

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

EFEITO DAS SUPLEMENTAÇÕES DE SELÊNIO NA RESPOSTA
IMUNE HUMORAL ANTI-RÁBICA, NA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE
SELÊNIO E DO CORTISOL EM BOVINOS

LUIS SOUZA LIMA DE SOUZA REIS

Botucatu – SP
2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

EFEITO DAS SUPLEMENTAÇÕES DE SELÊNIO NA RESPOSTA
IMUNE HUMORAL ANTI-RÁBICA, NA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE
SELÊNIO E DO CORTISOL EM BOVINOS

LUIS SOUZA LIMA DE SOUZA REIS

Tese apresentada junto ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina Veterinária
para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Ass. Dr. Simone Biagio
Chiacchio

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
Bibliotecária responsável: Selma Maria de Jesus

Reis, Luis Souza Lima de Souza.

Efeito das suplementações de selênio na resposta imune humoral anti-rábica, na concentração sérica de selênio e do cortisol em bovinos / Luis Souza Lima de Souza Reis. – Botucatu : [s.n.], 2008

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2008.

Orientador: Prof. Ass. Dr. Simone Biagio Chiacchio

Assunto CAPES: 50403001

1. Selênio na nutrição animal 2. Bovino - Aspectos imunológicos
3. Resposta imune 4. Imunologia veterinária

CDD 636.20896

Palavras-chave: Anticorpos neutralizantes anti-rábicos; Bovino; Cortisol; Selênio; Suplemento mineral

Nome do Autor: Luis Souza Lima de Souza Reis

Título: Efeito das suplementações de selênio na resposta imune humoral anti-rábica, na concentração sérica de selênio e do cortisol em bovinos

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Ass. Dr. Simone Biagio Chiacchio
Presidente e Orientador
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof. Dr. Roberto Calderon Gonçalves
Membro
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof. Dr. Rogério Martins Amorim
Membro
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. José Giometti
Membro
Departamento de Microbiologia e Imunologia
Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE

Prof. Dr. Laurenil Gaste
Membro
Departamento de Clínicas Veterinárias
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Data da Defesa: 10 de Setembro de 2008.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao que há de mais precioso na minha vida:

A Deus,

À minha esposa Fabiana e minha filha Rafaela, pela paciência, compreensão, apoio e por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos, tornando mais fácil essa caminhada,

Aos meus Pais Milton e Adalgisa, que são exemplos de dignidade, força e determinação, que sempre me apoiaram e me ensinaram o caminho da prosperidade, respeito pela vida e pelos nossos semelhantes, são a razão da minha existência,

À minha irmã Patrícia, pelo carinho e incentivo.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Professor Assistente Doutor Simone Biagio Chiacchio,

Pela orientação para a realização deste trabalho. Agradeço de coração os rumos indicados, incentivo, confiança, amizade e apoio. Seus ensinamentos fizeram engrandecer meus conhecimentos, contribuindo significativamente na minha vida profissional.

AGRADECIMENTOS

A todos que compartilharam, auxiliaram, incentivaram e acreditaram neste trabalho, principalmente:

Aos Professores do Curso de Doutorado em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu da Universidade do Estado de São Paulo – UNESP/FMVZ, em especial ao Prof. Dr. Antonio Carlos Paes, Prof. Dr. Celso Antonio Rodrigues, Profa. Dra. Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga, Prof. Dr. Helio Langoni, Prof. Dr. Izidoro Francisco Sartor, Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira, Prof. Dr. José Luiz de Mello Nicoletti, Prof. Dr. Julio Lopes Sequeira, Profa. Dra. Michiko Sakate, Profa. Dra. Noeme Sousa Rocha, Prof. Dr. Roberto Calderon Gonçalves, Prof. Dr. Stélio Pacca Loureiro Luna que por meio de seus ensinamentos em suas disciplinas engrandeceram meus conhecimentos científicos.

À Professora Titular Eunice Oba, Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Universidade do Estado de São Paulo – FMVZ/UNESP, Botucatu, pelo incentivo e atenção em seus ensinamentos para a dosagem sérica de cortisol dos bovinos por meio da técnica de radioimunoensaio em fase sólida.

*Ao Professor Titular Dr. Pedro de Magalhães Padilha, Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências da Universidade do Estado de São Paulo, Botucatu, pelas orientações nas dosagens de selênio séricas e na *Brachiaria decumbens*.*

À doutora Neuza Maria Frazatti Gallina do Laboratório de Raiva do Instituto Butantan, São Paulo, pelo incentivo e atenção em seus ensinamentos para a determinação dos títulos de anticorpos anti-rábicos por meio da técnica de soroneutralização em células BHK₂₁ (RFFIT).

Aos professores titulares da banca de defesa Dr. Roberto Calderon Gonçalves - FMVZ/UNESP, Dr. Rogério Martins Amorim – FMVZ/UNESP, Dr. Jose Giometti – UNOESTE e Dr. Laurenil Gaste – UEL e aos professores suplementes Dr. Ivan Roque de Barros Filho (UFPR), Dr. Luis Carlos Vianna (UNOESTE) e Dr. Raimundo Souza Lopes (FMVZ-UNESP) que por meio de suas sugestões e correções engrandeceram minha tese.

Ao Professor Doutor Paulo Eduardo Pardo, Departamento de Clínica Médica da Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, pelo apoio e incentivo para a realização desta pesquisa.

À Seção de Pós-Graduação em Medicina Veterinária em especial: a Denise Aparecida Fioravanti Garcia, Maria Aparecida Dias de Almeida Manoel e José Roberto de Lalla Júnior pelos seus atendimentos durante o curso.

Às bibliotecárias Luciana Pizzani e Selma Maria de Jesus pelas correções das referências bibliográficas.

À empresa Matsuda Sementes e Nutrição Animal pelo incentivo, apoio e patrocínio desta pesquisa.

À Professora Doutora Cecília Laposy Santarém, Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário da Universidade do Oeste Paulista, pelas orientações para o transporte, centrifugação do sangue dos bovinos, obtenção e armazenamento do soro sanguíneo.

Ao publicitário Fernando Souza Lima Benez da empresa OUZ Propaganda, Marília, São Paulo pelo tratamento das imagens.

Aos peões Sinivaldo, Gilberto e Sidnei da Fazenda Barro Branco pela contribuição no manejo dos bovinos durante a fase prática deste experimento.

O senhor fez sair da terra os medicamentos,

Deu aos homens a ciência para que pudessem honrá-lo com suas maravilhas,

Assim, suas obras não ficam inacabadas e a saúde se difunde sobre a terra.

Ecleseaste 38-4,6 e 8

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Programa de atomização para determinação de Selênio pela absorção atômica em forno de grafite.....	34
Tabela 2:	Médias (\pm dp) da concentração sérica de Se de bovinos da raça Nelore suplementados <i>ad libitum</i> com 0 (Gc), 3,6 (G _{3,6}), 5,4 (G _{5,4}) e 6,4 (G _{6,4}) mg de Se/bovino/dia.....	39
Tabela 3:	Médias (\pm dp) da concentração sérica de cortisol de bovinos da raça Nelore suplementados <i>ad libitum</i> com 0 (Gc), 3,6 (G _{3,6}), 5,4 (G _{5,4}) e 6,4 (G _{6,4}) mg de Se/bovino/dia.....	42
Tabela 4:	Medianas (\pm quartil) da concentração sérica de cortisol de bovinos da raça Nelore suplementados <i>ad libitum</i> com 0 (Gc), 3,6 (G _{3,6}), 5,4 (G _{5,4}) e 6,4 (G _{6,4}) mg de Se/bovino/dia.....	45
Tabela 5:	Coeficientes de correlação (r_s) entre as concentrações séricas de cortisol e selênio.....	48
Tabela 6:	Coeficientes de correlação (r_s) entre as concentrações séricas de selênio e títulos de anticorpos anti-rábicos.....	48
Tabela 7:	Coeficientes de correlação (R) entre as concentrações séricas de cortisol e títulos de anticorpos anti-rábicos.....	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Grupos experimentais a) bovinos do grupo $G_{3,6}$; b) bovinos do grupo $G_{5,4}$; c) bovinos do grupo $G_{6,4}$; d) bovinos do grupo G_c	29
Figura 2:	Piquetes a) piquete I; b) piquete II; c) piquete III; d) piquete IV....	30
Figura 3:	Cocho de sal a) cocho de sal utilizado no experimento; b) localização cocho de sal.....	31
Figura 4:	Colheita de sangue.....	33
Figura 5:	Amostras de sangue.....	33
Figura 6:	Centrifugação das amostras de sangue.....	33
Figura 7:	Amostras do soro sanguíneo.....	33
Figura 8:	Kit radioimunoensaio em fase sólida.....	36
Figura 9:	Contador Auto-Gamma Count Cobra II.....	36
Figura 10:	Efeito da suplementação <i>ad libitum</i> com 0 (G_c), 3,6 ($G_{3,6}$), 5,4 ($G_{5,4}$) e 6,4 ($G_{6,4}$) mg de Se/bovino/dia na concentração sérica de Se (\pm dp) de bovinos da raça Nelore.....	40
Figura 11:	Efeito do tempo de suplementação <i>ad libitum</i> (0, 60 e 120 dias) com 0 (G_c), 3,6 ($G_{3,6}$), 5,4 ($G_{5,4}$) e 6,4 ($G_{6,4}$) mg de Se/bovino/dia na concentração sérica de Se (\pm dp) de bovinos da raça Nelore.....	41
Figura 12:	Efeito da suplementação <i>ad libitum</i> com 0 (G_c), 3,6 ($G_{3,6}$), 5,4 ($G_{5,4}$) e 6,4 ($G_{6,4}$) mg de Se/bovino/dia na concentração sérica	43

- de cortisol (\pm dp) de bovinos da raça Nelore.....
- Figura 13: Efeito do manejo no curral na concentração sérica de cortisol (\pm dp) de bovinos da raça Nelore suplementados *ad libitum* com 0 (Gc), 3,6 (G_{3,6}), 5,4 (G_{5,4}) e 6,4 (G_{6,4}) mg de Se/bovino/dia depois de repetidos manejos nos dias 0, 15, 30, 60, 90 e 120..... 44
- Figura 14: Efeito da suplementação *ad libitum* com 0 (Gc), 3,6 (G_{3,6}), 5,4 (G_{5,4}) e 6,4 (G_{6,4}) mg de Se/bovino/dia nos títulos de anticorpos anti-rábicos (+ quartil) de bovinos da raça Nelore primovacinaados contra a raiva..... 46
- Figura 15: Efeito do tempo de suplementação *ad libitum* com 0 (Gc), 3,6 (G_{3,6}), 5,4 (G_{5,4}) e 6,4 (G_{6,4}) mg de Se/bovino/dia no título de anticorpos anti-rábicos (\pm quartil) de bovinos da raça Nelore..... 47

LISTA DE ABREVIações

ACTH = hormônio adrenocorticotrófico

AVP = vasopressina

CRH = hormônio liberador de corticotrofina

°C = graus Celsius

CO₂ = gás carbônico

dL = decilitro

Eixo HPA = eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

Eixo HPG = eixo hipotálamo-hipófise-gonadal

FSH = hormônio folículo estimulante

g = gramas

Gc = grupo de animais controle

GH = hormônio do crescimento

GnRH = hormônio liberador de gonadotrofina

GSH-Px = glutathiona peroxidase

G_{3,6} = grupo de animais que foram suplementados *ad libitum* com 3,6 mg de Se/animal/dia

G_{5,4} = grupo de animais que foram suplementados *ad libitum* com 5,4 mg de Se/animal/dia

G_{6,4} = grupo de animais que foram suplementados *ad libitum* com 6,4 mg de Se/animal/dia

H = análise de variância de Kruskal-Wallis

IL-1 = interleucina 1

IL-2 = interleucina 2

Kg = Kilograma

L = litro

LH = hormônio luteinizante

m = metro

mA = miliampère

mg = miligrama

mL = mililitro

mm = milímetro

nm = nanômetro

nmol = nanomol

NNP = nitrogênio não proteico

NRC = National Research Council

OMS = Organização Mundial de Saúde

PBS = *Phosphate-buffered saline*

pH = potencial hidrogeniônico

PV = peso vivo

R = correlação para amostras não paramétricas de Spearman

rpm = rotação por minuto

r_s = correlação de Spearman

Se = selênio

SNS = sistema nervoso autônomo simpático

Teste LSD = *Least Significance Difference test*

Teste NIH = *National Institutes of Health test*

UI = Unidade Internacional

U.A. = unidade animal

vírus PV = *Pasteur virus*

v/v = volume por volume

χ^2_r = análise de variância de Friedman

μg = micrograma

μL = microlitro

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Selênio.....	3
2.2 Raiva.....	9
2.3 Estresse.....	15
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4 RESULTADOS.....	39
4.1 Concentração de selênio na <i>Brachiaria decumbens</i>	39
4.2 Concentração sérica de selênio.....	39
4.3 Concentração sérica de cortisol.....	41
4.4 Títulos de anticorpos neutralizantes anti-rábicos.....	44
4.5 Correlação entre as concentrações séricas de selênio e cortisol...	48
4.6 Correlação entre as concentrações séricas de selênio e títulos de anticorpos anti-rábicos.....	48
4.7 Correlação entre as concentrações séricas de cortisol e títulos de anticorpos anti-rábicos.....	49
5 DISCUSSÃO.....	50
5.1 Concentração de selênio na <i>Brachiaria decumbens</i>	50
5.2 Concentração sérica de selênio.....	51
5.3 Concentração sérica de cortisol.....	53
5.4 Títulos de anticorpos anti-rábicos.....	56
5.5 Associação entre concentração sérica de cortisol e títulos de anticorpos anti-rábicos.....	60
6 CONCLUSÕES.....	63
7 REFERÊNCIAS.....	64

Capítulo 1 The Veterinary Record Instructions for Authors.....	93
Capítulo 2 The Australian Veterinary Journal Instructions for Authors.....	97
Capítulo 3 Trabalho científico: Effects of selenium supplementation on serum cortisol concentrations in bovine repeatedly handled.....	113
Capítulo 4 Trabalho científico: Selenium supplementation promotes the persistence of rabies antibody titers in cattle.....	131

REIS, L.S.L.S. **Efeito das suplementações de selênio na resposta imune humoral anti-rábica, na concentração sérica de selênio e do cortisol em bovinos.** Botucatu, 2008. 134p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade do Estado de São Paulo.

RESUMO

O objetivo do experimento foi avaliar o efeito de diferentes suplementações com selênio (Se) sobre a resposta imune humoral anti-rábica, na concentração sérica de selênio e cortisol em bovinos. Utilizou-se sessenta bovinos machos não castrados da raça Nelore, com 10 a 12 meses de idade, alimentados com pastagem de *Brachiaria decumbens*. Os animais foram divididos em 4 grupos (N=15) sendo que o primeiro deles não receberam suplementação (Gc) e os outros três suplementados diariamente e individualmente com concentrações de Se de 3,6 mg (G_{3,6}), 5,4 mg (G_{5,4}) ou 6,4 mg (G_{6,4}). Os animais foram imunizados no dia zero com uma dose de vacina anti-rábica comercial, líquida e inativada. Nos dias zero, 15, 30, 60, 90 e 120 durante os quais submetidos ao estresse de manejo no curral e colheita de sangue. As amostras de sangue foram colhidas depois da vacinação e depois de serem submetidos ao estresse para determinação da concentração sérica de selênio, títulos de anticorpos anti-rábicos e cortisol sérico. A concentração de selênio também foi determinada nas amostras das forrageiras colhidas dos piquetes utilizados pelos bovinos. A concentração de Se na *B. decumbens* foi de 0,04 mg de Se/Kg de matéria seca. A concentração sérica de Se obtida no dia zero no grupo Gc era mais elevada que nos grupos G_{5,4} e G_{6,4} (P= 0,005). A concentração sérica de Se diminuiu ao longo do experimento no Gc (P<0,004), aumentou no G_{3,6} (P<0,000) e no grupo G_{5,4} (P<0,000), entretanto, no grupo G_{6,4} aumentou no dia 60 (P<0,002). Os títulos de anticorpos anti-rábicos não diferiram entre os grupos tratados ou não com selênio. Entretanto, 120 dias após a vacinação os títulos de anticorpos no grupo G_{3,6} permaneceram acima do mínimo considerado protetor (=0,5 UI/mL) (P<0,000), enquanto que nos outros grupos permaneceram baixos (P<0,05). A concentração sérica de cortisol dos bovinos não diferiu ao longo do experimento (P=0,79), atingindo

um pico no dia 90 e voltando a valores próximos da normalidade no dia 120 ($P < 0,01$). Não houve correlação entre a concentração sérica de Se e cortisol. Concentração sérica de cortisol e títulos de anticorpos anti-rábicos estarem correlacionados no grupo $G_{6,4}$, no dia 60 ($R=0,513$; $P=0,050$) e 120 ($R=0,644$; $P=0,009$). A concentração sérica de Se e os títulos de anticorpos anti-rábicos se correlacionaram no grupo $G_{6,4}$, no dia 60 ($R=-0,580$; $P=0,023$). Conclui-se que: a) o perfil de variação do Se sérico é diferente entre os grupos que receberam diferentes concentrações deste elemento; b) a suplementação com 3,6 mg de Se por animal por dia é eficiente para tratamento e/ou prevenção da deficiência marginal de Se; c) a suplementação diária com 3,6 mg de Se por animal manteve os títulos de anticorpos anti-rábicos; d) a suplementação diária com 3,6; 5,4 e 6,4 mg de Se por animal é ineficaz para reduzir a concentração sérica de cortisol; e) repetidos manejos dos bovinos no curral estressam os animais, embora estes adaptem-se a estas condições, mas o cortisol sérico não volta aos valores basais até os 120 dias e f) O estresse gerado pelos repetidos manejos nos bovinos no curral não diminui os títulos de anticorpos após a vacinação anti-rábica.

Palavras-chave: selênio, anticorpos anti-rábicos, cortisol, suplemento mineral, bovino.

REIS, L.S.L.S. **Effects of selenium supplementation on cattle antirabies humoral immune response and levels of serum selenium and cortisol.** Botucatu, 2008. 134p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucau, Universidade do Estado de São Paulo.

ABSTRACT

This study evaluated the effect of different concentrations of selenium (Se) supplementation on cattle antirabies humoral immune response, serum Se concentrations and cortisol levels. Sixty uncastrated male Nelore calves from 10 to 12 months grazing on *Brachiaria decumbens* forage were studied. The animals were assigned to one of four groups (N=15 each), which received non-supplemented diets (G_c) or supplemented with daily and individual Se concentrations of 3.6 mg (G_{3.6}), 5.4 mg (G_{5.4}) or 6.4 mg (G_{6.4}). The animals were immunized on day 0 with one dose of commercial liquid inactivated rabies vaccination. On days 15, 30, 60, 90 and 120, the cattle underwent the same stressing procedures used for vaccination in the corral. Cattle blood samples were collected after vaccination and stressing procedures to determine serum Se levels, rabies antibody titers and serum cortisol. Se levels were also determined in forage samples collected from the paddocks in which the cattle were held. Se concentration in *B. decumbens* was 0.04 mg of Se/Kg dry matter. Baseline Se levels obtained on day 0 were higher in G_c than in G_{5.4} and G_{6.4} (P= 0.005). Serum Se levels decreased in G_c throughout the experiment (P<0.004), increased in G_{3.6} (P<0.000) and G_{5.4} (P<0.000) and were kept high from day 60 on in group G_{6.4} (P<0.002). Rabies antibody titers did not differ between control and supplemented groups. However, 120 post-vaccination rabies antibody titers were kept above the protective levels (=0.5 UI/mL) only in group G_{3.6} (P<0.00002), whereas they dropped in the other groups (P<0.05). Serum cortisol levels did not differ among the experimental groups (P=0.79), reached peak levels on day 90 and returned close to baseline levels on day 120. Se and cortisol levels were not markedly correlated. Serum cortisol and rabies antibody titers were correlated only in group G_{6.4}, on day 60 (R=0.513; P=0.05) and 120 (R=0.644; P=0.009). Serum Se and rabies antibody titers were

correlated only in group G_{6.4}, on day 60 ($R=-0,580$; $P= 0,023$). In conclusion: a) the profile of Se variation is different among groups receiving different concentrations of this element; b) the supplementation dosage of 3.6 mg Se/animal/day is efficient to treat/prevent marginal Se deficiency; c) individual supplementation with daily concentrations of 3.6 mg Se enhances the maintenance of rabies antibody titers in cattle; d) individual supplementation with daily concentrations of 3,6; 5,4 and 6.4 mg Se are ineffective in reducing serum cortisol; e) repeated cattle handling in corrals stress animals that adapt to these procedures, although serum cortisol does not return to baseline levels by 120 days; and f) the stress generated by repeated managements in cattle in the corral does not diminish the titles of antibodies after vaccination against rabies.

Key-words: Selenium, rabies antibodies, cortisol, mineral supplement, bovine.

1 Introdução

A criação de gado de corte é uma das principais atividades agropecuárias no Brasil. Mesmo assim, é constantemente ameaçada por zoonoses como a raiva, que traz sérios prejuízos econômicos. A raiva é uma das principais moléstias que acometem o gado, pois além de ser muito grave tem distribuição mundial. Essa infecção viral ataca o sistema nervoso central de mamíferos causando encefalite fatal e sem tratamento em praticamente todos os casos (LIMA et al. 2005; ALBAS et al., 2006). Anualmente, 30 a 40 mil bovinos morrem de infecção rábica no Brasil, perda essa que acarreta prejuízos diretos de 15 milhões de dólares e indiretos de 22,5 milhões de dólares (LIMA et al. 2005; ALBAS et al., 2006).

A vacinação anti-rábica é o melhor método de prevenção e controle da raiva bovina, pois tem baixo custo e é eficiente, podendo chegar a proteger 100% dos animais. Porém, os procedimentos de manejo do gado durante a vacinação comumente causam estresse, um efeito colateral indesejado. Os procedimentos para vacinação envolvem agentes e situações estressoras, tais como condução do gado do pasto para o curral (STANGER et al., 2005), manejo dentro do curral (HICKEY et al., 2003), presença de pessoas (HEMSWORTH et al., 2002) e a própria aplicação da vacina (NOCKELS et al., 1996).

Estímulos estressores ativam o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, o qual aumenta a liberação do hormônio cortisol na corrente sanguínea (CHARMANDARI et al., 2005; CURLEY Jr. et al., 2008). O aumento de cortisol pode reduzir a resposta imunológica dos animais a microrganismos, bem como a produção de anticorpos após a vacinação (TIZARD, 2002a). Assim, o estresse pode reduzir a eficiência da vacinação de bovinos deixando-os susceptíveis às doenças infecto-contagiosas. Isso foi observado em bovinos que, após serem submetidos a estresse de isolamento social, tiveram a resposta à infecção experimental com herpesvírus bovino 1 (BHV 1) prejudicada (VAN REENEN et al., 2000). Por outro lado, o estresse gerado por transporte não afeta a resposta imune humoral de bovinos contra a leucotoxina da *Mannheimia haemolytica* (WERNICKI et al., 2003). Nesse cenário, nada se sabe sobre os efeitos do estresse na resposta imune humoral anti-rábica de bovinos vacinados contra a raiva.

Alguns elementos minerais podem ser utilizados para estimular e melhorar o funcionamento do sistema imunológico. É o caso do selênio (Se), que participa da produção de anticorpos (CARROL e FOSBERG, 2007) além de proteger leucócitos e macrófagos dos radicais livres formados durante a fagocitose de agentes patogênicos (CARVALHO et al., 2003). Essa proteção é conferida por selenoproteínas, que são proteínas constituídas por Se. A glutathione peroxidase é a principal selenoproteína que atua na manutenção da função e integridade de membranas celulares e tecidos. A glutathione peroxidase participa do sistema antioxidante que combate o estresse celular convertendo radicais livres (peróxidos de hidrogênio e lipoperóxidos) em água e oxigênio ou hidroperóxidos de ácidos graxos não tóxicos (CARROL e FOSBERG, 2007).

O Se promove benefícios ao gado apenas quando administrado em concentrações adequadas para cada categoria de desenvolvimento animal (NRC, 1996). Concentrações abaixo do normal causam deficiência de Se, enquanto concentrações acima do recomendado podem causar intoxicação dos bovinos (NRC, 1996). Apesar da importância de se determinar concentrações ótimas de suplementação com Se, esse assunto não é bem estudado em bovinos da raça Nelore, mesmo porque os principais sistemas de nutrição de bovinos como o National Research Council (NRC) são desenvolvidos para raças taurinas. Isso é particularmente muito preocupante para pecuária brasileira porque o gado Nelore é a principal raça de bovinos de corte criada no país.

Considerando o papel do Se no combate ao estresse oxidativo celular, é esperado que os efeitos desse elemento tenham impacto no organismo como um todo, beneficiando a resposta ao estresse causado por agentes físicos, psicológicos e metabólicos. Além disso, por participar da produção de anticorpos, é possível ainda que o Se melhore a resposta imune humoral anti-rábica. Visto que esses assuntos ainda são poucos estudados, o objetivo deste trabalho foi de avaliar o efeito de diferentes suplementações com Se na concentração sérica de selênio, na concentração sérica de cortisol, na resposta imune humoral anti-rábica e a associação entre concentração sérica de cortisol e títulos de anticorpos anti-rábicos em bovinos da raça Nelore primovacinados contra a raiva.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Selênio

O Selênio (Se) é um micromineral essencial para os animais e os seres humanos (HINTZE et al., 2002; HAWKES et al., 2003; KOMMISRUD et al., 2005; HADDAD e ALVES, 2006; MURPHY et al., 2006; PASCHOAL et al., 2006) que atua concomitantemente com a vitamina E (HADDAD e ALVES, 2006; PASCHOAL et al., 2006). Este elemento mineral é integrante de várias selenoproteínas, entre elas, a glutathiona peroxidase (GSH-Px) que faz parte do sistema antioxidante das células (ENJALBERT et al., 1999; IVANCIC e WEISS, 2001; ROWNTREE et al., 2004; KOMMISRUD et al., 2005; HADDAD e ALVES, 2006; PASCHOAL et al., 2006).

O Se é absorvido no duodeno e ceco e é transportado pelas proteínas plasmáticas para os tecidos. No rim é encontrada a maior concentração deste mineral seguido pelo fígado, baço e pâncreas. A lã e o pelo também possui elevada concentração de Se. Enquanto que o sistema nervoso possui baixa concentração deste micromineral. Este elemento mineral é excretado pelas fezes, urina e exalado (McDOWELL, 1992).

O Se passa a barreira placentária ficando disponível para o feto (ENJALBERT et al., 1999) como também a barreira da glândula mamária chegando ao colostro e leite (McDOWELL, 1992).

A GSH-Px atua destruindo o peróxido de hidrogênio e os lipoperóxidos que são formados durante o metabolismo celular normal convertendo-os em água e oxigênio e também a hidróxidos de ácidos graxos não-tóxicos (SMITH, 1994; RADOSTITS et al., 2002; KOMMISRUD et al., 2005; PASCHOAL et al., 2006). Enquanto que a vitamina E é ativa como antioxidante lipossolúvel da membrana celular, atua “limpando” os radicais livres que poderia reagir com ácidos graxos insaturados formando os hidroperóxidos lipídicos, e assim, esta vitamina evita a formação dos hidroperóxidos de ácidos graxos (RADOSTITS et al., 2002). Desta forma, protege a integridade das membranas das células (KOMMISRUD et al., 2005; HADDAD e ALVES, 2006; PASCHOAL et al., 2006) mantendo a integridade celular e dos tecidos (CARVALHO et al., 2003; KOMMISRUD et al., 2005; PASCHOAL et al., 2006) contra a oxidação tecidual (CARVALHO et al., 2003; GUNTER et al., 2003; ROWNTREE et al., 2004;

KOMMISRUUD et al., 2005; HADDAD e ALVES, 2006) que provoca degeneração e necrose celular (RADOSTITS et al., 2002a; PASCHOAL et al., 2006).

O Se também é necessário para o bom funcionamento do sistema imunológico, pois ele protege os neutrófilos e os macrófagos das substâncias tóxicas advindas da morte das bactérias durante o processo de fagocitose e com isso, estas células fagocitam quantidade maior de patógenos. Além disso, participa da produção de anticorpos (McDOWELL, 1992; MURPHY et al., 2006). Em consequência, eleva a resposta imune (HINTZE et al., 2002; PASCHOAL et al., 2003; KOMMISRUUD et al., 2005; HADDAD e ALVES, 2006) conferindo nos animais maior resistência frente aos agentes patogênicos.

A influência do Se na saúde da glândula mamária está relacionada com a função protetora dos neutrófilos e os macrófagos, sobre os danos oxidativos das substâncias tóxicas advindas da morte das bactérias, durante o processo de fagocitose, que é desempenhado pela GSH-Px (KOMMISRUUD et al., 2005; MURPHY et al., 2006; PASCHOAL et al., 2006).

No sistema reprodutor dos animais o Se é parte integrante da enzima glutathiona peroxidase que está presente nos espermatozóides, ovócitos e folículos protegendo as suas membranas contra os danos oxidativos provocados pelos radicais livres que provocam a ruptura ou causam danos irreparáveis dessas membranas. Este elemento mineral ainda participa da manutenção das condições uterinas para sobrevivências dos espermatozóides e do embrião por meio da sua ação antioxidante e da participação no metabolismo da progesterona (CARVALHO et al., 2003; HADDAD e ALVES, 2006).

O Se ainda é de fundamental para a iodotironina desidrogenase (ID) que regula a conversão da tiroxina (T_4) a 3,3,5, triiodotironina (T_3), hormônio tireoideano ativo (ROWNTREE et al., 2004; KOMMISRUUD et al., 2005; HADDAD e ALVES, 2006).

2.1.1 Indicação da suplementação com Se

O selênio é indicado como suplemento alimentar nas seguintes situações: prevenção e tratamento da distrofia muscular nutricional (ORTOLANI, 1999);

como promotor de crescimento (REIS et al., 2008) e da produção de leite (KNOWLES et al., 1999); agente imunestimulante; na prevenção e controle da incidência de mastite (PASCHOAL et al., 2003; KOMMISRUD et al., 2005; ENJALBERT et al., 2006; MURPHY et al., 2006). Smith et al. (1984) observaram redução na incidência de mastite na ordem de 46%; para a redução da contagem de células somáticas no leite (HEMMINGWAY et al., 2000; SPEARS, 2000; KOMMISRUD et al., 2005); para a redução da incidência de retenção de placenta, cistos ovarianos e metrite (ENJALBERT et al., 1999; IVANCIC e WEISS, 2001; HEMINGWAY, 2003; KOMMISRUD et al., 2005); na melhora da qualidade do sêmen e para a redução da incidência de animais com lesões musculares (creatina kinase acima da normalidade) (REIS et al. 2007).

