem da placa para dosagem do cortisol fecal (ELISA).	60

Lista de tabelas

Tabela 1 - Valores médios, máximos e mínimos das variáveis meteorológicas registradas no galpão durante o experimento 1.	39
Tabela 2 - Número de eventos (eventos/hora) do comportamento de vocalização observado nos ovinos durante os dias de adaptação (1º e 2º dia) e colheita (3º dia).	43
Tabela 3 - Correlações entre o pico de cortisol sanguíneo e valores de cortisol fecal encontrados às 6, 8, 10 e 12 horas após o pico de cortisol sérico.	52
Tabela 4 - Valores médios de temperatura retal (TR), frequência respiratória (FR) e cortisol sanguíneo, seguidas do erro padrão médio, observadas nos animais antes e depois da exposição ao estresse.	61

Lista de gráficos

Gráfico 1 - Distribuição média observada da ocorrência do comportamento ingerir durante os três dias de avaliação.....	40
Gráfico 2 - Distribuição média observada da ocorrência do comportamento ruminar durante os três dias de avaliação.....	40
Gráfico 3 - Distribuição média observada da ocorrência do comportamento ócio durante os três dias de avaliação.....	41
Gráfico 4 - Distribuição média observada da ocorrência do comportamento deitado durante os três dias de avaliação.....	41
Gráfico 5 - Escore de reatividade médio observado durante a contenção para colheita de sangue.....	45
Gráfico 6 - Concentração média de cortisol sanguíneo observada nos diferentes horários antes e após a aplicação do ACTH*.....	47
Gráfico 7 - Distribuição das concentrações de cortisol sanguíneo verificadas nos diferentes horários antes e após a aplicação do ACTH*.....	47
Gráfico 8 - Boxplot * de concentrações agrupadas de cortisol fecal encontradas antes e após a aplicação do ACTH (**)......	51

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

%	Porcentagem
$\bar{X}$	Média
$\mu\text{g.dl}^{-1}$	Microgramas por decilitros
μl	Microlitros
AC	Adenilato Ciclase
ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
AE	Antes do estresse
AOAC	Association of Analytical Communities
ATP	Trifosfato de Adenosina
cAMP	Monofosfato de Adenosina Cíclico
CRH	Liberador de Corticotropina
DE	Depois do estresse
EIA	Ensaio Imunoenzimático
EPM	Erro padrão da média
FR	Frequência retal
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
HHA	Eixo Hipotálamo Hipófise Adrenal
Kg	Quilograma
LH	Hormônio Luteinizante
m	Metro
Máx	Máximo
Mín	Mínimo
mov.min⁻¹	Movimentos por minuto

Ng.g MS⁻¹	Nanograma por grama de matéria seca
ng.ml⁻¹	Nanograma por mililitro
°C	Graus Celsius
pg.ml⁻¹	Picograma por mililitro
PKA	Quinase A
PV	Peso vivo
RIA	Radioimunoensaio
r.p.m	Rotações por minuto
Tar	Temperatura do ar
Tgn	Temperatura do globo negro
TR	Temperatura retal
UR	Umidade relativa
VP	Vasopressina

SUMÁRIO

1	Introdução	19
2	Hipótese	21
3	Objetivo geral	21
3.1	Objetivos específicos	21
4	Revisão de literatura	22
4.1	Estresse x Bem-estar animal.....	22
4.2	Cortisol	24
4.3	Metodologias para quantificação de glicocorticoides	26
4.4	Técnicas analíticas para avaliação hormonal.....	29
4.5	Interferências na dosagem de hormônios esteroides	30
5	Material e métodos - Organização Geral	32
5.1	Análises Laboratoriais	32
5.2	Variáveis meteorológicas	32
5.3	Determinação da matéria seca.....	33
6.	Experimento I – Curva de excreção do cortisol.....	33
6.1	Locais.....	33
6.2	Animais.....	34
6.3	Fornecimento de ração.....	34
6.4	Avaliação do comportamento e reatividade na colheita de sangue.....	34
6.5	Administração do ACTH e colheita de fezes	36
6.6	Cortisol sanguíneo	37
6.7	Análise dos dados	38
6.8	Resultados	38
6.8.1	Variáveis Meteorológicas	38
6.8.2	Avaliação do comportamento	39
6.8.3	Reatividade na colheita de sangue	44

6.8.4 Cortisol sanguíneo	46
6.8.5 Curva de excreção do cortisol fecal	50
6.8.6 Conclusões.....	55
7 Experimento II – Estabilidade do cortisol nas fezes	55
7.1 Locais e animais.....	55
7.2 Estresse térmico e colheita de fezes	55
7.3 Cortisol sanguíneo, frequência respiratória e temperatura retal.....	56
7.4 Preparação das amostras e tratamentos.....	57
7.5 Protocolo de extração para determinação do cortisol fecal	58
7.6 Análise dos dados	60
7.7 Resultados	60
7.7.1 Estresse térmico nos ovinos.....	60
7.7.2 Estabilidade do cortisol nas fezes	63
7.7.3 Conclusões.....	66
REFERÊNCIAS.....	67
ANEXO	79

1 Introdução

O estresse é caracterizado como mecanismo de reação frente a situações aversivas desencadeadas por fatores ambientais, sociais ou de manejo, atuando na resposta rápida do organismo e disponibilizando energia para que o corpo reaja a situação de ameaça que lhe foi imposta.

O desequilíbrio da homeostase durante uma situação de estresse é caracterizado por diversas variações nas respostas comportamentais e fisiológicas dos animais, podendo desencadear falhas nos principais processos imunológicos, reprodutivos e de crescimento.

Em geral, a resposta endócrina ao estresse envolve a secreção do hormônio liberador de corticotropina e subsequente produção do hormônio adrenocorticotrófico, o qual estimula a secreção do cortisol pela glândula adrenal, sintetizado a partir do colesterol (YEAGER, GUYRE e MUNCK, 2004).

Com o objetivo de refletir o estado fisiológico de um indivíduo durante ou após uma situação de estresse, diversas metodologias são aplicadas ao estudo da dosagem de glicocorticoides, sendo algumas consideradas de caráter invasivo ou não-invasivo, caracterizadas com relação a invasibilidade da técnica a ser utilizada perante a espécie e o método de colheita do material.

A quantificação dos níveis de cortisol sanguíneo é considerada um importante indicador do estresse em ovinos, no entanto, a necessidade de contenção durante a colheita pode gerar um estresse adicional, desencadeando reações de fuga ou defesa naturais da espécie. Além disso, tais procedimentos se tornam impossíveis ou até mesmo perigosos quando se trata do estudo de animais selvagens, sendo de grande importância a utilização de métodos não invasivos para a avaliação da função adrenal destes indivíduos (PALME e MÖSTL, 1996).

Neste contexto, a obtenção de uma estimativa do cortisol através de sua recuperação nas fezes garante uma maior acurácia dos dados, evitando possíveis interferências que possam aumentar os níveis de cortisol circulante e interferir na exatidão dos resultados.

Todavia, as fezes nem sempre podem ser obtidas no exato momento da defecação, sendo de extrema importância estabelecer intervalos de tempo confiáveis, bem como determinar a estabilidade do cortisol fecal perante diferentes condições de

temperatura ambiente, estabelecendo um período no qual as amostras poderiam ser colhidas sem nenhuma interferência em sua concentração.

Além disso, a quantificação da curva de excreção do cortisol após o estímulo estressor permite determinar em qual momento os metabólitos estarão presentes nas fezes, diminuindo a possibilidade do cortisol resultante ainda não estar totalmente contido no bolo fecal do animal, visto que alterações decorrentes do metabolismo são verificadas em relação as espécies.

2 Hipótese

A hipótese do presente trabalho foi:

I. A concentração de cortisol fecal como indicadora do nível de estresse em ovinos pode substituir o uso da concentração sanguínea.

3 Objetivo geral

O presente projeto buscou compreender o mecanismo de excreção e estabilidade do cortisol fecal após o estímulo estressor, como metodologia não-invasiva para determinação do estresse em ovinos.

3.1 Objetivos específicos

- Quantificar a curva de excreção do cortisol fecal após o estímulo estressor (ACTH), correlacionando os níveis de cortisol fecal com o pico de cortisol sanguíneo;
- Quantificar a recuperação do cortisol fecal dos ovinos submetidos a estresse térmico, nas amostras de fezes mantidas em diferentes temperaturas do ar (15°C, 25°C e 35°C), ao longo de diferentes períodos de tempo (1, 3, 6 e 12 horas) entre a defecação e a colheita.

4 Revisão de literatura

4.1 Estresse x Bem-estar animal

A disseminação do conceito de bem-estar animal tem aguçado o senso crítico dos consumidores e, conseqüentemente, da indústria, transformando o que antes parecia um empecilho em um aliado importante para o agronegócio.

Diversos estudos descrevem a relação do estresse com a redução no desempenho produtivo, adaptativo e/ou reprodutivo do animal, ressaltando que alterações no comportamento e a incidência de algumas enfermidades são sinais óbvios de que o bem-estar está prejudicado.

O estresse pode ser definido como uma resposta biológica que ocorre quando o indivíduo se expõe a situações que exerçam algum tipo de ameaça sobre o equilíbrio de sua homeostase, as quais são, segundo Morgan e Tromborg (2007), chamadas de estressores.

Figura 1 - Esquema geral dos tipos de respostas biológicas que os animais dispõem durante o estresse.

Fonte: Adaptado de MOBERG, G. P. Respostas biológicas ao estresse: implicações para o bem-estar animal. In: MOBERG, G. P.; MENCH, J. A. **A biologia do estresse animal: Princípios básicos e implicações no bem-estar animal**. Nova Iorque: CABI Publishing, 2000. p. 5.

O tempo de resposta ao estresse difere entre as espécies e em relação aos fatores envolvidos (TREIMAN e LEVINE, 1969), podendo interagir com diversas

condições exógenas como situações de frio e calor excessivos, umidade, fome, sede, enfermidades, esforço corporal, elevada densidade populacional, isolamento, transporte, manejos de rotina e pré-abate (TEIXEIRA, 2005).

Indivíduos sob condições de estresse tendem a ser mais reativos e apresentar piores índices de ganho de peso e taxa de crescimento quando comparados a animais menos estressados (LYONS, 1989; VOISINET et al., 1997). Correlações negativas entre perdas na carcaça e presença de contusões (FORDYCE et al., 1985, 1988), além de piores qualidades de carcaça (VOISINET et al., 1997; DEL CAMPO et al., 2010) também puderam ser observadas em animais de maior reatividade.

Em estudo conduzido com ovinos da raça Santa Inês, verificou-se que os animais se mostraram sensíveis ao estresse ambiental, apresentando menor desempenho produtivo, sem atingir o peso máximo esperado quando expostos a condições de ausência de sombra (NEIVA et al., 2004).

Além disso, o conjunto de alterações metabólicas ocorridas durante o estresse térmico são extremamente prejudiciais às fêmeas gestantes, resultando em queda nas taxas de fertilização e aumento da mortalidade embrionária (BROWN et al., 1977).

Segundo Marai et al. (2007), a exposição de ovelhas ao estresse térmico resultou em redução na ingestão de matéria seca, queda do peso corpóreo, diminuição no ganho de peso diário e bloqueio dos processos reprodutivos. Da mesma forma, Moreira, Moura e Araújo (2001), também observaram que o estresse térmico causou efeitos deletérios tanto na espermatogênese quanto no processo de maturação dos espermatozoides no epidídimo de carneiros Santa Inês.

Os conceitos de bem-estar animal e estresse, apesar de intimamente associados, são de caráter totalmente oposto, uma vez que o grau de bem-estar é baixo quando há falha na adaptação a uma situação estressante e vice-versa (VEISSIER e BOISSY, 2007). Por outro lado, o estresse moderado é importante para a sobrevivência dos animais, atuando como mecanismo de alerta em situações de risco (LEHUGEUR, 2012), sendo necessário diferenciar o estresse fisiológico do estresse patológico, o qual ocorre devido a eventos nocivos intensos e/ou prolongados ao qual o animal não é capaz de se adaptar (WIEPKEMA e KOOLHAAS, 1993).

Diversos hormônios estão envolvidos no processo fisiológico de resposta ao estresse, dentre eles se destacam o hormônio adrecorticotrófico (ACTH), os glicocorticoides (cortisol) e as catecolaminas (adrenalina e noradrenalina). (MATTERI, CARROLL e DYER, 2000). No entanto, tais respostas não devem ser consideradas

isoladamente, sendo necessário se atentar ao comportamento, espécie, raça e, principalmente, a situação rotineira a qual o animal é submetido, pois experiências prévias e vivências individuais podem gerar falhas na obtenção e entendimento das respostas apresentadas.

Neste sentido, o monitoramento de parâmetros fisiológicos aliado a estudos comportamentais são fundamentais para a avaliação do bem-estar, uma vez que podem ocorrer implicações na saúde do animal devido ao elevado nível de cortisol circulante (LUNDBERG, 2005).

4.2 Cortisol

O cortisol ou corticosterona é um glicocorticoide do eixo Hipotálamo Hipófise Adrenal (HHA) que pertence à família dos esteroides, tendo como principal função aumentar os níveis de glicose no sangue. As variações na sua concentração ocorrem em função da alteração da glândula adrenal e nas reações aos agentes estressores (WILHELM et al., 2007; KOEPPEN e STANTON, 2009).

Os estímulos estressores externos iniciam uma série de eventos que conduzem à ativação da divisão simpática do sistema nervoso e a secreção do hormônio liberador de corticotropina (CRH) e vasopressina (VP). A ativação das vias simpáticas resulta na liberação de catecolaminas pela medula adrenal, as quais atuam em vários órgãos e tecidos. O hormônio liberador de corticotropina e a vasopressina estimulam a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pelos corticotrófos da pituitária anterior (MATTERI, CARROLL e DYER, 2000).

O hormônio adrenocorticotrófico é um polipeptídeo de 39 aminoácidos e com meia vida de apenas dez minutos, sintetizado continuamente e destruído em um equilíbrio dinâmico (NELSON e COX, 2002), o qual se liga em receptores na superfície das células do córtex adrenal, estimulando-as a produzir os hormônios esteroides, como o cortisol (GLEW, 2007) (Figura 2).

O ACTH se liga a receptores localizados na membrana de células fasciculadas da adrenal, ativando a Adenilato Ciclase (AC) via proteína Gs (estimulatória) que, juntamente com uma molécula de Trifosfato de Adenosina (ATP) faz com que o Monofosfato de Adenosina cíclico (cAMP) ative a proteína Quinase A (PKA). A PKA por meio de fosforização realiza o aumento da hidrólise de ésteres de colesterol a colesterol livre, além de aumentar o transporte do mesmo para dentro da mitocôndria por meio da proteína StAR (steroidogenic acute regulatory protein), a qual funciona

entre as membranas mitocondriais externas e internas (SCHIMIDT e LITWACK, 2007).

Figura 2 - Esquema dos principais componentes e reações do eixo Hipotálamo Pituitária Adrenal (HPA) após a percepção de estímulo estressor.

Fonte: Adaptado de MATTERI, R. L.; CARROL J. A.; DYER C. J. Respostas Neuroendócrinas ao estresse. In: MOBERG, G. P.; MENCH, J. A. **A biologia do estresse animal: Princípios básicos e implicações no bem-estar animal**. Nova Iorque: CABI Publishing, 2000. p. 46.

O colesterol livre na mitocôndria é modificado pela enzima de clivagem de cadeia lateral do colesterol em pregnenolona (GRANNER, 2007) e, a partir dessa molécula é sintetizado o cortisol, ocorrendo o transporte para o sangue e o alcance das células-alvo de glicocorticoides para expressar sua ação hormonal (SCHIMIDT e LITWACK, 2007).

O cortisol é considerado um importante indicador biológico do estresse em diversas espécies animais, e a elevação dos níveis de glicocorticoides circulantes resulta em alterações no metabolismo dos carboidratos e na via energética em atividades não essenciais (MCKENZIE e DEANE, 2005). O animal exposto ao agente estressor por longo período fará com que ocorra a secreção excessiva de cortisol,

ocasionando fadiga e perda de massa muscular devido ao excesso de aminoácidos convertidos em glicose e da redistribuição da gordura no organismo (NELSON e COX, 2002).

O aumento do cortisol inibe a atividade do hipotálamo e da hipófise provocando a queda na produção e secreção de prolactina, somatotropina (hormônio do crescimento), do hormônio estimulante da tireoide e das gonadotrofinas (RIVIER e RIVEST, 1991).

O cortisol também diminui a atividade gonadal através da redução da frequência e amplitude dos pulsos de hormônio luteinizante (LH) (DOBSON et al., 2001; BREEN e KARSH, 2004), o que na fase lútea pode induzir a atresia folicular (DARAMOLA, ABIOJA e ONAGBESAN, 2012). Além disso, a supressão dos pulsos de LH na fase folicular pode atrasar ou até mesmo inibir a onda pré-ovulatória de liberação de LH, interrompendo a maturação do oócito e qualidade do embrião (MIHM et al., 1994; DOBSON e SMITH, 2000).

Tais afirmações corroboram com Breen et al. (2005), os quais verificaram uma diminuição nos pulsos de LH após a administração de 30 ng.mL^{-1} de cortisol em ovinos. Em contrapartida, o aumento da secreção do ACTH e liberação do cortisol plasmático, não afetou a secreção do hormônio folículo estimulante (FSH) (DOBSON et al., 2000).

Da mesma forma, seu aumento de origem fetal reduz a síntese placentária de progesterona e aumenta a de estradiol, promovendo a síntese e liberação de prostaglandina – $\text{PGF2}\alpha$, sensibilizando o útero à ocitocina, o que pode provocar a luteólise e levar ao aborto (REECE, 2006).

4.3 Metodologias para quantificação de glicocorticoides

Validações de análises para quantificação de hormônios esteroides vem sendo realizadas através de experimentos baseados no desafio com precursores da síntese do cortisol, tal como o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), o que torna possível a monitoração entre o tempo da secreção do hormônio no sangue até seu primeiro sinal de aparição na excreta (NARAYAN et al., 2010; TOUMA e PALME, 2005; VERA, ZENUTO e ANTENUCCI, 2012).

A quantificação de glicocorticoides geralmente é realizada através de ensaios baseados no sangue (soro ou plasma). No entanto, sua utilidade em estudos de longo prazo é limitada devido a influência do ritmo circadiano, da natureza pulsátil da

secreção de glicocorticoides e da possível indução de um estresse adicional durante os procedimentos de amostragem (YOUNG et al., 2004). Além disso, em alguns casos com estudos de animais selvagens, para que ocorra a coleta de sangue é necessário anestesiá-los e, apesar de anestésias utilizadas para este fim não afetarem o potencial produtivo, a dinâmica da secreção hormonal (amplitude do pulso e frequência) pode ser interrompida temporariamente por drogas anestésicas específicas (JOHNSON e GAY, 1981).

A utilização de métodos não invasivos para monitorar a atividade adrenocortical requer o conhecimento do metabolismo e excreção do cortisol (MOBIGLIA, CAMILO e FERNANDES, 2014). Segundo Dehnhard et al. (2003), métodos não invasivos para quantificação do estresse estão sendo aplicados em estudos com vertebrados, oferecendo diversas vantagens sobre os métodos considerados invasivos, o que, de acordo com Wasser et al. (2000), ocorre pelo fato das amostras serem facilmente obtidas sem incômodo ao animal e sem colocá-lo em perigo durante a captura.

Diversas metodologias de amostragem não invasivas como saliva, leite, urina, fezes, pelos, penas e ovos estão sendo estudadas (PALME, 2012). A colheita de leite fica restrito a fêmeas lactantes e as amostras de urina as vezes se tornam difíceis de obter (PALME, 2012). Do mesmo modo, a quantificação de corticosterona em ovos como indicador de estresse (DOWNING e BRYDEN, 2008) fica restrita a galinhas poedeiras e, além disso, apenas uma pequena porção de corticosterona do plasma entra nos ovos e diversas reações cruzadas podem confundir os resultados (RETTENBACHER et al., 2005; RETTENBACHER, MÖSTL e GROOTHUIS, 2009).

Por outro lado, amostras de saliva podem facilmente ser recolhidas de equinos, assim como de suínos, os quais podem ser facilmente treinados para aceitar este tipo de tratamento (SCHMIDT et al., 2010).

Métodos de colheita de pelos e penas foram recentemente defendidos como viáveis para avaliação do estresse a longo prazo, demonstrando associações significativas entre a concentração de cortisol em amostras de saliva e de pelos do quadril e cauda de bovinos, bem como entre metabólitos fecais de glicocorticoides e a concentração de cortisol no pelo do pescoço e cauda (MOYA, SCHWARTZKOPF-GENSWEIN e VEIRA, 2013).

No entanto, não existem evidências suficientes para concluir que tais concentrações de glicocorticoides refletem com exatidão os níveis do plasma a longo prazo (SHERIFF et al., 2011). Tal afirmação corrobora os resultados obtidos por

Keckeis et al. (2012) e Taves, Gomez Sanches e Soma (2011); os quais afirmam existir evidências de que a pele por si só produz uma quantidade local de glicocorticoides nos folículos pilosos.

Neste contexto, o monitoramento endócrino através da mensuração de metabólitos nas fezes aparece como uma alternativa na realização de pesquisas baseadas em estudos comportamentais. Como prova disto, devemos considerar os dados endócrino-reprodutivos atualmente disponíveis na literatura relativos a animais de difícil manejo (por exemplo, felinos selvagens), os quais eram até pouco tempo totalmente desconhecidos devido aos perigos e limitações vinculados a contenção física (MORAIS et al., 1996, 2002; MORATO et al., 2004; MOREIRA, 2001).

Segundo Moreira (2001), a caracterização de diferentes eventos reprodutivos em espécies brasileiras ameaçadas de extinção tais como gato do mato pequeno (*Leopardus tigrinus*) e gato maracajá (*Leopardus wiedii*) são excelentes exemplos da praticidade dessa metodologia em casos extremos.

Entre as perspectivas do quanto a dosagem de glicocorticoides fecais pode auxiliar no estudo dos animais domésticos estão a comparação de diferentes sistemas de manejo, o estresse térmico induzido por diferentes instalações, meios de transporte, provas de enduro em equinos, monitoramento de tratamentos e evolução de casos clínicos, avaliação do comportamento social de diferentes raças, entre outros (PEREIRA, 2007).

Além disso, nas fezes há uma grande quantidade de hormônios esteroides, como por exemplo, os andrógenos, estrógenos e progestágenos; além de glicocorticoides como corticosteroides, cortisol e dehidroepiandrosterona e mineralocorticoides (WASSER, HUNT e CLARKE, 2002).

Aplicações reprodutivas envolvendo a análise de andrógenos, estrógenos e progestinas urinários e/ou fecais juntamente com observações comportamentais são abundantes quando se trata de estudos realizados por pesquisadores brasileiros (PEREIRA, 2007).

Os produtos metabólicos destes esteroides sexuais podem fornecer dados fundamentais como diagnóstico de gestação, caracterização de ciclos estrais e períodos gestacionais normais, determinação do momento do parto, investigação de anormalidades dos ciclos reprodutivos, detecção de ovulação, eficiência de métodos contraceptivos, sazonalidade reprodutiva, correlações entre reprodução e

comportamento social (PETER, KASPUTIN e CRISTER, 1996, SCHWARZENBERGER et al., 1996).

A amostragem fecal, ao contrário da sanguínea representa níveis de metabólitos hormonais de períodos longos, conseqüentemente refletindo o mínimo de oscilações (BROWN e WILDT, 1997), o que corrobora os resultados de Palme (2012), que afirma que em amostras fecais os níveis de circulação hormonal estão integrados sobre um certo período de tempo e representam uma secreção cumulativa de hormônios, sendo menos afetados por pequenas flutuações ou pulsações naturais da secreção hormonal.

Tais afirmações apenas reforçam a flexibilidade que a dosagem de esteroides fecais concede a investigação de processos endócrino-comportamentais, uma vez que dificuldades como tamanho e comportamento do animal, número de amostras sanguíneas necessárias ou influência da manipulação excessiva nos níveis plasmáticos de cortisol, podem ser superadas sem prejuízos na qualidade do experimento (PEREIRA, 2007).

Neste sentido, verifica-se a importância da endocrinologia do estresse não invasiva, a qual é um avanço metodológico recente ao campo da fisiologia de conservação, permitindo a quantificação de hormônios do estresse a partir de métodos com o mínimo perturbação (NARAYAN et al., 2012).

4.4 Técnicas analíticas para avaliação hormonal

As principais técnicas de avaliação hormonal consistem em testes de ensaios imunoenzimáticos (EIA) e radioimunoensaio (RIA) (HARPER e AUSTAD, 2000; DEHNHARD et al., 2003), bem como de análises através de cromatografia líquida de alta pressão ou cromatografia gasosa (PEREIRA, 2007).

Apesar destas técnicas possuem alta capacidade de mensurar pequenas doses de hormônios presentes nas amostras, apresentando elevada precisão e acurácia em seus resultados na avaliação de diversas espécies, deve-se considerar os equipamentos utilizados e a técnica das pessoas envolvidas durante as análises (MÖSTL, RETTENBACHER e PALME, 2005), principalmente pelo fato de que a análise de RIA, baseia-se em uma técnica de custo elevado e com riscos devido ao contato com material radioativo.

Alguns testes de validação requerem uma infraestrutura laboratorial nem sempre disponível em muitas instituições brasileiras, fato que torna restrito o acesso

a essa tecnologia (PEREIRA, 2007). Além disso, a obtenção adequada da especificidade e sensibilidade do “kit” de dosagem, é totalmente dependente da precisão de pipetagem, controle de temperatura, tempo de incubação e análise dos dados (BROWN, WALKER e STEINMAN, 2004). As condições sob as quais as amostras são armazenadas são de extrema importância (MORROW et al. 2002; MÖSTL, RETTENBACHER e PALME, 2005; LEXEN et al., 2008), recomendando-se que as mesmas sejam colhidas frescas e congeladas imediatamente (<30 min) a -20°C após a defecação (PALME, 2012). O armazenamento em uma caixa de gelo antes de transferi-las para um congelador também pode ajudar a reduzir possíveis efeitos do metabolismo por enzimas bacterianas, sendo necessário manter as amostras congeladas até as análises (PALME, 2012).

Outro obstáculo significativo à realização de trabalhos envolvendo dosagens hormonais é o custo da análise por amostra, principalmente, quando nos referimos a utilização de “kits” comerciais, sugerindo como alternativa a compra de reagentes separados e montagem dos imunoensaios, porém, sem esquecer as dificuldades relacionadas à importação de alguns reagentes, especialmente de anticorpos e conjugados, fato que pode gerar atrasos consideráveis na implantação destas opções (PEREIRA, 2007).

4.5 Interferências na dosagem de hormônios esteroides

São evidentes as facilidades que técnicas de colheitas não invasivas propiciam, principalmente, na obtenção das amostras. Entretanto, o metabolismo e excreção dos hormônios esteroides variam substancialmente entre espécies e, por essa razão, todo monitoramento endócrino não invasivo deve ser previamente validado para cada espécie antes de sua aplicação (PETER, KASPUTIN e CRISTER, 1996; SCHWARZENBERGER et al., 1996).

Alguns estudos relatam que o sexo e o estado reprodutivo podem exercer impacto sobre a secreção de glicocorticoides entre as espécies (BOONSTRA et al., 2001; RUIS et al., 1997; WINGFIELD e FARNER, 1993), assim como diferenças na formulação da dieta, nível de atividade e ritmo circadiano.

Em suínos, foram encontradas médias de concentrações de cortisol basal maiores na saliva de machos do que nas fêmeas. Além disso, após um período de isolamento, a amplitude do ritmo de excreção foi aumentada nos machos, mas manteve-se inalterada em porcas jovens (RUIS et al., 1997).

Em ovinos, a concentração média de ACTH no plasma foi significativamente maior em ovelhas prenhes do que em animais acíclicos, assim como a média de cortisol, a qual foi significativamente maior em ovelhas que estavam ciclando do que em ovelhas não prenhes ou acíclicas. Da mesma forma, ovelhas ovariectomizadas também apresentaram maiores concentrações de cortisol plasmático do que as acíclicas, demonstrando um aumento no ACTH e cortisol basal durante a prenhez em ovinos (BELL et al., 1991).

A velocidade de excreção dos metabólitos hormonais está diretamente relacionada com o tempo de permanência da ingesta no trato gastrointestinal e com a taxa de metabolização, os quais estão relacionados ao tipo de alimento, modo de vida do animal (KLASING, 2005) e espécie, já que o tempo de passagem intestinal é variável (MOBIGLIA, CAMILO e FERNANDES, 2014).

A taxa de excreção dos hormônios esteroides na urina e fezes varia conforme a espécie e o hormônio o qual se espera avaliar, sendo excretado em maior quantidade na urina (cerca de 80%) do que nas fezes (aproximadamente 20%) em primatas, porém em maior quantidade nas fezes quando em felinos. Sendo assim, para uma adequada avaliação é preciso considerar a presença dos esteroides em um ou outro material, ou ambos (GRAHAN e BROWN, 1996; WASSER, HUNT e CLARKE, 2002; MILLSPAUGH e WASHBURN, 2004).

Além disso, a longevidade dos hormônios presentes nas excreções pode ser afetada pelo local de trabalho (temperatura e umidade) e armazenamento (WASSER, HUNT e CLARKE, 2002), bem como pela possibilidade de contaminação do material durante o manuseio.

5 Material e métodos - Organização Geral

O presente projeto é composto por dois experimentos relacionados entre si, nos quais foram determinadas a curva de excreção do cortisol fecal e a estabilidade de seus metabólitos nas fezes ao longo de diferentes períodos de tempo entre as colheitas e análises.

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Biometeorologia e Etologia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, Campus Fernando Costa em Pirassununga – SP, situado à 21°57'12" de latitude sul e 47°27'06" de longitude oeste, à uma altitude média de 605m.

5.1 Análises Laboratoriais

Os mesmos procedimentos analíticos para determinação do cortisol fecal e sanguíneo foram utilizados em ambas as fases experimentais do projeto.

As análises para determinação do cortisol fecal foram realizadas no Laboratório de Fisiologia Animal (FZEA/USP), utilizando-se o kit comercial *Cortisol ELISA* (ADI-900-071, Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA).

As amostras de cortisol sanguíneo foram centrifugadas e, posteriormente, enviadas para laboratório comercial, tendo sua dosagem quantitativa avaliada a partir do método de eletroquimioluminescência.

Todos estes procedimentos foram realizados em conjunto com o Laboratório de Biometeorologia e Etologia, onde foram executadas atividades como determinação da porcentagem de matéria seca, estocagem, centrifugação e preparação das amostras, interpretação e análise geral dos dados.

5.2 Variáveis meteorológicas

Variáveis meteorológicas como temperatura do ar, umidade relativa e temperatura do globo negro, foram registradas a cada 30 minutos durante todo o período de colheita de dados através de um data *logger* (Onset HOBO® temp/RH/2 ext channels) instalado dentro do galpão durante toda fase experimental 1, bem como no local onde os animais permaneceram durante o experimento 2.

5.3 Determinação da matéria seca

Para realização dos cálculos finais de concentração, foram determinados os teores de matéria seca de cada amostra, conforme metodologia descrita pela AOAC (1990).