2.1.2 Requerimento de Se na alimentação

O requerimento de Se na alimentação para bovinos de corte é de 0,1 mg de Se/Kg de matéria seca segundo o NRC (1996) e Radostits et al. (2002).

2.1.3 Fatores que interferem na necessidade nutricional de Se

A necessidade nutricional de Se pode ser influenciada por vários fatores, entre eles estão: duração da suplementação (GIERUS et al., 2002), a fonte de Se utilizada (NRC, 1996), interação do Se com a dieta (GIERUS et al., 2002): baixa concentração de vitamina E na dieta, elevada concentração de ácidos graxos insaturados e animais criados em condições de estresse requerem maior concentração de Se na dieta (NRC, 1996).

2.1.4 Deficiência de Se

A deficiência de Se ocorre nos animais quando sua dieta contém concentrações deficientes deste elemento mineral e/ou vitamina E como também em dietas com elevada concentração de ácidos graxos insaturados (NRC, 1996; RADOSTITS et al., 2002).

Nos bovinos, a deficiência de Se é considerada um dos maiores problemas na bovinocultura (MORAES, 2001) e pode provocar a morte de até 100% dos animais acometidos (ANDREWS, 1992) podendo ocorrer em quase todas as regiões do mundo.

Nos bovinos a deficiência de Se causa a doença do músculo branco ou distrofia muscular nutricional (IVANCIC e WEISS, 2001; ENJALBERT et al., 1999; ABUTARBUSH e RADOSTITS, 2003; KOMMISRUD et al., 2005; ENJALBERT et al., 2006). Além disso, reduz à taxa de crescimento, o ganho de peso, (TOKARNIA et al., 1999; PEIXOTO et al., 2003; REIS et al., 2008; KOMMISRUD et al., 2005) e a produção de leite (TOKARNIA et al., 1999; PEIXOTO et al., 2003). Ainda, aumenta a incidência de retenção de placenta, metrite e cistos ovarianos (ENJALBERT et al., 1999; IVANCIC e WEISS, 2001; HEMMINGWAY, 2003; KOMMISRUD et al., 2005) que conseqüentemente, reduz a taxa de concepção (ENJALBERT et al., 2006).

A deficiência de Se também reduzir a atividade do sistema imunológico (ENJALBERT et al., 1999) expondo os animais a contraírem as doenças infecto-contagiosas (SPEARS, 2000; GUNTER et al., 2003; ENJALBERT et al., 2006).

2.1.5 Tratamento da deficiência de Se

Para o tratamento da distrofia muscular nutricional em bovinos e eqüinos recomenda-se a administração de Se na dose de 0,055 a 0,067 mg de Se/Kg de peso vivo administrado por via intramuscular ou subcutânea (SMITH, 1994; RADOSTITS et al., 2002) e 150 Unidades Internacionais de acetato de DL-a-tocoferol/mL por via intramuscular (RADOSTITS et al., 2002).

No entanto, este tratamento às vezes não é efetivo, principalmente nos casos de acometimento grave do coração. Assim a prevenção da deficiência de Se é a mais indicada (ENJALBERT et al., 1999; ORTOLANI, 1999; RADOSTITS et al., 2002).

2.1.6 Formas de suplementação para prevenção e controle da deficiência de Se

A concentração de Se nos alimentos é muito variável, pois depende da quantidade de Se disponível no solo, pH do solo e da capacidade da planta forrageira acumular o mineral (GIERUS et al., 2002). Assim, é necessário realizar as práticas de prevenção da deficiência de Se, que podem ser realizadas de várias formas:

2.1.6.1 Administração de suplementos minerais contendo Se: a administração de Se aos animais por meio de mistura mineral é utilizada quando a dieta total é deficiente no mineral. Este método de suplementação de Se é o mais barato, prático e de melhor custo/benefício (ENJALBERT et al, 1999; CARVALHO et al., 2003). Nele a mistura mineral é de uso contínuo e fornecido aos bovinos em cochos de forma *ad libitum*. No entanto, para o sucesso desta prática é necessário atentar-se para alguns quesitos como: a altura do o cocho de sal deve estar a 50 cm de altura do solo nos pastos de maternidade e nos pastos de recreia de 60 a 70 cm de altura e nos pastos dos animais adultos a 100 cm de altura. A largura do topo e profundidade do cocho de sal igual a 40 cm e a largura do fundo igual a 30 cm. Ainda, o dimensionamento mínimo do cocho será igual a 4 cm linear de cocho para cada 450 Kg de peso vivo de bovino (ASBRAM, 2003).

- Para bovinos de leite recomenda-se a suplementação de vacas em lactação e prenhes, com 5 a 7 mg de Se/animal/dia (NRC, 2001).

- Para prevenção da retenção de placenta em bovinos recomenda-se a suplementação com 4 mg de Se/animal/dia, durante os períodos de transição, 3 semanas antes e após o parto (MURPHY, 2006).

2.1.6.2 Injeções de Se na dose de 10 mg para bezerros, administrados com intervalo de 30 dias entre as aplicações (RADOSTITS et al., 2002). Este método de suplementação de Se tem seu efeito por um período curto de tempo, além de ser de custo elevado.

2.1.6.3 Balas de Se de liberação lenta para: os bovinos, as balas necessitam conter 10% de Se que deverão liberar 3 mg de Se (RADOSTITS et al., 2002). Ela é engolida pelo animal permanecendo por vários meses no rúmen-retículo, liberando gradativamente o mineral nela presente, suprimindo as necessidades do animal. Entretanto, estas balas ainda não estão à venda no Brasil (CARVALHO et al., 2003).

2.1.6.4 Adubação da pastagem na dose de 10 gramas de Se/hectare pode ser eficiente por até 12 meses (RADOSTITS et al., 2002). No entanto, esta prática é de custo elevado (CARVALHO et al., 2003) e ainda, o aumento da concentração de Se nas plantas forrageiras, não depende somente da fertilização com este mineral, mas também do pH, do teor de sulfato presente no solo e da capacidade da planta em acumular Se (GIERUS et al., 2002; CARVALHO et al., 2003), requisitos nos quais as forrageiras tropicais não são muito eficientes (CARVALHO et al., 2003).

2.1.7 Intoxicação por Se

A intoxicação por Se é conhecida como selenose, acometendo em maior frequência os animais monogástricos, em especial os eqüinos e suínos, do que os ruminantes (ORTOLANI, 1999).

A selenose ocorre devido ao consumo excessivo de Se ou do consumo de plantas que possuem elevada concentração deste mineral. Segundo os resultados de pesquisa a intoxicação crônica de Se ocorre quando os animais consomem de 5 a 40 ppm de Se por longos períodos (NRC, 1996).

Os bovinos, quando intoxicados por Se apresentam: anorexia, ataxia (NRC, 1996), cegueira (CARVALHO et al., 2003), salivação (CARVALHO et al., 2003), pelos ásperos e sem brilho (CARVALHO et al., 2003), perda de pelos da cauda (NRC, 1996), deformações nos cascos, entre elas: alongamento e rachaduras (NRC, 1996; CARVALHO et al., 2003), claudicação (CARVALHO et al., 2003), cólica abdominal (CARVALHO et al., 2003), emaciação (NRC, 1996; CARVALHO et al., 2003), cirrose hepática (NRC, 1996; CARVALHO et al., 2003), nefrite (NRC, 1996), atrofia cardíaca (CARVALHO et al., 2003), letargia,

depressão (CARVALHO et al., 2003) e morte por falência respiratória (NRC, 1996).

2.1.8 Fontes de Se

A taxa de absorção de Se varia conforme as fontes utilizadas por ser influenciada pelo metabolismo ruminal (GIERUS, 2002).

Na literatura há vários trabalhos mostrando que a levedura de Se tem surtido melhores resultados na suplementação do que o selenito ou o selenato de sódio (ORTMAN e PEHRSON, 1997, 1999; PEHRSON et al., 1999; GUNTER et al., 2003).

As fontes de Se que são utilizadas freqüentemente são: o selenito de sódio com 45,7% de Se e o selenato de sódio que tem 41,8% de Se. Estas fontes de Se têm alta disponibilidade do elemento mineral. Além destas também pode ser utilizado a levedura de Se como fonte deste mineral (NICODEMO, 2001).

Vacas suplementadas com levedura enriquecida com Se apresentaram maior concentração deste elemento mineral no leite em relação às que foram suplementadas com selenito de sódio (ORTMAN e PEHRSON, 1997); transferindo maior concentração de Se para os bezerros, por via placentária (ORTMAN e PEHRSON, 1999; PEHRSON et al., 1999). Nas vacas e bezerros não só tiveram maior concentração sanguínea de Se como também aumentou a atividade da enzima glutathione peroxidase (GUNTER et al., 2003).

2.2 Raiva

A raiva é uma enfermidade infecciosa viral do sistema nervoso central dos mamíferos caracterizada por grave encefalite sem tratamento (INSTITUTO PASTEUR, 2002; UMEHARA et al., 2002; JACKSON et al., 2003; RIBAS et al., 2003; CHHABRA et al., 2004; FAVI et al., 2004). Essa encefalite fatal pode acometer qualquer mamífero, tem ampla distribuição geográfica e é considerada uma das mais importantes zoonoses mundiais (GIBBONS, 2002; CARAMORI JUNIOR et al., 2003; MANI et al., 2003; FRANKA et al., 2004; HANKINS e ROSEKRANS, 2004; LIMA et al., 2005; ALBAS et al., 2006).

A ocorrência de raiva em bovinos traz prejuízos econômicos diretos em vários países, principalmente nos da América Latina (ACHA e MALAGA–ALBA, 1988; OLIVEIRA et al., 2000) devido ao elevado número de casos, sendo a segunda espécie mais acometida depois da canina (CENTRO PAN-AMERICANO DE ZONÓSES, 1989; ALBAS et al., 2005). Os casos de raiva acontecem principalmente em regiões de ocorrência de morcegos hematófagos como Costa do Pacífico no Chile, Costa Atlântica no Uruguai e Sudeste do Brasil (BRASS, 1994). Na América Latina, a raiva mata cerca de 100 a 500 mil cabeças de gado por ano (LIMA et al., 2005), um prejuízo de aproximadamente 30 (ACHA e MALAGA – ALBA, 1988; OLIVEIRA et al., 2000) a 50 milhões de dólares (LIMA et al., 2005). Só no Brasil, a raiva mata de 30 a 40 mil bovinos por ano com prejuízos diretos na ordem de 15 milhões de dólares e indiretos de 22,5 milhões de dólares (OLIVEIRA et al., 2000; INSTITUTO PASTEUR, 2000a, b; INSTITUTO PASTEUR, 2002; PIZA et al., 2002; LIMA et al., 2005; ALBAS et al., 2006). Nos EUA, os custos estimados com a detecção, prevenção e controle da raiva excedem a 300 milhões de dólares por ano (CDC, 2000). Agravando a situação, essas perdas devem ser ainda maiores considerando-se que muitos animais mortos pela enfermidade não tem o diagnóstico confirmado por análises laboratoriais e, portanto, não são quantificados (MONTAÑO et al., 1987).

A raiva traz também prejuízos para a saúde pública. Hankins e Rosekrans (2004) relataram que, nos Estados Unidos, são tratadas anualmente de 25 a 40 mil pessoas expostas à raiva, e o custo desse tratamento supera 1.000 dólares por paciente. Dessa forma, o programa de controle da raiva deve ser intensificado por meio da imunização de toda população exposta ao risco de contato com os animais raivosos e da disseminação da doença entre esses animais (PASSOS et al.1998a).

A raiva é causada por vírus da ordem Mononegavirales, família Rhabdoviridae, gênero *Lyssavirus* (OLIVEIRA et al., 2000; ITO et al., 2001; MERCIER et al., 2002; QUEIROZ da SILVA, 2003; FRANKA et al., 2004; SATO et al., 2004; LIMA et al., 2005; SCHEFFER et al., 2007). São vírus neurotrópicos grandes (180 nm de comprimento e 75 nm de largura) e cilíndricos, com formato de bala de revólver (AMASINO et al., 2002; WU et al., 2002). Possuem envoltório e uma única cadeia de RNA (ETESSAMI et al.,

2000; ITO et al., 2001; MERCIER et al., 2002; SOARES et al., 2002; QUEIROZ da SILVA et al., 2003). Esses vírus são termolábeis e suscetíveis à degradação pela radiação ultravioleta, detergentes, enzimas proteolíticas, raios-X, por ácidos fortes, álcalis e pela maioria dos desinfetantes, solventes lipídicos e aniônicos. São sensíveis aos ácidos com $\text{pH} < 4$ e às bases com $\text{pH} > 10$. São inativados pelo calor, sobrevivendo 35 segundos a 60°C , 4 horas a 40°C e vários dias a 4°C (INSTITUTO PASTEUR, 2002). Análises do vírus isolado de animais e humanos mostram que ele tem numerosas variantes genéticas associadas aos diferentes reservatórios animais e suas regiões geográficas (DAVID et al., 1999; SERRA-COBO et al., 2002). Foram encontrados 7 sorotipos: Rabies virus, Lagos bat virus, Mokola vírus, Duvenhage vírus, Australian bat vírus (ABL) e dois genotipos European bat vírus (EBL), tipo 1 (EBL1) e tipo 2 (EBL2) (BADRANE et al., 2001; SERRA-COBO et al., 2002; VELASCO-VILLA et al., 2002; FOOKS et al., 2003; HANKINS e ROSEKRANS, 2004; HUGHES et al., 2004). Os mamíferos e os morcegos na América do Sul são infectados pelo vírus rábico clássico (RABV) ou sorotipo 1 (ECHEVARRIA et al., 2001). Após a inoculação subcutânea ou intradérmica, o vírus da raiva se multiplica localmente e, após diversos dias, migra para o sistema nervoso central por nervos periféricos, raízes espinhais e medula espinhal, produzindo assim a encefalite viral (INSTITUTO PASTEUR, 2002).

O vírus rábico tem cinco proteínas estruturais: núcleo proteína (N); fósforo proteína (P); matriz protéica (M); glicoproteína (G) e polimerase (L) (ALVES et al., 2003; McGETTIGAN et al., 2003; KANKANAMGE et al., 2003; SATO et al., 2004). Por serem proteínas complexas tornam o vírus rábico um bom indutor de imunidade quando comparado a outros vírus (ITO et al., 2001). A Glicoproteína G do envoltório viral tem também importante função na patogenicidade viral (ITO et al., 2001; KANKANAMGE et al., 2003; SATO et al., 2004). Essa proteína confere proteção à doença por ser o único antígeno capaz de induzir síntese de anticorpos neutralizantes e resposta imune no hospedeiro (ETESSAMI et al., 2000; MAILLARD e GAUDIN, 2002; PIZA et al., 2002; GUYATT, 2003; SATO et al., 2004). A glicoproteína ou antígeno N, detectado nas provas de diagnóstico de imunofluorescência, tem função secundária no reforço da imunidade. Essa proteína confere aos animais vacinados um bom nível de anticorpos e imunidade duradoura em situação de

campo (INSTITUTO PASTEUR, 2000a; ITO et al., 2001).

Os reservatórios mais eficientes do vírus rábico pertencem às ordens Quiróptera e Carnívora. Esses animais possuem características especiais para perpetuação do vírus rábico, tais como alta densidade populacional, grande capacidade de deslocamento e interações sociais intensas (GIBBONS, 2002; KOTAIT, 2003; HANKINS e ROSEKRANS, 2004; LANGONI et al., 2005; LIMA et al., 2005). Os animais contaminados transmitem o vírus rábico pela saliva, outros fluidos e por via transplacentária (DOMINGUES e LANGONI, 2001; INSTITUTO PASTEUR 2002; RIBAS et al., 2003; HANKINS e ROSEKRANS, 2004; LIMA et al., 2005). As transmissões por aerossóis em cavernas habitadas por morcegos são possíveis fontes de infecção para outros mamíferos (AUSTIN-SMITH, 1986). Em algumas situações, os portadores são inaparentes (DOMINGUES e LANGONI, 2001).

Os morcegos representam aproximadamente 24% de todas as espécies de mamíferos conhecidos. São freqüentemente os principais vetores do *Lyssavirus*. Os morcegos insetívoros desempenham uma função de especial importância na epidemiologia do vírus da raiva e alguns outros vírus afins (McCOLL e SETIEN, 2000). Os morcegos hematófagos, por sua parte, constituem o principal vetor selvagem da raiva na América Latina. Mais recentemente, tem sido estudado papel dos morcegos frugívoros na epidemiologia do microorganismo *Lyssavirus*, pois foi isolado este vírus nestes morcegos (McCOLL e SETIEN, 2000).

No Brasil, os morcegos hematófagos (principalmente o *Desmodus rotundus*) participam da cadeia epidemiológica da raiva transmitindo-a aos herbívoros domésticos (FAVORETTO et al., 2002; PIZA et al., 2002; LIMA et al., 2005; GOMES et al., 2006; SCHEFFER et al., 2007). Sendo os principais transmissores da raiva na América Latina (RODRIGUES da SILVA et al., 2000; McCOLL e SETIEN, 2000; SATO et al., 2004; ALBAS et al., 2006; SCHEFFER et al., 2007), infectam os animais ao se alimentarem de seu sangue (DOMINGUES e LANGONI, 2001; WRIGHT et al., 2002). A raiva se dissemina rapidamente entre os morcegos hematófagos, causando elevada mortalidade das populações desses animais. Devido à sua baixa taxa de reprodução as colônias se recuperam lentamente. Assim, o ciclo da raiva em morcegos tem curta duração, causa alta mortalidade e é recorrente (DELPIETRO et al., 2001).

É necessário ressaltar a importância dos morcegos na transmissão de raiva a herbívoros. Mas essa doença tem aumentado acentuadamente no Brasil, e para seu controle é preciso, além da redução sistemática da população de morcegos, a vacinação maciça dos animais, atendimento a focos e educação sanitária (OLIVEIRA et al., 2000; INSTITUTO PASTEUR, 2002; PIZA et al., 2002; CARRIERI et al., 2003; NOGUEIRA, 2003). Visto que diferentes sorotipos do gênero *Lyssavirus* são encontrados nas diferentes espécies de morcegos, há de se considerar ainda as variantes antigênicas do vírus da raiva no Brasil. São necessários mais estudos de amostras do vírus da raiva isolados de diferentes espécies de quirópteros para garantir a eficácia das vacinas convencionais frente às diferentes cepas, pois as variantes antigênicas podem influenciar a resposta imune humoral anti-rábica (INSTITUTO PASTEUR, 2002).

O risco de transmissão de raiva por morcegos é considerado alto independentemente do hábito alimentar (hematófago ou não) desses animais (RAMOS e RAMOS, 2001; AGUILAR-SETIÉN et al., 2002; LIMA et al., 2005). No Brasil, o vírus da raiva já foi isolado em 31 das aproximadamente 140 espécies de morcegos existentes (incluindo morcegos hematófagos, insetívoros, frugívoros e onívoros), reforçando que morcegos podem transmitir a raiva quaisquer sejam seus hábitos alimentares (PASSOS et al., 1999; INSTITUTO PASTEUR, 2000c; INSTITUTO PASTEUR, 2002; FOOKS et al., 2003). No Estado de São Paulo, as condições de meio ambiente favorecem o aumento da população de morcegos hematófagos, e por isso o controle da raiva exige aplicação de medidas criteriosas e efetivas para a redução da circulação do vírus entre as populações de quirópteros (PASSOS et al., 1998b, INSTITUTO PASTEUR, 2000c).

O *Desmodus rotundus* tem uma característica que é o intenso contato corporal dos indivíduos nas colônias, que se posicionam lado a lado e/ou uns sobre os outros, formando um grupo compacto, além do fato de realizarem limpeza mútua e regurgitação de alimento entre os membros do grupo (GOMES et al., 2006). Assim, atualmente, a medida oficial de controle baseia-se no extermínio de colônias de morcegos hematófagos por meio de aplicação de substância tóxica de ação lenta em alguns morcegos. Os morcegos são capturados e uma pasta com anticoagulante aplicada em seu dorso. Depois de

soltos, ao retornarem aos seus agrupamentos, contaminam e levam à morte os demais membros da colônia (GOMES et al., 2006). Contudo, esse método não é seletivo e pode matar colônias de morcegos não hematófagos (INSTITUTO PASTEUR, 2000c; RODRIGUES da SILVA et al., 2000; PIZA et al., 2002; ALBAS et al., 2006).

Os morcegos desempenham funções fundamentais nos ecossistemas de todo o planeta, especialmente no controle de pragas agrícolas e insetos disseminadores de doenças humanas e na polinização e dispersão de sementes em florestas (CDC, 2000). Conhecidas as principais funções dos morcegos, recomenda-se que se reduza seletivamente a sua população sem exterminá-los, mas apenas cortando a cadeia de transmissão da raiva (DELPIETRO et al., 2001).

Dadas as dificuldades para o controle de morcegos, a vacinação é o melhor meio de controle da raiva bovina (RODRIGUES da SILVA et al., 2000; AGUILAR-SETIÉN et al., 2002; PIZA et al., 2002; ALBAS et al., 2005; ALBAS et al., 2006). Preconiza-se que para o controle da raiva silvestre usa-se vacina anti-rábica oral (AGUILAR-SETIÉN et al., 2002). A vacina reduz perdas econômicas provocadas por enfermidades infecciosas e ajuda na manutenção da integridade das funções do organismo, que são indispensáveis para a ótima produção de leite e carne (MEGID, 2002). A vacinação é o método de controle mais efetivo, importante e de menor custo para reduzir as perdas causadas por doenças infecciosas (OLIVEIRA et al., 2000; QUEIROZ DA SILVA et al., 2002; FRANKA et al., 2004; HANKINS e ROSEKRANS, 2004; ALBAS et al., 2006). Nos últimos anos, grande parte das investigações sobre o controle da raiva silvestre tem se concentrado no desenvolvimento de métodos para a vacinação oral dos vetores selvagens dessa enfermidade (BROCHIER et al., 1996).

Há vários tipos de vacinas disponíveis no mercado, o que dificulta a escolha do procedimento mais indicado para uma efetiva imunização dos animais (OLIVEIRA et al., 2000). A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que se faça a avaliação da imunidade anti-rábica pela titulação de anticorpos, sendo a imunidade conferida por título igual ou maior que 0,5 UI/ml (ALMEIDA et al., 1997). A imunização pela vacina com microorganismos inativados pode ser ainda potencializada pela administração de um adjuvante

que estabeleça uma memória em longo prazo contra os antígenos solúveis (MEGID, 2002; TIZARD, 2002a, d).

Animais fortemente parasitados ou desnutridos podem ficar imunossuprimidos e não devem ser vacinados. A imunossupressão pode ser causada por infecções virais, fatores genéticos ou estressores em geral, incluindo prenhez, extremos de frio e calor, fadiga e fatores ambientais (TIZARD, 1998).

2.3 Estresse

O estresse é a resposta de um animal a um agente estressor (CARRASCO e VAN de KAR, 2003; NEGRÃO et al., 2004), isto é, a uma condição hostil. A resposta de estresse ativa o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) que desencadeia uma série de alterações no organismo. Essas respostas são necessárias para a adaptação e sobrevivência do animal a uma nova condição imposta (MATTERI et al., 2000; PACAK e PALKOVITS, 2001; CARRASCO e VAN de KAR, 2003; NEGRÃO et al., 2004).

A resposta aos agentes estressores envolve os sistemas neuroendócrino, imunológico, cardiovascular e gastrointestinal. Há alterações no comportamento do animal, no sistema nervoso autônomo e na secreção hormonal, incluindo os hormônios adrenocorticotrófico (ACTH), cortisol, as catecolaminas das glândulas adrenais, adrenalina e noradrenalina, ocitocina, prolactina e renina (VAN de KAR e BLAIR, 1999; CARRASCO e VAN de KAR, 2003). A resposta ao estresse envolve aumento da atenção do animal, mobilização de energia para manter o funcionamento do cérebro e músculos, perfusão e a utilização cerebral de glicose, aumento das frequências respiratória e cardiovascular, redistribuição do fluxo de sangue, modulação do sistema imunológico, inibição do sistema reprodutor e sexual e diminuição do apetite (SAPOLSKY et al., 2000; HABIB et al., 2001; CARRASCO e VAN de KAR, 2003).

As alterações fisiológicas provocadas durante o estado de estresse têm efeitos deletérios na produtividade de leite e carne (GRANDIN, 1997; ANDRADE et al., 2001; WEST, 2003) e no bem-estar dos animais. Elas reduzem o crescimento, a engorda, a reprodução, a produção de leite, a

qualidade da carne e o sistema imunológico (MORBERG, 2000; BORELL, 2001; GUYTON e HALL, 2002; COPPO et al., 2003; CHARMANDARI et al., 2005). O efeito do estresse é expressivo na produção de bovinos. Na Argentina, por exemplo, é responsável por uma perda econômica estimada em 50 milhões de dólares por ano (PERUCHENA, 1992; COPPO et al. 2003). Essas perdas são maiores em regimes modernos de criação, principalmente em sistemas intensivos que requerem alto investimento (ENCARNAÇÃO, 1989; DOBSON e SMITH, 2000). A exposição a vários agentes estressores desses sistemas aumenta a possibilidade de estresse (DOBSON e SMITH, 2000; VÁSQUEZ e HERRERA, 2003).

Definir estresse é difícil porque sua interpretação consiste do entendimento vários conceitos interligados. Ainda assim, o pioneiro Hans Selye descreveu os princípios gerais de fisiologia e fisiopatologia do estresse e também sua definição (CARRASCO e VAN de KAR., 2003), como mostrado a seguir.

2.3.1 Definição do Estresse

O estado de estresse é o estado do organismo o qual, após a atuação de agentes de quaisquer naturezas, responde com uma série de reações não específicas de adaptação iniciadas com respostas de hipertrofia do córtex das glândulas adrenais e conseqüente aumento na secreção dos seus hormônios (SELYE, 1936). Selye (1936) dividiu o estado de estresse do organismo em três estágios. O primeiro seria a expressão de um alarme geral do organismo quando subitamente confrontado com uma situação crítica. A partir do contato com o estressor, o organismo iniciaria um processo de adaptação a este agente, o que configura o segundo estágio. Permanecendo o contato com o fator promotor do estresse, o indivíduo perderia a capacidade de reagir e entraria no estágio de exaustão, o qual levaria às alterações orgânicas semelhantes ao primeiro estágio e que poderia levar à falência de órgão e a morte.

2.3.2 Agentes estressores

Selye (1936) denominou agente estressor todo fator exógeno que provoca o estado de estresse. Entretanto, mais recentemente os agentes estressores podem ser definidos como condições que põe em perigo ou são percebidas como perigosas à sobrevivência de um indivíduo (VAN de KAR e BLAIR, 1999; CARRASCO e VAN de KAR., 2003). Os agentes estressores podem ser divididos em três tipos: os psicológicos, que são condições adversas ameaçadoras que geram medo e ansiedade; os físicos, que agem fisicamente no animal (e podem atuar também como estressor psicológico); e metabólicos, que alteram a homeostase do organismo (VAN de KAR e BLAIR, 1999; CARRASCO e VAN de KAR, 2003).

Na criação de bovinos há vários agentes estressores comuns, como medo (GRANDIN, 1997; RUSHEN et al., 1999; LENSINK et al., 2000), hierarquia social entre os animais do lote (DOBSON e SMITH, 2000), exposição dos animais a um ambiente novo e desconhecido (GRANDIN, 1997; RUSHEN et al., 1999; LENSINK et al., 2000; ARTHINGTON et al., 2003), instalações (BORELL, 2001), transporte (EICHER, 2001; COPPO et al., 2003; VÁSQUEZ e HERRERA, 2003; YAGI et al., 2004; STANGER et al., 2005), confinamento (ENCARNAÇÃO, 1989; NDIBUALONJI et al., 1995), comportamento agonístico entre os animais (BLOOD e RADOSTITS, 1991), presença de pessoas estranhas (COOK et al., 2000; LENSINK et al., 2000; HICKEY et al., 2003), dor (BORELL, 2001), contenção ou imobilização do animal (PALMA et al., 2000; ANDRADE et al., 2001; HALE et al., 2003), captura (HOPSTER et al., 1999), marcação dos animais com ferro quente (RUSHEN, 1999; ANDRADE et al., 2001), qualquer tipo de trauma (BORELL, 2001; GUYTON e HALL, 2002; ARTHINGTON et al., 2003), choque (PALMA et al., 2000; HALE et al., 2003), manejo no curral (COOK et al., 2000; LENSINK et al., 2000; ANDRADE et al., 2001; HICKEY et al., 2003), fusão de lotes, onde a agressividade é aumentada pelo encontro de animais desconhecidos (MINTON, 1994; VEISSIER et al., 2001; GUPTA et al., 2005), superpopulação (MINTON, 1994; COPPO et al., 2003), isolamento (VAN REENEN et al., 2000; EICHER, 2001; GENARO et al., 2004), calor ou frio intenso (PALMA et al., 2000; BORELL, 2001; GUYTON e HALL, 2002; HALE et al., 2003; WEST, 2003; TOMASZEWSKI et al., 2005), intervenções cirúrgicas (COOK et al.,

2000; GUYTON e HALL, 2002) como castração (ANDRADE et al., 2001) e descorna (McMEEKAN et al., 1997; McMEEKAN et al., 1998; SUTHERLAND et al., 2002), doenças debilitantes como infecções, alterações metabólicas (GUYTON e HALL, 2002; ARTHINGTON et al., 2003; COPPO et al., 2003; VÁSQUEZ e HERRERA, 2003) e hipoglicemia (DOBSON e SMITH, 2000), gestação, parto e lactação (MALLARD et al., 1997; COPPO et al., 2003; VÁSQUEZ e HERRERA, 2003), desmame do bezerro (ARTHINGTON et al., 2003; BUENO et al., 2003; HICKEY et al., 2003), fome e sede (EICHER, 2001; BORELL, 2001; ARTHINGTON et al., 2003; VÁSQUEZ e HERRERA, 2003), vacinação (MINTON, 1994; NOCKELS et al., 1996), fatores genéticos (ANDRADE et al., 2001; BORELL, 2001) e exercício físico (GARCIA-BELENGUER et al., 1996).