6. Experimento I – Curva de excreção do cortisol

A fase experimental 1 teve duração de 3 dias, dispostos da seguinte forma (Figura 3):

Figura 3 - Esquema da distribuição do experimento 1.

Fonte: Própria autoria.

6.1 Locais

Os procedimentos de pesagem, seleção e embarque dos animais foram realizados no Biotério de Estudos em Biometeorologia, Etologia e Bem-estar Animal - Unidade Experimental de Comportamento de Ovinos do Laboratório de Biometeorologia e Etologia (FZEA/USP), à 21°58'04" de latitude sul e 47°27'13" de longitude oeste, à uma altitude de 620m.

Posteriormente, os animais foram transferidos para um galpão experimental anexo ao edifício Noé Mazotti (FZEA/USP) e alojados em gaiolas metabólicas individuais e contíguas durante três dias, de forma a permanecerem com contato olfativo e visual, diminuindo o estresse devido à supressão social. As gaiolas eram providas de piso ripado, bebedouro e comedouro, com dimensões de 118x57x70cm. O galpão era construído em alvenaria, com cobertura de telha de barro e comprimento de 17m, largura de 8,5m e altura de pé-direito de 4m.

6.2 Animais

Foram utilizadas seis fêmeas mestiças das raças Dorper x Santa Inês (Figura 4A) provenientes do rebanho do Laboratório de Biometeorologia e Etologia (FZEA/USP), com peso corporal médio de 32,8kg e 6 meses de idade (pré-púberes), a fim de não existirem interações com o balanço endócrino resultante do estado fisiológico.

6.3 Fornecimento de ração

Foi adotado o período de adaptação de dois dias antes da data de colheita, com acesso a água e alimento *ad libitum* (Figura 4B).

A alimentação era constituída por silagem de milho como alimento volumoso, e concentrado composto por milho grão moído (63,10%), farelo de soja (31,10%), calcário (0,80%) e núcleo vitamínico mineral (5,00%). No terceiro dia, uma quantidade pequena de alimento foi fornecida a cada 4 horas, sendo possível realizar a reposição com o mínimo de desperdício, com o intuito de fazer com que os animais se dirigissem à comida o maior número de vezes possível, aumentando a chance de colheita durante a defecação.

Figura 4 - A: Animais selecionados para o projeto; B: Animais se alimentando nas gaiolas metabólicas com bebedouros e comedouros instalados.

Fonte: Própria Autoria.

6.4 Avaliação do comportamento e reatividade na colheita de sangue

Devido a interferência do manejo de embarque e alojamento dos animais, bem como do manuseio para as colheitas de sangue, a avaliação do comportamento

individual foi realizada nos 3 dias de alojamento nas gaiolas, das 13 às 18 horas, tendo duração de 5 horas diárias. Os observadores foram treinados e possuíam conhecimento dos comportamentos próprios da espécie. As variáveis comportamentais de postura e atividades (Figura 5) foram registradas através de observação direta, por rota de amostragem focal e registro instantâneo com intervalo amostral de 5 minutos (MARTIN e BATESON, 1993). Para as demais atividades (Figura 6), todas as ocorrências eram anotadas através de observação direta com rota de amostragem do comportamento e registro contínuo (MARTIN e BATESON, 1993).

Figura 5 - Etograma de trabalho para observação da postura e atividades (5 em 5 minutos).

	Comportamento	Descrição
Postura	Em pé	Apoiado sobre os quatro membros, parado ou em movimento
	Deitado	Decúbito esternal ou lateral
Atividades	Ingerir	Ingestão de alimento no cocho
	Ruminar	Movimento de mastigação sem ingestão
	Ócio	Sem atividade aparente
	Beber	Ingestão de água no bebedouro

Fonte: Adaptado de Paranhos da Costa, M. J. R. e Cromberg, V. U. (1998).

Figura 6 - Etograma de trabalho para observação das demais atividades (contínuo).

	Comportamento	Descrição
Atividades	Estereotipias	Movimentos repetitivos, lambe/morder objetos
	Grooming	Se lambe, mordiscar/coçar
	Vocalização	Som emitido pelo animal (balido)
	Agressão	Agressão a outro animal/baia, cabeçada

Fonte: Adaptado de Paranhos da Costa, M. J. R. e Cromberg, V. U. (1998).

Durante as colheitas de sangue foram atribuídos escores de reatividade para cada animal, a fim de identificar possíveis interações da contenção com os níveis de cortisol obtidos (Figura 7).

Figura 7 - Escores de reatividade atribuídos aos ovinos durante as colheitas de sangue.

Escore	Descrição
1	Animal calmo no momento da contenção
2	Animal se debate no momento da contenção mas logo se acalma
3	Animal continua relutante, necessidade de fazer força para contê-lo

Fonte: Adaptado de Leme, T. M. C. (2013).

6.5 Administração do ACTH e colheita de fezes

No terceiro dia, na hora 0 (07:00h) foi injetado por via intravenosa o hormônio adrenocorticotrófico - ACTH (0,6 UI por kg PV, Porcine ACTH 1-24, Sigma, St. Louis, MO, USA). Uma amostra de fezes de cada animal foi colhida antes da aplicação do ACTH e, posteriormente, todos foram observados continuamente, sendo recolhidas as fezes totais sempre que algum animal defecasse. Como os animais estavam sob observação constante, geralmente, as amostras eram colhidas antes mesmo de entrar em contato com o chão da gaiola. No entanto, foram colocados coletores abaixo do piso onde as fezes poderiam ser recolhidas caso caíssem. Os coletores foram cobertos com pedaços de papel cartão (Figura 8A) a fim de facilitar a limpeza desta estrutura e, dessa forma, toda vez que o animal defecasse, urinasse ou derrubasse água/alimento sobre o papel, o mesmo era imediatamente trocado para evitar qualquer tipo de contaminação. Além disso, a utilização de luvas era obrigatória (Figura 8B), sendo as mesmas trocadas frequentemente, a fim de evitar o contato entre as fezes colhidas.

Figura 8 - Coletor de fezes coberto com papel cartão; B - Utilização de luva durante a colheita.

Fonte: Própria Autoria.

A hora da injeção correspondeu individualmente, para cada animal, a hora 0, e as amostras colhidas foram referenciadas para cada indivíduo e catalogadas de acordo com o horário da defecação. Essa etapa foi realizada durante 24 horas e as amostras de fezes eram imediatamente armazenadas em freezer a temperatura de -20°C , de acordo com procedimento descrito por Palme e Möstl (1997). Tal procedimento possibilitou elaborar para cada animal uma curva de excreção do cortisol fecal, com base num referencial fixo (0 hora) ajustado a um referencial móvel (horário em que cada indivíduo defecou). Sendo assim, as curvas de excreção puderam ser sobrepostas a fim de identificar as equações de regressão que determinassem o início, o pico e o grau de desaparecimento do cortisol fecal.

6.6 Cortisol sanguíneo

Foram colhidas amostras de sangue de cada animal, distribuídas da seguinte forma: uma colheita antes da aplicação do ACTH, e colheitas subsequentes aos 60, 120 e 300 minutos após a mesma, o que serviu como contraprova do valor de cortisol fecal encontrado. O sangue foi recolhido pela veia jugular em tubos secos mantidos em gelo. Logo após a colheita o mesmo era centrifugado a $1500 \times g$, a 4°C , durante 15 minutos, e o soro acondicionado em tubos e estocado a -20°C para posterior análise.

6.7 Análise dos dados

Para análise da curva de excreção do cortisol nas fezes foi inicialmente utilizada a análise descritiva dos dados por mediana e intervalo entre primeiro e terceiro quartil. Foi realizada análise de variância com efeito fixo de horas após a aplicação do ACTH e também correlação de Pearson entre os valores de cortisol sanguíneo e fecal, visando estabelecer as possíveis relações funcionais entre os dois métodos de análise.

Para a análise dos dados de comportamento foram realizadas análises exploratórias com o propósito de caracterizar a forma de distribuição dos dados e as fontes de variação mais relevantes, sendo que a partir destes resultados foi utilizado o modelo ajustado utilizando-se a teoria de modelos lineares generalizados, com o procedimento GLIMMIX do software SAS. Para avaliação das variáveis comportamentais foi realizada a transformação de escala dos dados para “arco-seno raiz de porcentagem”, procedendo-se à análise de variância. O modelo estatístico contemplou os efeitos de dia (1, 2 e 3) com análise individual por animal, com o procedimento para comparações múltiplas com as médias transformadas pelo teste F e teste t (PDIFF).

Foi analisado o efeito da reatividade durante a colheita de sangue nas dosagens de cortisol sanguíneo por variância e correlação de Pearson. Na análise do cortisol sanguíneo durante o experimento 1 utilizou-se os tempos como efeito fixo (0, 60, 120 e 300 minutos) e comparação de médias por PDIFF.

Todas as análises foram realizadas com auxílio do programa *Statistical Analysis System*®, versão 9.2 (SAS, 2008), a 5% de significância.

6.8 Resultados

6.8.1 Variáveis Meteorológicas

As médias das variáveis meteorológicas registradas durante o período experimental 1 encontram-se na tabela 1.

Tabela 1 - Valores médios, máximos e mínimos das variáveis meteorológicas registradas no galpão durante o experimento 1.

Dias	Tar ¹ (°C)			UR ² (%)			Tgn ³ (°C)		
	Média	Máx	Mín	Média	Máx	Mín	Média	Máx	Mín
1	26,7	35,6	17,9	47,3	73,9	24,6	26,7	36,6	17,4
2	24,7	32,9	16,6	57,9	83	35,9	25,0	33,9	16,5
3	24,3	33,2	16,6	55,7	80,3	28,1	24,5	34,3	16,3

¹ Temperatura do ar, ² Umidade Relativa, ³ Temperatura de Globo Negro.

Maiores médias de temperatura do ar e temperatura do globo negro foram registradas no primeiro dia, exceto para a umidade relativa, a qual apresentou médias mais elevadas nos dias 2 e 3. Da mesma forma, em relação as variáveis de temperatura do ar e temperatura do globo negro, os dias 2 e 3 também mantiveram médias semelhantes.

A temperatura de conforto térmico para ovinos deve situar-se entre 15 e 30°C, sendo a temperatura efetiva crítica superior a 34°C (FUQUAY, 1981) e umidade relativa ideal com valores entre 60 e 70% (MCDOWEL, 1972).

A média da temperatura de globo negro variou de 24,5 a 26,7°C, valores estes considerados ótimos segundo a classificação de Mota (2001), o qual sugere que temperaturas críticas de globo negro se dão acima de 35°C.

Neste sentido, a caracterização do ambiente térmico no galpão demonstrou uma situação de conforto para os animais. As variáveis se mantiveram dentro dos padrões estabelecidos para o bom desenvolvimento dos ovinos, com médias de temperatura do ar entre 24 e 26°C, bem como índices médios de umidade relativa próximos ao ideal, entre 47 e 58%.

6.8.2 Avaliação do comportamento

As frequências dos comportamentos de ingestão, ruminação e ócio não diferiram estatisticamente entre as datas para a maioria dos animais ($P>0,05$). Em contrapartida, em relação ao comportamento deitado, foram observadas diferenças significativas ($P<0,05$) em todos os animais durante o período de avaliação.

Em relação ao comportamento ingerir, apesar de não terem sido observadas diferenças significativas entre todos animais, verifica-se um aumento acentuado nas frequências do primeiro para o segundo dia (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Distribuição média observada da ocorrência do comportamento ingerir durante os três dias de avaliação.

Da mesma forma, o tempo dispendido com a ruminação, em geral, foi menor durante todo o período de adaptação, porém, um aumento na ocorrência destes comportamentos foi observado ao terceiro dia (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Distribuição média observada da ocorrência do comportamento ruminar durante os três dias de avaliação.

O comportamento de ócio apresentou uma tendência decrescente do primeiro para o segundo dia, com aumento no terceiro dia (Gráfico 3). As frequências do comportamento deitado diferiram entre si durante todos os dias de alojamento (Gráfico 4), apresentando uma tendência crescente.

Gráfico 3 - Distribuição média observada da ocorrência do comportamento ócio durante os três dias de avaliação.

Gráfico 4 - Distribuição média observada da ocorrência do comportamento deitado durante os três dias de avaliação.

Os animais são capazes de ajustar comportamentos em função das condições as quais são submetidos, sendo a ingestão de alimentos/água, ruminação, postura e

atividades, critérios importantes a serem avaliados quanto se trata do estudo de indicadores relacionados ao bem-estar.

Como a maioria dos herbívoros, os ruminantes passam de 3 a 12 horas por dia ingerindo a quantidade de alimento necessário para manutenção de suas funções vitais (DULPHY e FAVERDIN, 1987). As diferenças nas frequências entre os animais dentro de um mesmo dia podem ser explicadas pela individualidade na duração e repetição destas atividades, o que pode estar relacionado com o apetite e diferenças anatômicas (DULPHY e FAVERDIN, 1987; DESWYSEN, DUTTILEUL e ELLIS, 1989; DESWYSEN et al., 1993), assim como diferenças na composição e qualidade dos alimentos ofertados.

No presente experimento, as variações observadas entre os animais nas frequências de ingestão e ruminação pareceram estar associadas à individualidade comportamental.

O aumento na ingestão de alimento demonstra uma melhor condição de adaptabilidade do animal ao ambiente, bem como reflete na ocorrência da atividade de ruminação, a qual também é ritmada pela ingestão, realizada quando o animal está tranquilo (POLLI et al., 1996; MURPHY et al., 1983).

As oscilações observadas em relação ao comportamento ingerir podem ser explicadas pelo fato de que o número e a duração das refeições são mais variáveis que os períodos de ruminação, visto que, depois de uma grande refeição, a ruminação começa após um período de inatividade, com duração altamente variável (15 a 50 min) (DULPHY e FAVERDIN, 1987).

O tempo de ruminação pode variar de 4 a 9 horas, sendo dividido em períodos com duração de poucos minutos a uma hora ou mais (FRASER e BROOM, 1990). Do tempo diário em que ocorre a ruminação, a literatura mostra que 63% a 83% destas ocorrências ocorrem na posição deitada (HAFEZ e BOUISSOU, 1975). A maioria dos ruminantes passa mais de 50% do dia descansando e ruminando (AMARAL et al., 2009) e, a atividade de ruminação com o animal deitado demonstra uma melhor condição de conforto e bem-estar (RASLAN, 2008; BERNABUCCI et al., 2009).

O período em que os animais não estão comendo, ruminando ou ingerindo água, é definido como ócio (COSTA, MESQUITA e JUNQUEIRA FILHO, 1983; SHULTZ, 1983). O tempo de ócio está diretamente relacionado com o tempo de alimentação e disponibilidade de alimento (WILSON, 1961), o que justifica a

diminuição da frequência desta variável junto ao aumento na ocorrência das atividades de ingestão e ruminação.

Não foram observadas diferenças estatísticas ($P > 0,05$) para os demais comportamentos analisados (beber, *grooming*, agressão e estereotípias), exceto para vocalização ($P < 0,05$). Tais resultados corroboram os apresentados por LEME (2009), a qual avaliando o comportamento de ovinos confinados, verificou diferenças significativas nas variáveis de postura e comportamentos de ingerir, ruminar e ócio, porém, atividades de agressão (cabeçada, empurrar, apanhar), *grooming* e beber água, também não foram consideradas por apresentarem frequências abaixo de 5%.

A ocorrência do comportamento de vocalização está apresentada na tabela 2.

Tabela 2 - Número de eventos (eventos.hora⁻¹) do comportamento de vocalização observado nos ovinos durante os dias de adaptação (1º e 2º dia) e colheita (3º dia).

Animal	1º dia	2º dia	3º dia
73	1,63 ^a	0,00	0,18 ^a
78	12,54 ^a	2,72 ^b	0,18 ^b
80	4,09 ^a	0,90 ^b	0,63 ^b
82	6,27 ^a	0,27 ^b	2,27 ^b
86	1,81 ^a	0,91 ^a	0,72 ^a
94	1,18 ^a	0,00	0,27 ^a

*Valores seguidos por letras iguais não diferem estatisticamente entre si ($P > 0,05$), nas linhas.

* EPM: 1,1047.

Em relação à vocalização, no geral, verifica-se uma diminuição na ocorrência deste comportamento com o passar dos dias (Tabela 2).

Bench et al. (2001) e McGary, Estevez e Russek-Cohen (2003), após estudo com carneiros jovens, concluíram que estes exibem um comportamento relatado como "ansiedade da separação", com atitudes mais agressivas e vocalização excessiva gerada pela separação dos companheiros pertencentes ao seu grupo de convívio.

A experiência prévia dos animais também pode influenciar nas respostas frente ao manejo e mudança de ambiente. Segundo Beausoleil et al. (2012), ovelhas mais reativas apresentam maiores frequências de vocalização de alta intensidade, independentemente do estímulo. Viérin e Bouissou (2003), avaliando ovinos da raça

Romanov e Ile de France, observaram que cordeiros aos cinco e seis meses de idade apresentaram menores níveis de medo quando comparados aos mais jovens. Da mesma forma, Barbosa Silveira, Fischer e Mendonça (2010), ao avaliar a reatividade de borregas e ovelhas das raças Corriedale, Texel, Suffolk, Ideal e mestiços, verificaram que o percentual de animais reativos diminuiu conforme a idade aumentou, o que remete à experiência já vivida pelo animal.

Desta forma, os maiores valores observados no primeiro dia podem ter ocorrido devido à mudança de ambiente e separação dos animais, contudo, a posterior diminuição das frequências indica a possibilidade de uma melhor adaptação e conforto em relação ao local.

Além disso, comportamentos de agressividade foram verificados em trabalhos com diferentes grupos de cordeiros nas baias (VAN, THI MUI e LEDIN, 2007), no entanto, no caso deste estudo os animais foram alojados em baias individuais e, por já pertencerem ao mesmo lote desde nascidos, é possível que as interações agonísticas entre eles tenham sido minimizadas.

A manifestação de comportamentos anômalos ou estereotipados é comum quando se trata de animais em confinamento, visto que para os ovinos, o isolamento do rebanho é um fator muito estressante (NIEZGODA et al., 1987). No entanto, em relação ao presente estudo, a ausência significativa deste tipo de atividade pode ser explicada pelo fato de que os animais permaneceram alojados nas gaiolas durante um curto período de tempo.

Neste contexto, as frequências observadas nos comportamentos de ingerir, ruminar, ócio, deitado e vocalização, refletiram uma boa condição de adaptabilidade do animal ao ambiente no terceiro dia de alojamento nas gaiolas.

6.8.3 Reatividade na colheita de sangue

A reatividade dos animais foi determinada no momento das colheitas de sangue, a fim de detectar possíveis interferências deste manejo com os resultados obtidos. Os dados são apresentados no gráfico 5.

Gráfico 5 - Escore de reatividade médio observado durante a contenção para colheita de sangue.

* Aplicação do ACTH.

A correlação entre os escores médios de reatividade e os valores de cortisol sanguíneo foi negativa ($r = -0,14$), indicando que, neste caso, o manejo de contenção não gerou estresse adicional significativo em nenhum dos horários.

A ausência de efeito entre a reatividade e o cortisol ($P > 0,05$), neste experimento, foi importante pois elimina possíveis confundimentos entre o estresse advindo da aplicação do ACTH e possíveis interações com o estresse causado pelo manejo.

Estudos conduzidos por Morrow et al. (2002) observaram que os níveis de cortisol de vacas avaliadas após a aplicação de ACTH retornaram aos níveis basais somente após o término da monitoração do cortisol no sangue, evidenciando a possível ocorrência de estresse adicional devido ao manejo de colheita.

Por outro lado, Palme et al. (1999) observaram médias de cortisol plasmático nas faixas mais baixas de valores reportados em bovinos e ovinos durante colheitas realizadas antes da aplicação do ACTH. No entanto, segundo o autor, tal fato pode ter ocorrido devido a especificidade do ensaio imunoenzimático utilizado, bem como pela colheita através de catéteres permanentes, aos quais os animais foram previamente acostumados dias antes do experimento.

Hargreaves e Hutson (1990) também sugeriram menores influências da obtenção de amostras sanguíneas através da utilização de catéteres, em relação a venopunção e contenção contínua, porém, reações de alarme em relação ao procedimento de amostragem foram refletidas através da elevação dos hematócritos e cortisol plasmático.

Ovinos são animais reativos e a aproximação humana pode desencadear uma ação de fuga ou defesa, refletindo um sentimento de ameaça por parte do animal e, consequentemente, causando o estresse.

Hargreaves e Hutson (1990) avaliando ovinos perante diferentes tipos de manejo de rotina, verificaram efeitos significativos dos tratamentos em relação ao cortisol plasmático. O mesmo foi observado por Hutson (1985) e Rushen (1986), que também ressaltam que a manipulação rotineira pode ser considerada de caráter aversivo para os animais envolvidos.

Os resultados obtidos neste estudo podem ser explicados pelo fato dos animais já estarem habituados às pessoas que executaram as atividades de contenção e colheita, visto que os mesmos são manejados com frequência desde o nascimento.

Todavia, tal observação não pode ser compreendida de forma genérica, em razão de que ocorrem variações de animal para animal, os quais podem apresentar respostas diferentes em relação ao mesmo estímulo estressor, relacionadas com as experiências prévias de cada indivíduo.

6.8.4 Cortisol sanguíneo

Os valores médios do cortisol sanguíneo nos diferentes horários de colheita antes e após a aplicação do ACTH estão apresentados no gráfico 6.

Gráfico 6 - Concentração média de cortisol sanguíneo observada nos diferentes horários antes e após a aplicação do ACTH*.

* Aplicação do ACTH.

O gráfico 7 representa a distribuição dos valores de cortisol sanguíneo nos animais induzidos ao estresse por ACTH.

Gráfico 7 - Distribuição das concentrações de cortisol sanguíneo verificadas nos diferentes horários antes e após a aplicação do ACTH*.

* Aplicação do ACTH.

Observa-se maior concentração média de cortisol 60 minutos após a aplicação do ACTH ($15,25 \text{ ng.mL}^{-1}$), que apresentou uma tendência decrescente, seguida dos valores aos 120 ($6,91 \text{ ng.mL}^{-1}$) e 300 minutos ($2,04 \text{ ng.mL}^{-1}$), quando os animais já apresentavam níveis considerados normais para ovinos sem estresse.

O cortisol sanguíneo tem sido utilizado como base para determinação dos diferentes mecanismos envolvidos na resposta ao estresse (ALAM, DOBSON e FITZPATRICK, 1986).

A concentração média de cortisol sérico em ovinos encontra-se entre 6 e 14 ng.mL^{-1} (ENCARNAÇÃO, 1989), podendo apresentar níveis mais baixos, entre 1,1 e $3,7 \text{ ng.mL}^{-1}$, os quais, segundo Silva, Kaltenbach e Dunn (1983) são considerados normais.

Segundo Grandin (1994) esses valores podem dobrar ou quadruplicar quando em situações de estresse extremo, o que corrobora os dados de Hargreaves e Hutson (1990) e Minton, Apple e Parsons (1995), os quais encontraram valores médios de 20 ng.mL^{-1} ao dosar as concentrações de cortisol em ovinos sem imposição de nenhum tipo de estresse. Da mesma forma, ao utilizar a tosquia como agente estressor, Hargreaves e Hutson (1990) observaram picos de cortisol de $72,7 \text{ ng.mL}^{-1}$.

Testes realizados a partir da aplicação de ACTH via endovenosa estão sendo aplicados a fim de estudar os mecanismos endócrinos decorrentes do estresse fisiológico, mensurando a habilidade dos animais em suportar diferentes situações estressantes impostas ao longo de sua vida produtiva (FULKERSON e JAMIESON, 1982; NEGRÃO et al., 2004; DELGADO, 2008).

Entretanto, a semelhança no padrão de liberação de cortisol após a administração de ACTH oferece a possibilidade de definir somente reações de estresse agudo (FULKERSON e JAMIESON, 1982), uma vez que níveis de glicocorticoides em fluidos corporais podem voltar ao normal ou quase normal quando um estressor não persiste (REHBINDER e HAU, 2006).

Gaiato, Delgado e Negrão (2008) usando aplicação de 0,6 UI de ACTH por quilograma de peso vivo em cabras da raça Saanen, verificaram que no tempo -30 (30 minutos antes da aplicação) e no tempo 0 (momento da aplicação), os animais apresentavam níveis basais similares de cortisol sanguíneo, observando um aumento aos 60 minutos, que se manteve aos 120 minutos, retornando aos níveis basais após 300 minutos da aplicação.

Resultados semelhantes foram observados por Stradiotto (2012) que aponta

um aumento significativo das concentrações de cortisol plasmático após a aplicação do ACTH em ovelhas da raça Santa Inês, quando comparadas aos valores basais de -20 e 0 minutos, demonstrando valores máximos no tempo de 60 minutos, com queda acentuada aos 120 minutos após a indução do estresse e redução aos níveis basais após 300 minutos.

Em outras condições, Bobek et al. (1986) observaram que ovelhas separadas do rebanho também tiveram suas taxas de cortisol sanguíneo elevadas após 60 minutos, assim como uma diminuição destes níveis após 5 horas de isolamento. Kent, Molony e Robertson (1993) verificaram que o pico de cortisol ocorreu entre 84 a 138 minutos em cordeiros submetidos a castração e caudectomia, o que corrobora o descrito por Peers et al. (2002), que registraram picos de cortisol sérico 80 minutos após procedimentos de caudectomia cirúrgica e com anel de borracha em cordeiros de idades distintas.

Tais variações corroboram resultados de Grandin (1997) que relata que os níveis de cortisol em situação de estresse se apresentam de forma variável, e que comparações absolutas não devem ser feitas entre estudos.

Desta maneira, os resultados de concentração de cortisol sanguíneo encontrados no presente estudo são corroborados pela literatura citada (BOBEK et al. 1986; GRANDIN, 1997; KENT e MOLONY e ROBERTSON, 1993; PEERS et al. 2002; GAIATO, DELGADO E NEGRÃO, 2008; STRADIOTTO, 2012).

A alteração de níveis séricos de cortisol é de caráter individual (ALAM, DOBSON e FITZPATRICK, 1986), refletindo diferenças relacionadas ao próprio metabolismo, bem como memórias e experiências prévias de cada animal (COOK, 1995).

Estudos conduzidos por Palme et al. (1999) ressaltaram variações entre os animais tanto em relação aos valores basais, quanto aos valores de pico de cortisol plasmático após a administração do ACTH, com níveis basais variando de 0,4 a 7,3 ng.ml⁻¹ em vacas e 0,6 a 6,5 ng.ml⁻¹ em ovinos; bem como variações de pico entre todos os animais.

Alam, Dobson e Fitzpatrick (1986) ao estudar diferentes doses de ACTH frente à estimulação de respostas endócrinas, também constataram variações entre os animais. Da mesma forma, Stradiotto (2012), demonstrou que aproximadamente 90% das ovelhas desafiadas com ACTH tiveram liberações medianas de cortisol, enquanto o restante apresentou valores de cortisol maiores ou menores.

Neste contexto, em relação ao presente estudo, pode-se observar grandes variações individuais frente à aplicação do ACTH, com valores máximos aos 60 minutos, seguindo padrões de excreção condizentes com a literatura.

6.8.5 Curva de excreção do cortisol fecal

As concentrações de cortisol fecal para cada horário, durante 24 horas, estão representadas no gráfico 8.

Gráfico 8 - Boxplot * de concentrações agrupadas de cortisol fecal encontradas antes e após a aplicação do ACTH (**).

* Gráficos Boxplot demonstram as medianas, o primeiro e terceiro quartil (25% e 75%), bem como os extremos (valor mais alto e mais baixo observado).

** Aplicação do ACTH

*** Pico de cortisol sanguíneo.

Os valores para os tempos 08, 11, 02 e 04 não foram incluídos devido ao número insuficiente de amostras para análise, visto que as fezes eram colhidas durante a defecação espontânea dos animais.

Valores mais altos da mediana de concentração do cortisol fecal puderam ser observados entre as 11 e 12 horas após o pico de cortisol sanguíneo (tempos 19 e 20 horas do dia, respectivamente), o qual ocorreu 60 minutos após a administração do ACTH, realizada no tempo 7 (basal).

Apesar do valor de mediana para o horário das 22 horas ser próximo ao observado às 19 e 20 horas, a distribuição dos dados ocorre de forma assimétrica, demonstrando uma maior quantidade de dados com valores abaixo da tendência central apresentada.

Desta forma, no período de 11 a 12 horas (tempos 19 e 20 horas) após o pico de cortisol sanguíneo, verifica-se uma maior simetria e homogeneidade nos dados, confirmando que os animais demonstraram padrões de excreção mais semelhantes.

Além disso, apesar das oscilações dos valores de cortisol fecal dentro do período de 24 horas de avaliação, não foram verificadas diminuições significativas nas concentrações que indicassem o retorno aos níveis basais ($P > 0,05$), apesar das medianas observadas nos horários das 18 e 23 horas.

Tais resultados corroboram os de Palme et al. (1999) que verificaram concentrações superiores de metabólitos fecais de bovinos e ovinos aproximadamente 10 horas (6 a 18,7 horas) após o pico de cortisol plasmático, retornando aos níveis basais entre 18 e 44 horas.

As correlações entre o pico de cortisol sanguíneo e os valores de cortisol fecal às 6, 8, 10 e 12 horas após o pico de cortisol sérico estão apresentadas na tabela 3.

Tabela 3 - Correlações entre o pico de cortisol sanguíneo e valores de cortisol fecal encontrados às 6, 8, 10 e 12 horas após o pico de cortisol sérico.

	CS (60m)	CF (6h)	CF (8h)	CF (10h)	CF (12h)
CS (60m)	1	- 0,31058	0,433218	0,500191	0,422496
CF (6h)		1	- 0,00356	0,263069	0,522778
CF (8h)			1	0,949461	0,877731
CF (10h)				1	0,776014
CF (12h)					1

* CS: cortisol sanguíneo; CF: cortisol fecal.

Verifica-se uma alta correlação entre a concentração de cortisol fecal e sanguíneo 10 horas após o pico de cortisol sérico ($r = 0,50$), seguida de correlações muito próximas às 8 ($r = 0,43$) e 12 horas ($r = 0,42$), horários correspondentes às 16, 18 e 20 horas do dia; respectivamente.

Da mesma forma, maiores correlações puderam ser observadas dentro deste intervalo, sendo $r=0,87$ (8 e 12 horas), $r=0,94$ (8 e 10 horas) e $r=0,77$ (10 e 12 horas).

Estudos conduzidos com vacas leiteiras recebendo ACTH sintético através de cateter, relataram que os glicocorticoides de metabólitos fecais começaram a apresentar aumentos significativos 8 horas após a infusão do ACTH, apresentando picos entre as 14 e 18 horas, e permanecendo com valores elevados durante 16 horas (11,9 a 18,5 horas) (MORROW et al., 2002). Em experimento anexo, Morrow et al. (2002) também verificaram o efeito do transporte sobre a concentração de metabólitos de cortisol nas fezes às 6, 24 e 30 horas depois, observando um aumento significativo nos valores às 6 horas, retornando aos níveis basais 24 horas após o transporte.

Palme et al. (2000) em estudo semelhante, constataram que o transporte é capaz de elevar a concentração de metabólitos de cortisol nas fezes de bovinos, observando picos de excreção após 12 horas, os quais retornaram aos níveis basais após 26 a 48 horas.