2.3.3 Resposta neuro-endócrina de estresse

A resposta neuroendócrina ao estresse consiste na ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e conseqüente secreção dos hormônios das glândulas adrenais, entre eles o cortisol, a adrenalina e a noradrenalina (MATTERI et al., 2000; AGUILERA et al., 2001; CARRASCO e VAN DE KAR, 2003; HICKEY et al., 2003). Na ativação do eixo HPA ocorre inicialmente, a liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e da vassopressina (AVP) pelo hipotálamo; estes estimulam a adenohipófise (hipófise anterior) a produzir e secretar o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) que, por sua vez, estimula o córtex das glândulas adrenais a produzir e secretar glucocorticoides como o cortisol na corrente circulatória (DOBSON e SMITH, 2000; COVENTRY et al., 2001; HALE et al., 2003; SMITH et al., 2003; GENARO et al., 2004; YAGI et al., 2004; CHARMANDARI et al., 2005). A vassopressina liberada no estado de estresse atua sinergicamente ao CRH, potencializando assim a liberação do ACTH (SERRADEIL-LE GAL et al., 2001; CARRASCO e VAN de KAR, 2003; CHARMANDARI et al., 2005).

Durante o estresse há também aumento na secreção de opióides endógenos, entre eles as β -endorfinas (RUSHEN et al., 1999; COVENTRY et al., 2001; YAGI et al., 2004) que reduzem a sensibilidade da detecção da dor (RUSHEN et al., 1999). Também são secretados os hormônios: a prolactina e a

ocitocina que reduzem a produção de leite e a liberação do leite durante o estado de estresse (GRANDIN, 1997; RUSHEN et al., 1999).

A alta concentração de cortisol na corrente sanguínea regula a ativação do eixo HPA por “feedback” negativo, atuando sobre o hipotálamo e a hipófise de modo a reduzir a secreção de CRH e ACTH, respectivamente. Com a redução desses hormônios, há conseqüente diminuição na secreção dos hormônios das glândulas adrenais (DOBSON e SMITH, 2000; COVENTRY et al., 2001; CHARMANDARI et al., 2005), minimizando assim efeitos indesejáveis como processos catabólicos, lipolíticos, anti-reprodutivos e imunossupressores (CHARMANDARI et al., 2005).

O sistema nervoso autônomo simpático (SNS), que controla muitas funções do organismo, também responde rapidamente aos agentes estressores e controla muitas funções do organismo (CHARMANDARI et al., 2005) pela ativação do eixo simpato-adrenal (O’CONNOR et al., 2000; HALE et al., 2003; HICKEY et al., 2003). O SNS libera os neurotransmissores adrenérgicos, adrenalina e noradrenalina, dos nervos simpáticos e da camada medular das glândulas adrenais, elevando assim a concentração destes na corrente circulatória (ERIKSEN et al., 1999; HICKEY et al., 2003).

As inervações do SNS derivam das fibras eferentes pré-ganglionares (os neurônios pré-ganglionares são colinérgicos e os pós-ganglionares são noradrenérgicos). As fibras inervam o músculo liso dos vasos, o músculo esquelético, coração, rins, intestino, tecido adiposo e outros órgãos, atuando, portanto no sistema cardiovascular, respiratório, renal, gastrointestinal, endócrino e oftálmico. (CHARMANDARI et al., 2005).

O sistema parassimpático é antagonista do sistema nervoso simpático (CHARMANDARI et al., 2005).

2.3.4 Efeito do estresse no metabolismo de proteína

O estado de estresse altera o metabolismo das proteínas. Aumenta a concentração plasmática de glicina e de aminoácidos essenciais como histidina, leucina, lisina e valina. Além disso, diminui outros aminoácidos não essenciais como alanina, asparagina, glutamina, glicina. Essas alterações no perfil de aminoácidos essenciais e não-essenciais sugerem um aumento na

mobilização das proteínas corporais e conseqüente catabolismo de proteínas musculares (NDIBUALONJI et al., 1995).

2.3.5 Efeito do estresse sobre o metabolismo de carboidrato e gordura

O cortisol eleva a glicemia durante o estado de estresse. Para tal, desencadeia alterações fisiológicas. Provoca redução da utilização periférica de glicose e aumento da utilização dos ácidos graxos livres e corpos cetônicos (NDIBUALONJI et al., 1995).

2.3.6 Efeito do estresse sobre o sistema imunológico

Durante o estado de estresse, há ativação do eixo HPA e conseqüente aumento da concentração de cortisol na corrente circulatória. Esse glucocorticóide imunossupressor inibe a resposta a infecções ou danos nos tecidos (O'CONNOR et al., 2000; HICKEY et al., 2003). A atividade imunossupressora é exercida sobre neutrófilos, macrófagos e linfócitos (BLECHA, 2000; TIZARD, 2002a, b).

Segundo Tizard (2002a, b), os corticosteróides são rapidamente absorvidos no interior dos neutrófilos, macrófagos e linfócitos, ligam-se a um receptor no citoplasma, são transportados para o núcleo e suprimem a atividade da proteína I κ Ba. A proteína I κ Ba, por sua vez, suprime a atividade do fator de transcrição NF- κ B. O NF- κ B encontra-se em estado inativo para formar complexos com a I κ Ba. Quando estimulam o linfócito, os complexos NF- κ B e I κ Ba dissociam-se; a proteína I κ Ba é degradada rapidamente e o NF- κ B ativo fica livre para agir. Pela estimulação da síntese de um excesso de I κ Ba, que se reconjuga com o NF- κ B, os corticosteróides bloqueiam todos os processos mediados pelo NF- κ B, incluindo a síntese de citocinas.

Nos neutrófilos o estresse diminui a quimiotaxia, a fagocitose, a atividade bactericida, algumas reações de citotoxicidade dependente de anticorpo (ADCC), impede a marginação pela eliminação de L-seletina da superfície dos neutrófilos e reduz o número e a afinidade da expressão das moléculas de

CD18. Esses efeitos reduzidos de L-seletina e CD18 prejudicam a cinética de migração dos neutrófilos para os tecidos (TIZARD, 2002a, b).

Nos macrófagos o estresse reduz a quimiotaxia, fagocitose, atividade bactericida, produção de interleucina-1 (IL-1) e processamento de antígeno (TIZARD, 2002). Nos linfócitos, diminui a proliferação, resposta das células T, produção de interleucina-2 (IL-2), produção de citocinas e citotoxicidade mediadas por células T (BLECHA, 2000; TIZARD, 2002a, b).

As imunoglobulinas sofrem uma mínima diminuição. Mas tem depressão na expressão do complexo de histocompatibilidade maior (MHC) de classe II na superfície dos macrófagos, impossibilitando o reconhecimento antigênico por parte do linfócito T e a capacidade de produzir mais citocinas. Sofrem ainda depressão na quantidade e atividade de linfócitos T-“helper” circulantes, uma vez que reduzem a síntese de interleucina-1 bem como a capacidade de ligação desta com receptores na superfície das células. Os glicocorticosteróides causam apoptose dos timócitos, especialmente com fenótipo duplo-positivo (CD+4 e CD+8) (TIZARD, 2002a, b).

2.3.7 Efeito do estresse sobre o apetite

O estresse reduz o consumo de alimentos nos animais (MATTERI et al., 2000; RAHMOUNI e HAYNES, 2001; WEST, 2003; CHARMANDARI et al., 2005). Afeta o apetite influenciando o centro da saciedade no hipotálamo. O estímulo constante do agente estressor aumenta a secreção do neuropéptido Y (NPY) que acentua a liberação do hormônio CRH (LIU et al., 1994; CHARMANDARI et al., 2005). O aumento de CRH na corrente circulatória causa anorexia (EGAWA et al., 1991; CHARMANDARI et al., 2005). A Leptina, um estimulador da saciedade secretado pelo tecido adiposo, é um potente inibidor hipotalâmico do NPY e estimula um subgrupo de neurônios do núcleo PMOC (peptídeo opióide produzido no neurônio “arcuate nucleus” do hipotálamo) a secretar o hormônio estimulador do a-melanócito (a-MSH), que é outro anorexígeno (RAHMOUNI e HAYNES, 2001; CHARMANDARI et al., 2005). Assim, a redução na ingestão de alimentos está associada à elevada concentração de glucocorticóide plasmático que, por sua vez, aumenta a

concentração plasmática de leptina (NEWCOMER et al., 1998; MATTERI et al., 2000).

2.3.8 Efeito do estresse sobre o sistema reprodutivo

O sistema reprodutivo está diretamente relacionado ao eixo HPA que é ativado durante o estado de estresse (TSIGOS e CHROUSOS, 2002; GENARO et al., 2004). Por isso, o estresse pode reduzir a eficiência reprodutiva do rebanho, causando sub-fertilidade nos animais (DOBSON e SMITH, 2000; JORDAN, 2003).

O eixo reprodutivo hipotálamo-hipófise-gonadal (HPG) pode ser bloqueado por vários componentes do eixo HPA (ANDRADE et al., 2001; TSIGOS e CHROUSOS, 2002; GENARO et al., 2004). Esses componentes do eixo HPG, por sua vez, são diferentemente afetados de acordo com a natureza do agente estressor (DOBSON e SMITH, 2000), provocando encurtamento do cio, redução da ovulação e taxa de concepção e aumento da mortalidade embrionária. Tem também efeitos negativos em programas de inseminação artificial (ANDRADE et al., 2001).

Durante o estado de estresse o eixo HPG pode ser inibido pela β -endorfina (TSIGOS e CHROUSOS, 2002), CRH (CHARMANDARI et al., 2005), ACTH (DOBSON e SMITH, 2000), glicocorticoides (GENARO et al., 2004; CHARMANDARI et al., 2005) e vasopressina (AKEMA et al., 1996; CARRASCO e VAN de KAR, 2003). Essas substâncias estimulam os neurônios secretores de peptídeos (POMC) que suprimem a secreção do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) pelo hipotálamo (DOBSON e SMITH, 2000; CHARMANDARI et al., 2005). Conseqüentemente, é inibida a secreção dos hormônios da adeno-hipófise: hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH). Além disso, há também a supressão dos hormônios produzidos pelas gônadas (DOBSON e SMITH, 2000; CARRASCO e VAN DE KAR, 2003; GENARO et al., 2004; CHARMANDARI et al., 2005).

A inibição da secreção de GnRH diminui os hormônios FSH, LH, estrógeno e progesterona durante o estado de estresse, reduzindo o crescimento dos folículos, a ovulação e o cio de fêmeas (DOBSON e SMITH, 2000). Além disso, tem efeitos indesejáveis no desenvolvimento e,

posteriormente, na função do corpo lúteo uma vez que acarreta sérias conseqüências na implantação, desenvolvimento embrionário e manutenção da prenhez (BIGGERS et al., 1987; WISE et al., 1988). A liberação de LH é também inibida pela prolactina liberada durante o estresse (GENARO et al., 2004).

As alterações no “status” endócrino e no ciclo estral de fêmeas sob estresse podem causar anestro (DOBSON e SMITH, 2000; JORDAN, 2003), redução do crescimento folicular (HANSEN et al., 2001; JORDAN, 2003), redução da concentração do fluído folicular e do 17 β -estradiol (WOLFENSON et al., 1997; HANSEN et al., 2001), prejuízo do desenvolvimento e mecanismo de luteinização folicular (JORDAN, 2003) e redução no tempo de expressão do estro (DOBSON e SMITH, 2000; HANSEN et al., 2001; JORDAN, 2003) devido ao aumento da secreção do hormônio adrenocorticotrófico e conseqüente bloqueio do 17 β -estradiol (HANSEN et al., 2001). Podem ainda causar alteração na função uterina com exposição do endométrio (JORDAN, 2003), redução da taxa de concepção (JORDAN, 2003) e efeitos negativos sobre a prenhez e desenvolvimento embrionário (HANSEN et al., 2001; JORDAN, 2003), isto é, redução do estágio de desenvolvimento às características morfológicas de embrião (HANSEN et al., 2001) e baixo crescimento fetal (JORDAN, 2003).

Nos machos, o estresse reduz a quantidade e qualidade espermática (HANSEN et al., 2001), prejudicando a motilidade e a viabilidade espermática (CHANDOLIA et al., 1999; HANSEN et al., 2001).

2.3.9 Efeito do estresse no crescimento e na engorda

O estresse diminui o crescimento e engorda dos animais provavelmente devido à redução do apetite (MATTERI et al., 2000; WEST, 2003), da conversão alimentar (GALLI et al., 1995; COPPO et al., 2003) e da secreção do hormônio do crescimento (GH), também denominado de somatotropina ou hormônio somatotrópico (GUYTON e HALL, 2002; TSIGOS e CHROUSOS, 2002; CHARMANDARI et al., 2005). Além disso, o estresse estimula a lipólise, gliconeogênese (MATTERI et al., 2000) e lesões no abomaso, como a úlcera abomasal (WIEPKEMA, 1985; LENSINK et al., 2000).

A ativação prolongada do eixo HPA durante o estado de estresse aumenta a concentração de glucocorticóides que suprimem a secreção do GH e de outros fatores de crescimento como somatomedina C (TSIGOS e CHROUSOS, 2002; CHARMANDARI et al., 2005), também denominado de IGF-I (GUYTON e HALL, 2002). Além disso, os glicocorticóides antagonizam os efeitos anabólicos do GH e dos hormônios esteróides sexuais sobre os tecidos adiposo, muscular e ósseo (TSIGOS e CHROUSOS, 2002). Essas alterações reduzem o crescimento e a engorda dos animais, podendo até causar seu emagrecimento porque os tecidos muscular e gorduroso são utilizados na glicólise (ELSASSER et al., 2000; LENSINK et al., 2000; MATTERI et al., 2000).

Com a ativação do eixo HPA, o hipotálamo secreta somatostatina e CRH que suprimem a secreção do GH (TSIGOS e CHROUSOS, 2002; CHARMANDARI et al., 2005). O GH promove várias ações fisiológicas benéficas para o crescimento, como deposição de proteínas nos tecidos, potencialização da utilização das gorduras como fonte de energia e diminuição da utilização de carboidratos (GUYTON e HALL, 2002).

O aumento da deposição de proteínas nos tecidos ocorre porque o GH potencializa processos de captação de aminoácidos e síntese de proteína, além de reduzir a degradação das proteínas de maneira conjunta. Com aumento na captação, aumenta também o transporte de aminoácidos para o interior das células e, conseqüentemente, a síntese protéica. Assim, há aumento na tradução do ácido ribonucléico (RNA) e transcrição do ácido desoxirribonucléico (DNA), causando mais formação de RNA. O GH diminui o catabolismo de proteínas e aminoácidos por mobilização de grande quantidade de ácidos graxos livres do tecido adiposo, suprimindo assim uma grande parte da demanda de energia pela célula. O GH ainda intensifica a conversão de ácidos graxos em acetil-coenzima A (acetil-co A) e sua posterior utilização como fonte de energia. Com essas funções de anabolismo de proteínas e utilização das gorduras como fonte de energia o GH aumenta a massa magra (GUYTON e HALL, 2002).

O GH diminui a utilização de carboidratos pela redução da captação de glicose pelo tecido adiposo e músculo esquelético, aumento na produção de glicose pelo fígado e aumento da secreção de insulina. Cada uma dessas

alterações resulta da resistência à insulina do organismo (GUYTON e HALL, 2002).

O GH estimula o crescimento da cartilagem e do osso. Isso ocorre pela deposição aumentada de proteínas pelas células condrocíticas e osteogênicas (que causam o crescimento do osso), a velocidade aumentada da reprodução dessas células e o efeito específico da conversão dos condrócitos em células osteogênicas, induzindo a deposição de novo osso (GUYTON e HALL, 2002).

A somatomedina é produzida pelo fígado e outros tecidos estimulados pelo GH. Foram isoladas pelo menos quatro somatomedinas, sendo a mais importante a somatomedina C, também denominada de IGF-I. Muitas das ações do GH sobre o crescimento resultam da ação da somatomedina C, mas muitas das hipóteses sobre essa substância são questionáveis. Uma possibilidade é que o GH induz a formação de somatomedina C no tecido local em quantidade suficiente para produzir o crescimento localizado (GUYTON e HALL, 2002).

A adrenalina estimula a lipólise e a gliconeogênese durante o estado de estresse (MATTERI et al., 2000). O cortisol também aumenta a gliconeogênese, aumentando a glicemia, diminui a captação de glicose nas células musculares e reduz a síntese de proteína nas células (BUENO et al., 2003). O cortisol ainda aumenta as enzimas que convertem aminoácidos em glicose nas células hepática e causa a mobilização dos tecidos extra-hepáticos, principalmente dos músculos, elevando os níveis destes no plasma sanguíneo para entrar no processo de gliconeogênese no fígado (GUYTON e HALL, 2002). Também os efeitos catabólicos sobre os tecidos conjuntivo e ósseo resultam em balanço negativo de nitrogênio no organismo ao invés da formação e deposição nos músculos ou mesmo reposição de tecidos. A síntese de proteínas e lipídeos dá lugar à degradação de açúcares em moléculas mais simples, inibindo o crescimento. Além disso, os glicocorticóides reduzem a secreção dos hormônios gonadotróficos, que são esteróides anabolizantes que estimulam o desenvolvimento da musculatura (ENCARNAÇÃO, 1989; MATTERI et al., 2000).

2.3.10 Efeito do estresse na produção de leite

O estresse tem efeito negativo sobre a produção de leite, principalmente em regime de produção intensivo com elevada densidade populacional, maior competição por alimento, local de descanso, parceira sexual, interações hierárquicas ou medo (MATTERI et al., 2000). Esse estresse diminui a produção de leite e leva as fêmeas à perda de peso (RUSHEN et al., 1999; MATTERI et al., 2000; WEST, 2003). As alterações no perfil hormonal das fêmeas em estado de estresse também prejudicam a qualidade do leite (NDIBUALONJI et al., 1995; RUSHEN et al., 1999). Há ainda prejuízos com a redução do apetite e conseqüente queda na ingestão de nutrientes (MATTERI et al., 2000; WEST, 2003) e conversão alimentar (GALLI et al., 1995; COPPO et al., 2003), aumento de lipólise e gliconeogênese (MATTERI et al., 2000), redução da concentração sanguínea dos hormônios somatotrofina, triiodotironina (T_3) (McGUIRE et al., 1991; WEST, 2003) e tiroxina (T_4) (WEST, 2003) e aumento do leite residual no úbere devido ao bloqueio no reflexo de ejeção (BRUCKMAIER e BLUM, 1998; RUSHEN et al., 1999).

O bovino sob a condição de estresse sofre um desequilíbrio hormonal que estimula o catabolismo e a gliconeogênese. Nesse processo, é estimulada a produção de glicose para o trabalho muscular, entre outras funções fisiológicas, através da mobilização e degradação de gorduras e proteínas. Fica reduzida assim a disponibilidade de substratos para a síntese de proteínas e lipídeos usados na produção de leite, que também está diminuída (ELSASSER et al., 2000; MATTERI et al., 2000). Além disso, há aumento na quantidade de células somáticas (SCC) no leite (VARNER et al., 1983; YAGI et al., 2004).

Essas células são neutrófilos, macrófagos e linfócitos derivados do sangue e de células epiteliais do tecido mamário (CONCHA, 1986; YAGI et al., 2004).

O estresse inibe a secreção de ocitocina provocando retenção do leite no interior do úbere e diminuição ou lentidão da ejeção durante a ordenha (BRUCKMAIER e BLUM, 1998; RUSHEN et al., 1999). A redução na secreção de ocitocina para o tecido mamário é provocada pela alta concentração de adrenalina e noradrenalina que, secretadas durante o estado de estresse, causam intensa vasoconstrição nas glândulas mamárias e subseqüente bloqueio da excreção do leite (ENCARNAÇÃO, 1989).

2.3.11 Efeito do estresse sobre a qualidade da carne

Durante a engorda, os animais estressados sofrem alterações na conformação do corpo, prejudicando as características da carcaça e qualidade da carne. O estresse exerce efeitos evidentes sobre o teor de gordura intramuscular, cor e maciez da carne; prejudica ainda o sabor, aroma, textura e provoca escurecimento progressivo da carne (ENCARNAÇÃO, 1989).

As alterações hormonais provocadas pelo estresse desencadeiam uma série de reações orgânicas. Há redução do glicogênio no músculo após o sacrifício do animal por causa do aumento de glicogenólise (VOISINET et al., 1997; LENSINK et al., 2000) estimulado pela secreção de adrenalina, que eleva a formação de ácido lático e assim diminui o pH na carne (PRZYBYLSKI et al., 1994; FERNANDEZ et al., 1996). O baixo pH leva à desnaturação das proteínas dos músculos e alterações na coloração (ENCARNAÇÃO, 1989; GUIGNOT et al., 1994; LENSINK et al., 2000), flacidez e grande perda de líquidos da carne (conhecida internacionalmente como carne “PSE” – pale, soft, exudative). Isso traz a desqualificação da carne por sua aparência pouco atrativa para o consumidor e não adequada para a industrialização (ENCARNAÇÃO, 1989).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Condições gerais

Este estudo foi aprovado pela Câmara de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia UNESP/FMVZ – Campus de Botucatu, SP, Brasil.

O experimento foi realizado no município de Lutécia, SP, Brasil, nos meses de fevereiro a junho (verão ao outono) de 2.007, com clima tropical, caracterizado por uma estação chuvosa (Outubro a Abril) e uma seca (Maio a Setembro), com precipitação anual média de 1.300 mm, umidade relativa do ar de 64%, temperatura média de 25 °C e altitude de 602 m.

3.2 Animais e formação dos grupos experimentais

Foram utilizados 60 machos inteiros da raça Nelore (*Bos taurus indicus*), com aproximadamente 10 a 12 meses de idade, alimentados com *Brachiaria decumbens* em sistema de pastejo extensivo. Estes animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais com suplementação de selênio *ad libitum* (15 animais/grupo): um grupo controle, que foi formado com os animais que apresentaram a maior concentração sérica de Se no dia zero e suplementados com mistura mineral proteinada sem adição de selênio; e três grupos que os animais apresentaram a menor concentração sérica de Se no dia zero e com mistura mineral proteinada contendo 18, 27 ou 32 mg de Se/kg de MS. O consumo diário médio/animal de ambos os suplementos foram de 200 g durante o período experimental, onde se determinou que nesse período os animais consumiram 0, 3,6; 5,4 ou 6,4 mg de Se/dia. Assim, os grupos experimentais foram denominados G_{3,6} (Figura 2a), G_{5,4} (Figura 2b) e G_{6,4} (Figura 2c) de acordo com a concentração recebida e o controle onde não houve a adição de desse elemento, foi chamado de G_c (Figura 2d).

Os animais com pelagem marrom (Figura 2a) e os de pelagem preta (Figura 2b e 2c) não pertencem aos seus respectivos grupos experimentais. Estes foram acrescentados a estes grupos de bovinos somente para identificações dos mesmos nas fotografias.



Figura 1: Grupos experimentais **a)** bovinos do grupo $G_{3,6}$; **b)** bovinos do grupo $G_{5,4}$; **c)** bovinos do grupo $G_{6,4}$; **d)** bovinos do grupo G_c .

O peso vivo médio em Kg dos animais dos grupos foram: $G_c = 182,5 \pm 10,30$; $G_{3,6} = 180,3 \pm 12,61$; $G_{5,4} = 174,6 \pm 7,88$ e $G_{6,4} = 183,0 \pm 7,86$.

Após 30 dias de ajuste às condições de manejo e às dietas experimentais, os animais foram primovacinaados contra a raiva no dia 0 do experimento. Nos 120 dias subsequentes, os bovinos passaram por outras cinco sessões de estresse de manejo para colheita de sangue (dias 0, 15, 30, 60, 90 e 120) necessárias para a determinação concentração sérica de selênio e de cortisol e dos títulos de anticorpos neutralizantes anti-rábicos.

Nos 30 dias que antecederam o início do experimento todos os bovinos receberam uma dose de ivermectina¹ (200 mg/Kg de PV) e também foi aplicado deltametrina² pour-on na dose de 10 mL do produto/100 Kg de PV, conforme recomendação do fabricante.

Os animais pertencentes aos grupos G_c , $G_{3,6}$, $G_{5,4}$ e $G_{6,4}$ foram examinados clinicamente nos dias zero, 30, 60, 90 e 120.

¹ Altec[®], TORTUGA Companhia Zootécnica Agrária.

² Butox[®] pour-on, Intervet Schering-Plough Animal Health.

3.3 Piquetes

Os quatros piquetes utilizados por todos os grupos de bovinos eram semelhantes na topografia e na composição botânica, sendo formados por *Brachiaria decumbens* (Figura 2 a, b, c, d).



Figura 2: Piquetes **a)** piquete I; **b)** piquete II; **c)** piquete III; **d)** piquete IV.

O sistema de pastejo adotado foi o contínuo e os grupos experimentais de bovinos foram trocados de piquetes a cada 30 dias. A lotação foi de 100 Kg de PV/hectare.

No dia 0 recolheram-se ainda amostras das forrageiras dos piquetes, cortadas à altura de pastejo, acondicionadas em sacos plásticos e conservadas sob refrigeração a -20 °C para posterior determinação da concentração de selênio.

3.4 Suplemento mineral proteico

O suplemento mineral proteico³ utilizado no experimento, cada quilograma do suplemento mineral era composto por: 124 g de cálcio, 65 g de fósforo, 8 g de magnésio, 89 g de sódio, 172 g de cobalto, 1.600 mg de cobre, 12 mg de enxofre, 1.000 mg de ferro, 650 mg de flúor (máx.), 160 mg de iodo, 1.300 mg de manganês, 35 mg de níquel, 4.500 mg de zinco, 22.000 UI de vitamina A, 6.000 UI de Vitamina D, 15 UI de vitamina E, 20 mg de tamponante, 400 Kcal de energia metabolizável, NNP equivalente em proteína máxima 140 mg, 95% de solubilidade do P em ácido Cítrico 2% (min). Nesta mistura mineral proteinada adicionou-se 0, 18, 27 e 32 mg de selênio/Kg.

Ambas os suplementos minerais proteicos foram fornecidos aos bovinos em cocho de madeira coberto (Figura 3a) com 13 centímetros lineares de cocho/U.A.⁴ por animal e localizados aproximadamente a 50 metros do bebedouro (Figura 2b).

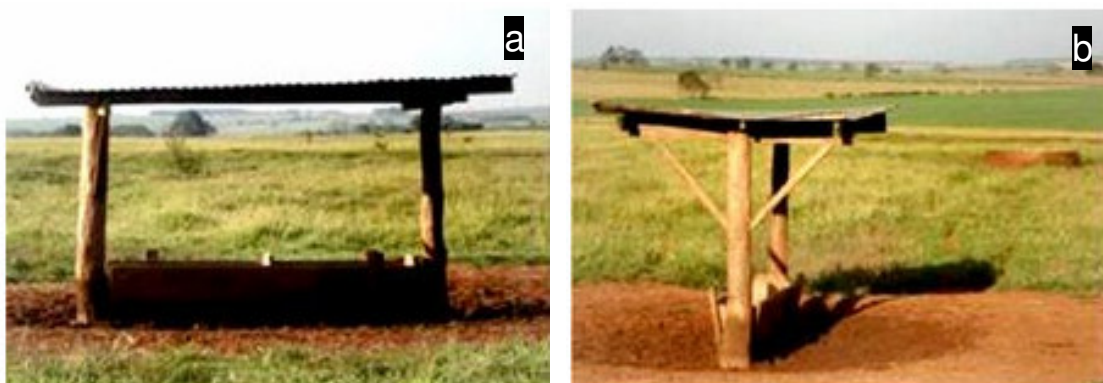


Figura 3: Cocho de sal **a)** cocho de sal utilizado no experimento; **b)** localização cocho de sal.

3.5 Vacina anti-rábica

Utilizou-se uma vacina comercial anti-rábica⁵, inativada, líquida, indicada para bovinos, aprovada pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), composta por uma suspensão de vírus rábico fixo

³ Top Line Recria[®] produzida por Matsuda Sementes e Nutrição Animal, Álvares Machado-SP, Brasil certificada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

⁴ Uma U.A.= 450 Kg de peso vivo.

⁵ Alurabiffa[®] produzida por Merial.

cepa PV (Pasteur Vírus), replicado em células de BHK₂₁ clone 13 inativada pela β -propiolactona e adsorvida em timerosal na concentração de 1:10.000 e os adjuvantes Hidróxido de Alumínio e Saponina com potência de 1,31 UI/mL determinada pelo teste NIH (WILBUR e AUBERT, 1996).

A vacina anti-rábica foi aplicada pela via subcutânea na dose de 2 mL por animal.

3.6 Agentes estressores impostos aos animais

O estresse de manejo foi imposto aos animais no período da manhã para preparo, realização da vacinação e colheita de amostras de sangue. Os estressores impostos foram aqueles normalmente presentes no manejo: condução dos animais do pasto para o curral, permanência no curral, presença e gritos de pessoas, movimentação forçada dos animais dentro do curral, vacinação anti-rábica no dia 0, contenção dos animais no tronco tipo brete por 5 minutos e colheita de sangue.

3.7 Colheita de sangue

As amostras de sangue dos bovinos foram colhidas nos dias zero, 15, 30, 60, 90 e 120. Nesses dias, os bovinos foram levados no período da manhã para o curral e após serem manejados foram contidos em brete de contenção. De cada animal foi colhido 10 mL de sangue por meio da punção da veia jugular em tubos à vácuo sem anticoagulante (Figura 4 e 5). As amostras de sangue foram centrifugadas a 2.500 rpm por 10 minutos (Figura 6) para obtenção das amostras de soro que foram acondicionadas em tubos de plásticos (1,5 mL) (Figura 7) e armazenadas em freezer a -20 °C para posterior determinação da concentração sérica de selênio e de cortisol e dos títulos de anticorpos anti-rábicos.



Figura 4: Colheita de sangue.



Figura 5: Amostras de sangue.



Figura 6: Centrifugação das amostras de sangue.



Figura 7: Amostras do soro de sanguíneo.

3.8 Determinação da concentração de selênio no soro dos bovinos e na *Brachiaria decumbens* dos piquetes

A concentração sérica de Se dos bovinos foram determinadas nas amostras colhidas nos dias zero, 60 e 120 e na *Brachiaria decumbens* nas amostras colhidas no dia zero.

A determinação da concentração sérica de Se e na *Brachiaria decumbens* utilizou-se a técnica de Espectrofotometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite.

Antes do processamento das amostras, toda a vidraria e recipientes para preparo e armazenamento das soluções foram lavadas com detergente neutro,

água destilada e ácido nítrico a 10%, e o enxágüe, com água deionizada em sistema de 8 mA⁶.