Variações significativas entre as respostas individuais para os níveis de metabólitos de cortisol fecal, assim como para o cortisol no sangue foram descritas por Palme et al. (1999).

Segundo Möstl e Palme (2002), concentrações de metabólitos de cortisol encontrado nas fezes após a infusão de cortisol foram diferentes entre várias espécies, obtendo-se picos entre 12 horas em ovelhas, 24 horas em pôneis e 48 horas em suínos.

O intervalo entre o aumento de glicocorticoides no sangue e seu reflexo nas fezes está relacionado ao tempo de passagem intestinal (PALME, MÖSTL, 1996), o qual é influenciado pelo indivíduo e demais fatores como, por exemplo, o tipo de dieta e a ingestão de alimento (DANTZER et al., 2011).

Dantzer et al. (2011) ressaltaram que a ocorrência de variações na dieta pode afetar a recuperação dos metabólitos em decorrência do estresse pela baixa disponibilidade de alimentos, alterações no consumo de fibras, entre outros. O maior consumo de fibra aumenta a excreção de metabólitos fecais de esteroides (GOLDIN et al., 1982; PUSATERI et al., 1990; DANTZER et al., 2011), o que pode ser atribuído

ao aumento do tempo de transição de materiais ingeridos, desde o duodeno até ao reto. Isso se dá pelo fato de que hormônios não ligados ao plasma são metabolizados pelo fígado e excretados para o intestino através dos canais biliares (TAYLOR, 1971), e alguns destes metabolitos são reabsorvidos via circulação entero-hepática (MACDONALD, 1983; TAYLOR, 1971). Desta forma, presume-se que um aumento na frequência de defecação, devido ao aumento do consumo de fibras dietéticas pode diminuir a reabsorção de metabolitos no intestino delgado e, portanto, causar um aumento na excreção de metabolitos fecais de esteroides (GOLDIN et al. 1982).

Por outro lado, El-Bahr e Albokhadaim (2014), verificou que as bactérias presentes no intestino são capazes de alterar a estrutura destes esteroides, revelando um metabolismo rápido. Desta forma, assim como a flora fecal é capaz de metabolizar esteroides nas fezes de humanos e de ratos (CERONE MCLERNON et al., 1981), a mesma pode estar relacionada ao decréscimo observado no cortisol e corticosterona em fezes de ruminantes (EL-BAHR e ALBOKHADAIM, 2014). Tais resultados discordam daqueles encontrados por Miller, Hoobs e Souza (1991), que descrevem que elevados níveis de cortisol fecal puderam ser mensurados em carneiros selvagens durante situações de estresse.

Além disso, vários mecanismos são responsáveis pela variação genética do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (MORMÈDE et al., 2007). A resposta adrenal ao ACTH é uma característica individual e hereditária (HENNESSY et al., 1988; ZHANG, HENNESSY e CRANWELL, 1990; ZHANG et al., 1992), a qual pode influenciar a biodisponibilidade de hormônios corticosteroides (MORMÈDE et al., 2007).

Segundo Mormède et al. (2007), as variações individuais também podem surgir a partir de influências ambientais. Mudanças nas respostas do eixo HPA foram encontradas em suínos após o estresse pré-natal de contenção (TUCHSCHER et al., 2002), repetidas exposições ao ruído (OTTEN et al., 2004; KANITZ, OTTEN e TUCHSCHERER, 2005), isolamento social durante os primeiros 10 dias de vida (KANITZ et al., 2004; TUCHSCHERER et al. 2004) ou a manipulação neonatal (WEAVER et al., 2000), sendo necessários mais estudos para validar estes resultados em outras espécies de animais de exploração (MORMÈDE, 2007).

À luz de uma visão geral, e salvaguardadas as variações individuais, os resultados do presente experimento são respaldados pela literatura citada (PALME et al., 1999; PALME et al. 2000; MORROW et al. 2002; MÖSTL e PALME, 2002).

6.8.6 Conclusões

A variação individual observada no padrão de excreção do cortisol fecal dificulta a determinação de respostas concretas frente a uma situação de estresse agudo.

A quantificação do cortisol sanguíneo apresentou variações acentuadas entre os animais, porém, menores que as observadas nas amostras fecais, não justificando a substituição de metodologia proposta.

7 Experimento II – Estabilidade do cortisol nas fezes

A fase experimental 2 foi iniciada logo após o término das análises da primeira etapa do projeto, sendo possível tomar como base os resultados obtidos anteriormente.

7.1 Locais e animais

Foram utilizados 9 cordeiros mestiços (Dorper x Santa Inês), com peso médio de 35 kg e 6 meses de idade, provenientes do confinamento da Unidade Experimental de Comportamento de Ovinos do Laboratório de Biometeorologia e Etologia (FZEA/USP).

7.2 Estresse térmico e colheita de fezes

Os animais foram submetidos a uma situação de estresse térmico, permanecendo em piquetes desprovidos de qualquer tipo de estrutura natural/artificial que fornecesse sombra durante os horários mais quentes do dia, entre 11:00 e 15:00 horas (Figura 9).

Figura 9 - Animais nos piquetes.

Fonte: Própria autoria.

A partir da análise das variáveis meteorológicas registradas, foram verificadas temperaturas mais elevadas às 12:00, 13:00 e 14 horas (31,4°C; 32,0°C; 31,8°C; respectivamente), cujas médias serviram como referencial para a realização da colheita de fezes, a qual se deu às 23:00 horas do mesmo dia. As fezes foram colhidas diretamente do reto do animal e dentro das próprias baias, por equipes previamente estabelecidas, a fim realizar todas as colheitas ao mesmo tempo, com a mínima variação de tempo possível.

7.3 Cortisol sanguíneo, frequência respiratória e temperatura retal

Além de colheitas de sangue, foram aferidas as frequências respiratórias e a temperatura retal dos animais antes e depois de serem submetidos ao estresse térmico. As primeiras medidas foram realizadas no interior das baias, sendo a frequência respiratória obtida antes de qualquer uma das demais colheitas, seguida da mensuração da temperatura retal e colheita de sangue. Após o período de exposição ao sol, os animais foram levados ao curral de manejo, onde as medidas foram realizadas novamente, antes que os mesmos voltassem para o confinamento.

A frequência respiratória foi registrada com auxílio de um cronômetro, através da contagem dos movimentos laterais do flanco por minuto (mov.min^{-1}). As medidas de temperatura retal foram registradas com uso de termômetro clínico digital, e as colheitas de sangue para quantificação do cortisol sérico realizadas através da punção

venosa da jugular, seguindo os mesmos procedimentos de colheita e análise realizados no experimento 1.

7.4 Preparação das amostras e tratamentos

Imediatamente após a colheita, as fezes foram agrupadas em três grupos (cada um contendo fezes de três animais distintos), os quais foram homogeneizados com auxílio de um gral e pistilo de porcelana (Figura 10A), a fim de gerar amostras compostas. Foram obtidos três *pools* amostrais, divididos em A, B e C; de onde retiraram-se alíquotas referentes aos tratamentos. As amostras fecais eram pesadas (1g de fezes por amostra) (Figura 10B) e colocadas em tubos de ensaio numerados, nos quais foram adicionados 200µl de solução de cortisol padrão por amostra (20.000 pg.ml⁻¹), exceto em uma das amostras do grupo controle de cada *pool* (controle sem cortisol).

Figura 10 - A: Fezes maceradas com auxílio de gral e pistilo; B: Pesagem das amostras em balança analítica

Fonte: Própria autoria.

Após a adição do cortisol (Figura 11A), os tubos foram congelados e, imediatamente após o descongelamento, as amostras do grupo controle (T0) foram analisadas. O restante das amostras foi submetido aos tratamentos térmicos no Laboratório Multiusuário de Saúde Animal e Segurança Alimentar (FZEA/ZMV), através da utilização de câmara incubadora (MA 415 – Marconi, Piracicaba, SP, BR), onde foram expostas a três temperaturas diferentes: 15°C, 25°C e 35°C, permanecendo em cada temperatura durante quatro tempos: 1 hora (T1), 3 horas (T3),

6 horas (T6) e 12 horas (T12) (Figura 11B), períodos após os quais foram analisadas de acordo com o mesmo procedimento das demais (Figura 12).

Figura 11 - A: Adição de solução padrão de cortisol; B: Amostras submetidas aos tratamentos dentro da incubadora.

Fonte: Própria autoria.

Figura 12 - Esquema para determinação da estabilidade do cortisol fecal.

Fonte: Própria Autoria.

7.5 Protocolo de extração para determinação do cortisol fecal

Com o intuito de melhorar a eficiência da extração, os procedimentos para extração foram baseados no protocolo recomendado pelo fabricante, sendo anteriormente determinadas a quantidade de fezes por amostra (gramas por amostra), o tempo de centrifugação e a quantidade de éter dietílico para diluição.

Um grama de fezes por amostra foi separado em tubo de ensaio limpo e diluído em 3ml de éter dietílico (Dinâmica Química Contemporânea, Diadema, SP, BR). Os tubos foram agitados em vórtex durante 60 segundos e centrifugados a 3.500 r.p.m. (Figura 13A) durante 30 minutos a temperatura de 20°C. O sobrenadante de cada amostra foi transferido para um tubo limpo (Figura 13B) e submetido à evaporação com nitrogênio por aproximadamente 2 minutos (Figura 14A). Após a evaporação total do solvente (éter dietílico), adicionou-se 100µl de solução padrão (80-0010, Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA) em cada tubo, agitando novamente em vórtex durante 60 segundos. Após a agitação, as amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 5 minutos e repetia-se a adição de solução padrão e a agitação em vórtex por mais duas vezes. O sobrenadante de cada amostra era transferido para as placas para dosagem quantitativa do cortisol (Figura 14B). A curva padrão foi determinada utilizando-se 7 pontos com as concentrações variando de 0.0156 a 0.001 µg dl⁻¹, utilizando-se comprimento de onda para leitura de 405nm, com sensibilidade de 0.005672 µg dl⁻¹.

Figura 13 - A: Amostras centrifugadas por 30 minutos; B: Transferência do sobrenadante para tubo limpo.

Fonte: Própria autoria.

Figura 14 - A: Evaporação do reagente com Nitrogênio; B: Montagem da placa para dosagem do cortisol fecal (ELISA).

Fonte: Própria autoria.

7.6 Análise dos dados

Para análise da estabilidade de cortisol fecal foi utilizada uma ANOVA multifatorial com dois fatores, temperatura (15°C, 25°C, 35°C) e intervalo de tempo (1, 3, 5, 12 horas) e sua interação. Durante a exposição ao sol, para os parâmetros cortisol sanguíneo, frequência respiratória e temperatura retal, comparou-se os tempos antes e depois do estresse térmico pelo teste t e também foi realizada correlação de Pearson.

Todas as análises foram realizadas com auxílio do programa *Statistical Analysis System*®, versão 9.2 (SAS, 2008), a 5% de significância.

7.7 Resultados

7.7.1 Estresse térmico nos ovinos

Os animais foram submetidos às condições de temperatura do ar média de 31,4°C, máxima de 31,8°C e mínima de 31,0°C; umidade relativa do ar média de 38,5%, máxima de 39,5%, mínima de 37,5% e temperatura do globo negro média de 31,8°C, máxima de 32,1°C e mínima de 31,4°C.

Resultados obtidos por Fuquay (1981) demonstram que a zona de conforto térmico dos ovinos se situa entre 20 e 30°C, com umidade relativa variando entre 60 e 70%, sendo considerada crítica acima de 34°C.

Observa-se que as médias de temperatura superaram o intervalo de conforto proposto, no entanto, não atingiram o valor considerado crítico pelo autor.

Para que os animais alcancem máxima produtividade, os mesmos dependem de uma faixa de temperatura e umidade ideais, também chamada de zona de conforto térmico, onde os limites de temperatura crítica e níveis de umidade relativa do ar são compatíveis com a capacidade termorregulatória, não ocorrendo gasto de energia para termólise ou termogênese (TITTO, 1998).

A associação entre os vários fatores climáticos como temperatura do ar, umidade relativa e irradiação provocam alterações fisiológicas que acabam interferindo na produtividade animal (SILVA et al., 2005).

Dessa forma, apesar das temperaturas do ar e do globo negro não terem se mostrado superiores às consideradas como críticas a espécie, o aumento da temperatura acima do intervalo de conforto junto a umidade relativa baixa, e a exposição ao sol sem o oferecimento de sombra, justificam as variações fisiológicas observadas nos animais (Tabela 4).

Tabela 4 - Valores médios de temperatura retal (TR), frequência respiratória (FR) e cortisol sanguíneo, seguidas do erro padrão médio, observadas nos animais antes e depois da exposição ao estresse.

Variáveis	AE	DE	Valor de P
TR (°C)	39,14±0,12 ^b	40,03±0,05 ^a	< 0,0001
FR (mov.min ⁻¹)	64,44±6,54 ^b	147,1±10,66 ^a	< 0,0001
Cortisol (ng.ml ⁻¹)	0,68±0,14 ^b	2,15±0,19 ^a	< 0,0001

*Letras diferentes representam diferença significativa entre as colunas (P<0,05).

¹ AE: antes do estresse; ² DE: depois do estresse.

As variáveis fisiológicas diferiram estatisticamente entre os dois períodos avaliados, indicando uma mudança nos padrões internos para manutenção da homeotermia na condição de estresse imposto aos animais.

Os ovinos apresentam uma temperatura retal média de aproximadamente 39,1°C (SWENSON, 1988), variando entre 38,5 a 40°C (BACCARI JÚNIOR, 2001), sendo uma elevação de 1°C ou menos o bastante para a redução do desempenho na maioria das espécies de animais domésticos (MCDOWELL, HOOVEN e CAMOENS, 1976).

A frequência respiratória normal de um ovino em repouso é de 20 a 34 respirações por minuto (KOLB, 1980; FEITOSA, 2008), podendo se elevar a 300 mov.min⁻¹ em ovinos estressados (TERRIL e SLEE, 1991). Segundo Silanikove (2000), a frequência respiratória pode quantificar a severidade do estresse por calor, em que frequências de 40 a 60, 60 a 80 e 80 a 120 mov.min⁻¹ caracterizam um estresse baixo, médio-alto e alto para ruminantes, sendo classificado como severo quando acima de 200 mov.min⁻¹ em ovinos.

Outro desafio imposto pelo estresse térmico aos animais é a capacidade de manter os balanços energético, endócrino e mineral (GARCIA, 2013).

No campo imunológico, segundo Baccari Júnior (2001), em resposta ao estresse, os glicocorticoides produzem alterações no número relativo dos glóbulos brancos, inclusive linfócitos, inibindo sua resposta aos desafios imunogênicos.

Além disso, o estresse térmico pode desencadear alterações agudas e crônicas nas concentrações plasmáticas de cortisol, hormônios tireoidianos e metabólitos lipídicos (URIBE-VELÁSQUEZ et al., 1998).

A temperatura retal e frequência respiratória apresentaram correlações altas e positivas entre si ($r=0,698$), bem como em relação as concentrações de cortisol sérico, sendo $r=0,743$ e $r=0,776$, respectivamente para temperatura retal e frequência respiratória.

Os níveis de cortisol variam devido a situações estressantes, muitas vezes geradas por elementos meteorológicos como a temperatura e umidade do ar, vento e alta intensidade de radiação solar (COLLIER et al., 1982).

Em condições de pasto aberto, os animais estão expostos à radiação direta e indireta, sendo parte desta radiação refletida e a outra parte absorvida, tornando-se uma parcela importante do incremento calórico, podendo interferir negativamente sobre o desempenho animal se a exposição for prolongada e excessiva (BACCARI JÚNIOR, 2001).