Foi utilizada um espectrofotômetro de absorção atômica com forno de grafite⁷, com corretor Self-Reversal para correção de fundo, mostrador automático, lâmpada oca de catodo de selênio, operando a 10 mA, no comprimento de onda de 357,4 nm. Utilizou-se uma fenda de 0,5 nm, tubos de grafite recobertos piroliticamente e vazão de 3,0 litros por minuto de argônio como gás purga. Esse gás foi interrompido durante a etapa de atomização (Tabela 1).

Tabela 1: Programa de atomização para determinação de Selênio pela absorção atômica em forno de grafite.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (segundos)	Leitura
1	120	20	Não
2	250	10	Não
3	600	10	Não
4	600	3	Não
5	2.200	3	Não
6	2.500	3	Sim

Os volumes de amostra e de modificador químico Paládio (Pd) foram injetados no tubo de grafite de 10 µL cada.

Para calibração do equipamento foram utilizados padrões a partir de soluções-estoque de 1.000 µg/L na seguinte faixa de concentração: Se= 0 a 17,76 µg/mL.

A solução estoque era composta por 1.000 mg/L de selênio⁸ e 2% m/v de Pd em 1% v/v de ácido nítrico (HNO₃), com pureza de 99,99%.

Um volume de 1,0 mL de amostra foi diluída cinco vezes com água deionizada. Dessa solução foi retirada um alíquota de 1,0 mL e acrescentado

⁶ Milli-Q®.

⁷ Varian modelo AA-800.

⁸ Merk.

0,5 mL da solução de 100 mg/L de nitrato de Paládio (modificador de matriz), acertando-se em seguida o volume para 5,0 mL com água deionizada, finalizando uma diluição de 1:25.

Utilizou-se como branco analítico uma solução aquosa contendo 10 mg/L de Pd.

Os copos plásticos do amostrador automático, utilizados para leitura das amostras, foram previamente descontaminados em banhos de ácido nítrico a 10% por 24 horas.

3.9 Determinação da concentração sérica de cortisol

A concentração sérica de cortisol foi determinada nas amostras colhidas nos dias zero, 15, 30, 60, 90 e 120 utilizando kit comercial de radioimunoensaio em fase sólida⁹ (Figura 8) e contada em contador Auto-Gamma Count Cobra II¹⁰ (Figura 9).

As amostras de soro dos bovinos foram descongeladas em temperatura ambiente, durante 30 minutos, assim como os demais componentes do kit comercial. Após o descongelamento, pipetou-se 25 µL de cada amostra de soro sanguíneo em tubo de ensaio contendo anticorpo anti-cortisol, adicionando-se, em seguida, 1 mL de cortisol sintético marcado com iodo 125. Homogenizou-se o conteúdo do tubo em agitador automático e, depois colocado em banho-maria a 37 °C durante 45 minutos. Logo após aspirou-se todo o conteúdo dos tubos que foram acondicionados nas caçapas e realizaram-se as mensurações da radioatividade remanescente no seu interior por meio de um contador gama, durante 1 minuto e, a partir da curva padrão, automaticamente foram calculadas as concentrações séricas de cortisol.

A curva de calibração empregada no presente trabalho utilizou calibradores contendo de 0-1,380 nmol/L de cortisol na forma líquida. O anticorpo empregado no teste é altamente específico para cortisol com uma porcentagem de reação cruzada relativamente baixa com outros esteróides, tais como corticosterona (0,94%), cortisona (0,98%) e 11-deoxicortisol (11,4%). O limite de detecção, ou dose mínima detectável do ensaio é de cerca de 5,5

⁹ DPC-Diagnostic Products Corporation, USA.

¹⁰ Packard Bio Sciences Company, USA.

nmol/L e os coeficientes intra-ensaio e interensaio de 17,6% e 16,1%, respectivamente.



Figura 8: Kit radioimunoensaio em fase sólida.



Figura 9: Contador Auto-Gamma Count Cobra II.

3.10 Determinação dos títulos de anticorpos anti-rábicos

Os títulos individuais de anticorpos anti-rábicos dos bovinos foram determinados nas amostras de sangue colhidas nos dias zero, 30, 60, 90 e 120 por meio da técnica de neutralização em células BHK₂₁ clone 13. Este teste foi desenvolvido a partir do “Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test” (RFFIT) (SMITH; YAGER; BAER, 1996) e no “Fluorescent Inhibition Microtest” (FIMT RFFIT) (ZALAN; WILSON; PUKITIS, 1979). Como controle foram utilizados o vírus rábico CVS11 e o 2º Padrão Internacional de Soro Anti-rábico.

Na primeira fase, inativou-se os soros sanguíneos em banho maria a 56 °C por 30 minutos e após foram diluídos em série na razão 2, em meio EAGLE-MEM com 2,5% de soro fetal bovino. A cada uma dessas diluições foi adicionado o mesmo volume (50 µL) de uma diluição de vírus fixo PV em células BHK₂₁, contendo 100 doses formadoras de focos fluorescentes 50% (DFF₅₀).

Em todas as microplacas de poliestireno com 96 orifícios¹¹ foi utilizado soro eqüino de referência nacional lote 03, fornecido pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), contendo título de 132 UI/mL. O

¹¹ Corning, USA.

controle do vírus foi realizado por meio de titulação do vírus PV, utilizando-se 4 diluições seriadas na base 10, sendo a primeira igual à diluição adicionada aos soros teste e referência.

As microplacas com as misturas de soro e vírus foram incubadas e mantidas a 37 °C por 90 minutos. Em seguida 100 µL do meio EAGLE contendo $3,0 \times 10^6$ células BHK₂₁ (pertencentes ao banco de células da seção de Raiva do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil) foram acrescentados a cada orifício que não receberam soro ou vírus, para controle das células. As microplacas foram novamente incubadas a 37 °C em estufa com 5% de CO₂ por 22 horas e depois as células foram lavadas com solução PBS pH 7,0 e fixadas com acetona a 80% em água destilada a -20 °C por 10 minutos. As células foram então marcadas com imunoglobulina antinucleocapsídeo rábico conjugada com isotiocianato de fluoresceína¹², em solução de azul de Evans a 1:40.000 durante uma hora a 37 °C. As placas foram lavadas por imersão 3 vezes em solução PBS pH 7,0 seguida de mais 3 vezes em água destilada. Após a secagem das placas, adicionou 70 µL de glicerina tamponada pH 8,5 a cada orifício para aumentar a intensidade da fluorescência. Foram observados 10 campos em cada orifício da microplaca em microscópio de fluorescência invertido com aumento de 100 vezes e foi considerado positivo o campo que continha um ou mais focos fluorescentes.

A DE₅₀ (diluição de soro que protege 50% das células inoculadas, da infecção pelo vírus rábico) de cada soro foi determinada e os títulos de anticorpos, expressos em UI/mL.

3.11 Análise estatística

As médias das concentrações séricas de cortisol foram comparadas por Análise de Variância para medidas repetidas, considerando-se quatro tratamentos de selênio (Gc, G_{3,6}, G_{5,4} e G_{6,4}) e seis dias de observação (D₀, D₁₅, D₃₀, D₆₀, D₉₀ e D₁₂₀). Quando houve diferença significativa, as médias foram comparadas pelo teste LSD (ZAR, 1999).

¹² Sanofi-Pasteur.

Os dados obtidos dos títulos de anticorpos anti-rábicos violaram a premissa da normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnoff) e foram, portanto, analisados por testes não paramétricos. Para comparação dos tratamentos em cada dia experimental, usou-se o teste de Kruskal Wallis (H); para análise de cada tratamento ao longo do tempo, usou-se o teste de Friedman (ZAR, 1999).

Os dados obtidos das concentrações séricas de selênio violaram a premissa da normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e foram, portanto, analisados por testes não paramétricos. Assim, para comparar as concentrações de selênio entre os grupos G_c , $G_{3,6}$, $G_{5,4}$ e $G_{6,4}$ para cada dia de observação (dias 0, 60 e 120) utilizou-se a análise de variância de Kruskal-Wallis (H) complementada pelo teste de comparações múltiplas de Nemenyi (ZAR, 1999). A comparação das concentrações de selênio entre os dias 0, 60 e 120, dentro de cada grupo experimental, foi feita pela análise de variância de Friedman (χ^2_r) complementada pelo teste de comparações múltiplas de Nemenyi (ZAR, 1999).

Para avaliar o nível de associação entre as concentrações séricas de selênio e de cortisol para cada grupo e em cada dia experimental, utilizou-se o teste de correlação de Spearman (r_s) (ZAR, 1999).

A correlação entre as concentrações séricas de cortisol e títulos de anticorpos anti-rábicos foi avaliada pelo teste de correlação para amostras não paramétricas de Spearman (R) (ZAR, 1999). Foram avaliadas 16 correlações das amostras nos diferentes grupos e dias de colheita de sangue.

Para avaliar o nível de associação entre as concentrações séricas de Selênio e de títulos de anticorpos para cada grupo (G_c , $G_{3,6}$, $G_{5,4}$ e $G_{6,4}$) e em cada dia experimental (dias 60 e 120), utilizou-se o teste de correlação de Spearman (r_s) (ZAR, 1999).

Em todas as análises considerou-se a probabilidade de erro $\alpha=0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Concentração de selênio na *Brachiaria decumbens*

A concentração de selênio na *Brachiaria decumbens* dos piquetes foi de 0,04 mg de Se/Kg de MS.

4.2 Concentração sérica de selênio

As médias (\pm desvio padrão) da concentração sérica de Se de bovinos da raça Nelore suplementados *ad libitum* com 0 (Gc), 3,6 (G_{3,6}), 5,4 (G_{5,4}) e 6,4 (G_{6,4}) mg de Se/bovino/dia estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2: Médias (\pm dp) da concentração sérica de Se de bovinos da raça Nelore suplementados *ad libitum* com 0 (Gc), 3,6 (G_{3,6}), 5,4 (G_{5,4}) e 6,4 (G_{6,4}) mg de Se/bovino/dia.

Grupos de bovinos	Concentração sérica de Se ($\mu\text{g/L}$)		
	Dias de observação		
	0	60	120
Gc	105,68 \pm 51,87	80,91 \pm 33,73	81,08 \pm 40,92
G _{3,6}	67,69 \pm 26,31	84,96 \pm 38,09	103,09 \pm 47,29
G _{5,4}	59,02 \pm 24,29	78,23 \pm 41,74	95,37 \pm 37,89
G _{6,4}	63,20 \pm 30,42	87,78 \pm 40,87	87,65 \pm 31,22

O grupo Gc apresentou maior concentração de Se que G_{5,4} e G_{6,4} somente no dia 0 ($H_{0,05; 15; 15; 15} = 12,916$; $P=0,005$). Nos demais dias, não houve diferenças entre os grupos (Figura 10).

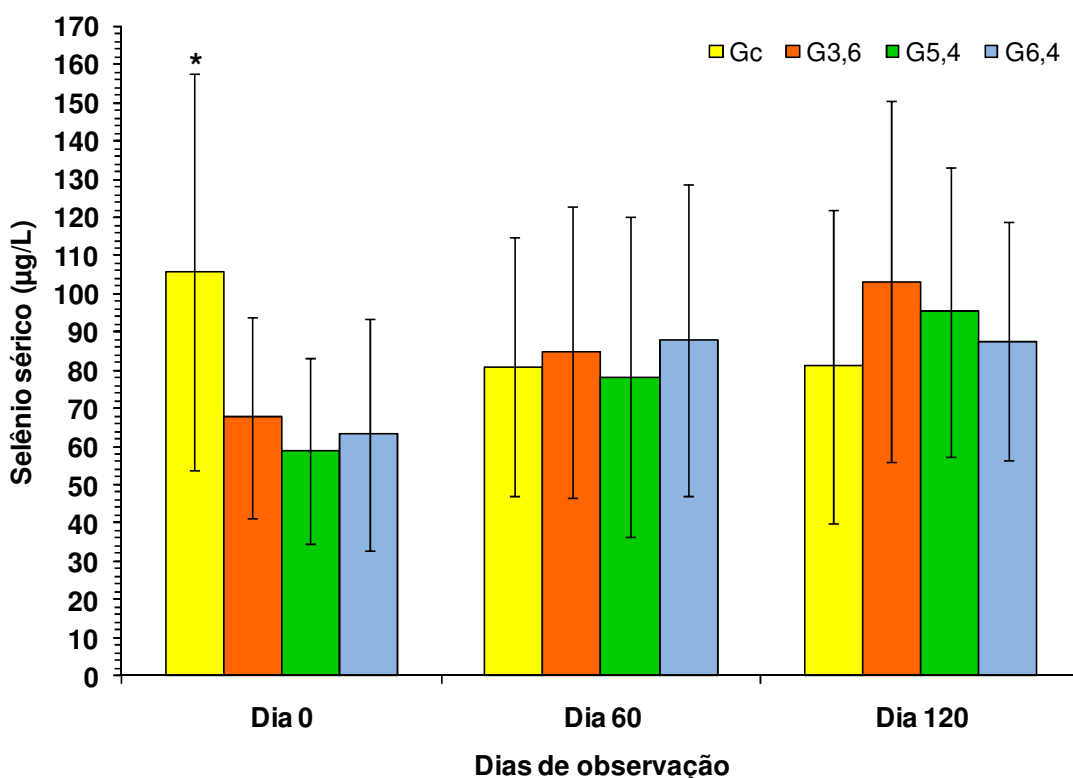


Figura 10: Efeito da suplementação *ad libitum* com 0 (Gc), 3,6 (G_{3,6}), 5,4 (G_{5,4}) e 6,4 (G_{6,4}) mg de Se/bovino/dia na concentração sérica de Se (\pm dp) de bovinos da raça Nelore. * indica diferença significativa na contração sérica de Se entre os tratamentos (P=0,005).

Os grupos apresentaram diferentes perfis de alteração de concentração de Se ao longo do experimento. O grupo controle foi o único que apresentou redução nessas concentrações a partir do dia 60 ($(\chi^2_r)_{3, 15} = 11,200$; P<0,004). O grupo G_{3,6} teve aumento progressivo ao longo do experimento ($(\chi^2_r)_{3, 15} = 26,133$; P<0,000). No grupo G_{5,4} as concentrações de Se foram maiores no dia 120 em relação ao dia 0 ($(\chi^2_r)_{3, 15} = 16,133$; P<0,000), enquanto em G_{6,4} essas concentrações se mantiveram mais altas a partir do dia 60 ($(\chi^2_r)_{3, 15} = 12,933$; P<0,002) (Figura 11).

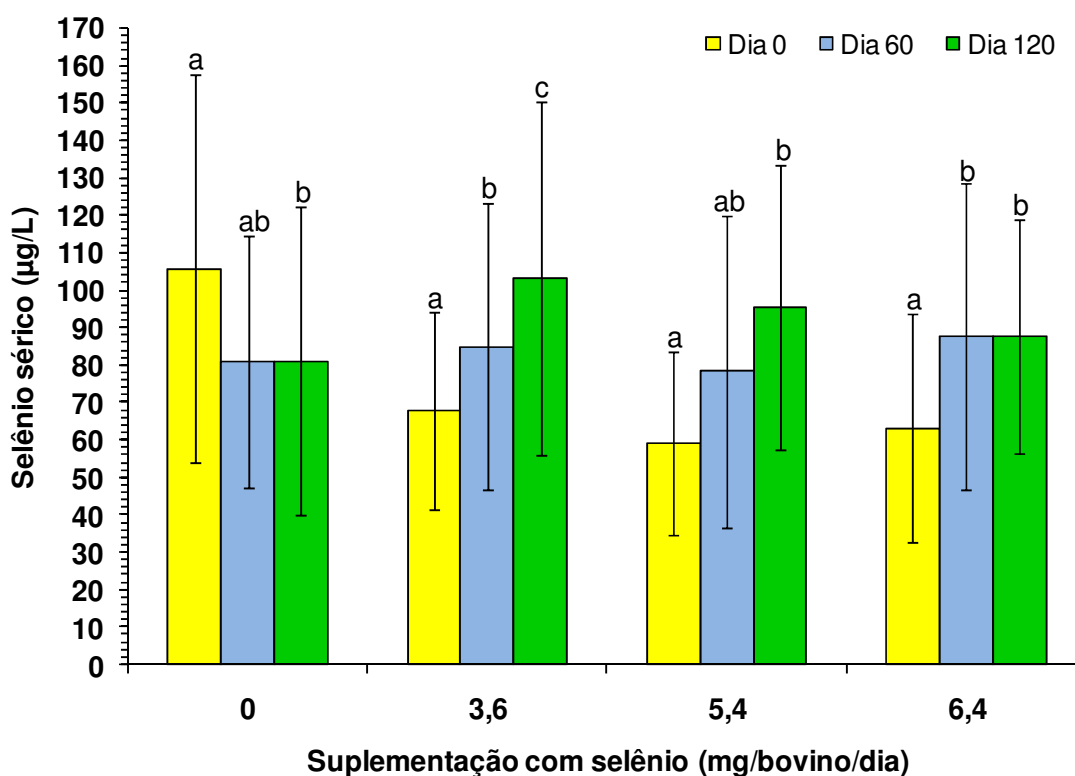


Figura 11: Efeito do tempo de suplementação *ad libitum* (0, 60 e 120 dias) com 0 (G_c), 3,6 (G_{3,6}), 5,4 (G_{5,4}) e 6,4 (G_{6,4}) mg de Se/bovino/dia na concentração sérica de Se (\pm dp) de bovinos da raça Nelore. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os dias de observação (G_c P<0,004; G_{3,6} P<0,000; G_{5,4} P<0,000 e G_{6,4} P<0,002).

4.3 Concentração sérica de cortisol

As médias (\pm desvio padrão) da concentração sérica de cortisol de bovinos da raça Nelore suplementados *ad libitum* com 0 (G_c), 3,6 (G_{3,6}), 5,4 (G_{5,4}) e 6,4 (G_{6,4}) mg de Se/bovino/dia estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3: Médias (\pm dp) da concentração sérica de cortisol de bovinos da raça Nelore suplementados *ad libitum* com 0 (Gc), 3,6 (G_{3,6}), 5,4 (G_{5,4}) e 6,4 (G_{6,4}) mg de Se/bovino/dia.

Grupos de bovinos	Concentração sérica de cortisol (μ g/dL)					
	Dias de observação					
	0	15	30	60	90	120
Gc	2,20 \pm 0,86	2,71 \pm 0,44	2,95 \pm 0,69	3,47 \pm 0,82	4,36 \pm 1,74	3,85 \pm 0,79
G _{3,6}	2,75 \pm 0,97	2,75 \pm 0,63	2,80 \pm 1,01	3,21 \pm 1,17	4,13 \pm 1,11	3,69 \pm 0,72
G _{5,4}	2,39 \pm 0,42	2,46 \pm 0,32	2,92 \pm 0,54	3,73 \pm 0,73	3,93 \pm 0,49	3,69 \pm 1,28
G _{6,4}	2,62 \pm 0,69	2,96 \pm 0,68	3,21 \pm 1,09	4,06 \pm 0,89	4,01 \pm 1,92	3,24 \pm 1,06

Não houve interação entre as concentrações séricas de cortisol e o tempo de suplementação com selênio ($F_{(15,280)} = 1,41$; $P = 0,14$).

A concentração sérica de cortisol não foi afetada pelas diferentes suplementações com selênio ($F_{(3,65)} = 0,35$; $P = 0,79$) (Figura 12).

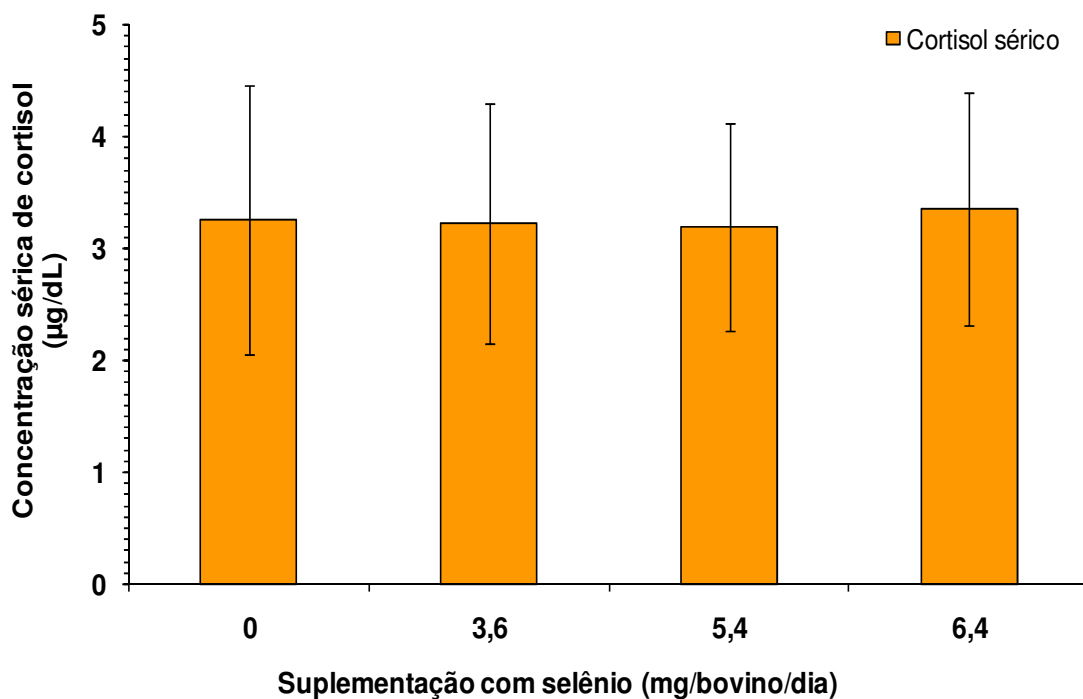


Figura 12: Efeito da suplementação *ad libitum* com 0 (G_c), 3,6 (G_{3,6}), 5,4 (G_{5,4}) e 6,4 (G_{6,4}) mg de Se/bovino/dia na concentração sérica de cortisol (\pm dp) de bovinos da raça Nelore. Não houve diferença significativa na concentração sérica de cortisol entre os tratamentos ($F_{(3,56)} = 0,35$; $P = 0,79$) juntando-se os dias de observação zero, 15, 30, 60, 90 e 120.

A concentração sérica de cortisol dos bovinos aumentou gradativamente ao longo do período experimental ($F_{(5,280)} = 32,65$; $p < 0,01$; efeito do tempo juntando-se as concentrações séricas de cortisol dos grupos) atingindo um pico no dia 90 com diminuição no dia 120 (Figura 13).

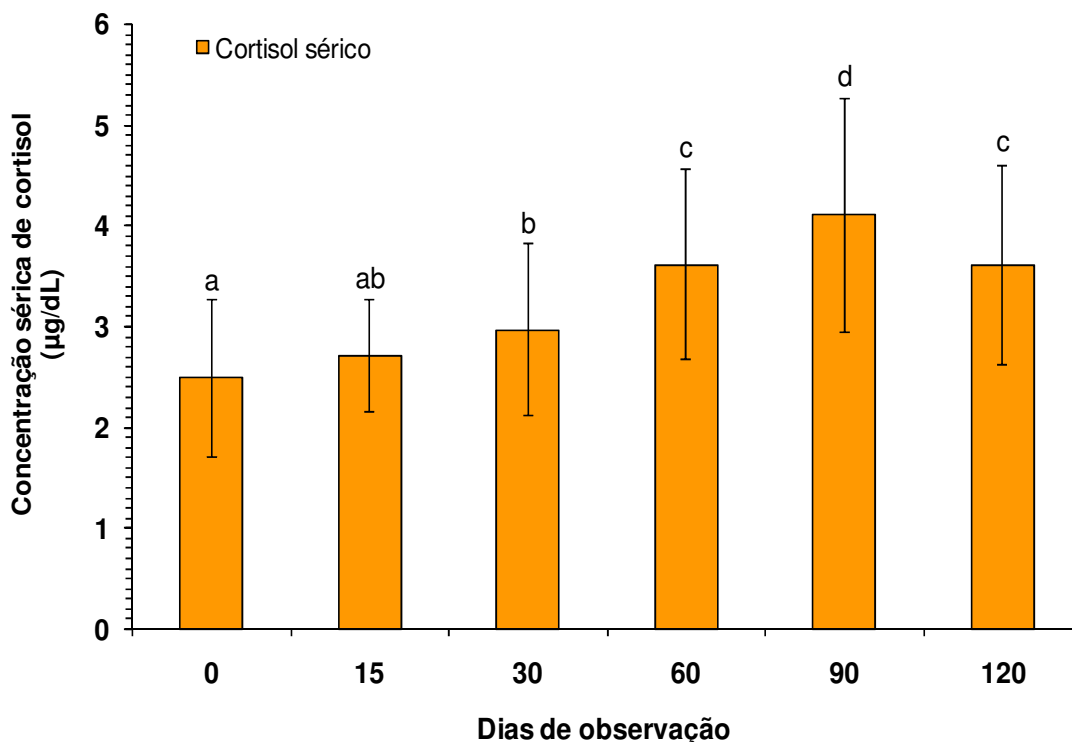


Figura 13: Efeito do manejo no curral na concentração sérica de cortisol (\pm dp) de bovinos da raça Nelore suplementados *ad libitum* com 0 (G_c), 3,6 (G_{3,6}), 5,4 (G_{5,4}) e 6,4 (G_{6,4}) mg de Se/bovino/dia depois de repetidos manejos nos dias 0, 15, 30, 60, 90 e 120. Médias seguida de letra diferente indica diferença significativa ($P < 0,01$). Dados dos grupos G_c, G_{3,6}; G_{5,4} e G_{6,4} juntando-se as concentrações séricas de cortisol.

4.4 Títulos de anticorpos neutralizantes anti-rápicos

As medianas (\pm quartil) da concentração sérica de Se de bovinos da raça Nelore suplementados *ad libitum* com 0 (G_c), 3,6 (G_{3,6}), 5,4 (G_{5,4}) e 6,4 (G_{6,4}) mg de Se/bovino/dia estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4: Medianas (\pm quartil) da concentração sérica de cortisol de bovinos da raça Nelore suplementados *ad libitum* com 0 (Gc), 3,6 (G_{3,6}), 5,4 (G_{5,4}) e 6,4 (G_{6,4}) mg de Se/bovino/dia.

Grupos de bovinos	Medianas dos títulos de anticorpos anti-rábiticos (UI/mL)			
	Dias de observação			
	30	60	90	120
Gc	1,22 \pm 0,42	0,49 \pm 0,42	0,31 \pm 0,42	0,25 \pm 0,42
G _{3,6}	0,70 \pm 0,35	0,62 \pm 0,35	0,70 \pm 0,35	0,60 \pm 0,35
G _{5,4}	0,52 \pm 0,30	0,37 \pm 0,30	0,40 \pm 0,30	0,35 \pm 0,30
G _{6,4}	0,60 \pm 0,56	0,42 \pm 0,56	0,40 \pm 0,56	0,35 \pm 0,56

Os títulos de anticorpos anti-rábiticos não diferiram significativamente entre os grupos Gc, G_{3,6}, G_{5,4} e G_{6,4} em nenhum dos dias de observação ($D_{30} H_{3,60} = 2,404$; $P = 0,493$; $D_{60} H_{3,60} = 0,498$; $P = 0,919$; $D_{90} H_{3,60} = 2,056$; $P = 0,561$; $D_{120} H_{3,60} = 1,149$; $P = 0,765$) (Figura 14).

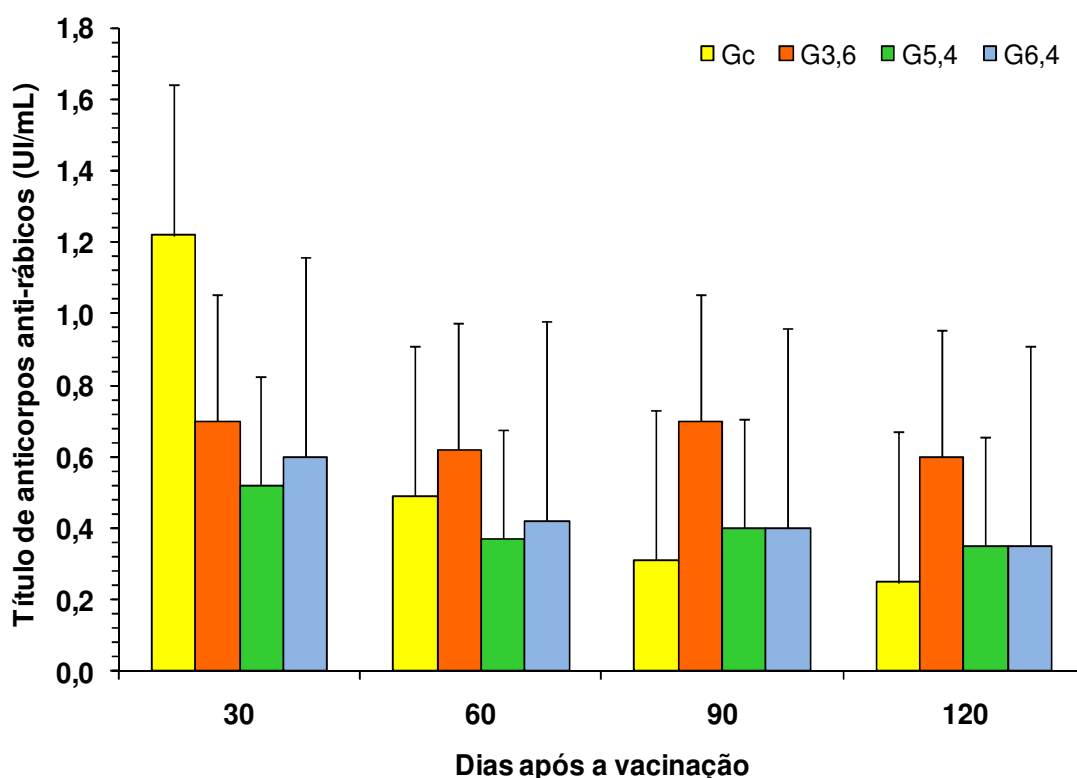


Figura 14: Efeito da suplementação *ad libitum* com 0 (Gc), 3,6 (G_{3,6}), 5,4 (G_{5,4}) e 6,4 (G_{6,4}) mg de Se/bovino/dia nos títulos de anticorpos anti-rábicos (+ quartil) de bovinos da raça Nelore primovacinação contra a raiva. Não houve diferença significativa nos títulos de anticorpos anti-rábicos entre os tratamentos (D₃₀ P=0,493; D₆₀ P=0,919; D₉₀ P= 0,561; D₁₂₀ P=0,765).

Nos grupos Gc, G_{5,4} e G_{6,4} estes títulos de anticorpos reduziram significativamente do dia 30 para o dia 120 (Gc: $(\chi^2_r)_{3, 15} = 22,407$; P<0,000; G_{5,4} $(\chi^2_r)_{3, 15} = 9,380$; P<0,025 e G_{6,4} $(\chi^2_r)_{3, 15} = 12,857$; P<0,005). No grupo Gc, os títulos diminuíram significativamente do dia 30 para o 90 e 120 e do dia 60 para o dia 120 (Gc: $(\chi^2_r)_{3, 15} = 22,407$; P<0,000). No grupo G_{3,6}, os títulos de anticorpos reduziram do dia 30 para o dia 60 (G_{3,6} $(\chi^2_r)_{3, 15} = 24,985$; P<0,000) (Figura 15).

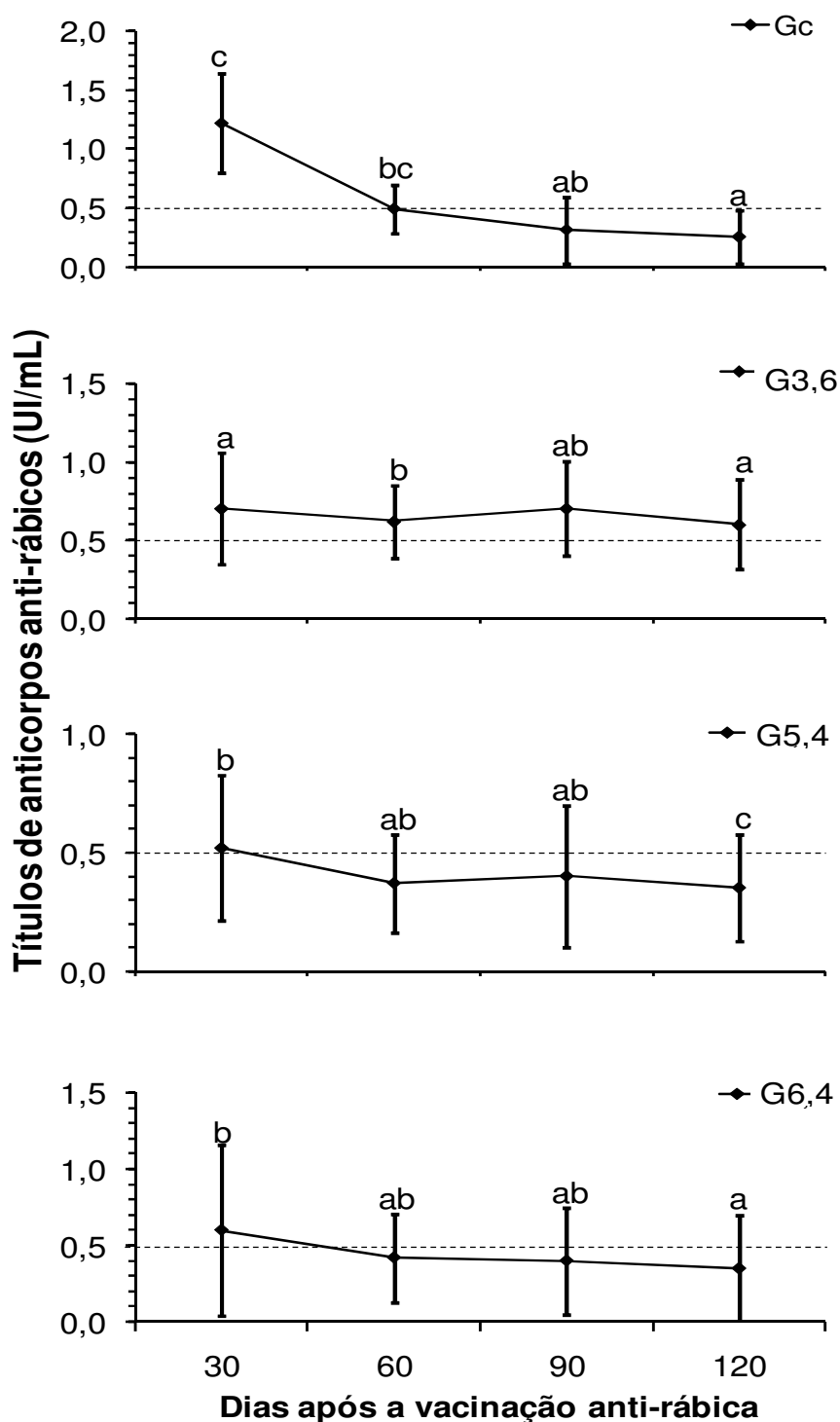


Figura 15: Efeito do tempo de suplementação *ad libitum* com 0 (Gc), 3,6 (G_{3,6}), 5,4 (G_{5,4}) e 6,4 (G_{6,4}) mg de Se/bovino/dia no título de anticorpos anti-rábicos (\pm quartil) de bovinos da raça Nelore. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os dias de observação (Gc $P < 0,00005$; G_{3,6} $P < 0,00002$; G_{5,4} $P < 0,0246$ e G_{6,4} $P < 0,00496$). Linhas pontilhadas (----) indicam títulos de anticorpos anti-rábicos considerados protetores.

4.5 Correlação entre as concentrações séricas de selênio e cortisol

Das 12 associações avaliadas, apenas uma foi significativa. Houve correlação negativa entre a concentração sérica de selênio e de cortisol no grupo G_{6,4} para o dia 0 ($r_s = -0,514$; $P=0,05$) (Tabela 5).

Tabela 5: Coeficientes de correlação (r_s) entre as concentrações séricas de cortisol e selênio

Grupos de bovinos	Coeficientes de correlação		
	Dia 0	Dia 60	Dia 120
Gc	-0,068 ^{NS} ($P>0,81$)	-0,070 ^{NS} ($P>0,805$)	0,357 ^{NS} ($P>0,191$)
G _{3,6}	-0,123 ^{NS} ($P>0,661$)	-0,193 ^{NS} ($P>0,491$)	-0,071 ^{NS} ($P>0,800$)
G _{5,4}	0,186 ^{NS} ($P>0,567$)	-0,339 ^{NS} ($P>0,216$)	0,450 ^{NS} ($P>0,092$)
G _{6,4}	-0,514* ($P>0,050$)	-0,186 ^{NS} ($P>0,507$)	0,055 ^{NS} ($P>0,844$)

^{NS} - não significativo, * - correlação significativo.

4.6 Correlação entre as concentrações séricas de selênio e títulos de anticorpos anti-rábicos

Das oito associações avaliadas, somente a correlação negativa entre a concentração sérica de selênio e de títulos de anticorpos no grupo G_{6,4} no dia 60 foi significativa (Tabela 6).

Tabela 6: Coeficientes de correlação (r_s) entre as concentrações séricas de selênio e títulos de anticorpos anti-rábicos.

Grupos de bovinos	Coeficientes de correlação	
	Dia 60	Dia 120
Gc	-0,255 ^{NS} ($P=0,358$)	-0,124 ^{NS} ($P=0,658$)
G _{3,6}	0,068 ^{NS} ($P=0,810$)	0,124 ^{NS} ($P=0,660$)
G _{5,4}	-0,113 ^{NS} ($P=0,690$)	-0,353 ^{NS} ($P=0,195$)
G _{6,4}	-0,580* ($P= 0,023$)	-0,143 ^{NS} ($P=0,610$)

^{NS} – não significativo, * - significativo.

4.7 Correlação entre as concentrações séricas de cortisol e títulos de anticorpos anti-rábiticos

Não houve correlação entre concentração sérica de cortisol e de títulos de anticorpos anti-rábiticos na maioria dos grupos e dias de coleta de sangue. Houve apenas duas correlações positivas nos dias 60 e 120, ambas no grupo G_{6,4} (Tabela 7).

Tabela 7: Coeficientes de correlação (R) entre as concentrações séricas de cortisol e títulos de anticorpos anti-rábiticos.

Grupos de bovinos	Coeficientes de correlação			
	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120
Gc	-0,027 ^{NS}	-0,030 ^{NS}	0,121 ^{NS}	-0,034 ^{NS}
G _{3,6}	0,193 ^{NS}	-0,261 ^{NS}	-0,352 ^{NS}	0,077 ^{NS}
G _{5,4}	-0,057 ^{NS}	-0,272 ^{NS}	0,087 ^{NS}	-0,371 ^{NS}
G _{6,4}	0,294 ^{NS}	0,513*	0,177 ^{NS}	0,645*

^{NS} = Não significativo, * Significativo (P<0,05).

5 DISCUSSÃO

5.1 Concentração de Se na *Brachiaria decumbens*

As variações que ocorreram nos títulos de anticorpos neutralizantes anti-rábicos, na concentração sérica de Se e cortisol dos bovinos durante o período experimental foram exclusivamente em função dos tratamentos. A semelhança na concentração de Se (0,04 mg de Se/Kg de matéria seca(MS)) na *Brachiaria decumbens* de todos os piquetes e a rotação de piquetes dos grupos de bezerros a cada 30 dias garantiram a igualdade da qualidade de pastejo.

A concentração de Se na forrageira dos piquetes era baixa segundo orientação do National Research Council (NRC) (1996) o qual relator que a concentração ideal de Se para bovinos é de 0,1 mg de Se/Kg de MS. Além disso, McDowell (1992) e o NRC (1996) referiram que os animais alimentados com capim contendo 0,02 a 0,05 mg de Se/Kg de forragem, podem apresentar sinais clínicos ou sub-clínicos de deficiência de Se, portanto, nesta condição é necessária a suplementação deste elemento mineral para os bovinos manterem-se saudáveis (GIERUS et al., 2002; PEIXOTO et al., 2005).

Demonstraram-se pastagens deficientes em Se no estado de São de Paulo (LUCCI et al., 1984, 1986), no Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (TORKARNIA et al., 1998, 1999; MORAES et al., 1999) e no Rio Grande do Sul (SANTIAGO, 1986; BARROS et al., 1988).

Segundo Carvalho et al. (2003) a deficiência de Se nas gramíneas no Brasil ocorre provavelmente porque este elemento mineral é escasso em praticamente todo território, devido a grande maioria do solo ser ácido, altamente lixiviado, com baixo teor de matéria orgânica e rica em Ferro (Fe), de modo que, neste tipo de solo o Se se perde facilmente. Assim, as gramíneas que se estabelecem nestes solos, absorvem pouco Se, devido à formação de um complexo de Fe e selenito. Além disso, as gramíneas tropicais que são cultivadas no Brasil não são boas acumuladoras desse mineral.

Forragens deficientes em Se também já foram encontradas na Argentina, Estados Unidos (PAVLATA et al., 2002), Canadá, China, Austrália, França, Inglaterra (GUNTER et al., 2003) e Alemanha (GIERUS et al., 2002) e Nova Zelândia (GRANT e SHEPPARD, 1983; THOMPSON et al., 1998).

5.2 Concentração sérica de Se

A dosagem de Se no soro sanguíneo tem sido freqüentemente utilizada para avaliar se a concentração do mineral está normal, deficiente ou excessiva (HERDT et al., 2000; RADOSTITS et al., 2007) após a ingestão de alimentos e/ou suplementos minerais (LONGNECKER et al., 1996; HERDT et al., 2000).

A concentração sérica de Se pode variar conforme a idade e a raça dos animais (HERDT et al., 2000). Entretanto, estes fatores não interferiram no resultado deste trabalho porque todos os bovinos eram da raça Nelore, com idade de aproximadamente 12 meses no dia zero e tinham pesos vivos médios semelhantes ($G_c = 182,5 \pm 10,30$; $G_{3,6} = 180,3 \pm 12,61$; $G_{5,4} = 174,6 \pm 7,88$ e $G_{6,4} = 183,0 \pm 7,86$). A ingestão de alimentos com diferentes concentrações de Se é outro fator que influencia a concentração sérica de Se nos bovinos, mas este fator também foi controlado no presente estudo. As amostras da *Bachiaria decumbens* de ambos os piquetes tiveram concentração semelhante de Se no dia zero (0,04 mg de Se/Kg de MS) e mostraram-se deficientes no mineral. Além disso, a rotação de piquetes a cada 30 dias garantiu que a qualidade de pastejo fosse semelhante em ambos os grupos experimentais. Portanto, as condições experimentais garantem que as variações que ocorreram na concentração sérica de Se dos bovinos foram exclusivamente em função dos tratamentos.

A concentração sérica de Se considerada adequada para os bovinos ainda não está totalmente estabelecida e diferentes autores descrevem valores discrepantes. Neste experimento serão considerados os valores dos estudos de Underwood e Suttle (1999) que consideram a concentração sérica de Se adequada ou normal $>100 \mu\text{g/L}$ e deficiência marginal de 80 a $95 \mu\text{g/L}$. Radostits et al. (2007) consideram adequada ou normal a concentração sérica de Se entre 80 a $300 \mu\text{g/L}$, enquanto que HERDT et al. (2000) consideram concentração sérica de Se adequada para bovinos de 65 a $100 \mu\text{g/L}$.

A concentração sérica de Se de $105,68 \mu\text{g/L}$ no grupo G_c no dia zero é significativamente maior em relação aos demais grupos (Figura 10) e está dentro dos valores considerados adequados ou normais conforme preconizado por Underwood e Suttle (1999) e Radostits et al. (2007). Os outros grupos apresentam deficiência marginal de Se ($G_{3,6} = 67,69 \mu\text{g de Se/L}$; $G_{5,4} = 59,02 \mu\text{g/L de Se}$; $G_{6,4} = 63,20 \mu\text{g/L de Se}$). Apesar desta diferença, o aumento na

concentração sérica de Se não interferiu nos resultados do experimento, pois sua concentração sérica reduziu significativamente ao longo do período experimental (Figura 11), como era esperado para o grupo deficiente em Se.

Após 120 dias de suplementação, a concentração sérica de Se no grupo G_{3,6} foi 27,2%; 8,1% e 16,6% maior do que as dos grupos G_c; G_{5,4} e G_{6,4}, respectivamente. No grupo G_{5,4}, a concentração sérica de Se foi 19% e 9,5% maior do que aquela dos G_c e G_{6,4}, respectivamente. No grupo G_{6,4}, a concentração sérica de Se foi 8,1% maior do a do G_c, mas comparando com G_{3,6} e G_{5,4}, que foram suplementados com doses menores de Se, a concentração sérica de Se foi 15% e 8,1% menor, respectivamente. Mesmo assim, não houve diferença significativa na concentração sérica de Se entre os grupos experimentais (Figura 10). No entanto, o tempo de suplementação com Se afetou a concentração sérica deste mineral (Figura 11).

No início do experimento, no grupo G_c a concentração sérica de Se estava dentro da concentração considerada adequada ou normal segundo Underwood e Suttle (1999), mas ao longo do período experimental reduziu significativamente e, no dia 120, os bovinos apresentaram deficiência marginal de Se (Figura 11). Assim, a alimentação para bovinos da raça Nelore contendo 0,04 mg de Se/Kg de MS pode ser considerada deficiente para este elemento mineral. Estes resultados corroboram com os achados de Hidroglou et al. (1985), Spears et al. (1986); McDowell (1992) e Radostits et al. (2007), que observaram que os bovinos de raças taurinas quando alimentados com dietas contendo 0,02 to 0,05 mg Se/kg de MS também apresentaram deficiência clínica ou subclínica de Se. De fato, o NRC (1996) recomendou que a dieta dos bovinos de corte deve conter 0,1 mg Se/Kg de MS. Deste modo, provavelmente a exigência de Se para bovinos de corte de raças Nelore e taurinas é semelhante.

No dia zero, o grupo G_{3,6} apresentava deficiência marginal de Se segundo Underwood e Suttle (1999) e Radostitis et al. (2007). Entretanto, após a suplementação, a concentração sérica de Se aumentou progressivamente ao longo do experimento e atingiu valor considerado normal ao término do experimento (Figura 11). Portanto, a suplementação *ad libitum* com 3,6 mg de Se/animal/dia foi eficiente para tratar e/ou prevenir sua deficiência marginal em bovinos da raça Nelore. Esta concentração de suplementação é semelhante à

recomendada pelo NRC (1996) que é de 3 mg de Se/animal/dia para os bovinos de corte das raças taurinas. Desta forma, estes dados reforçam que a dose de suplementação com Se para prevenir a deficiência deste elemento mineral nos bovinos seja semelhante entre as raças taurinas e Nelore.

Nos grupos G_{5,4} e G_{6,4} as concentrações séricas de Se no dia zero apresentavam-se deficientes marginalmente. Underwood e Suttle (1999) e Radostits et al. (2007). Após 120 dias de suplementação, a concentração sérica de Se dos animais destes grupos mostraram-se dentro da normalidade, segundo Radostits et al. (2007), mas utilizando concentração proposta por Underwood e Suttle (1999), estes animais permaneceram com deficiência marginal de Se após 120 dias de suplementação (Figura 11). Estas suplementações com 5,4 e 6,4 mg de Se/animal/dia pode ter alterado o metabolismo de Se por estarem excessivamente elevadas. Já que são 1,8 e 2,13 vezes maiores que a dose recomendada pelo NRC (1996) que é de 3 mg/bovino/dia. Embora os doses de suplementação aplicadas aos grupos G_{5,4} e G_{6,4} sejam elevadas, elas não causaram intoxicação, pois a concentração sérica de Se dos animais estavam dentro da normalidade (RADOSTITS et al., 2007) após 120 dias de suplementação (Figura 11). Além disso, os animais não mostraram qualquer sinal clínico de intoxicação por Se durante o experimento.

5.3 Concentração sérica de cortisol

As concentrações séricas de cortisol dos bovinos no dia zero estavam dentro da normalidade nos grupos G_c ($2,20 \pm 0,86 \mu\text{g/dL}$), G_{3,6} ($2,75 \pm 0,97 \mu\text{g/dL}$), G_{5,4} ($2,39 \pm 0,42 \mu\text{g/dL}$) e G_{6,4} ($2,62 \pm 0,69 \mu\text{g/dL}$). De fato, Aragón et al. (2001), Vasquez e Herrera (2003) citaram que o valor médio basal da concentração plasmática de cortisol é de $3,29 \mu\text{g/dl}$ para bovinos de raça zebuína. Reis et al. (2006) relataram que a concentração sérica basal média de cortisol em bovinos da raça Nelore é de $3,68 \mu\text{g/dL}$. Além disso, a rotação de piquetes dos grupos de bezerros a cada 30 dias e a deficiência de concentração de Se ($0,04 \text{ mg de Se/Kg de matéria seca}$) na *Brachiaria decumbens* dos piquetes garantiu a igualdade da qualidade de pastejo. A concentração de Se na forrageira dos piquetes estava deficiente e assim, as variações que ocorreram na concentração sérica de cortisol dos bovinos

durante o período experimental foram exclusivamente em função dos tratamentos.

A alteração na concentração sérica de cortisol ao longo dos dias mostrou que este dado foi uma variável adequada para indicar estresse em bovinos (HICKEY et al., 2003; YAGI et al., 2004; GUPTA et al., 2005a; REIS et al., 2006; SACO et al., 2007) e os animais que possuem concentração elevada de cortisol na corrente circulatória são considerados estressados (ANDRADE et al., 2001; ACARO JUNIOR et al., 2003; REIS et al., 2006).

Os resultados obtidos mostraram que a concentração sérica de cortisol não foi afetada pela interação entre os níveis de Se e o tempo de ingestão. Portanto, estas alterações que ocorreram na concentração sérica deste hormônio ao longo do período experimental são independentes das suplementações com Se.

As suplementações de 3,6; 5,4 e 6,4 mg de Se/bovino/dia não atuou como redutor de estresse causado por agentes estressores físicos e/ou psicológicos que foram impostos aos bovinos (Figura 12). Estes resultados corroboram os achados de Gupta et al. (2005a) que observaram que a concentração plasmática de cortisol em vacas no período pós-parto, não diminuiu após a injeção de 30 mg de Se. Além disso, não houve associação entre concentração sérica de cortisol e Se (Tabela 5), fato que reforça ausência de interação dos efeitos entre as variáveis, ou seja, a concentração sérica de cortisol e Se são independentes. A correlação negativa entre a concentração sérica de cortisol e Se no grupo G_{6,4} é fraca, isolada e ocorreu unicamente no início do experimento (dia zero), quando os animais ainda não tinham sido submetidos aos agentes estressores, e provavelmente, foi efeito do acaso. Depois que os agentes estressores de manejo foram impostos, esta correlação não persistiu.

Entre os dias 0 e 15, após os bovinos terem sido vacinados uma vez e manejados no curral por duas vezes consecutivas, a concentração sérica de cortisol não se elevou significativamente ($P < 0,01$; Figura 13). Durante este período os animais não estavam estressados, visto que a concentração sérica de cortisol de ambos os grupos experimentais estavam dentro dos valores basais conforme descrito por Aragón et al. (2001), Vasquez e Herrera (2003),

Reis et al. (2006). Portanto, a vacinação anti-rábica e o manejo dos bovinos no curral por duas vezes consecutivas não interferiu no seu bem-estar.

Após o dia 15, o cortisol sérico aumentou gradativamente ao longo do período experimental ($P < 0,01$) atingindo um pico no dia 90. Desta forma, o manejo freqüente dos bovinos no curral para a vacinação atuou como agente estressor para os bezerros independente da suplementação ou não com Se. Estes resultados são semelhantes aos de Cook et al. (2000), Lensink et al. (2000), Andrade et al. (2001), Reis et al. (2006) que também consideraram o manejo no curral como agente estressor para os bovinos. Ainda, estes resultados mostram a dificuldade de interação que os bovinos tiveram com o meio hostil que foi imposto a eles e estas alterações, acontecem mais intensamente à medida aumenta a dificuldade dos animais adaptarem-se ao novo meio a que foram expostos (BROOM, 1986).

Os bezerros foram expostos a vários agentes estressores durante o manejo, tais como: condução dos animais do pasto para o curral (EICHER, 2001; BORELL, 2001; MELLOR et al., 2002); o manejo no curral (COOK et al., 2000; LENSINK et al., 2000; ANDRADE et al., 2001; REIS et al., 2006) que é exercício físico forçado para os bovinos; a presença das pessoas gritando e as agressões físicas durante o manejo (PAJOR et al., 2000; HEMSWORTH et al., 2002), o curral que é um novo ambiente para os animais (GRANDIN, 1997; MORROW et al., 2002; ARTHINGTON et al., 2003; VASQUEZ e HERRERA, 2003) e o medo (GRANDIN, 1998, BORELL, 2001; MELLOR et al., 2002). Estes agentes estressores ativam o eixo HPA estimulando as glândulas adrenais a produzirem e secretarem os hormônios o cortisol, a adrenalina e a noradrenalina (CARRASCO e VAN de KAR, 2003; DICKERSON e KEMENY, 2004; CHARMANDARI et al., 2005; CURLEY Jr. et al., 2007). Esta alteração neuroendócrina e metabólica (BRUCKNAIER e BLUM, 1992; GARCIA-BELENGUER et al., 1996) afeta a homeostasia do organismo (GARCIA-BELENGUER et al., 1996; PALUDO et al., 2002) provocando efeitos deletérios para a saúde e bem-estar dos animais. Desta forma, o aumento na concentração sérica de cortisol que ocorreu nos bovinos durante o período experimental (Figura 13) foi em resposta a esses estressores que foram impostos.

No dia 120, a concentração sérica de cortisol dos bovinos reduziu significativamente ($P < 0,01$; Figura 13), independente da suplementação ou não com Se, possivelmente porque os bovinos adaptaram-se aos agentes estressores. Entretanto, a concentração sérica de cortisol não retornou à concentração basal conforme descrita por Aragón et al. (2001), Vasquez e Herrera (2003), Reis et al. (2006). A adaptação dos bovinos ao manejo também foi observada por Andrade et al. (2001), Mellor et al. (2002), Hickey et al. (2003), Solano et al. (2004), Reis et al. (2006). Estas adaptações aos agentes estressores ocorrem por mudanças no sistema nervoso central: no hipotálamo e função da hipófise, nos hormônios neuroesteróides e neurotransmissores causam alteração no sistema límbico principalmente na amígdala e hipocampo, e modificações na atividade do eixo HPA (COOK et al. 2000), frente aos agentes estressores (HOPSTER et al. 1999; GUPTA et al. 2005b). Outros fatores que contribuem para a adaptação dos bovinos frente aos agentes estressores são a genética (GRANDIN 1998; HOPSTER et al., 1999) -a subespécie *Bos taurus indicus* adapta-se mais facilmente do que os *Bos taurus taurus*- (BEATTY et al., 2006) e o temperamento sendo que os mais dóceis adaptam-se com maior facilidade (Le NEINDRE et al., 1995; GRANDIN, 1998).

5.4 Títulos de anticorpos anti-rábicos

Os procedimentos experimentais comuns aos grupos testados garantiram a igualdade das condições gerais. A similaridade nas condições de pastejo também ficou comprovada porque a concentração de Se das forrageiras de todos os piquetes eram idênticas (0,04 mg de Se/kg de MS) e pela a rotação de piquetes a cada 30 dias conforme proposto por Malafaia et al. (2004). Além disso, os soros de todos os animais utilizados no experimento, colhidos no dia zero, não apresentaram anticorpos anti-rábicos, indicando que estes animais não haviam tido contato com o vírus rábico e também não tinham sido imunizados contra raiva anteriormente. Assim, as variações encontradas nas concentrações de anticorpos anti-rábicos nos soros desses animais durante o experimento, foram induzidas exclusivamente pela vacinação anti-rábica e pelas diferentes suplementações de Se.

A *Brachiaria decumbens* era deficiente em Se (0,04 mg de Se/kg de MS). Conforme o NRC (1996), o requerimento de Se para bovinos é de 0,1 mg de Se/Kg de forragem. Fato que ficou comprovado devido a redução significativa na concentração sérica de Se nos bovinos do grupo Gc durante o experimento (Figura 11).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda que, para que um indivíduo esteja protegido contra a raiva é necessário que apresente um título de anticorpos anti-rábicos igual ou superior a 0,5 UI/mL. Em estudos realizados por Benišek et al. (2000), Cardoso et al. (2004) e Albas et al. (2005) este título de anticorpos também foi considerado protetor para bovinos.

A resposta imune humoral dos bovinos após a vacinação anti-rábica foi heterogênea com os animais apresentando baixa resposta à vacinação (títulos de anticorpos < 0,50 UI/mL), intercalados com outros com títulos de anticorpos anti-rábicos considerados protetores (= 0,50 UI/mL), mínimos a elevados, ficando confirmado pelo elevado coeficiente de variação para grupos (C.V.= 159,40%) e dias de observação (C.V.= 61,22%). Este fato também foi observado por Ciuchini et al. (1981), Albas et al. (2005) e Giometti et al. (2006) que também avaliaram a resposta imune humoral de outras vacinas anti-rábicas comerciais para bovinos. Portanto, esta variação nos títulos de anticorpos que ocorreu nos animais pode ser considerada uma característica fisiológica da resposta imune humoral anti-rábica em bovinos primovacinados contra a raiva.

A mediana dos títulos de anticorpos anti-rábicos dos animais do grupo G_{3,6}, suplementados com 3,6 mg de Se/animal/dia, é 26,5%; 125,8% e 140% maior que os do grupo Gc nos dias 60, 90 e 120, respectivamente. Ainda mais, estes títulos nos dias 90 e 120 são 29% e 40% maior do que os dos G_{5,4} e G_{6,4}, respectivamente. Mesmo assim, não houve diferença significativa nos títulos de anticorpos anti-rábicos (Figura 14) ou na concentração sérica de Se (Figura 10) entre os grupos experimentais. Estes resultados corroboram com os de Nemeček et al. (1990) que também não observaram diferença significativa na concentração de anticorpos totais, imunoglobulina G (IgG) e M (IgM) após a vacinação contra a Brucelose entre os grupos tratados ou não com Se. Entretanto, Awadeh et al. (1998) mostraram um aumento significativo na concentração de IgG e IgM de vacas e bezerros suplementados com mistura

mineral contendo 60 e 120 ppm de Se. A diferença entre resultados dos estudos é a grande variação entre as concentrações de suplementação com Se utilizada nos experimentos.

No grupo controle (Gc) houve redução significativa nos títulos de anticorpos anti-rábicos nos dias 90 e 120 quando comparado com os obtidos nos dias 30 e 60 após a vacinação ($P < 0,05$). As medianas dos títulos de anticorpos ficaram abaixo do mínimo requerido para que os bovinos sejam considerados protegidos contra o vírus rábico (Figura 15). A concentração sérica de Se também reduziu significativamente ao longo do experimento (Figura 11). Além disso, 120 dias após a vacinação 73,3% dos bezerros do grupo Gc apresentaram títulos de anticorpos anti-rábicos inferiores ao valor mínimo considerado protetor ($=0,5$ UI/mL) e permaneceram expostos ao vírus rábico. Estes bovinos provavelmente tiveram deficiência subclínica de Se ao longo do período experimental, pois sua concentração sérica mostrava deficiência marginal no dia 120 (Figura 18). De fato, Underwood e Suttle (1999) consideraram que os bovinos que apresentam concentração sanguínea de 80 a 100 $\mu\text{g/L}$ tem deficiência marginal deste elemento mineral. Os resultados desta pesquisa corroboram os de Carroll e Fosberg (2007) e Radostits et al. (2007) que relataram que a deficiência de Se provoca imunossupressão devido a redução na produção de anticorpos. Além disso, a dieta contendo 0,04 mg de Se/kg de MS é deficiente para os bovinos da raça Nelore sendo necessário suplementá-los com Se. Os resultados desta pesquisa corroboram os de Hidroglou et al. (1985), Spears et al. (1986) e McDowell (1992) que observaram que os bovinos das raças taurinas, quando alimentados com dieta contendo de 0,02 a 0,05 mg de Se/kg, também apresentaram deficiência clínica ou subclínica deste mineral.