Em estudo conduzido com búfalos, o cortisol foi significativamente elevado em situações nas quais os animais não tinham acesso à área de sombra para descanso, quando comparadas a animais criados em sistemas silvipastoris em regiões de clima tropical ($19 \pm 0,2$ vs. $17 \pm 0,3$ ng.ml⁻¹), com diferenças mais marcantes no período do ano em que as chuvas são menos frequentes e a radiação solar é mais intensa (GARCIA, 2013).

Da mesma forma, ovinos mantidos em ambientes parcialmente sombreados apresentaram ganho de peso superior àqueles que receberam radiação direta (Magalhães et al, 2001), evidenciando que o oferecimento de sombra evita tanto a energia solar direta quanto a refletida, sendo eficiente ao reduzir a radiação que chega aos animais (RASLAN, 2008).

Neste contexto, nas condições do presente trabalho, os valores de cortisol e sua correlação com a temperatura retal mostram efeito significativo da exposição à radiação solar direta, como estressor, evidenciando a resposta termolítica respiratória. Esses dados corroboram as citações de Garcia (2013), Baccari Júnior (2001) e Raslan (2008).

7.7.2 Estabilidade do cortisol nas fezes

As amostras de fezes obtidas nos ovinos submetidos ao estresse térmico foram utilizadas para avaliação da estabilidade do cortisol. Os resultados obtidos em relação a estabilidade do cortisol fecal perante os tratamentos propostos no projeto, estão descritos na tabela 5.

Tabela 5 - Valores de cortisol fecal (ng.g MS^{-1}) obtidos nos diferentes períodos e temperaturas estudadas.

Tempo (horas)	Temperaturas			
	15°C	25°C	35°C	$\bar{x}$ (P=0,1395)
T1	1,14	1,05	0,98	1,05
T3	0,88	0,83	0,73	0,81
T6	0,98	1,00	0,85	0,94
T12	0,68	0,84	0,84	0,78
$\bar{x}$ (P=0,7538)	0,92	0,93	0,85	

* EP Hor = 0,9041; EP Hor x T°C = 1,5660 (P=0,95); Tempo 0 - com cortisol ($\bar{x} = 0,96 \pm 1,43$).

A interação entre as temperaturas e os diferentes tempos de exposição não foi significativa para nenhum dos tratamentos estudados ($P > 0,05$). Da mesma forma, a média dos grupos controle com cortisol analisados no tempo 0 (T0) não diferiu significativamente em relação à média dos demais horários ($P > 0,05$).

Neste sentido, verifica-se uma tendência a manutenção dos metabólitos durante o período total de 12 horas, apresentando mínimas oscilações e quedas não significativas ($P > 0,05$).

A deterioração hormonal em decorrência da degradação microbiana é uma importante fonte de variação nas concentrações de metabólitos fecais do cortisol (BEEHNER e WHITTEN, 2004).

Os metabólitos hormonais nas fezes são afetados por fatores como temperatura, umidade e raios ultravioletas, os quais podem influenciar a presença e atividade das bactérias, de forma direta e/ou indireta, por meio de processos de biotransformação (TOUMA e PALME, 2005; SCHWARTZ e MONFORT, 2008)

Geralmente, as amostras são congeladas logo após a colheita, sendo mais estáveis quando armazenadas à temperaturas abaixo de 0°, como a maioria das amostras biológicas (WHITTEN, BROCKMAN e STAVISKY, 1998).

Palme e Möstl (1997), recomendam que as amostras fecais sejam rapidamente acondicionadas a -20°C até que seja realizado o processo de análise, no entanto, quando se trata de colheitas realizadas à campo, nem sempre é possível realizar o armazenamento de forma imediata, sendo necessário recorrer a métodos como o congelamento em nitrogênio líquido (CREEL, CREEL e MONFORT, 1997; WASSER, RISLER e STEINER, 1988), etanol (STRIER e ZIEGLER, 1997; WASSER, 1996; WASSER et al., 1997) ou gelo (MORROW et al., 2002).

Morrow et al. (2002), estudando o efeito dos intervalos de 6, 9, 12 e 24 horas entre as colheitas e o congelamento das amostras fecais de bovinos, em temperatura ambiente (25 a 28 °C), relataram que os metabólitos se mantiveram estáveis durante até 12 horas, e por até 24 horas quando armazenadas em gelo.

Estudos realizados por Parnell et al. (2015), verificaram que as concentrações de metabólitos fecais de tigres, mudaram significativamente somente após 48 horas de exposição às condições de ambiente seco, sem ocorrência de precipitação, com temperaturas variando entre 17,8 a 26,4°C.

Segundo Abáigar, Domené e Palomares (2012), exceto para os estrógenos, as alterações nas concentrações hormonais de esteroides fecais também não foram verificadas por, pelo menos, 48 horas em fezes de gazelas e Carneiros do Sahara e, de acordo com os autores, a sazonalidade foi o fator que mais afetou a dinâmica de variação hormonal, verificando um aumento nas concentrações de metabólitos na estação seca e uma diminuição na estação chuvosa.

Por outro lado, Washburn e Millspaugh (2002), realizaram um teste durante 7 dias, com cinco condições diferentes de exposição, submetendo as amostras fecais a (1) condições de temperatura ambiente - 22°C, (2) alta temperatura - 38°C, (3) condições alternadas de alta e baixa temperatura, (4) condições alternadas de resfriamento a -20 °C e temperatura ambiente e, por fim, (5) simulação de chuva. Os autores observaram que as concentrações de metabólitos nas fezes submetidas aos tratamentos 1, 4 e 5; aumentaram durante o período de 7 dias, concluindo que o aumento do metabolismo microbiano de glicocorticoides fecais pode explicar em parte estes resultados. No entanto, outros processos bioquímicos como a clivagem de grupos laterais de conjugados de metabólitos hormonais por ação não microbiana, ou a liberação de glicocorticoides de micelas lipídicas também podem ter contribuído para esse resultado.

Diferenças nos ensaios para a determinação da concentração de cortisol fecal podem estar relacionadas à diferenças nas condições de estabilidade. Mesa Cruz, Brown e Kelly (2014), avaliando o efeito das condições ambientais sobre a concentração de metabólitos fecais em onças pintadas, verificaram que fezes avaliadas a partir de ensaio imunoenzimático permaneceram estáveis durante 5 dias na estação seca, porém menos de um dia durante a estação chuvosa. Por outro lado, no mesmo experimento, as fezes analisadas com radioimunoensaio, se mantiveram estáveis durante os 5 dias, tanto na estação chuvosa quanto na estação seca.

Da mesma forma, Möstl et al. (1999), utilizando ensaios baseados na mensuração de 11,17 – dioxoandrostanes (11,17-DOA), relataram um aumento significativo nas concentrações destes metabólitos em amostras de fezes de bovinos mantidas à temperatura ambiente durante 1 hora. Resultados semelhantes foram encontrados por Palme et al. (1999), os quais explicaram que as maiores concentrações detectadas podem ter ocorrido em função de diferenças entre as reações cruzadas.

Os efeitos do ambiente e da atividade bacteriana podem confundir os resultados e minimizar a confiabilidade da utilização de métodos não-invasivos em condições de campo (PARNELL, 2015), sendo evidente a necessidade de validações metodológicas para cada espécie, bem como em relação aos ensaios empregados para cada tipo de análise (TOUMA e PALME, 2005).

7.7.3 Conclusões

Os resultados do presente estudo revelam uma alta estabilidade do cortisol nas fezes de ovinos perante diferentes temperaturas e períodos de exposição. No entanto, devido a extensa variação observada entre os padrões de excreção e comportamento dos metabólitos fecais do cortisol nas diferentes espécies, se torna evidente a necessidade do desenvolvimento de novos estudos, a fim de validar procedimentos que sejam capazes de refletir, com o mínimo de interferência, as características e padrões inerentes a cada indivíduo e espécie.

Cabe aqui enfatizar que o uso de cortisol nas fezes não parece eficaz como medida de estresse agudo, mas que devido à estabilidade e aos estímulos prolongados ou contínuos pode ter boa aplicação em situações de estresse crônico, por exemplo em animais mal estabulados e com mau manejo continuado.

REFERÊNCIAS

- ABÁIGAR, T.; DOMENÉ, M. A.; PALOMARES, F. Effects of fecal age and sazonality on steroid hormone concentration as a reproductive parameter in field studies. **European Journal of Wildlife Research**. Heidelberg, v. 56, p. 781-787, 2010.
- ALAM, M. G. S; DOBSON, H.; FITZPATRICK, R. J. Endocrine responses to different doses of ACTH in cows. **British Veterinary Journal**. London, v. 142, p. 239-245, 1986.
- AMARAL, D. F. et al. Efeito da suplementação alimentar nas respostas fisiológicas, hormonais e sanguíneas de ovelhas Santa Inês, Ile de France e Texel. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**. Maringá, v. 31, n. 4, p. 403-410, 2009.
- ASSOCIATION OF ANALITICAL CHEMIST – AOAC. 1990. **Oficial methods of analysis**. 15. ed. Arlington: Virginia, 117 p.
- BACCARI Jr., F. **Manejo Ambiental de Vacas Leiteiras em Clima Quente**. UEL, Londrina. 2001.
- BARBOSA SILVEIRA, I. D.; FISCHER, V.; MENDONÇA, G. Efeito do genótipo e da idade de ovinos na reatividade medida em pista de venda. **Revista Brasileira de Zootecnia**. Viçosa, v. 39, n. 10, p. 2304-2309, 2010.
- BEAUSOLEIL, N. J. et al. Seletion for temperamento in sheep: domain – general and contexto specific traits. **Applied animal behaviour Science**. Amsterdam, v. 139, n. 1-2, p. 74 – 85, 2012.
- BEEHNER, J. C.; WHITTEN, P. L. Modifications of a field method for fecal steroids analysis in baboons. **Physiology and Behaviour**, v. 82, n. 2-3, p. 269-277, 2004.
- BELL, M. E. et al. Influence of reproductive state on pituitary-adrenalactivity in the ewe. **Domestic Animal Endocrinology**. Philadelphia, v. 8, n. 2, p. 245-254, 1991.
- BENCH, C. J. et al. Artificial selection of rams for sexual performance and its effect on the sexual behavior and fecundity of male and female progeny. **Applied Animal Behaviour Science**. Amsterdam, v. 72, p. 41-50, 2001.
- BERNABUCCI, U. et al. Influence of different periods of exposure to hot environment on rumen function and diet digestibility in sheep. **Internacional Journal of Biometeorology**. Heidelberg, v. 53, p. 387–395, 2009.
- BOBEK, S. et al. Changes in circulating levels of iodothyronine, cortisol and endogenous thiocynate in sheep during emotional stress caused by isolation of the animals from the flock. **Journal of Veterinary Medicine Series A**. Berlim, v. 33, p. 698-705, 1986.
- BOONSTRA, R. et al. Seasonal changes in glucocorticoid and testosterone concentrations in freeliving arctic ground squirrels from the boreal forest of the Yukon. **Canadian Journal of Zoology**. Ottawa, v. 79, p. 49–58, 2001.
- BREEN, K.M.; KARSCH F. J. Does cortisol inhibit pulsatile luteinizing hormone secretion at the hypothalamic or pituitary level. **Endocrinology**. Chevy Chase, v.145, n. 2, p. 692 - 698, 2005.

- BROWN, D.E.; HARRISON, P.C.; HINDS, F.C., LEWIS, J. A., WALLACE, M. H. Heat stress effects on fetal development during late gestation in the ewe. **Journal of Animal Science**. Champaign, v.44, n.3, p.442-446, 1977.
- BROWN, J.L.; WALKER, S.; STEINMAN, K. Endocrine manual for the reproductive assessment of domestic and non-domestic species. **Endocrine Research Laboratory**. Front Royal, 2004, 68 p.
- BROWN, J.L.; WILDT, D. Assessing reproductive status in wild felids by non- invasive faecal steroid monitoring. **International Zoo Yearbook**, v.35, p. 173- 191, 1997.
- CERONE-MCLERNON, A. J. et al. Side-chain cleavage of cortisol by fecal flora. **Biochimica Biophysica Acta (BBA) – Lipids Lipid Metab.** Amsterdam, v. 666, p. 341-347, 1981.
- COLLIER, R. J. et al. Influence of environment and its modification on dairy animal health and production. **Journal of Dairy Science**. New York, v. 65, p. 2213-2227, 1982.
- COOK, C.J.; JACOBSON, L.H. Salivary cortisol as na indicator of stress in sheep. **New Zealand Veterinary Journal**. Wellington, v. 43, n. 7, p. 248, 1995.
- COSTA, M.J.R.P.; MESQUITA, J.C.; JUNQUEIRA FILHO, A.A. Comportamento de vacas Holandesas em pastagem. In: Encontro Paulista de Etologia,1, Jaboticabal, 1983. **Anais...** Jaboticabal: UNESP/FCAVJ, p.251, 1983.
- CREEL, S., CREEL, N., MONFORT, S. Radiocollaring and stress hormones in African wild dogs. **Conservation Biology**. Amsterdam, v. 11, p. 544–548, 1997.
- DANTZER, B. et al. How do diet affect fecal steroid hormone metabolite concentrations? Na experimental examination in red squirrels. **General and Comparative Endocrinology**. Toronto, v. 174, n. 2, p. 124-131, 2011.
- DARAMOLA, J. O.; ABIOJA, M. O.; ONAGBESAN O. M. Heat Stress Impact on Livestock Production. In: SEJAM, V.; NAQVI, S. M. K.; EZEJI, T.; LAKRITZ, J.; LAL, R. **Enviromental stress and amelioration in livestock production**. Heidelberg: Springer, 2012. cap. 2, p. 53-73.
- DEHNHARD, M. et al. Measurement of plasma corticosterone and fecal glucocorticoid metabolites in the chicken (*Gallus domesticus*), the great cormorant (*Phalacrocorax carbo*), and the goshawk (*Accipiter gentilis*). **General and Comparative Endocrinology**. Toronto, v.131, p.345–352, 2003.
- DEL CAMPO, M.; BRITO, G.; SOARES DE LIMA, J., HERNÁNDEZ, P. MONTOSI F. Finishing diet, temperament and lairage time effects on carcass and meat quality traits in steers. **Meat Science**. Amsterdam, v. 86, p. 908-914, 2010.
- DELGADO, T. F. G. **Produção leiteira em cabras da raça Saanen: Influência dos hormônios Cortisol e IGF-I**. 2008. 91 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.
- DESWYSEN, A.G. et al. Nycterohemeral eating and ruminating patterns in heifers fed grass or corn silage: analysis by finite Fourier transform. **Journal of Animal Science**. Champaign, v. 71, n. 10, p. 2739-2747, 1993.

DESWYSEN, A.G.; DUTTILEUL, P.; ELLIS, W.C. Quantitative analysis of nycterohemeral eating and ruminating patterns in heifers with different voluntary intakes and effects of monensin. **Journal of Animal Science**. Champaign, v. 67, n. 10, p. 2751-2761, 1989.

DOBSON, H.; SMITH, R.F. What is stress, and how does it affect reproduction? **Animal Reproduction Science**, v.60–61, p.743–752, 2000.

DOBSON, H. et al. Is stress really all that important? **Theriogenology**. Philadelphia, v.55, p. 65–73, 2001.

DOWNING, J. A.; BRYDEN, W. L. Determination of corticosterone concentrations in egg albumen: a non-invasive indicator of stress in laying hens. **Physiology and Behavior**. v. 95, p. 381-387, 2008.

DULPHY, J. P.; FAVERDIN, P. H. L'ingestion alimentaire chez les ruminants: modalités et phénomènes associés. **Reproduction Nutrition Développement**. Les Ulis, v. 27, p. 129-155, 1987.

EL-BAHR, S. M.; ALBOKHADAIM, I. F. *In vitro* metabolic changes of glucocorticoids added to the faeces of ruminants. **International Journal of Biological Chemistry**. New York, v. 9, n. 1, p. 30-37, 2014.

ENCARNAÇÃO, R. O. Estresse e produção animal. In: CICLO INTERNACIONAL DE PALESTRAS SOBRE BIOCLIMATOLOGIA ANIMAL, 1. 1989, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: FUNEP, 1989, p. 111-129.

FEITOSA, F. L. F. **Semiologia veterinária: a arte do diagnóstico**. São Paulo: Roca, 2004.

FORDYCE, G. et al. Cattle temperament in extensive beef herds in Northern Queensland. 1. Factors affecting temperament. **Australian Journal of Experimental Agriculture**. Clayton, v. 28, N. 6, p. 683-687, 1988.

FORDYCE, G. et al. Temperament and bruising of Bos indicus cross cattle. **Australian Journal of Experimental Agriculture**. Clayton, v. 25, n. 2, p. 283-288, 1985.

FRASER, A.F.; BROOM, D.M. **Farm animal behaviour and welfare**. 3. ed. London: Balliere Tindall, 1990.

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

FUQUAY, W. J. Heat stress as it affects animal production. **Journal of Animal Science**. Champaign, v. 52, p. 164-174, 1981.

GAIATO, A. P. R.; DELGADO, T. G. F.; NEGRÃO, J. A. Qualidade e quantidade do leite produzido por cabras da raça Saanen submetidas a estresse por três dias consecutivos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v. 64, n. 5, p. 1373-1380, 2012.

GARCIA, A. R. Conforto térmico na reprodução de bubalinos criados em condições tropicais. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, v. 37, n. 2, p. 121-130, 2013.

GLEW, R.H. 2007. Metabolismo dos lipídeos II: vias do metabolismo de lipídeos especiais. In: DEVLIN, M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. 6a ed. Editora Bucher. São Paulo. pp. 684-725.

GOLDIN, B. R. et al. **Estrogen excretion patterns and plasma-levels in vegetarian and omnivorous women**. **New England Journal of Medicine**. Waltham, v. 307, p. 1542–1547, 1982.

GRAHAN, L. H.; BROWN, J. L. Cortisol metabolism in the domestic cat and implications for non-invasive monitoring adrenocortical function in endangered felids. **Zoo Biology**. Hoboken, v. 15, p. 71-82, 1996.

GRANDIN, T. Assessment of stress during handling and transport. **Journal of Animal Science**. Champaign, v. 75, p. 248-257, 1997.

GRANDIN, T. Farm animal welfare during handling transport and slaughter. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. Schaumburg, v. 204, p. 372–376, 1994.

GRANNER, D.K. 2007. A diversidade do sistema endócrino. In: MURRAY, R. K.; BENDER, D. A.; BOTHAM, K. M.; KENNELLY, P. J.; RODWELL, V. W.; WELL, P. A. **Bioquímica ilustrada de Harper**. 27a ed. McGraw-Hill: Porto Alegre. pp. 411-430.

HAFEZ, E. S. E.; BOUISSOU, M. F. The Behaviour of cattle. In: HAFEZ, E. S. E. **The behaviour of domestic animals**. London: Baillière, Tindall, 1975.

HARGREAVES, A.L.; HUTSON, G.D. Changes in heart rate, plasma cortisol and haematocrit of sheep during a shearing procedure. **Applied Animal Behaviour Science**. Amsterdam, v. 26, p. 91 – 101, 1990.

HARPER, J.M.; AUSTAD, S. N. Fecal glucocorticoids. A noninvasive method of measuring adrenal activity in wild and captive rodents. **Physiology Biochemistry Zoology**, v. 73, p. 12–22, 2000.

HENNESSY, D. P. et al. Consistent capacity for adrenocortical response to ACTH administration in pigs. **American Journal of Veterinary Research**. Schaumburg, v. 49, p. 1276–1283, 1988.

HUTSON, G. D. The influence of barley food rewards on sheep movement through a handling system. **Applied Animal Behaviour Science**. Amsterdam, v. 14, n. 3, p. 263-273, 1985.

JOHNSON, L.M.; GAY, V. L. Luteinizing hormone in the cat. II. Mating-induced secretion. **Endocrinology**. Chevy Chase, v. 109, n. 1, p. 247-252, 1981.

KANITZ, E.; OTTEN, W.; TUCHSCHERER, M. Central and peripheral effects of repeated noise stress on hypothalamic–pituitary–adrenocortical axis in pigs. **Livestock Production Science**. Amsterdam, v. 94, p. 213–224, 2005.

KECKEIS, K. et al. Hair cortisol: a parameter of chronic stress? Insights from a radiometabolism study in guinea pigs. **Journal of Comparative Physiology**. Heidelberg, v. 182, n. 7, p. 985-996, 2012.

KENT, J. E.; MOLONY, V. ROBERTSON, I. S. Changes in plasma cortisol concentration in lambs of three ages after three methods of castration and tail docking. **Research in Veterinary Science**. London, v. 55, n. 2, p. 246-251, 1993.

- KLASING, K. C. Potential impact of nutritional strategy on noninvasive measurements of hormones in birds. **Annals of the New York Academy of Sciences**. Hoboken, v. 1046, p. 5–16, 2005.
- KOEPPEN, B.M.; STANTON. **Berne & Levy: Fisiologia**. 3.ed. Barcelona: Elsevier Mosby, 2009.
- KOLB, E. **Fisiologia veterinária**. 4. Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1980.
- LEHUGEUR C. M. **Bem-estar em ovinos no Rio Grande do Sul: Termografia na avaliação de podridão dos cascos e estresse por calor**. 2012. 70 F. Dissertação (Mestre em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.
- LEME, T. M. C. **Métodos de transporte e períodos de descanso pré-abate sobre o nível de estresse e qualidade de carne de ovinos**. 2009. 96 f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2009.
- LEXEN, E. et al. Monitoring the adrenocortical response to disturbances in sheep by measuring glucocorticoid metabolites in the faeces. **Wiener Tierärztliche Monatsschrift**, v. 95, p. 64-71, 2008.
- LUNDBERG, U. Stress hormones in health and illness: The roles of work gender. **Psychoneuroendocrinology**. Kidlington, v. 30, p. 1017-1021, 2005.
- LYONS, D.M. Individual differences in temperament of dairy goats and the inhibition of milk ejection. **Applied Animal Behaviour Science**, Amsterdam, v. 22, p. 269- 282, 1989.
- MACDONALD, I. A. et al. Degradation of steroids in the human gut. **Journal of Lipid Research**. Rockville, v. 24, p. 675–700, 1983.
- MAGALHÃES, J.A. et al. Desempenho produtivo e reações fisiológicas de ovinos deslanados mantidos sob seringal (*Havea brasiliensis*). **Revista Científica de Produção Animal**. Teresina, v. 3, n. 1, p. 77-82, 2001.
- MARAI, I.F.M.; EL-DARAWANY, A.A.; FADIEL, A. ABDEL-HAFEZ, M., A., M. Physiological traits as affected by heat stress in sheep - A review. **Small Ruminant Research**. Amsterdam, v.71, p. 1-12, 2007.
- MARTIN, P.; BATESON, P. 1993. **Measuring Behaviour: an introductory guide**. 2. ed. Cambridge University Press: Cambridge, 222 p.
- MATTERI, R.L.; CARROLL, J.A.; DYER, C.J. Neuroendocrine responses to stress. In: **The biology of animal stress**. Wallingford: Cabi Publishing, p. 43-76, 2000.
- MCDOWELL, R. E.; HOOVEN, N.W.; CAMOENS, J. K. Effects of climate on performance of Holsteins in first lactation. **Journal Dairy Science**. New York, v. 59, p. 965-973, 1976.
- MCDOWELL, R.G. **Improvement of livestock production in war climates**. San Francisco: W.H. Freeman and Company, 1972.
- MCGARY, S.; ESTEVEZ I.; RUSSEK-COHEN, E. Reproductive and aggressive behavior in male broiler breeders with varying fertility levels. **Applied Animal Behaviour Science**. Amsterdam, v. 82, p. 29–44, 2003.

MCKENZIE, S.; DEANE, E.M. Faecal corticosteroid levels as an indicator of well-being in the tammar wallaby, *Macropus eugenii*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. Philadelphia, v.140, n. 1, p.81– 87, 2005

MESA-CRUZ, J. B.; BROWN, J. L.; KELLY, M. J. Effects of natural environmental conditions on faecal glucocorticoid metabolite concentrations in jaguars (*Panthera onca*) in Belize. **Conservation Biology**. Amsterdam, v. 2, p.1-10, 2014.

MIHM, M. et al. Association between the duration of dominance of the ovulatory follicle and pregnancy rate in beef heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.102, n.1, p.123–130, 1994.

MILLER, M. W.; HOOBS, N. T.; SOUZA, M. C. Detecting stress responses in Rocky Mountain Bighorn sheep (*Ovis canadenses Canadensis*): Reliability of cortisol concentrations in urine and feces. **Canadian Journal of Zoology**. Ottawa, v. 69, p. 15-24, 1991.

MILLSPAUGH, J. J.; WASHBURN, B. E. Use of fecal glucocorticoid metabolite measures in conservation biology research: considerations for application and interpretation. **General and Comparative Endocrinology**. Toronto, v. 138, p. 189-199, 2004.

MINTON, J. E.; APPLE, J. K.; PARSONS, K. M. Stress-associated concentrations of plasma cortisol cannot account for reduced lymphocyte function and changes in serum enzymes in lambs exposed to restraint and isolation stress. **Journal of Animal Science**. Champaign, v. 73, p. 812–817, 1995.

MOBIGLIA, A. M.; CAMILO, F. F.; FERNANDES, J. J. R. Mensuração de metabólitos de cortisol nas fezes como um indicador de estresse em bovinos de corte. **Archivos de Zootecnia**. Córdoba, v. 63, p. 1-9, 2014.

MORAIS, R.N. et al. Testicular and ovarian function in South American felids assessed by fecal steroids. In: ANNUAL CONFERENCE OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF ZOO VETERINARIANS, Puerto Vallarta, **Proceedings**, 1996, p. 561-565, 1996.

MORAIS, R.N. et al. Seasonal analysis of semen characteristics, serum testosterone and fecal androgens in the ocelot (*Leopardus pardalis*), margay (*L. wiedii*) and tigrina (*Leopardus tigrinus*). **Theriogenology**. Philadelphia, v. 57, p. 2027-2041, 2002.

MORATO, R.G. et al. Changes in the fecal concentrations of cortisol and androgen metabolites in captive male jaguars (*Panthera onca*) in response to stress. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. Ribeirão Preto, v.37, p.1903-1907, 2004.

MOREIRA, E. P.; MOURA, A. A. A.; ARAÚJO, A. A. Efeitos da insulação escrotal sobre a biometria testicular e parâmetros seminais em carneiros da raça Santa Inês criados no Estado do Ceará. **Revista Brasileira de Zootecnia**. Viçosa, v. 30, n. 6, p.1704-1711, 2001.

MOREIRA, N. **Reprodução e estresse em fêmeas de felídeos do gênero *Leopardus***. 2001. 231 p. Tese (Doutorado em Zoologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

MORGAN, K. N.; TROMBORG, C. T. Sources of stress in captivity. **Applied Animal Behaviour Science**. Amsterdam, v.102, n. 3-4, p. 262-302, 2007.

MORMÉDE, P. et al. Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. **Physiology and Behaviour**, v. 92, n. 3, p. 317-339, 2007.

MORROW, C. J. et al. Fecal glucocorticoid metabolites as a measure of adrenal activity in dairy cattle. **General and Comparative Endocrinology**. Toronto, v. 126, p. 229-241, 2002.

MÖSTL, E. AND PALME, R. Hormones as indicators of stress. **Domestic Animal Encocrinology**. Philadelphia, v. 23, p. 67-74, 2002.

MÖSTL, E. et al. Measurement of glucocorticoid metabolite concentrations in faeces of domestic livestock. **Zentralblatt Veterinarmed**, v. 46, p. 621–632, 1999.

MÖSTL, E.; RETTENBACHER, S.; PALME, R. Measurement of corticosterone metabolites in birds' droppings: an analytical approach. **Annals of the New York Academy of Sciences**. Hoboken, v. 1046, p. 17-34, 2005.

MOTA F. S. **Climatologia zootécnica**. Pelotas: Edição do autor, 104 p. 2001.

MOYA, D.; SCHWARTZKOPF-GENSWEIN, K. S. G.; VEIRA, D. M. Standardization of a non-invasive methodology to measure cortisol in hair of beef cattle. **Livestock Science**. Amsterdam, v. 158, n. 1-3, p. 138-144, 2013.

MURPHY, M.R. et al. A quantitative analysis of rumination patterns. **Journal of Animal Science**. Champaign, v. 56, n. 5, p. 1236-1240, 1983.

NARAYAN, E. et al. Urinary corticosterone metabolite responses to capture, and annual patterns of urinary corticosterone in wild and captive endangered Fijian ground frogs (*Platymantis vitiana*). **Australian Journal of Zoology**. Clayton, v. 58, p. 189-197, 2010

NARAYAN, E. et al. A. Non-invasive monitoring of physiological stress hormone responses in a captive population of the Greater Bilby (*Macrotis lagotis*). **Endangered Species Research**. Oldendorf, v. 18, p. 279-289, 2012.

NEGRÃO, J. A.; PORCIONATO, M. A. F.; De PASSILÉ, A. M.; RUSHEN, L. Cortisol in saliva and plasma of cattle after ACTH administration and milking. **Journal of Dairy Science**. New York, v. 87, n. 6, p. 1713-1718, 2004.

NEIVA, J. N. M.; TEIXEIRA, M.; TURCO, S. H. N.; OLIVEIRA, S. M. P; MOURA, A. A. A. N. Efeito do estresse climático sobre os parâmetros produtivos e fisiológicos de ovinos Santa Inês mantidos em confinamento na região litorânea do Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**. Viçosa, v. 33, n. 3, p. 668-678, 2004.

NELSON, D. L.; COX, M. Hormônios. In: LEHNINGER, A. L. **Princípios de Bioquímica**. 2ed. São Paulo: Savier, 2002. pp. 513-536.

NIEZGODA, J. et al. Lack of adaptation to repeated emotional stress evoked by isolation of sheep from the flock. **Journal of veterinary medicine**. New York, v. 34, n.10, p. 734-739, Dec.1987.

OTTEN, W. et al. Acute and long term effects of chronic intermittent noise stress on hypothalamic–pituitary–adrenocortical and sympatho-adrenomedullary axis in pigs. **Animal Science**. Cambridge, v. 78, p. 271–283, 2004.

PALME, R. et al. Measurement of faecal cortisol metabolites in ruminants: a non-invasive parameter of adrenocortical function. **Wiener Tierärztliche Monatsschrift**. Vienna, v. 86, p. 237-241, 1999.

PALME, R. et al. Transport stress in cattle as reflected by an increase in faecal cortisol metabolites. **Veterinary Record**. Barcelona, v. 146, p. 108-109, 2000.

PALME, R. Monitoring stress hormone metabolites as a useful, non-invasive tool for welfare assessment in farm animals. **Animal Welfare**. Hertfordshire, v. 21, p. 331-337, 2012.

PALME, R.; MÖSTL, E. Measurement of cortisol metabolites in faeces of sheep as a parameter of cortisol concentration in blood. **International Journal of Mammalian Biology**. Muenchen, v. 62, p. 192 - 197, 1997.

PALME, R.; MÖSTL, E. Measurement of cortisol metabolites in faeces of sheep as a parameter of cortisol concentration in blood. **International Journal of Mammalian Biology**. Muenchen, v. 62, n. 2, p. 192-197, 1996.

PARNELL, T. et al. Maximising the reliability of non-invasive endocrine sampling in the tiger (*Panthera tigris*): Environmental decay and intra-sample variation in faecal glucocorticoid metabolites. **Conservation and Physiology**. Amsterdam, v. 3, p. 1-7, 2015.