O grupo $G_{3,6}$ que foi suplementado com 3,6 mg de Se/animal/dia foi o que apresentou a melhor resposta imune humoral anti-rábica. Neste grupo, 30 dias após a vacinação, a média dos títulos de anticorpos anti-rábicos estava acima do mínimo considerado protetor e se mantiveram por 120 dias após a vacinação (Figura 15). Ainda mais, 53,3% dos bezerros apresentaram títulos de anticorpos anti-rábicos maiores ou iguais ao mínimo considerado protetor ($=0,5$ UI/mL). Estes títulos de anticorpos mantiveram-se estáveis durante o experimento possivelmente por causa do aumento progressivo na

concentração sérica de Se, atingindo no dia 120 a concentração mínima requerida para proteção dos bovinos (Figura 11). Realmente, Underwood e Suttle (1999) consideraram que concentração sanguínea adequada de Se para bovinos é maior do que 100 µg/dL. Esta suplementação alimentar com 3,6 mg de Se/bovino/dia aumentou a persistência dos títulos de anticorpos anti-rábicos em bovinos da raça Nelore primovacinados contra a raiva. Este fato é de fundamental importância para o sucesso do controle da raiva dos bovinos por meio de programas de vacinação. Esta suplementação do grupo G_{3,6} está muito próxima da dose recomendada pelo NRC (1996) para bovinos de corte de raças taurinas que é de 3 mg de Se/animal/dia. Assim, estes dados indicam que a dose de suplementação com Se para elevar a persistência dos títulos de anticorpos anti-rábicos em bovinos não é dependente da raça, pois as raças taurinas são semelhantes à raça Nelore.

A concentração sérica de Se nos grupos G_{5,4} e G_{6,4} que receberam 5,4 e 6,4 mg de Se/bovino/dia, respectivamente, aumentou significativamente durante o experimento (Figura 11). Entretanto, estas elevadas suplementações com Se não promoveram a resposta imune humoral anti-rábica, pois os títulos de anticorpos anti-rábicos diminuíram significativamente 120 dias após a vacinação. Além disso, as medianas dos títulos de anticorpos nestes grupos permaneceram abaixo dos títulos de anticorpos mínimos considerados protetores (Figura 15) e uma elevada porcentagem de bovinos (60% no grupo G_{5,4} e 80% no grupo G_{6,4}) não atingiram o título mínimo considerado protetor (=0,5 UI/mL) no dia 120, deixando estes animais susceptíveis a contraírem o vírus rábico. As suplementações com Se nestes grupos foram excessivas, mas não tóxicas clinicamente, comprometendo a resposta imune humoral anti-rábica. O NRC (1996) recomenda suplementação diária de 3 mg de Se/bovino/dia. Portanto, as suplementações utilizadas no presente estudo são 180% e 213,3% maiores que a recomendada pelo NRC (1996).

Houve correlação negativa entre títulos de anticorpos e concentração sérica de Se no grupo G_{6,4} (Tabela 6). O mecanismo fisiológico que está envolvido na associação entre títulos de anticorpos e concentração sérica de Se não foram elucidados, necessitando de maiores investigações. Contudo, os resultados obtidos ao final deste estudo sugerem que a suplementação com

6,4 mg de Se/bovino/dia é excessivo e prejudica a resposta imune humoral anti-rábica em bovinos da raça Nelore.

5.5 Associação entre concentração sérica de cortisol e títulos de anticorpos anti-rábicos

Este estudo mostra que a suplementação adequada da alimentação dos bovinos com Se promove a persistência dos títulos de anticorpos em animais primovacinados, mesmo quando passem periodicamente por estresse de manejo. O estresse de manejo, por sua vez, não se associa negativamente à resposta imune humoral anti-rábica. Esse dado é importante porque esse estresse é sistematicamente aplicado aos bovinos em programas de controle da raiva.

As variações de concentração sérica de cortisol e os títulos de anticorpos nos animais testados foram obtidos exclusivamente em função dos tratamentos e condições impostas (estresse de manejo, vacinação anti-rábica, e suplementações com Se). Isso pode ser afirmado porque no início do experimento (dia 0) as amostras de sangue foram não-reativas para a raiva e os valores de cortisol em todos os grupos estavam dentro da normalidade considerando-se como referência para bovinos zebu os valores basais médios de cortisol de 3,29 µg/dl (ARAGON et al. , 2001; VASQUEZ e HERRERA, 2003) e, especificamente para os da raça Nelore, de 3,68 µg/dL para (REIS et al., 2006).

Considera-se que os bovinos estão em estado de estresse quando apresentam concentrações séricas de cortisol acima da normalidade (ACARO JUNIOR et al., 2003; REIS et al., 2006; GUPTA et al., 2007; CURLEY Jr. et al., 2008). Dessa forma, o aumento da concentração sérica de cortisol ao longo do experimento indica que, a partir do dia 30, todos os animais testados ficaram estressados com as condições de manejo, e o pico de estresse ocorreu no dia 90 (Figura 13). Parece, no entanto, que os bovinos se ajustaram ao estresse de manejo uma vez que no último dia de observação (dia 120) as concentrações séricas de cortisol diminuíram significativamente ($P < 0,01$), embora não tenham retornado às concentrações basais (Figura 13). A adaptação dos bovinos ao

manejo foi também observada em outros estudos (MELLOR et al., 2002; HICKEY et al., 2003; SOLANO et al., 2004; REIS et al.; 2006).

Apesar do aumento do cortisol sérico, o estresse não interferiu na resposta imune humoral anti-rábica nos bovinos (Figura 13). Esse dado corrobora os achados de Wernicki et al. (2003) que mostraram que o estresse gerado pelo transporte de bovinos não afeta a resposta imune humoral contra a leucotoxina da *Mannheimia haemolytica* e os de Stanger et al. (2005) que afirmaram que o toxóide tetânico não interfere na resposta imune humoral após a vacinação. Por outro lado, Van Reenen et al. (2000) mostraram que o isolamento social prejudicou a resposta à infecção experimental com herpesvirus bovino 1 (BHV 1) em bezerros de 12 semanas. Essas divergências devem se explicar pela natureza dos estressores além da idade dos animais. O isolamento social dos bezerros parece afetar a resposta imunológica por gerar estresse mais intenso do que o manejo freqüente no curral. É importante a constatação que o estresse de manejo para vacinação não interfere na resposta imune humoral anti-rábica nos bovinos, pois vacinações periódicas são necessárias para o sucesso do controle da raiva nos bovinos da raça Nelore.

A diminuição nos títulos de anticorpos anti-rábicos foi detectada no fim do experimento (Figura 15). Essa redução de anticorpos algum tempo após a vacinação é uma característica fisiológica da resposta imune humoral anti-rábica em bovinos primovacinados já mostrada em outros estudos (CIUCHINI et al., 1981; ALBAS et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2000; RODRIGUES da SILVA et al., 2000; ALBAS et al., 2005; GIOMETTI et al., 2006). Essa queda não foi observada no grupo $G_{3,6}$ onde os níveis de anticorpos anti-rábicos foram mantidos. A concentração de Se recebida por $G_{3,6}$ foi muito próxima à recomendada pelo NRC (1996), que é de 3 mg de Se por dia para bovinos de corte das raças taurinas. Como evidenciado neste estudo, a concentração de Se próxima a este valor eleva a persistência dos títulos de anticorpos anti-rábicos em bovinos da raça Nelore, sendo semelhante a resposta de raças taurinas.

Apesar dos níveis de cortisol e títulos de anticorpos caírem ao longo do experimento, essas variáveis não se correlacionaram na maioria dos grupos e dias de amostragem de sangue. Isso reforça que o estresse não interferiu na

resposta imune humoral anti-rábica dos bovinos. Pelo contrário, as correlações encontradas, nos dias 60 e 120 no grupo $G_{6,4}$ (Tabela 7), foram positivas. Essa associação positiva indica a princípio que o estresse de manejo foi de alguma forma associado ao aumento da resposta imune. Essa resposta, porém, não foi mantida, e no dia 120 os títulos de anticorpos anti-rábicos de $G_{6,4}$ ficaram abaixo dos níveis mínimos necessários à proteção contra o vírus rábico (Figura 15). Mais investigações são necessárias para elucidar os mecanismos fisiológicos que mediaram essas relações entre cortisol e títulos de anticorpos. Porém, o resultado ao término do experimento sugere que a dose de 6,4 mg de Se é excessiva (NRC, 1996) e prejudica resposta imune humoral anti-rábica em bovinos da raça Nelore.

6 CONCLUSÕES

Nas condições em que foi conduzido e conforme os resultados obtidos permitiram concluir que:

a) A concentração sérica de Se aumenta conforme o aumento de ingestão até 5,4 mg de Se/animal/dia.

b) A suplementação com 3,6 mg de Se por animal por dia é eficiente para tratamento e/ou prevenção da deficiência marginal de Se.

c) A suplementação de 3,6; 5,4 e 6,4 mg de Se por animal por dia é ineficaz para reduzir a concentração sérica de cortisol.

d) Repetidos manejos dos bovinos no curral estressa os animais, embora haja adaptação a estas condições mas a concentração sérica de cortisol não volta aos valores basais até os 120 dias.

e) A suplementação diária com 3,6 mg de Se/animal manteve os títulos de anticorpos anti-rábicos neutralizantes em bovinos da raça Nelore primovacinados contra a raiva.

f) O estresse gerado pelos repetidos manejos nos bovinos no curral não diminui os títulos de anticorpos após a vacinação anti-rábica.

7 REFERÊNCIAS*

ABUTARBUSH, S.M.; RADOSTITS, O.M. Congenital nutritional muscular dystrophy in a beef calf. *Can. Vet. J.*, v.44, p.738-739, 2003.

ACARO JR., I.; ACARO, J.R.P.; POZZI, C.R.; FAGUNDES, H.; MATARAZZO, S.V.; OLIVEIRA, C.A. Teores plasmáticos de hormônios, produção e composição do leite em sala de espera climatizada. *Rev. Bras. Eng. Agríc. Ambient.*, v.7, n.2, p.350-354, 2003.

ACHA, P.N.; MALAGA-ALBA, A. Economical losses due to *Desmodus rotundus*. In: GREENHAL, A.M.; SCHMIDT, V. (Eds.). *Natural history of vampire bats*. Boca Raton: CRC Press Inc., 1988. p.207-214.

AGUILAR-SETIÉN, A.; CAMPOS, Y.L.; CRUZ, E.T.; KRETSCHMER, R.; BROCHIER, B.; PASTORET, P.P. Vaccination of vampire bats using recombinant vaccinia-rabies virus. *J. Wildl. Dis.*, v.38, n.3, p.539-544, 2002.

AGUILERA, G.; RABADAN-DIEHL, C.; NIKODEMOVA, M. Regulation of pituitary corticotropin releasing hormone receptors. *Peptides*, v.22, p.769-774, 2001.

AKEMA, T.; CHIBA, A.; SHINAZAKI, R.; OXIDA, M.; KIMURA, F.; TOYODA, J. Acute immobilization stress and intraventricular injection of CRF suppress naloxone-induced LH release in ovariectomized estrogen-primed rats. *J. Neuroendocrinol.*, v.8, p.647-652, 1996.

ALBAS, A.; PARDO, P.E.; BREMER NETO, H.; GALLINA, N.M.F.; MOURAO FUCHES, R.M.; SARTORI, A. Vacinação anti-rábica em bovinos: comparação de cinco esquemas vacinais. *Arq. Inst. Biol.*, v.72, n.2, p.153-159, 2005.

* UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA – UNESP/FMVZ. *Modelos para Elaboração da Dissertação/Tese*. Botucatu, 2005. Disponível em: http://www.fmvz.unesp.br/PosGraduacao/MedVet/Formularios/modelos_diss_tese.pdf. Acessado: 01 Set 2008.

ALBAS, A.; FONTOLAN, O. L.; PARDO, P. E.; BREMER NETO, H.; SARTORI, A. Interval between first dose and booster affected antibody production in cattle vaccinated against rabies. *J. Venom. Anim. Toxins. Incl. Trop. Dis.*, v.12, n.3, p.476-486, 2006.

ALMEIDA, M.F.; AGUIAR, E.A.C.; MARTORELLI, L.A.F.; PRESOTTO, D.; BRANDÃO, M.M.; PEREIRA, O.A.C. Resposta imune humoral de cães à vacina inativada de cérebro de camundongos lactentes utilizada nas campanhas anti-rábicas no Brasil. *Rev. Saúde Pública*, v.31, n.5, p.502-507, 1997.

ALVES, L.M.; SOARES, R.M.; CORTEZ, A.; RICHTZENHAIN, L.J.; ITO, F.H. Pathogenesis of rabies vírus by ERA and PV strains administered orally in hamsters (*M. auratus*). *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.40, n.1, p.79-84, 2003.

AMASINO, C.F.; GARBI, C.J.; AMASINO, M.F. La rabia urbana em la provincia de Buenos Aires, Argentina: origen-evolution-actualidad. *Analecta Veterinaria*, v.22, n.1, p.17-31, 2002.

ANDRADE, O.; ORIHUELA, A.; SOLANO, J.; GALINA, C.S. Some effects of repeated handling and the use of a mask on stress responses in Zebu cattle during restraint. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, v.71, n.3, p.175-181, 2001.

ANDREWS, A.H. Other calf problems. In: ANDREWS, A.H. et al. (Eds.). *Bovine medicine*. London: Blackwell Scientific Publications, 1992. p.213-228.

ARAGÓN, V.E.F.; GRAÇA, D.S.; NORTE, A.L.; SANTIAGO, G.S.; PAULA, O.J. Suplementação com cromo e desempenho reprodutivo de vacas primíparas mantidas a pasto. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.53, n.5, p.624-628, 2001.

ARTHINGTON, J.D.; EICHER, S.D.; KUNKLE, W.E.; MARTIN, F.G. Effect of transportation and commingling on the acute-phase protein response, growth, and feed intake of newly weaned beef calves. *J. Anim. Sci.*, v.81, p.1120-1125, 2003.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE SUPLEMENTOS MINERAIS (ASBRAM). Cochos: instalações rurais indispensáveis para a correta suplementação. In: _____. *Guia prático para a correta suplementação pecuária*. Sorocaba: CONTATOCOM, 2003. Cap.12, p.31-41.

AUSTIN–SMITH. Bats, rabies. *Department of Natural Resources*, v.10, n.4, 1986. Disponível em: <<http://www.gov.ns.ca/natr/wildlife/conserva/10-04-10.htm>>. Acesso em: 21 jun. 2003.

AWADEH, F.T.; KINCAID, R.L.; JOHNSON, K.A. Effect of level and source of dietary selenium on concentrations of thyroid hormones and immunoglobulins in beef cows and calves. *J. Anim. Sci.*, v.76, p.1204-1215, 1998.

BADRANE, H.; BAHLOUL, C.; PERRIN, P.; TORDO, N. Evidence of two Lyssavirus phylogroups with distinct pathogenicity and immunogenicity. *J. Virol.*, v.75, n.7, p.3268-3276, 2001.

BARROS, C.S.L.; BARROS, S.S.; SANTOS, M.N.; METZDORF, L.L. Miopatia nutricional em bovinos no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.*, v.8, n.3/4, p.51-55, 1988.

BEATTY, D.T.; BARNES, A.; TAYLOR, E.; PETHICK, D.; MCCARTHY, M.; MALONEY, SK. Physiological responses of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle to prolonged, continuous heat and humidity. *J. Anim. Sci.*, v.84, p.972-985, 2006.

BENIŠEK, Z.; SÜLI, J.; ŠVRCK, Š.; MOJŽIŠ OVA, J.; TAKÁCOVA, D.; ZÁVADOVÁ, J.; ONDREJKA, R.; ONDREJKOVÁ, A. Experimental inactivated purified concentrated adjuvant rabies vaccine. Evaluation of its efficacy in cattle. *Acta Vet. Brno*, v.69, p.39-44, 2000.

BIGGERS, B.G.; GIESERT, R.D.; WERREMAN, R.P.; BUCHANAN, D.S. Effect of heat stress on early embryonic development in the beef cow. *J. Anim. Sci.*, v.64, p.1512, 1987.

BLECHA, F. Immune system response to stress. In: MORBERG, G.P.; MENCH, J.A. *The biology of animals stress: basic principles and implications for animal welfare*. New York: CABI Publishing, 2000. p.111-121.

BLOOD, D.C.; RADOSTITS, O.M. Estados sistêmicos gerais. In: _____. *Clínica veterinária*. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. cap.2, p.31-80.

BORELL, E.H. The biology of stress and its application to livestock housing and transportation assessment. *J. Anim. Sci.*, v.79, p.E260-E267, 2001.

BRASS, D.A. *Rabies in bats: natural history and public health implications*. Ridgefield: C.T. Livia Press, 1994. 335p.

BROCHIER, B.; AUBERT, M.F.A.; PASTORET, P.P.; MASSON, E.; SCHON, J.; LOMBARD, M.; CHAPPUIS, G.; LANGUET, B.; DESMETTRE, P. Utilización sobre el terreno de una vacuna con virus recombinante de la vaccinia para el control de la rabia silvestre en Europa y America del Norte. *Rev. – Off. Int. Epizoot.*, v.15, n.3, p.947-970, 1996.

BROOM, D.M. Indicators of poor welfare. *Br. Vet. J.*, v.142, p.524-526, 1986.

BRUCKMAIER, R.M.; BLUM, J.W. Oxytocin release and milk removal in ruminants. *J. Anim. Sci.*, v.81, p.939-949, 1998.

BUENO, A.R.; RASBY, R.; CLEMENS, E.T. Age at weaning and the endocrine response to stress. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.55, n.1, p.1-7, 2003.

CARAMORI JUNIOR, J.G.; LUBAS, M.A.S.; KAWATAKE, M.S.; SALES, K.G.; GUEDES, J.C.; SCHMITT, A.C. Inquérito epidemiológico sobre características da população canina e felina de um bairro próximo à zona rural em Cuiabá-MT, visando o controle da raiva animal. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.36, n.3, p.419-420, 2003.

CARDOSO, T.C.; QUEIROZ DA SILVA, L.H.; ALBAS, A.; FERREIRA, H.L.; PERRI, S.H.V. Rabies neutralizing antibody detection by indirect immunoperoxidase serum neutralizing assay performed on chicken embryo related cell line. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.99, n.5, p.531-534, 2004.

CARRASCO, G.A.; VAN DE KAR, L.D. Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur. J. Pharmacol.*, v.463, p.235-272, 2003.

CARROLL, J.A.; FORSBERG, N.E. Influence of stress and nutrition on cattle immunity. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, v.23, p.105-149, 2007.

CARRIERI, M.L.; PEIXOTO, Z.M.; FAVORETO, S.R.; CARNIELI, P.; KOTAIT, I. Diagnóstico laboratorial da raiva dos eqüídeos: dados preliminares. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE RAIVA, 2003, São Paulo. *Anais...* São Paulo, 2003. p.31-32.

CARVALHO, F.A.N.; BARBOSA, F.A.; MCDOWELL, L.R. Minerais. In: _____. (Eds.). *Nutrição de bovinos a pasto*. Belo Horizonte: PapelForm, 2003. p.157-368.

CENTER FOR DISEASE CONTROL - CDC. Rabies preventions United States. 2000. Disponível em: <[http:// www.avma.org/pubchlt/rabprev.asp](http://www.avma.org/pubchlt/rabprev.asp)>. Acesso em: 11 mar. 2003.

CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSES. Vigilancia Epidemiológica. *Rabia American*, v.21, n.7, p.12, 1989.

CHANDOLIA, R.K.; REINERTSEN, E.M.; HANSEN, P.J. Lack of breed differences in responses of bovine spermatozoa to heat shock. *J. Dairy Sci.*, v.82, p.2617-2619, 1999.

CHARMANDARI, E.; TSIGOS, C.; CHROUSOS, G. Endocrinology of the stress response. *Annu. Rev. Physiol.*, v.67, p.259-284, 2005.

CHHABRA, M.; ICHHPUJANI, R.L.; TEWARI, K.N.; LAL, S. Human rabies in Delhi. *Indian. J. Pediatr.*, v.71, p.217-220, 2004.

CIUCHINI, I.A.; IRSARA, A.; PESTALOZZA, S.; TRANI, L.; ANTONUCCI, G. Risposta immunitaria in bovini vaccinati contro la rabia com virus atenuado ceppo ERA. *Rev. Zootec. Vet.*, v.9, p.176-184, 1981.

CONCHA, C. Cell type and their immunological functions in bovine mammary tissues and secretions-a review of the literature. *Nord. Vet. Med.*, v.38, p.257-272, 1986.

COOK, C.J.; MELLOR, D.J.; HARRIS, P.J.; INGRAM, J.R.; MATTHEWS, L.R. Hands-on and hands-off measurement of stress. In: MORBERG, G.P.; MENCH, J.A. *The biology of animals stress: basic principles and implications for animal welfare*. New York: CABI Publishing, 2000. p.123-146.

COPPO, J.A.; MUSSART, N.B.; REVIDATTI, M.A.; CAPELLARI, A. Absence of biochemically demonstrable stress in early weaned half-bred zebu calves. *Cien. Inv. Agr.*, v.30, n.2, p.97-105, 2003.

COVENTRY, T.L.; JESSOP, D.S.; FINN, D.P.; CRABB, M.D.; KINOSHITA, H. Endomorphins and activation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *J. Endocrinol.*, v.169, p.185-193, 2001.

CURLEY JR., K.O.; NEUENDORFF, D.A.; LEWIS, A.W.; CLEERE, J.J.; WELSH, T.H. Jr, RANDEL, R.D. Functional characteristics of the bovine hypothalamic-pituitary-adrenal axis vary with temperament. *Horm. Behav.*, v.53, p.20-27, 2008.

DAVID, D.; RUPPRECHT, C.E.; SMITH J.S.; STRAM, Y. Antemortem detection and vírus characterization of three human rabies fatalities in Israel between 1996-1997. *Israel Veterinary Medical Association*, v.54, n.3, 1999. Disponível em: <http://www.isrvma.org/article/54_3.htm>. Acessado em: 22 jun. 2003.

DELPIETRO, H.A.; LARGHI, O.P.; RUSSO, R.G. Virus isolation from saliva and glands salivary of cattle naturally infected with paralytic rabies. *Prev. Vet. Med.*, v.48, p.223-228, 2001.

DICKERSON, S.S.; KEMENY, M.E. Acute stressors and cortisol responses: a theoretical integration and synthesis of laboratory research. *Psychol. Bull.*, v.130, p.355-391, 2004.

DOBSON, H.; SMITH, R.F. What is stress, and how does it affect reproduction?. *Anim. Reprod. Sci.*, v.60-61, p.743-752, 2000.

DOMINGUES, P.F.; LANGONI, H. *Manejo sanitário animal: manejo sanitário de bovinos*. Rio de Janeiro: Editora de Publicações Biomédica Ltda, 2001. 101p.

ECHEVARRIA, J.E.; AVELLON, A.; JUSTE, J.; VERA, M.; IBANEZ, C. Screening of active *Lysavirus* infection in wild bat populations by viral RNA detection on oropharyngeal swabs. *J. Clin. Microbiol.*, v.39, n.10, p.3678-3683, 2001.

EGAWA, M.; YOSHIMATSU, H.; BRAY, G.A. Neuropeptide Y suppresses sympathetic activity to interscapular brown adipose tissue in rats. *American Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, v.260, p.R328-334, 1991.

EICHER, S.D. Transportation of cattle in the dairy industry: current research and future directions. *J. Dairy Sci.*, v.84, p.E19-E23, 2001.

ELSASSER, T.H.; KLASING, K.C.; FILIPOV, N.; THOMPSON, F. The metabolic consequences of stress: targets for stress and proprieties of nutrient use. In: MORBERG, G.P.; MENCH, J.A. *The biology of animals stress: basic principles and implications for animal welfare*. New York: CABI Publishing, 2000. p.77-110.

ENCARNAÇÃO, R.O. Estresse e produção animal. In: COSTA, M.J.R.P. 1º *Ciclo internacional de palestras sobre bioclimatologia animal*. Jaboticabal: FUNEP, 1989. p.111-129.

ENJALBERT, F.; LEBRETON, P.; SALAT, O.; SCHELCHER, F. Effects of pre or postpartum selenium supplementation on selenium status in beef cows and their calves. *J. Anim. Sci.*, v.77, p.223-229, 1999.

ENJALBERT, F.; LEBRETON, P.; SALAT, O. Effects of copper, zinc and selenium status on performance and health in commercial dairy and beef herds: retrospective study. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, v.90, p.459-466, 2006.

ERIKSEN, H.R.; OLFF, M.; MURISON, R.; URSIN, H. The time dependent dimension in stress responses: relevance for survival and health. *Psychiatry Res.*, v.85, p.39-50, 1999.

ETESSAMI, R.; CONZELMANN, K.K.; FADAI-GHOTBI, B.; NATELSON, B.; TSIANG, H.; CECCALDI, P.E. Spread and pathogenic characteristics of a Gdeficient rabies virus recombinant: in vitro and in vivo study. *J. Gen. Virol.*, v.81, p.2147-2153, 2000.

FAVI, C.M.; YUNG, V.P.; ROOS, K.O.; RODRÍGUEZ, L.A.; TRUJILLO, R.M.; ATTIA, A.A. Evaluación de la capacidad inmunogénica de la vacuna antirrábica tipo Fuenzilada-Palacios (CRL) y de la vacuna antirrábica de cultivo celular (Verorab[®]) en personas con tratamiento preexposición. *Rev. Méd. Chile*, v.132, n.1, p.41-46, 2004.

FAVORETTO, S.R.; CARRIERI, M.L.; CUNHA, S.E.M.; AGUIAR, E.A.C.; SILVA, L.H.Q.; SODRÉ, M.M.; SOUZA, M.C.A.M.; KOTAIT, I. Antigenic typing of brasilian rabies virus samples isolated from animals and humans, 1989-2000. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, v.44, n.2, p.91-95, 2002.

FERNANDEZ, X.; MONIN, G.; CULIOLI, J.; LEGRAND, I.; QUILICHINI, Y. Effect of duration of feed withdrawal and transportation time on muscle characteristics and quality in Friesian-Holstein calves. *J. Anim. Sci.*, v.74, p.1576-1583, 1996.

FOOKS, A.R.; BROOKES, S.M.; JOHNSON, N.; MCELHINNEY, L.M.; HUTSON, A.M. European bat lyssaviruses: an emerging zoonosis. *Epidemiol. Infect.*, v.131, n.3, p.1029-1039, 2003.

FRANKA, R.; SVRCEK, S.; MADAR, M.; KOLESAROVA, M.; ONDREJKOVA, A.; ONDREJKA, R.; BENISEK, Z.; SULI, J.; VILCEK, S. Quantification of the effectiveness of laboratory diagnostics of rabies using classical and molecular-genetic methods. *Vet. Med.*, v.49, n.7, p.259-267, 2004.

GALLI, I.O.; MONJE, A.R.; HOFER, C.C. Destete precoz: clave para nuevos sistemas de producción de carne vacuna. Concepción del Uruguay: Editorial INTA, 1995. 33p.

GARCIA-BELENGUER, S.; PALACIO, J.; GASCÓN, M.; ACEÑA, C.; REVILLA, R.; MORMÈDE, P. Differences in the biological stress responses of two cattle breeds to walking up to mountain pastures in the Pyrenees. *Vet. Res.*, v.27, p.515-526, 1996.

GENARO, G.; SCHMIDEK, W.R.; FRANCI, C.R. Social condition affects hormone secretion and exploratory behavior in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.37, n.6, p. 833-840, 2004.

GIBBONS, R. Cryptogenic rabies, bats, and question of aerosol transmission. *Ann. Emerg. Med.*, v.39, n.5, p.528-536, 2002.

GIERUS, M.; SCHWARZ, F.J.; KIRCHGESSNER, M. Selenium supplementation and selenium status of dairy cows fed diets based on grass, grass silage or maize silage. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, v.86, p.74-82, 2002.

GIOMETTI, J.; CHIACCHIO, S.B.; ALBAS, A.; PARDO, P.E.; BREMER-NETO, H.; GIOMETTI, A.I.; REIS, L.S.L.S. Influência da suplementação com cromo na resposta imune humoral anti-rábica em Bovinos. *Arq. Inst. Biol.*, v.73, p.421-427, 2006.

GIOMETTI, J.; CHIACCHIO, S.B.; ALBAS, A.; PARDO, P.E.; BREMER NETO, H.; GIOMETTI, A.I.; REIS, L.S.L.S. Efeito da suplementação com levedura de crômio no cortisol sérico de bovinos. *Arch. Zootec.*, v.56, n.213, p.79-82, 2007.

GOMES, M.N.; UIEDA, W.; LATORRE, M.R.D.O. Influência do sexo de indivíduos da mesma colônia no controle químico das populações do morcego hematófago *Desmosdus rotundus (Phyllostomidae)* no Estado de São Paulo. *Pesq. Vet. Bras.*, v.26, n.1, p.38-43, 2006.

GRANDIN, T. Assessment of stress during handling and transport. *J. Anim. Sci.*, v.75, p.249-257, 1997.

GRANDIN, T. Handling methods and facilities to reduce stress on cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, v.14, p.325-241, 1998.

GRANT, A.B.; SHEPPARD, A.D. Selenium in New Zealand pastures. *N. Z. Vet. J.*, v.31, p.131-136, 1983.

GUIGNOT, F.; TOURAILLE, C.; OUALI, A.; RENERRE, M.; MONIN, G. Relationships between post-mortem pH changes and some traits of sensory quality in veal. *Meat Sci.*, v.37, p.315-325, 1994.

GUNTER, S.A.; BECK, P.A.; PHILLIPS, J.M. Effects of supplementary selenium source on the performance and blood measurements in beef cows and their calves. *J. Anim. Sci.*, v.81, p.856-864, 2003.

GUPTA, S.; EARLEY, B.; TING, S.T.; CROWE, M.A. Effect of repeated regrouping and relocation on the physiological, immunological, and hematological variables and performance of steers. *J. Anim. Sci.*, v.83, p.1948-1958, 2005.

GUPTA, S.; GUPTA, H.K.; SONI, J. Effect of vitamin E and selenium supplementation on concentration of serum cortisol and erythrocyte lipid

peroxides and the incidence of retained fetal membranes in crossbred dairy cattle. *Theriogenology*, v.64, p.1273-1286, 2005a.

GUPTA, S.; GUPTA, H.K.; SONI, J. Effect of vitamin E and selenium supplementation on concentrations of serum cortisol and erythrocyte lipid peroxides and the incidence of retained fetal membranes in crossbred dairy cattle. *Theriogenology*, v.64, p.1273-1286, 2005b.

GUPTA, S.; EARLEY, B.; CROWE, M.A. Pituitary, adrenal, immune and performance responses of mature Holstein x Friesian bulls housed on slatted floors at various space allowances. *Vet. J.*, v.173, p.594-604, 2007.

GUYATT, H.J. A molecular, epidemiological study of Australian bat lyssavirus. *J. Gen. Virol.*, v.84, p.485-496, 2003.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. *Tratado de fisiologia médica*. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 100p.

HABIB, K.E.; GOLD, P.W.; CHROUSOS, G.P. Neuroendocrinology of stress. *Endocrinol. Metabol. Clin. North Am.*, v.30, n.3, p.695-728, 2001.

HADDAD, C.M.; ALVES, F.V. Minerais para gado de corte. In: BITTAR, C. et al. (Eds.). *Minerais e aditivos para bovinos*. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz – FEALQ, 2006. p.63-76.

HALE, K.D.; WEIGENT, D.A.; GAUTHIER, D.K.; HIRAMOTO, R.N.; GHANTA, V.K. Cytokine and hormone profiles in mice subjected to handling combined with rectal temperature measurement stress and handling only stress. *Life Sci.*, v.72, p.1495-1508, 2003.

HANKINS, D.G.; ROSEKRANS, J.A. Overview, prevention and treatment of rabies. *Mayo Clin. Proc.*, v.79, n.5, p.671-676, 2004.

HANSEN, P.J.; DROST, M.; RIVERA, R.M.; PAULA-LOPES, F.F.; AL-KATANANI, Y.M.; KRININGER, C.E.; CHASE, C.C. Adverse impact of heart stress on embryo production: causes and strategies for mitigation. *Theriogenology*, v.55, p.91-103, 2001.

HAWKES, W.C.; ALKAN, F.Z.; OEHLER, L. Absorption, distribution and excretion of selenium from beef and rice in healthy North American men. *J. Nutr.*, v.133, p.3434-3442, 2003.

HEMINGWAY, R.G.; PARKINS, J.J.; RITCHIE, N.S.; TAYLOR, D.J. Somatic cell count and reduction in antibiotic use in dairy cows by dietary supplementation with trace elements and vitamins given as a ruminal bolus system. *Vet. Res. Commun.*, v.87, p.102-110, 2000.

HEMINGWAY, R.G. The influence of dietary intakes and supplementation with selenium and vitamin E on reproduction diseases and reproductive efficiency in cattle and sheep. *Vet. Res. Commun.*, v.27, p.159-174, 2003.

HEMSWORTH, P.H.; COLEMAN, G.J.; BARNETT, J.L.; BORG, S.; DOWLING, S. The effects of cognitive behavioral intervention on the attitude and behavior of stockpersons and the behavior and productivity of commercial dairy cows. *J. Anim. Sci.*, v.80, p.68-78, 2002.

HERDT, T.H.; RUMBEIHA, W.; BRASELTON, E. The use of blood analyses to evaluate mineral status in livestock. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, v.16, n.3, p.423-444, 2000.

HICKEY, M.C.; DRENNAN, M.; EARLEY, B. The effect of abrupt weaning of suckler calves on the plasma concentrations of cortisol, catecholamines, leukocytes, acute-phase proteins and in vitro interferon-gamma production. *J. Anim. Sci.*, v.81, p.2847-2855, 2003.

HIDROGLOU, M.; PROULX, J.; JOLETTE, J. Intraruminal selenium pellet for control of nutritional muscular dystrophy in cattle. *J. Dairy Sci.*, v.68, p.57-66,

1985.

HINTZE, K.J. et al. Selenium accumulation in beef: effect of dietary selenium and geographical area of animal origin. *J. Agric. Food Chem.*, v.50, p.3.938-3.942, 2002.

HOPSTER, H.; VAN DER WERF, J.T.N.; ERKENS, J.H.F.; BLOKHUIS, H.J. Effects of repeated jugular puncture on plasma cortisol concentrations in loose-housed dairy cows. *J. Anim. Sci.*, v.77, n.3, p.708-714, 1999.

HUGHES, G.J.; SMITH, J.S.; HANLON, C.A.; RUPPRECHT, C.E. Evaluation of a taqman PCR assay to detect rabies virus RNA: influence of sequence variation and application to quantification of viral loads. *J. Clin. Microbiol.*, v.42, n.1, p.299-306, 2004.

INSTITUTO PASTEUR DE SÃO PAULO. *Controle da raiva dos herbívoros*. São Paulo, 2000a. Disponível em: <http://www.pasteur.saúde.sp.gov.br/informações/manuais/manual1/manual_01.htm>. Acesso em: 17 jan. 2003.

INSTITUTO PASTEUR DE SÃO PAULO. *A situação da raiva no Brasil*. 2000b. Disponível em: <http://www.pasteur.saude.sp.gov./infomrações/anais/seminario_interna.../resumo-2-2ht>. Acesso em: 11 jun. 2003.

INSTITUTO PASTEUR DE SÃO PAULO. *Controle da população de morcegos hematófagos*. São Paulo, 2000c. Disponível em: <http://www.pasteur.saúde.sp.gov.br/informações/manuais/manual_1/manual-05htm>. Acesso em: 17 jan. 2003.

INSTITUTO PASTEUR DE SÃO PAULO. *Vacinação*. 2000d. Disponível em: <http://www.pastuer.saúde.sp.gov.br/informações/manuais/manual_1/manual_02ht>. Acesso em: 17 jan. 2003.

INSTITUTO PASTEUR DE SÃO PAULO. *A raiva*. 2002. Disponível em: <http://www.pastuer.saude.sp.gov.br/informações_05.htm>. Acesso em: 01 jul. 2003.

ITO, N.; TAKAYAMA, M.; YAMADA, K.; SUGIYAMA, M.; MINAMOTO, N. Rescue of rabies virus from cloned cDNA and identification of the pathogenicity-related gene: glycoprotein gene is associated with virulence for adult mice. *J. Virol.*, v.75, n.19, p.9121-9128, 2001.

IVANCIC JR., J.; WEISS, W.P. Effect of dietary sulfur and selenium concentrations on selenium balance of lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, v.84, p.225-232, 2001.

JACKSON, A.C.; WARRELL, M.J.; RUPPRECHT, C.E.; ERTL, H.C.J.; DIETZCHOLD, B.; O'REILLY, M.; LEACH, R.P.; FU, Z.F.; WUNNER, W.H.; BLECK, T.P.; WILDE, H. Management of rabies in humans. *Clin. Infect. Dis.*, v.36, p.60-63, 2003.

JORDAN, E.R. Effects of heat stress on reproduction. *J. Dairy Sci.*, v.86, p.E104-E114, 2003.

KANKANAMGE, P.J.; IRIE, T.; SHOJI, J.; TOCHIKURA, T.S.; KAWAI, A. Further characterization of the rabies virus glycoproteins produced by virus infected and G cDNA-transfected cells using a monoclonal antibody 1-30-44, which recognizes an acid-sensitive epitope. *Microbiol. Immunol.*, v.47, n.5, p.337-349, 2003.

KOTAIT, I. Vigilância Epidemiológica da raiva em animais silvestres: propostas do Estado de São Paulo. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE RAIVA, 2003, São Paulo. *Anais...* São Paulo, 2003. p.21-22.

KOMMISRUUD, E.; OSTERAS, O.; VATN, T. Blood selenium associated with health and fertility in Norwegian dairy herds. *Acta Vet. Scand.*, v.46, p.229-240, 2005.

KNOWLES, S.O.; GRACE, N.D.; WURMS, K.; LEE, J. Significance of amount and form of dietary selenium on blood, milk, and casein selenium concentrations in grazing cows. *J. Dairy Sci.*, v.82, p.429-437, 1999.

LANGONI, H.; LIMA, K.; MENOZZI, B.D.; SILVA, R.C. Rabies in the big fruit-eating bat *Artibeus lituratus* from Botucatu, Southeastern Brazil. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, v.11, n.1, p.84-87, 2005.

Le NEINDRE, P.; Trillat, G.; SAPA, J.; MÉNISSIER, F.; BONNET, J.N.; CHUPIN, J.M. Individual differences in docility in Limousin cattle. *J. Anim. Sci.*, v.73, p.2249-2253, 1995.

LENSINK, B.J.; FERNANDEZ, X.; BIVIN, X.; PRADEL, P.; LE NEINDRE, P.; VEISSIER, I. The impact of gentle contacts on ease of handling, welfare, and growth of calves and on quality of veal meat. *J. Anim. Sci.*, v.78, p.1219-1226, 2000.

LIMA, E.F.; BIAZZONO, L.S.A.C.; CORREA, A.P.F.L.; LUVIZOTTO, M.C.R. Sinais clínicos, distribuição das lesões no sistema nervoso e epidemiologia da raiva em herbívoros na região nordeste do Brasil. *Pesq. Vet. Bras.*, v.25, n.4, p.250-254, 2005.

LIU, J.P.; CLARKE, I.J.; FUNDER, J.W.; ENGLER, D. Studies of the secretion of corticotrophin-releasing factor and arginine vasopressin into the hypophyseal-portal circulation of the conscious sheep. II. The central noradrenergic and neuropeptide Y pathways cause immediate and prolonged hypothalamic-pituitary-adrenal activation. Potential involvement in the pseudo-Cushing's syndrome of endogenous depression and anorexia nervosa. *J. Clin. Invest.*, v.93, p.1439-1450, 1994.

LONGNECKER, M.P.; STRAM, D.O.; TAYLOR, P.R.; LEVANDER, O.A.; HOWE, M.; VEILLON, C.; McADAM, P.A.; PATTERSON, K.Y.; HOLDEN, J.M.; MORRIS, J.S.; SWANSON, C.A.; WILLETT, W.C. Use of selenium

concentration in whole blood, serum, toenails, or urine as a surrogate measure of selenium intake. *Epidemiology*, v.7, n.4, p.384-390, 1996.

LUCCI, C.S.; MOXON, A.L.; ZANETTI, M.A.; FRANZOLIN NETO, R.; MARCOMINI, D.G. Selênio em bovinos leiteiros do Estado de São Paulo II. Níveis de selênio nas forrageiras e concentrados. *Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. São Paulo*, v.21, p.71-76, 1984.

LUCCI, C.S.; ZANETTI, M.A.; SCHALCH, E.; PETTINATI, R.I.; CAMPOS, D.M. Selênio em bovinos leiteiros do Estado de São Paulo. Suplementação no município de São Carlos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.38, n.4, p.589-597, 1986.

MALAFIA, P.; PEIXOTO, P.V.; GONÇALVES, J.C.S.; MOREIRA, A.L.; COSTA, D.P.B.; CORREA, W.S. Ganho de peso e custos em bovinos de corte submetidos a dois tipos de suplementos mineral. *Pesq. Vet. Bras.*, v.24, p.160-164, 2004.

MALLARD, B.A.; WAGTER, L.C.; IRELAND, M.J.; DEKKERS, J.C. Effects of growth hormone, insuline-like growth factor-I, and cortisol on periparturient antibody response profiles of dairy cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.60, p.61-76, 1997.

MAILLARD, A.P.; GAUDIN, Y. Rabies virus glycoprotein can fold in two alternative antigenically distinct conformations depending on membrane anchors type. *J. Gen. Virol.*, n.83, p.1465-1476, 2002.

MANI, J.; REED, B.C.; BORGOHAIN, R.; STAJAYALAKSHMI, S.; SUNDARAN, C.; MOHANDAS, S. Magnetic resonance imaging in rabies. *J. Postgrad. Med.*, v.79, p.352-354, 2003.

MATTERI, R.L.; CARROLL, J.A.; DYER, C.J. Neuroendocrine responses to stress. In: MORBERG, G.P.; MENCH, J.A. *The biology of animals stress: basic*

principles and implications for animal welfare. New York: CABI Publishing, 2000. p.43-76.

McCOLL, K.A.; SETIEN, A. Infecciones por *Lyssavirus* del murciélago. *Rev. - Off. Int. Epizoot.*, v.19, n.1, p.177-196, 2000.

McDOWELL, L.E. Selenium. In: _____. (Ed.). *Minerals in animal and human nutrition*. London: Academic Press, 1992. p.294-332.

McGETTIGAN, J.P.; POMERANTZ, R.J.; SILER, C.A.; MCKENNA, P.M.; FOLEY, H.D.; DIETZSCHOLD, B.; SCHNELL, M.J. Second-generation rabies virus-based vaccine vectors expressing human immunodeficiency virus type 1 gag have greatly reduced pathogenicity but are highly immunogenic. *J. Virol.*, v.77, n.1, p.237-244, 2003.

McGUIRE, M.A.; BEEDE, D.K.; COLLIER, R.J.; BUONOMO, F.C.; DELORENZO, M.A.; WILCOX, C.J.; HUNTINGTON, G.B.; REYNOLDS, C.K. Effects of acute thermal stress and amount of feed intake on concentrations of somatotropin, insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-II, and thyroid hormones in plasma of lactating Holstein cows. *J. Anim. Sci.*, v.69, p.2050-2056, 1991.

McMEEKAN, C.A.; MELLOR, D.J.; STAFFORD, K.J.; BRUCI, R.A.; WARD, R.N.; GREGORY, N.G. Effects of shallow scoop and deep scoop dehorning on plasma cortisol concentrations in calves. *N. Z. Vet. J.*, v.45, p.69-71, 1997.

McMEEKAN, C.A.; MELLOR, D.J.; STAFFORD, K.J.; BRUCI, R.A.; WARD, R.N.; GREGORY, N.G. Effects of local anaesthesia of 4 or 8 h duration on the acute cortisol response to scoop dehorning in calves. *Aust. Vet. J.*, v.76, p.281-285, 1998.

MEGID, J. Imunização e vacinas em grandes animais. In: ANDRADE, S.F. *Manual de terapêutica veterinária*. 2.ed. São Paulo: Roca, 2002. p.607-628.

MELLOR, D.J.; STAFFORD, K.J.; TODD, S.E.; LOWE, T.E.; GREGORY, N.G.; BRUCE, R.A.; WARD, R.N. A comparison of catecholamine and cortisol responses of young lambs and calves to painful husbandry procedures. *Aust. Vet. J.*, v.80, p.228-233, 2002.

MERCIER, P.L.; JACOB, Y.; TANNER, K; TORDO, N. A novel expression cassette of *Lyssavirus* shows that the distantly related Mokola virus can rescue a defective rabies virus genome. *J. Virol.*, v.76, n.4, p.2024-2027, 2002.

MINTON, J.E. Function of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the sympathetic nervous system in model of acute stress in domestic farm animals. *J. Anim. Sci.*, v.72, p.1891-1898, 1994.

MONTAÑO, J.A.; POLACK, G.W.; MORA, E.F. Raiva bovina em animais vacinados. II – Situação epidemiológica no Estados do Paraná, Brasil 1994. *Arq. Biol. Tecnol.*, v.30, n.2, p.367-380, 1987.

MORAES, S.S.; TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J. Deficiências e desequilíbrios de microelementos em bovinos e ovinos em algumas regiões do Brasil. *Pesq. Vet. Bras.*, v.19, n.1, p.19-33, 1999.

MORAES, S.S. *Principais deficiências minerais em bovinos de corte*. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001. 27p. (Documentos 112).

MORBERG, G.P. Biological responses to stress: implications for animal welfare. In: MORBERG, G.P.; MENCH, J.A. *The biology of animals stress: basic principles and implications for animal welfare*. New York: CABI Publishing, 2000. p.1-21.

MORROW, C.J.; KOLVER, E.S.; VERKERK, G.A.; MATTHEWS, L. Fecal glucocorticoid metabolites as a measure of adrenal activity in dairy cattle. *Gen. Comp. Endocrinol.*, v.126, p.229-241, 2002.

MURPHY, A.; LEWIS, T.; CUNDY, M. Selenium revisited: selenium nutrition for achieving optimal health and performance in New Zealand dairy cows. In: XII AAAP ANIMAL SCIENCE CONGRESS, 12., 2006, New Zealand. *Proceedings...* New Zealand, 2006. p.22-45.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL MINERALS. Minerals. In: NATIONAL RESEARCH COUNCIL (Eds.). *Nutrient requirements of beef cattle*. 7.ed. Washington: National Academy Press, 1996. p.54-74.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Minerals. In: _____. (Eds.). *Nutrient requirements of dairy cattle*. Washington: National Academy Press, 2001. p.105-161.

NDIBUALONJI, B.B.; DEHARENG, D.; VAN EENAEME, C.; GODEAU, J.M. Response of milk yield, plasma cortisol, amino acids, urea and glucosa to a single low-dose administration of adrenocorticotrophic hormona in lactating cows. *Vet. Res.*, v.26, p.32-42, 1995.

NEGRÃO, J.A.; PORCIONATO, A.M.; PASSILLÉ, A.M.; RUSHEN, J. Cortisol in saliva and plasma of cattle after ACTH administration and milking. *J. Dairy Sci.*, v.87, p.1713-1718, 2004.

NEMEC, M.; HIDROGLU M, NIELSEN K, PROULX J. Effect of vitamin E and selenium supplementation on some immune parameters following vaccination against brucellosis in cattle. *J. Anim. Sci.*, v.68, p.4303-4309, 1990.

NEWCOMER, J.W.; SELKE, G.; MELSON, A.K.; GROSS, J.; VOGLER, G.P.; DAGOGO-JACK, S. Dose-dependent cortisol-induced increases in plasma leptin concentrations in healthy humans. *Arch. Gen. Psychiatry*, v.55, n.11, p.995-1000, 1998.

NICODEMO, M.L.F. *Cálculo de misturas minerais para bovinos*. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001. 25p. (Documentos 109).

NOCKELS, C.F.; ODDE, K.G.; CRAIG, A.M. Vitamin E supplementation and stress affect tissue α -tocopherol content of beef heifers. *J. Anim. Sci.*, v.74, p.672-677, 1996.

NOGUEIRA, V. Programa Estadual de controle da raiva dos herbívoros. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE RAIVA, 2003, São Paulo. *Anais...* São Paulo, 2003. p.30-31.

O'CONNOR, T.M.; O'HALLORAN, D.J.; SHANAHAN, F. The stress response and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: from molecule to melancholia. *Q. J. Med.*, v.93, p.323-333, 2000.

OLIVEIRA, A.N.; ANDRADE, M.C.R.; SILVA, M.V.; MOURA, W.C.; CONTREIRAS, E.C. Immune response in cattle vaccinated against rabies. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.95, n.1, p.83-88, 2000.

ORTMAN, K.; PEHRSON, B. Selenite and selenium yeast as feed supplements for dairy cows. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.*, v.44, p.373-380, 1997.

ORTMAN, K.; PEHRSON, B. Effect of selenate as a feed supplement to dairy cows in comparison to selenite and selenium yeast. *J. Anim. Sci.*, v.77, p.3365-3370, 1999.

ORTOLANI, E.L. Macro e microelementos. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. *Farmacologia aplicada à medicina veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p.555-565.

PACAK, K.; PALKOVITS, M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocrinol. Rev.*, v.22, p.502-548, 2001.

PAJOR, E.A.; RUSHEN, J.; De PASSILLÉ, A.M. Aversion learning techniques to evaluate dairy cattle handling practices. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, v.69, p.89-

102, 2000.

PALMA, B.D.; SUCHECKI, D.; TUFIK, S. Differential effects of acute cold and footshock on the sleep of rats. *Brain Res.*, v.861, n.1, p.97-104, 2000.

PALUDO, G.R.; MCMANUS, C.; MELO, R.Q.; CARDOSO, A.G.; MELLO, F.P.S.; MOREIRA, M.; FUCK, B.H. Efeito do estresse térmico e do exercício sobre parâmetros fisiológicos de cavalos do exército brasileiro. *R. Bras. Zootec.*, v.31, p.1130-1142, 2002.

PASCHOAL, J.J.; ZANETTI, M.A.; CUNHA, J.A. Efeito da suplementação de selênio e vitamina E sobre a incidência de mastite clínica em vacas da raça holandesa. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.55, n.3, p.249-255, 2003.

PASCHOAL, J.J.; ZANETTI, M.A.; CUNHA, J.A. Contagem de células somáticas no leite de vacas suplementadas no pré-parto com selênio e vitamina E. *Ciênc. Rural*, v.36, n.5, p.1462-1466, 2006.

PASSOS, A.D.C.; CASTRO E SILVA, A.A.M.C.; FERREIRA, A.H.C.; SILVA, J.M.; MONTEIRO, M.E.; SANTIAGO, R.C. Epizootia de raiva na área urbana de Ribeirão Preto, SP, Brasil. *Cad. Saúde Pública*, v.14, n.4, p.1-7, 1998a.

PASSOS, E.C.; CARRIERI, M.L.; DAINOVSKAS, E.; CAMARA, M.; SILVA, M.M.S. Isolamento do vírus rábico em morcego insetívoro, *Nyctinomops macrotis*, no município de Diadema, SP (Brasil). *Rev. Saúde Pública*, v.32, n.1, p.74-76, 1998b.

PASSOS, E.C.; CARRIERI, M.L.; SILVA, M.M.S.; PEREIRA JR., R.G.; MELO, J.A.T.S.; MAULE, L.J. Vírus rábico isolado de morcegos frugívoro (*Artibeus lituratus*), capturado em 1997 no município de Rio Claro, SP. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.36, n.1, 1999. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-95961999000100007&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 14 jul. 2005.

PAVLATA, L.; ILLEK, J.; PECHOVÁ, A.; MATEJICEK, M. Selenium status of cattle in the Czech Republic. *Acta Vet. Brno*, v.71, p.3-8, 2002.

PEHRSON, B.; ORTMAN, K.; MADJID, N.; TRAFIKOWSKA, U. The influence of dairy selenium as selenium yeast or sodium selenite on the concentration of selenium in the milk of suckler cows and on the selenium status of their calves. *J. Anim. Sci.*, v.77, p.3371-3376, 1999.

PEIXOTO, P.V.; MALAFAIA, P.; MIRANDA, L.V.; CANELLA, C.C.F.; CANELLA FILHO, C.C.F.; VILAS BOAS, F.V. Eficiência reprodutiva de matrizes bovinas de corte submetidas a três diferentes tipos de suplementação mineral. *Pesq. Vet. Bras.*, v.23, n.3, p.125-130, 2003.

PEIXOTO, P.V.; MALAFAIA, P.; BARBOSA, J.D.; TOKARNIA, C.H. Princípios de suplementação mineral em ruminantes. *Pesq. Vet. Bras.*, v.25, p.195-200, 2005.

PERUCHENA, C.O. Nutrición de bovinos sobres pastizales de baja calidad del nordeste argentin. In: SESIÓN DE COMUCACIONES CIENTÍFICAS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE, 1992, Corrientes. *Anais... Corrientes*, 1992. p.16.

PIZA, A.T.; PIERI, K.M.S.; LUSA, G.M.; CAPORALE, G.M.M.; TERRERAN, M.T.; MACAHDO, L.A.; ZANETTI, C.R. Effect of the contents and form of rabies glycoprotein of hte potency of rabies vaccination in cattle. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.97, n.2, p.265-268, 2002.

PRZYBYLSKI, W.; VERNIN, P.; MONIN, G. Relationship between glycolytic potential and ultimate pH in bovine, porcine, ovine muscles. *J. Muscle Foods*, v.5, p.245-255, 1994.

QUEIROZ DA SILVA, L.H.; BISSOTO, C.E.; CARVALHO, C.; CARDOSO, T.C.; PINHEIRO, D.M.; PERRI, S.H.V. Comparison between the counter immunoelectrophoresis tes and mouse neutralization test for the detection

of antibodies against rabies viurs in dog. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.97, n.2, p.259-261, 2002.

QUEIROZ DA SILVA, L.H.; CARDOSO, T.C.; PERRI, S.H.V.; PINHEIRO, D.M.; CARVALHO, C. Pesquisa de anticorpos anti-rábicos em bovinos vacinados da região de Araçatuba, SP. *Arq. Inst. Biol.*, v.70, n.4, p.407-413, 2003.

RADOSTITS, O.M.; GAY C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. Doenças causadas por deficiências nutricionais. In: _____. *Clínica Veterinária*. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p.1330-1405.

RADOSTITS, O.M.; GAY C.C.; HINCHCLIFF, K.W. CONSTABLE, P.D. Selenium and/or vitamin E deficiencies. In: _____. *Veterinary Medicine*. 10 ed. London: Saunders Elsever, 2007. p.1735-1755.

RAHMOUNI, K.; HAYNES, W.G. Leptin signaling pathways in the central nervous system: interations between neuropeptide Y and melanocortins. *BioEssays*, v.23, p.1095-1099, 2001.

RAMOS, P.M.; RAMOS, P.S. Avaliação de acidentes com morcegos no município de São Paulo, Brasil, no período de 1996 a 1998. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v.23, n.6, p.246-249, 2001.

REIS, L.S.L.S.; PARDO, P.E.; OBA, E.; KRONKA, S.N.; FRAZATTI-GALLINA, N.M. *Matricaria chamomilla* CH12 decreases handling stress in Nelore calves. *J. Vet. Sci.*, v.7, n.2, p.189-192, 2006.

REIS, L.S.L.S.; CHIACCHIO, S.B.; PARDO, P.E.; TAKAHIRA, R.K.; COUTO, R.; OBA, E.; KRONKA, S.N. Efeito da suplementação com doses de selênio sobre a concentração sérica de creatina kinase em bovinos. In: REUNIÃO

ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 44°, 2007, Jaboticabal. *Anais...* Jaboticabal, 2007. p.1-3.

REIS, L.S.L.S.; CHIACCHIO, S.B.; PARDO, P.E.; OBA, E.; GIUFFRIDA, R.; FRAZATTI-GALLINA, N.M. Selenium supplementation enhances weight gain in cattle. *Arch. Zootec.*, v.57, n.218, p.271-274, 2008.

RIBAS, M.A.; REBULL, A.; TORRES, G.; ÁLVAREZ, M.; MORIER, L.; TEJERO, Y.; GARCÍA, D.; RODRÍGUEZ, C. Detección de anticuerpos antirrábicos en personal de riesgo con el empleo de la técnica de neutralización por reducción del número de placas. *Rev. Cubana Med. Trop.*, v.55, n.2, p.91-95, 2003.

RODRIGUES DA SILVA, A.C.; CAPORALE, G.M.M.; GONÇALVES, C.A.; TARGUETA, M.C.; COMIN, F.; ZANETTI, C.R.; KOTAIT, I. Antibody response in cattle after vaccination with inactivated na attenuated rabies vaccines. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, v.42, n.2, p.95-98, 2000.

ROWNTREE, J.E.; HILL, G.M.; HAWKINS, D.R.; LINK, J.E.; RINCKER, M.J.; BEDNAR, G.W.; KREFT, R.A. Jr. Effect of Se selenoprotein activity and thyroid hormone metabolism in beef and dairy cows and calves. *J. Anim. Sci.*, v.82, p.2995-3005, 2004.

RUSHEN, J.; BOISSY, A.; TERLOUW, E.M.C.; DE PASSILLÉ, A.M.B. Opioid peptides and behavioral and physiological responses of dairy cows to social isolation in unfamiliar surroundings. *J. Anim. Sci.*, n.77, p.2918-2924, 1999.

RUSHEN, J.; DE PASSILLÉ, A.M.B.; MUNKSGAARD, L. Fear of people by cows and effects on milk yield, behaviour, and heart rate at milking. *J. Anim. Sci.*, v.82, p.720-727, 1999.

SACO, Y.; FINA, M.; GIMÉNEZ, M.; PATO, R.; PIEDRAFITA, J.; BASSOLS, A. Evaluation of serum cortisol, metabolic parameters, acute phase proteins and faecal corticosterone as indicators of stress in cows. *Vet. J.*, 2007. In press.

SANTIAGO, C.M. Efeito da emulsão de selênio-tocoferol na fertilidade de vacas de corte no Rio Grande do Sul, Brasil. *A Hora Veterinária*, v.6, n.32, p.13-15, 1986.

SAPOLSKY, R.M. Stress hormones: good and bad. *Neurobiol. Dis.*, v.7, p.540-542, 2000.

SATO, G.; ITOU, T.; SHOJI, Y.; MIURA, Y.; MIKAMI, T.; ITO, M.; KURANE, I.; SÂMARA, S.I.; CARVALHO, A.A.; NOCITI, D.P.; ITO, F.H.; SAKAI, T. Genetic and phylogenetic analysis of glycoprotein of rabies virus isolated from several species in Brazil. *J. Vet. Med. Sci.*, v.66, n.7, p.747-753, 2004.

SCHEFFER, K.C.; CARRIERI, M.L.; ALBAS, A.; SANTOS, H.C.P.; KOTAIT, I.; ITO, F.H. Vírus da raiva em quirópteros naturalmente infectados no Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Saúde Pública*, v.41, n.3, p.389-395, 2007.

SELYE, H. Syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*, v.138, p.32-38, 1936.

SERRA-COBO, J.; AMENGUAL, B.; ABELLÁN, C.; BOURHY, H. European bat Lyssavirus infection in Spanish bat populations. *Emerg. Infect. Dis.*, v.8, n.4, p.413-420, 2002.

SERRADEIL-LE GAL, C. An overview of SR121463, a selective non-peptide vasopressin V(2) receptor antagonist. *Cardiovasc. Drug. Rev.*, v.19, p.201-214, 2001.

SMITH, K.L.; HARRISON, J.H.; HANCOCK, D.D.; TODHUNTER, D.A.; CONRAD, H.R. Effect of vitamin E and selenium supplementation on incidence of clinical mastitis and duration of clinical symptoms. *J. Dairy Sci.*, v.67, p.1293-1300, 1994.

SMITH, J.S.; YAGER, P.A.; BAER, G.M. A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determining rabies virus-neutralizing antibody. In: MESTIN, F.X.; KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H. (Eds.). *Laboratory techniques in rabies*. Geneva: World Health Organization, 1996. p.181-192.

SMITH, R.F.; FRENCH, N.P.; SAPHIER, P.W.; LOWRY, J.P.; VELDHUIS, J.D.; DOBSON, H. Identification of stimulatory and inhibitory inputs to the hypothalamic-pituitary-adrenal axis during hypoglycaemia or transport in ewes. *J. Neuroendocrinol.*, v.15, p.572-585, 2003.

SOARES, R.M.; BERNARDI, F.; SAKAMOTO, S.M.; HEINEMANN, M.B.; CORTEZ, A.; ALVES, L.M.; MEYER, A.D.; ITO, F.H.; RICHTZENHAIN, L.J. A heminested polymerase chain reaction for the detection of Brazilian rabies isolates from vampire bats and herbivores. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.97, n.1, p.109-111, 2002.

SOLANO, J.; GALINDO, F.; ORIHUELA, A.; GALINA, C.S. The effect of social rank on the physiological response during repeated stressful handling in Zebu cattle (*Bos indicus*). *Physiol. Behav.*, v.82, p.679-683, 2004.

SPEARS, J.W.; HARVEY, R.W.; SEGERSON, E.C. Effects of marginal selenium deficiency and winter protein supplementation on growth, reproduction and selenium status of beef cattle. *J. Anim. Sci.*, v.63, p.586-594, 1986.