PEERS, A. et al. Blood Pressure, heart rate, hormonal and other acute responses to rubber-ring castration and tail docking of lambs. **New Zealand Veterinary Journal**, Wellington, v.50, n.2, p. 56-62, 2002.

PEREIRA, R. J. G. Métodos não invasivos para análises hormonais aplicadas aos estudos de ecologia e etologia. **Revista Brasileira de Zootecnia**. Viçosa, v. 36, p. 71-76, 2007.

PETER, A.T.; KASPUTIN N.; CRISTER J.K. Analysis of sex steroid metabolites excreted in feces and urine of nondomesticated animals. **The Compendium**, v.18, n.7, p. 781-791, 1996.

POLLI, V. A. et al. Aspectos relativos a ruminação de bovinos e bubalinos em regime de confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**. Viçosa, v.25, n.5, p. 987-993, 1996.

PUSATERI, D. J. et al. Dietary and hormonal evaluation of men at different risks for prostate cancer: plasma and fecal hormone–nutrient interrelationships. **American Journal of Clinical Nutrition**. Bethesda, v. 51, p. 371-377, 1990.

RASLAN, L. S. A. **Aspectos comportamentais e fisiológicos de ovino SPRD sob pastejo com e sem sombreamento**. 2008. 92 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Sudoeste de Bahia, Itapetinga, 2008.

REECE, W.O. **Dukes: fisiologia dos animais domésticos**. 12. ed. São Paulo: Guanabara, 2006.

REHBINDER, C.; HAU, J. Quantification of cortisol, cortisol immunoreactive metabolites, and immunoglobulin A in serum, saliva, urine, and feces for noninvasive assessment of stress in reindeer. **Canadian Journal of Veterinary Research**. Ottawa, v. 70, n. 2, p. 151-154, 2006.

RETTENBACHER, S. et al. Corticosterone in chicken eggs. **Annals of the New York Academy of Sciences**. Hoboken, v. 1046, p. 193-203, 2005.

RETTENBACHER, S.; MÖSTL, E. GROOTHUIS, T. G. G. Gestagens and glucocorticoids in chicken eggs. **General and Comparative Endocrinology**. Toronto, v. 164: p. 125-129, 2009.

RIVIER, C. J.; RIVEST, S. Effect of stress on the activity of the hypothalamic pituitary gonadal axis: peripheral and central mechanisms: peripheral and Central Mechanisms. **Biology of Reproduction**. Madison, v. 45, n. 4, p. 523-532, 1991.

ROMERO, L.M. Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research. **Trends in Ecology and Evolution**, v.19, n.5, 2004.

RUIS, M.A.W. et al. The circadian rhythm of salivary cortisol in growing pigs: effects of age, gender, and stress. **Physiology and Behaviour**. v. 62, p. 623–630, 1997.

RUSHEN, J. Aversion of sheep for handling treatments: Paired-choice studies. **Applied Animal Behavioural Science**. Amsterdam, v.16, n. 4, p. 363-370, 1986.

SCHIMIDT, T.; LITWACK, G. 2007. Bioquímica de hormônios. In: DEVLIN, M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. 6ª ed. Editora Bucher: São Paulo. pp. 871-925.

SCHWARTZ, M. K., MONFORT, S. L. Genetic and endocrine tools for carnivore surveys. In: LONG, R. A.; MACKAY, P.; RAY, J. C.; ZIELINSKI, W. J. **Noninvasive survey methods for North American carnivores**. Island Press: Washington, D.C., p. 228–250.

SCHWARZENBERGER, F. et al. Faecal steroid analysis for non-invasive monitoring of reproductive status in farm, wild and zoo animals. **Animal Reproduction Science**. Amsterdam, v. 42, p. 515-526, 1996.

SHERIFF, M. J. et al. Measuring stress in wildlife: techniques for quantifying glucocorticoids. **Oecologia**, v. 166, p. 869-887, 2011.

SHULTZ, T.A. Weather and shade effects on cow corral activities. **Journal Dairy Science**. New York, v. 67, p. 868-873, 1983.

SILANIKOVE, N. Effects of heat stress on the welfare of extensively managed domestic ruminants. **Livestock Production Science**. Amsterdam, v.67, p.1-18, 2000.

SILVA, G. A. et al. Efeito das épocas do ano e de turno sobre os parâmetros fisiológicos e seminais de caprinos no semiárido paraibano. **Agropecuária Científica no Semiárido**, vol. 1, p. 07-14, 2005.

SILVA, M.; KALTENBACH, C. C.; DUNN, T. G. Serum cortisol and progesterone after administration of adrenocorticotrophin and (or) prolactina to sheep. **Journal of Animal Science**. Savoy, v. 57, p. 1525-1529, 1983.

STRADIOTTO, M. M. **Respostas fisiológicas, produtivas e comportamentais de ovelhas Santa Inês submetidas a manejos considerados estressantes e desempenho de seus cordeiros**. 2012. 104 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

STRIER, K.; ZIEGLER, T. Behavioral and endocrine characteristics of the reproductive cycle in wild muriqui monkeys, *Brachyteles arachnoides*. **American Journal of Primatology**. Hoboken, v. 42, p. 299–310, 1997.

SWENSON, M. J. **Duke's physiology of domestic animals**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988.

TAVES, M. D.; GOMEZ SANCHEZ, C. E.; SOMA, K. K. Extra- adrenal glucocorticoids and mineralocorticoids: evidence for local synthesis, regulation, and function. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**. Bethesda, v. 301, p. 11-24, 2011.

TAYLOR, W. The excretion of steroid hormone metabolites in bile and feces. **Vitamins e Hormones**. Maryland Heights, v. 29, p. 201–285, 1971.

TEIXEIRA, P. P. **Ritmo circadiano do cortisol, triiodotironina (T3) e tiroxina (T4) como indicadores de estresse no parto de éguas da raça quarto de milha**. 2005. 91 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2005.

TERRILL, C.E.; SLEE, J. Breed differences in adaptation of sheep. In: MAIJALA, K. (Ed.) **Genetic resources of pigs, sheep and goat**. Amsterdam: Elsevier, 1991. p.195-233.

TITTO, E. A. L. Clima: Influência na produção de leite. In: AMBIÊNCIA NA PRODUÇÃO DE LEITE EM CLIMA QUENTE, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1998.p. 10-23.

TOUMA, C.; PALME, R. Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: the importance of validation. **Annals of the New York Academy of Sciences**. Hoboken, v. 1046, p. 54-74, 2005.

TREIMAN, D. M. LEVINE, S. Plasma corticosteroid response to stress in four species of wild mice. **Endocrinology**. Chevy Chase, v. 84, p.676-80, 1969.

TUCHSCHERER, M. et al. Effects of prenatal stress on cellular and humoral immune responses in neonatal pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. Amsterdam, v. 86, p. 195–203, 2002.

TUCHSCHERER, M. et al. Effects of postnatal social isolation on hormonal and immune responses of pigs to an acute endotoxin challenge. **Physiology and Behaviour**, v. 82, n. 2-3, p. 503-511, 2004.

URIBE-VELASQUEZ, L. F. et al. Concentrações plasmáticas de cortisol, hormônios tireoidianos, metabólitos lipídicos e temperatura corporal de cabras Alpinas submetidas ao estresse térmico. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**. Viçosa, v. 27, n.6, p.1123- 1130, 1998.

VAN, D. T. T.; THI MUI, N.; LEDIN, I. Effect of group size on feed intake, aggressive behaviour and growth rate in goat kids and lambs. **Small Ruminant Research**. Amsterdam, v. 71, p. 187-196, 2007.

VEISSIER, I.; BOISSY, A. Stress and welfare: Two complementary concepts that are intrinsically related to the animal's point of view. **Physiology and Behaviour**, v. 92, n. 3, p. 429 – 433, 2007.

VERA, F.; ZENUTO R. R.; ANTENUCCI, C. D. Differential Responses of cortisol and corticosterone to adrenocorticotrophic hormone (ACTH) in a subterranean rodent (*Ctenomys talarum*). **Journal of Experimental Zoology**. Hoboken, v. 317, p. 173-184, 2012.

VIÉRIN, M.; BOUISSOU, M. F. Responses of weaned lambs to fear-eliciting situations: origin of individual differences. **Developmental psychobiology**. Hoboken, v. 42, n. 2, p. 131-147, 2003.

VOISINET, B. D. et al. Feedlot cattle with calm temperaments have higher average daily gains than cattle with excitable temperaments. **Journal of Animal Science**. Champaing, v. 75, n. 4, p. 892-896, 1997.

WASHBURN, B.E.; MILLSPAUGH, J. J. Effects of simulated environmental conditions on glucocorticoid metabolite measurements in white tailed deer feces. **General Comparative Endocrinology**. Toronto, v. 127, p. 217–222, 2002.

WASSER, S. et al. Non-invasive 558 physiological measures of disturbance in the northern spotted owl. **Conservation Biology**. Amsterdam, v. 11, p. 1019–1022, 1997.

WASSER, S. K. et al. A generalized fecal glucocorticoid assay for use in diverse array of nondomestic mammalian and avian species. **General and Comparative Endocrinology**. Toronto, v. 120, p. 260-275, 2000.

WASSER, S. K.; HUNT, K. E.; CLARCKE, C. M. Assessing stress and population genetics through noninvasive means. In: AGUIRRE, A. A.; OSTFELD, R. S.; TABOS, G. M.; HOUSE, C.; PEARL, M. C. (Edt.) **Conservation Medicine – Ecological Health in Practice**. New York: Oxford University Press, 2002. p. 131-144.

WASSER, S. Reproductive control in wild baboons measured by fecal steroids. **Biology of Reproduction**. Madison, v. 55, p. 393–399, 1996.

WASSER, S.; RISLER, L.; STEINER, R. Excreted steroids in primate feces over the menstrual cycle and pregnancy. **Biology of Reproduction**. Madison, v. 39, p. 862–872, 1988.

WASSER, S.K.; HUNT, K.E.; BROWN, J.L. *et al.* A generalized fecal glucocorticoid assay for use in a diverse array of nondomestic mammalian and avian species. **General and Comparative Endocrinology**. Toronto, v.120, p.260-275, 2000.

WASSER, S.K.; HUNT, K.E.; CLARKE, C.M. Assessing stress and population genetics through noninvasive means. In: AGUIRRE, A.A.; OSTFELD, R.S.; TABOR, G.M. et al. (Eds.) **Conservation medicine - ecological health in practice**. Oxford University Press: New York, United States of America, 2002.

WEAVER, S. A. et al. Neonatal handling permanently alters hypothalamic–pituitary–adrenal axis function, behaviour, and body weight in boars. **Journal of Endocrinology**. Bristol, v. 164, p. 349–359, 2000.

WHITTEN, P.L.; BROCKMAN, D.K.; STAVISKY, R.C. Recent advances in noninvasive techniques to monitor hormone-behavior interactions. **American Journal of Physical Anthropology**. Hoboken, v. 107, p. 1-23, 1998.

WIEPKEMA, P. R.; KOOLHAAS, J. M. Stress and animal welfare. **Animal Welfare**, v. 2, n. 3, p. 195 – 218, Aug. 1993.

WILHELM, I.; BOM, J.; KUDIELKA, B.M.; SCHLOTZ, W.; WUST. S. Is the cortisol awakening rise a response to awakening? **Psychoneuroendocrinology**. Kidlington, v. 32, n. 4, p. 358-366, 2007.

WILSON, P.N. The grazing behaviour and free-water intake of east African Shorthorned zebu heifers at Serere Uganda. **Journal of Agricultural Science**. Cambridge, v. 56, n. 3, p. 351-364, 1961.

WINGFIELD, J.C., FARNER, D.S. Endocrinology of reproduction in wild species. **Avian Biology**. Herts, v. 9, p. 163–327, 1993.

YEAGER, M. P.; GUYRE, P. M.; MUNCK, A. U. Glucocorticoid regulation of the inflammatory response to injury. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**. Hoboken, v. 48, n. 7, p. 799 - 813, 2004.

YOUNG, K. M. et al. Noninvasive monitoring of adrenocortical activity in carnivores by fecal glucocorticoid analyses. **General and Comparative Endocrinology**. Toronto, v. 137, p. 148-165, 2004.

ZHANG, S.H. et al. Physiological responses to exercise and hypoglycemia stress in pig of differing adrenal responsiveness. **Comparative Biochemistry and Physiology A**. Philadelphia, v. 103, p. 695–703, 1992.

ZHANG, S.H.; HENNESSY, D. P.; CRANWELL, P. D. Pituitary and adrenocortical responses to corticotrophin-releasing factor in pigs. **American Journal of Veterinary Research**. Schaumburg, v. 51, p. 1021–1025, 1990.

ANEXO

ANEXO A - Frequências (%) dos comportamentos ingerir, ruminar, ócio e deitado observadas nos ovinos durante os dias de adaptação (1º e 2º dia) e colheita (3º dia).

Animal	Dias	Comportamento			
		Ingerir	Ruminar	Ócio	Deitado
73	1	17,35 ± 0,03 ^a	12,24 ± 0,03 ^a	62,24 ± 0,04 ^a	22,45 ± 0,04 ^c
	2	27,27 ± 0,04 ^a	9,90 ± 0,02 ^a	57,85 ± 0,04 ^a	41,32 ± 0,04 ^b
	3	26,23 ± 0,05 ^a	16,39 ± 0,04 ^a	52,46 ± 0,06 ^a	54,10 ± 0,06 ^a
78	1	16,33 ± 0,03 ^a	11,22 ± 0,03 ^a	63,27 ± 0,04 ^a	24,49 ± 0,04 ^b
	2	19,83 ± 0,03 ^a	11,57 ± 0,02 ^a	47,11 ± 0,04 ^b	44,63 ± 0,04 ^a
	3	16,39 ± 0,04 ^a	21,31 ± 0,05 ^a	60,66 ± 0,06 ^{ab}	55,74 ± 0,06 ^a
80	1	21,43 ± 0,04 ^a	7,14 ± 0,02 ^a	70,41 ± 0,05 ^a	16,33 ± 0,03 ^b
	2	28,10 ± 0,04 ^a	9,00 ± 0,02 ^a	52,89 ± 0,04 ^b	52,89 ± 0,04 ^a
	3	27,87 ± 0,05 ^a	14,75 ± 0,04 ^a	55,74 ± 0,06 ^b	57,38 ± 0,06 ^a
82	1	24,49 ± 0,04 ^b	18,37 ± 0,03 ^a	47,96 ± 0,05 ^a	28,57 ± 0,04 ^b
	2	47,11 ± 0,04 ^a	8,20 ± 0,02 ^b	33,88 ± 0,04 ^b	28,10 ± 0,04 ^b
	3	22,95 ± 0,05 ^b	24,59 ± 0,05 ^a	52,46 ± 0,06 ^a	57,38 ± 0,06 ^a
86	1	10,20 ± 0,03 ^b	19,39 ± 0,03 ^{ab}	63,27 ± 0,04 ^a	17,35 ± 0,03 ^b
	2	30,58 ± 0,04 ^a	28,93 ± 0,04 ^a	28,10 ± 0,04 ^b	43,80 ± 0,04 ^a
	3	26,23 ± 0,05 ^a	11,48 ± 0,04 ^b	59,02 ± 0,06 ^a	54,10 ± 0,06 ^a
94	1	7,10 ± 0,02 ^a	14,29 ± 0,03 ^a	70,71 ± 0,04 ^a	21,43 ± 0,04 ^b
	2	12,40 ± 0,02 ^a	9,90 ± 0,04 ^a	66,12 ± 0,04 ^a	47,93 ± 0,04 ^a
	3	14,75 ± 0,04 ^a	13,11 ± 0,04 ^a	60,66 ± 0,05 ^a	54,10 ± 0,06 ^a

*Valores seguidos por letras iguais dentro de cada animal não diferem estatisticamente entre si (P > 0,05).