SPEARS, J.W. Micronutrients and immune function in cattle. *Proc. Nutr. Soc.*, v.59, p.587-584, 2000.

STANGER, K.J.; KETHEESAN, N.; PARKER, A.J.; COLEMAN, C.J.; LAZZARONI, S.M.; FITZPATRICK, L.A. The effect so transportation on the immune status of *Bos indicus* steers. *J. Anim. Sci.*, v.83, p.2632-2636, 2005.

SUTHERLAND, M.A.; MELLOR, D.J.; STAFFORD, K.J.; GREGORY, N.G.; BRUCE, R.A.; WARD, R.N. Cortisol responses to dehorning of calves given a 5h local anaesthetic regimen plus phenylbutazone, ketofen, or adrenocorticotrophic hormone prior to dehorning. *Res. Vet. Sci.*, v.73, p.115-123, 2002.

TSIGOS, C.; CHROUSOS, G.P. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J. Psychosom. Res.*, v.53, p.865-871, 2002.

THOMPSON, J.C.; THORNTON, R.N.; BRUERE, S.N.; ELLISON, R.S. Selenium reference ranges in New Zealand cattle. *N. Z. Vet. J.*, v.46, n.2, p.65-67, 1998.

TIZARD, I. *Imunologia veterinária*. 5.ed. São Paulo: Roca, 1998. p.284.

TIZARD, I.R. O fenômeno da imunidade. In: _____. *Imunologia veterinária*. 6.ed. São Paulo: Roca, 2002a. cap.1, p.1-8.

TIZARD, I.R. Vacinação e vacinas. In: _____. *Imunologia veterinária*. 6.ed. São Paulo: Roca, 2002b. cap.21, p.271-274.

TOMASZEWSKI, M. A.; DE HAAN, M.A.; THOMPSON, J.A.; JORDAN, E.R. The impact of cooling ponds in North Central Texas on dairy farm performance. *J. Dairy Sci.*, v.88, n.6, p.2281-2286, 2005.

TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J.; MORAES, S.S.; PEIXOTO, P.V. Deficiências e desequilíbrios minerais em bovinos e ovinos, revisão dos estudos realizados no Brasil de 1987 a 1998. *Pesq. Vet. Bras.*, v.19, n.2, p.47-62, 1999.

UNDERWOOD, E.J.; SUTLLE, N.F. Selenium. In: _____. *The mineral nutrition of livestock*, 3 ed. Wallingford, Oxon: CAB International, 1999. cap.15, p.421-475.

UMEHARA, O.; DE LUCCA NETO, D.; MORO, E.; BERNARDI, F.; ITO, F.H.; RODRIGUES, C.A. Rabies vírus neutralizing antibody profile in cattle vaccinated with inactivated vaccine adjuvanted with either aluminum hydroxide alone or combined with avridine. *Arq. Inst. Biol.*, v.69, n.1, p.23-28, 2002.

VAN de KAR, L.D.; BLAIR, M.L. Forebrain pathways mediating stress-induced hormona secretion. *Front. Neuroendocrinol.*, v.20, p.1-48, 1999.

VAN REENEN, C.G.; MARS, M.H.; LEUSHUIS, I.E.; RIJESWIJK, F.A.M.; VAN OIRSCHOT, J.T.; BLOKHUIS, H.J. Social isolation may influence

responsiveness to infection with bovine herpesvirus 1 in veal calves. *Vet. Microbiol.*, v.75, p.135-143, 2000.

VARNER, M.A.; JOHNSON, B.H.; BRITT, J.H. Influence of herd relocation upon production and endocrine traits of dairy cows. *J. Anim. Sci.*, v.66, p.466-474, 1983.

VÁSQUEZ, E.F.A.; HERRERA, A.P.N. Concentração plasmática de cortisol, uréia, cálcio e fósforo em vacas de corte mantidas a pasto suplementadas com levedura de cromo durante a estação de monta. *Ciênc. Rural*, v.33, n.4, p.743-747, 2003.

VEISSIER, I.; BOISSY, A.; DEPASSILÉ, A.M.; RUSHEN, J.; VAN REENEN, C.G.; ROUSSEL, S.; ANDANSON, S.; PRADEL, P. Calves responses to repeated social regrouping and relocation. *J. Anim. Sci.*, v.79, p.2580-2593, 2001.

VELASCO-VILLA, A.; GÓMEZ-SIERRA, M.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, G.; JUÁREZ-ISLAS, V.; MELÉNDEZ-FÉLIX, A.; VARGAS-PINO, F.; VELÁZQUEZ-MONROY, O.; FLISSER, A. Antigenic diversity and distribution of rabies virus in Mexico. *J. Clin. Microbiol.*, p.951-958, 2002.

VOISNET, B.D.; GRANDIN, T.; O'CONNOR, S.F.; TATUM, J.D.; DEESING, M.J. *Bos indicus*-cross feedlot cattle with excitable temperaments have tougher meat and a higher incidence of borderline dark cutters. *Meat Sci.*, 46, p.367-377, 1997.

WERNICKI, A.; URBAN-CHMIEL, R.; MIKUCKI, P.; PUCHALSKI, A.; KANKOFER, M. The influence of transport stress on the humoral immunological response of calves induced by *Mannheimia haemolytica* leukotoxin. *Pol. J. Vet. Sci.*, v.6, p.41-45, 2003.

WEST, J.W. Effects of heat-stress on production in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, v.86, p.2131-2144, 2003.

WIEPKEMA, P.R. The significance of behavioural disturbances in farm animals. *Tijdschr. Diergeneeskd.*, v.110, p.12-20, 1985.

WILBUR, L.A.; AUBERT, M.F.A. The NIH test for potency. In: MESTIN, F.X.; KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H. (Eds.). *Laboratory techniques in rabies*. Geneva: World Health Organization, 1996. p.360-368.

WISE, M.E.; ARMSTRONG, D.V.; HUBER, J.T.; HUNTER, R.; WIERSMA, F. Hormonal alterations in the lactating dairy cow in response to thermal stress. *J. Dairy Sci.*, v.71, p.2480-2485, 1988.

WOLFENSON, D.; LEW, B.J.; THATCHER, W.W.; GRABER, Y.; MEIDAN, R. Seasonal and acute heat stress effect on steroid production by dominant follicles in cows. *Anim. Reprod. Sci.*, v.47, p.9-19, 1997.

WRIGHT, A.; RAMPERSAD, J.; RYAN, J.; AMMONS, D. Molecular characterization of rabies virus isolates from Trinidad. *Vet. Microbiol.*, v.87, p.95-102, 2002.

WU, X.; GONG, X.; FOLEY, H. D.; SCHNELL, M.J.; FU, Z.F. Both viral transcription and replication are reduced when the rabies virus nucleoprotein is not phosphorylated. *J. Virol.*, v.76, n.9, p.4153-4161, 2002.

YAGI, Y.; SHIONO, H.; CHIKAYAMA, Y.; OHNUMA, A.; NAKAMURA, I.; YAYOU, K. I. Transport stress increases somatic cell counts in milk, and enhances the migration capacity of peripheral blood neutrophils of dairy cows. *J. Vet. Med. Sci.*, v.66, n.4, p.381-387, 2004.

ZALAN, E.; WILSON, C.; PUKITIS, D. A microtest for the quantitation of rabies virus neutralizing antibodies. *J. Biol. Stand.*, v.7, p.213-220, 1979.

ZAR, J.H. *Biostatistical analysis*. New Jersey: Prentice Hall, 1999. 663p.

Capítulo 1 The Veterinary Record Instructions for Authors

Contributions in the form of original research papers, review articles, clinical case histories, short communications and letters on all aspects of veterinary medicine and surgery are invited. All except letters are refereed. Submissions are accepted on the understanding that they have not been published elsewhere and that they are subject to editorial revision. All material published is the copyright of The British Veterinary Association.

Papers

Papers should include a title of not more than 15 words, the names, qualifications and addresses of each author, and a summary of not more than 200 words. They should be set out in the following sections: summary, introduction, materials and methods, results, discussion, acknowledgements and references. Clinical papers or case reports should follow a similar overall arrangement, modified appropriately. The text should be as concise as possible; the whole length should not exceed 4000 words (that is, about four to five pages of The Veterinary Record).

Format

Manuscripts should be submitted electronically via The Veterinary Record submission and tracking system. Most common wordprocessing formats are accepted for text and tables, although the system prefers Word and PDF. Images should be submitted as GIF, TIFF, EPS or JPEG files (more information is available via the link above) and should not be embedded within the Word file. This system does not accept Excel files.

Tables and illustrations

Tables should be kept to a minimum and should be created in Word. The legend should clearly explain what data the table is presenting without the need to refer back to the text. Tables should not duplicate information presented in figures.

Line figures and photographs will normally be reproduced at column width (76 mm). Histograms should be presented in a simple, two-dimensional format,

with no background grid; tones should be avoided.

Digital images should be sent as GIF, TIFF, EPS or JPEG files, in CMYK format, at a minimum resolution of 300 dpi at an image size of 8.5 cm across. Please label them to correspond with the list of numbered figure captions; for example 'Figure 3.jpg' or 'Figure 7B.jpg', etc.

Style

Measurements should be expressed in the metric system or in SI units. Temperatures should be given in °C. Centrifugation speeds should be given in g.

All abbreviations should be spelt out in full the first time they are used in the text.

Medicines should be referred to by the generic name (Recommended International Non-Proprietary Name), as used in the sixth edition of The Veterinary Formulary (London, Pharmaceutical Press 2005) and listed on the website of the Medicines and Healthcare products Regulatory Agency, followed by the proprietary name and manufacturer in brackets when first mentioned; eg, fenbendazole (Panacur; Intervet).

Parasitic infections should be referred to according to the Standardised Nomenclature of Parasitic Diseases (SNOPAD) guidelines, which are summarised by the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology.

Spelling should be in British English.

Manuscripts should be written in the third person.

References

In the text, references should be cited as follows: Smith (1995) described.../...recorded earlier (Brown and Jones 1994, Smith and others 1997). Lists of references should be given in date order in the text, but alphabetically in the reference list.

In the reference list, all authors' names and initials should be given followed by the date, title of the paper, full title of the journal, volume number and full page range, eg: SMITH, A. B., JONES, C. D. & BROWN, E. F. (1995) How to list your references. *Veterinary Record* xxx, 71-76.

Book references should include the chapter title if appropriate, the full title of the book, the edition, the editors, the town of publication, publisher and page numbers of material referred to, eg: SMITH, A. B., JONES, C. D. & BROWN, E. F. (1993) How to list your references. In *Getting It Right*. 3rd edn. Eds S. Adams, J. Alexander. London, Society of Reference Publishers. pp 23-37.

Proceedings should include the title of the paper given at the meeting, proceedings title, the editors (if applicable), town, country, month date a to b, year, and page numbers (if applicable), eg: MILLER, W. (1976) A state-transition model of epidemic foot-and-mouth disease. *Proceedings of an International Symposium: New Techniques in Veterinary Epidemiology and Economics*. Reading, UK, July 12 to 15, 1976. p 56.

Websites should include the title of the page, website address and date accessed, eg: DEFRA (2001) Explanation of Foot and Mouth Restrictions. www.defra.gov.uk/animalh/diseases/fmd/disease/restrictions/explanation.asp. Accessed August 24, 2001.

Personal communications should be cited within the text and follow the form 'A. B. Smith, personal communication'.

Ethics

Papers may be rejected on ethical grounds if the severity of the experimental procedure does not appear to be justified by the value of the work presented.

To submit a paper or short communication, [click here](#).

Letters

Letters on all topics related to the science, practice and politics of veterinary medicine and surgery will be considered for publication. They should be typed in double-line spacing on one side of the paper only. The length should not exceed 400 words and the editor reserves the right to shorten letters for publication. References should be quoted only when absolutely necessary. Illustrations and tables suitable for reproduction will occasionally be allowed. Letters can be submitted by post, fax or email and must give full address details of all authors as well as a contact telephone number. To submit a letter to the editor [click here](#) .

For general editorial inquiries regarding The Veterinary Record, or if you are having problems submitting manuscripts electronically, email Editorial .

Capítulo 2 The Australian Veterinary Journal Instructions for Authors

Aims and scope

The Australian Veterinary Journal (AVJ) is the official journal of the Australian Veterinary Association. The AVJ aims to advance veterinary science by publishing and promoting high quality refereed scientific and clinical articles.

The AVJ publishes original articles, case reports, short contributions, clinical updates, diagnostic challenges, reviews and veterinary history articles. All articles are peer reviewed.¹

The AVJ Peer review process operates under the guidelines of the World Association of Medical Editors (<http://www.WAME.org>).

Editorial review and acceptance

The acceptance criteria for all papers are the quality and originality of the research and its significance to the readership.

Manuscripts should be written in a clear, concise, direct style, so that they are intelligible to the professional reader who is not a specialist in the particular field. Where contributions are judged as acceptable for publication on the basis of content, the Editors reserve the right to modify manuscripts to eliminate ambiguity and repetition, to improve communication between author and reader, and for length. If extensive alterations are required, the manuscript will be returned to the author for revision.

The AVJ reserves the right to reject any manuscript. After review, recommendations on outcome are made by the Editorial Committee and the Associate Editors. Final decisions are made by the Editor in Chief, Dr Anne Jackson, MA, VetMB, PhD, MRCVS, CMAVA.

Submission of manuscripts

Manuscripts should be submitted online at <http://mc.manuscriptcentral.com/avj>. Authors must supply an email address as all correspondence will be by email.

All articles submitted to the AVJ must comply with these instructions. Failure to do so will result in the return of the manuscript and delay in processing, review and publication. The most likely reasons for papers to be

unsubmitted before review are the quality of the image files, images embedded in a Word file, and the formatting of the manuscript and the references (see details below).

Submit your manuscript as a word processor file, with separate files for each figure and table. The online system cannot accept Microsoft Word 2007 documents (.docx) at this time. Files created in Word 2007 should be saved as .doc files.

Articles that are being submitted to fulfill requirements for fellowship qualifications must not be submitted for review at the last minute. At least 6 months should be allowed for review of articles submitted, and their purpose should be stated in the covering letter.

Requirements for submission

In order to submit, authors must do the following by ticking the boxes on the Details and Comments page of the submission:

- confirm that the manuscript has been submitted solely to the AVJ and is not published, in press or submitted elsewhere
- declare that all the research meets the ethical guidelines of the study country
- declare any real or potential conflict of interest, including the source of any financial grants or other funding
- confirm that all author contributions are stated and all authors are in agreement with the content of the manuscript.

Please submit a covering letter when prompted by the submission system. The covering letter should contain:

- information on prior or duplicate publication or submission elsewhere of any part of the paper
- a statement confirming that any handling and/or use of animals in experiments conforms to the Australian Code of Practice for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes²
- if the research was not conducted in Australia, please include a statement confirming that the research adhered to the ethical requirements of the study country

- if tables or figures have been reproduced from another source, a letter from the copyright holder, stating authorisation to reproduce the material, must be attached
- any additional information that may be helpful to the Editors.

Authorship

Eligibility for authorship should be based only on substantial contributions to (a) conception and design, or analysis and interpretation of data; and (b) drafting the article or revising it critically for important intellectual content. Conditions (a) and (b) must both be met. For example, for a pathologist to be included as author of an article, he or she should have contributed to conception and/or interpretation of pathological data, drafted relevant sections of the article and engaged in critical review and revision of the whole article.

Each author must have participated sufficiently in the work to take public responsibility for their contribution. General supervision of the research group, or participation in the acquisition of funding or the collection of data, do not in themselves justify authorship.

Author material archive policy

Authors who require the return of any submitted material should inform the Editorial Office. If no indication is given that author material should be returned, all hardcopy and electronic material submitted by authors will be disposed of six months after a final decision on publication is made.

Ethical considerations

Submission to the AVJ confirms that the protocol for the research project has been approved by a properly constituted Ethics Committee of the institution within which the work was undertaken and that, if applicable, it conforms to the provisions of the Declaration of Helsinki (as revised in Edinburgh 2000). The AVJ retains the right to reject any manuscript on the basis of unethical conduct of either human or animal studies.

The handling and use of animals in experiments must conform to the Australian Code of Practice for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes.² In cases likely to raise controversy, an appropriate reference in the

article to approval by an animal experimentation ethics committee is recommended.

Copyright

Authors publishing in the AVJ will be asked to sign an Exclusive Licence Form. In signing the form, authors are confirming that they have obtained permission to use any copyrighted or previously published material. All authors must read and agree to the conditions outlined in the form, and must sign the form or agree that the corresponding author can sign on their behalf. Articles cannot be published until a signed form has been received.

Manuscript style

The AVJ uses the Style Manual for Authors, Editors and Printers,⁴ Scientific Style and Format: The CBE Manual for Authors, Editors, and Publishers⁵ and recommends Strunk's classic book,⁶ for clarity of expression.

Do not use Enter at the end of lines within a paragraph. Do not underline anything.

Use concise English without jargon or colloquialisms. Avoid long sentences. Reading the text aloud helps with punctuation and finding the right syntax. Please use computer spelling and grammar checking programs. It is recommended that the manuscript is critically read by a colleague experienced in scientific authorship, but who is not directly involved in the study, before submitting it to the AVJ.

The responsibility for making sure that manuscripts are submitted in the correct format and with a suitable standard of English rests with the authors. Papers will be returned without review if the English is not of a sufficient standard. Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission or during the review process. Further details can be found at: http://www.blackwellpublishing.com/bauthor/english_language.asp.

Spelling

The AVJ uses Australian spelling and authors should follow the latest edition of The Australian Oxford Dictionary⁷ or The Macquarie Dictionary.⁸

Units

Use SI basic or derived units or declared units of the Australian metric system (e.g. ha, min, °C) where applicable. Write dates in the form 10 April 2002 and currency in the form A\$33. Spell out single digit numbers that express a quantity (three sheep, five paddocks) but not if used with an SI or similar unit or its symbol (5 mL, 9 m, 7 weeks, 6°C) or as an identifier (group 4, farms 7 and 9). If you start a sentence with a number, spell it out. Type a space between a number and its unit symbol, except for °C and %. Use a comma as a thousands marker in numbers of more than four digits (e.g. 21,000).

Abbreviations

Abbreviations should be used only where they ease the reader's task by reducing repetition of long, technical terms. Use abbreviations only if the term is used three or more times. All abbreviations are to be listed in the abbreviations list and written out in full the first time they appear in the text, followed by the abbreviation in brackets. Exceptions are SI units and commonly used terms that can be understood from the context, for example:

IV, SC, IM, DNA, RNA, EDTA, IgA, IgG

These need not be written out in full or included in the abbreviations list.

Trade names

Mention the manufacturer and the essential information on drugs, reagents and equipment in parentheses within the text. Details on commonly used and well-known materials may not be necessary unless likely to influence the results.

Article format

Please refer to the specific instructions below for each type of article.

Title

The title should be concise, specific and informative, but should not make an assertive claim about the conclusions of the study. Avoid including geographical locations unless they are of epidemiological significance. Title should have only the initial letter capitalised.

Authors' names and addresses

Give initials and surnames in capitals without stops, following the convention of first name, then family name. Separate the authors' names with a comma, except the names of the last two authors, which are separated with 'and' in lower case letters.

Include the addresses of the institutions at which the work was carried out. The submitting author will be the author for all correspondence. Include the submitting author's email address. The present address of the submitting author, if different from that where the work was carried out, should be supplied.

Headings

Do not indent headings or end headings with stops. Only the first letter is capitalised. Major headings are typed in bold on a separate line. First-order subheadings are typed on a separate line and italicised. Second-order subheadings are italicised and followed by a tab to separate them from the text, which follows on the same line. Do not number subheadings, paragraphs or itemised lists in the text.

Key words

Key words are used by indexes and electronic search engines, and should appear after the abstract. Use the heading 'Key words:' and then the key words separated by commas. Include up to six key words. Also enter the key words where prompted during the submission process. Keywords are required for all papers.

Abbreviations list

Compose the list in alphabetical order by abbreviation. Use the heading 'Abbreviations:' and then the list of abbreviations followed by their definitions, separated by semi-colons.

Acknowledgments

Sources of funding and donations should be acknowledged. Authors should acknowledge only significant intellectual and technical contributions, and permission from those listed should be obtained before publication.

References

Use references judiciously. Cite only those publications that are essential for the understanding of the study.

Number text references consecutively with superscript Arabic numerals that follow any punctuation marks, with no space in between. Construct the reference list in the same numerical sequence of the references in the text. References cited only in tables or in figure legends are numbered according to the first identification of the table or figure in the text. References to journals, books, conference proceedings, organisational papers, anonymous editorials, foreign language articles and internet websites, respectively, are written as follows:

1. Gibson KT, Hodge H, Whitem T. Inflammatory mediators in equine synovial fluid. *Aust Vet J* 1996;73:148-151.

2. Peterson ME, Randolph JF, Mooney CT. Endocrine diseases. In: Sherding RG, editor. *The Cat: Diseases and Management*. 2nd edn. Churchill Livingstone, New York, 1994:1403-1506.

3. Rhodes AP. Infectious bovine keratoconjunctivitis vaccination. In: *Proceedings of the 23rd Seminar, Sheep and Beef Cattle Society, New Zealand Veterinary Association*, June 1993.

4. Australian Veterinary Association. Tethering of sows and sow stalls. In: Greenwood PE, editor. *Members' Directory and Policy Compendium*. 1997:B5

5. Where do we stand on manpower? [editorial] *Vet Rec* 1995;137:1

6. Homberger FR. Mäusehepatitis-Virus. *Schweiz Arch Tierheilkd* 1996;138:183-188.

7. Council of Docked Breeds. The case for docking. <http://www.cdb.org>. 1992. Accessed 15 October 2001.

List all authors if there are five or fewer. When there are more than five authors, list only the first three and add 'et al'. Write titles of books, journals and other publications in italics. Do not underline or use bold letters.

The abbreviation of journals follows that of Serial sources for the BIOSIS previews database. A list of journal abbreviations can be found at http://entnemdept.ifas.ufl.edu/all_journals.htm. Journal abbreviations do not contain stops. Cite references to unpublished work only in the text, with a notation of (personal communication) or (unpublished). Please send a copy of any cited work that is included in the reference list as 'in press'. It is the authors' responsibility to check the accuracy of reference citations.

Tables

Tables should be self-contained and complement, but not duplicate, information contained in the text. Format tables with the table function in a word processor, such as MS Word, on a separate page with the legend typed above. Column headings should be brief, with units of measurement in parentheses. All abbreviations must be defined in footnotes to the table. Use superscript lower case letters to mark footnotes and superscript capital letters to mark statistical significance.

Number tables consecutively in the order they occur in the text, with Arabic numerals.

Figures

Include figures only if they are informative and necessary for the understanding of the text. Figures must be uploaded as separate files and not be embedded in the main text file. Each figure must be uploaded separately from other figures.

Line figures and graphs should be supplied in their original format, preferably as .xls or .eps files.

Photographs should be in sharp focus and cropped appropriately. They should be of sufficient clarity to enable identification of relevant features. Submit photographs as .tif or .jpg files with a resolution of at least 300 dpi, and at least 8.6 cm in image width at that resolution. It is not possible to print images that are of insufficient resolution. Scale bars must be included on micrographs. See <http://www.blackwellpublishing.com/bauthor/illustration.asp> for more details.

Any lettering should be sans-serif, and must be large enough to allow for a reduction in size. Use a consistent style of layout, lettering, symbols and

thickness of lines.

Digital manipulation of an image is acceptable only if it is done to enhance photographic density or to eliminate artefacts. Any digital manipulation must be mentioned in the figure legend. The author(s) must also state in the covering letter that the scientific content of the image has not been altered. The Editor may need to examine the original image.

Number figures consecutively in the order they occur in the text, with Arabic numerals.

Figure and table legends

Legends should be concise, but comprehensive. The figure or table and its legend must be understandable without reference to the text. Include definitions of any symbols used and define/explain all abbreviations and units of measurement.

Article types

Please look at a recent issue of the AVJ to see the elements of each article type. The Editors may change the categories of submitted articles at their discretion.

Original article

Maximum 6500 words including up to 40 references. Include a structured abstract of up to 250 words. The abstract's subdivision is up to the author, but should encompass the objective, design, procedure, results and conclusion. Type abstract subheadings in bold with only the first letter capitalised, separated by a tab from the text on the same line.

The main headings, following an untitled introduction, are Materials and methods, Results, Discussion, Acknowledgments and References. The introduction should state the purpose of the study. The content of Materials and methods should enable others to reproduce the work. Present the findings in Results concisely and logically. Evaluate and interpret the findings in the Discussion, but do not present new data. If possible, write the main conclusions at the end of the Discussion. Headings may vary from standard if the variation makes the article more informative.

Review

Maximum 6500 words including references. Include a structured abstract of up to 250 words.

Reviews should provide a critical assessment of published works that have contributed to the development or understanding of the chosen topic, and not just a summary of published papers. The soundness of experimental evidence and the validity of conclusions and recommendations in cited articles should be assessed. Conflicting observations and interpretations should be examined and evaluated. A review might bring together disparate strands of knowledge into a unified concept, offer new interpretations of existing data or be the basis of a new hypothesis. A state-of-the-art review may have a more limited aim of educating readers about new methods and materials in rapidly developing new fields, but should also give an unbiased evaluation of their place in future practice.

There may be a place for review authors to introduce a limited amount of their own unpublished results. This, as with all of the authors' input, must be subjected to the same rigorous scrutiny applied in assessing all other cited works.

Reviews that critically evaluate the effect of specified treatments or interventions on defined conditions form a valuable part of evidence-based medicine. Such reviews in the human medical field can be accessed through the Cochrane Collaboration (<http://www.cochrane.org>). For guidance on their preparation, an extensive handbook is available online at (<http://www.cochrane.dk/cochrane/handbook/hbook.htm>). We encourage the publication of such reviews in veterinary medicine and interested reviewers are invited to contact the Editors.

Short contribution

Maximum 1500 words and 15 references. Novel observations and interpretations that have not arisen within rigorous experimental constraints and may not therefore warrant a full article, or observations that are of wide interest, but of a minor nature, may be suited to this format.

Short contributions have a 100-word, unstructured abstract, up to five key words and no subheadings, except References.

Case report

Case reports should concern a rare or new condition. Case reports that do not add substantially to the existing literature will not be published.

Maximum 3500 words including references. Include a concise, unstructured summary of up to 200 words and up to five key words. The main headings, following an untitled introduction, are Case report, Discussion, Acknowledgments and References. The introduction should indicate the importance of the case and why it is worth reporting. This rationale of what is interesting and relevant may contain some evidence from published articles to substantiate the claim that the case is important. A full review of the literature is not warranted.

A description of the case should include a history and description of animals, clinical features, diagnosis, interventions and procedures, and outcome.

Description should be brief and clear. The clinical features should be only those needed to convince readers that the case is what it is claimed to be and that other plausible diagnoses have been excluded. Reference range of values for any laboratory tests conducted must be included.

The case should be discussed in the light of relevant published work. The width and depth of the search of publications should be described but only findings that are relevant to the case should be discussed. If authors think a full review is necessary, then they should consider two manuscripts: a case report and a review.

Authors should:

- discuss the evidence that the case is what they believe it to be
- discuss how their observations and the results of tests support their diagnosis, treatment and recommendations
- consider and refute other plausible explanations
- explain any other contradictory observations or evidence
- discuss the implications and relevance of the case
- identify lessons learnt from the case for investigation or management of similar cases.

A submission by a student who is the sole author of a case report should be accompanied by a letter from the Head of Department or Dean, who verifies

that the report has been generated by the student's endeavours. Students are advised to consult with all clinicians who have responsibility for the case during its time in the university clinic and all staff who contributed in any significant way to case management.

History

Maximum 5000 words including up to 40 references. Include a structured abstract of up to 250 words. Articles should be relevant to the history of veterinary medicine in Australia.

Clinical update

Maximum 200 words including 25 references.

Diagnostic challenge

Maximum 500 words. Photographs preferred.

Publication

Proofs

Notification of the URL from where to download a Portable Document Format (PDF) typeset page proof, associated forms and further instructions will be sent by email to the corresponding author if an article is accepted for publication. The purpose of the PDF proof is a final check of the layout, and of tables and figures. Alterations other than the essential correction of errors are unacceptable at PDF proof stage. The proof should be checked, and approval to publish the article should be emailed to the Publisher by the date indicated, otherwise publication will be delayed.

Offprints

A free PDF offprint will be supplied to the corresponding author. A minimum of 50 additional offprints will be provided upon request, at the author's expense.

Statistical Guidelines

Consultation with a biometrician is recommended before the experiment, because decisions made at the design stage are critical for a successful outcome. *Statistics for Veterinary and Animal Science*⁹ is recommended as a good straight forward text book.

Experiments should be designed to test specific hypotheses. The design constitutes the best way to set up and perform the experiment in order to test the hypotheses.

The number of subjects: The experiment should be neither too small nor too large. Where feasible a pre-study power calculation should be carried out to estimate the numbers required.

Method of analysis: The method of analysis should be clearly specified. Although in most cases standard methods of analysis will be sufficient, complex analyses are readily available in computer packages. Experimenters should be satisfied that the output of a package is both appropriate and intelligible.

Randomisation: An appropriate method should be used to allocate subjects to treatments, and should be briefly mentioned in the text. If some other variable, such as body weight, is taken into account in the allocation, it should be included in the analysis as a covariate or a blocking factor.

Surveys should be designed so that the parameters to be estimated, for example, the prevalence of a particular disorder, can be estimated with appropriate precision. Possible sources of bias, as for example introduced by structuring or incomplete returning of a questionnaire, should be discussed.

Analysis

Errors in calculation: Rigorous checking should be used to avoid computational errors, including those of data entry and selection of options when using a package. Because statistics is commonsense in a mathematical form, any seeming discrepancy between P values and intuition should be viewed with suspicion.

Appropriate analysis: The analysis used should be appropriate to the design. Take account of blocking if this has been used in allocation, and of trend if an explanatory variable (e.g. dose at different levels) is included.

Appropriate test: Statistical tests used should be appropriate. Remember that there are restrictions on the use of the commoner tests - for example, the t test and analysis of variance require that the data are reasonably consistent with a normal distribution and that the variances to be pooled are compatible. If such assumptions are untenable, the variable can be transformed or non-parametric techniques can be applied. The χ^2 test is not recommended if expected values are small, in which case an alternative test should be adopted.

Direction of testing and level of significance: Use two-sided testing unless a very clear case is made for one-sided. The most commonly used level of significance (α) is 0.05. This may be varied depending on the relative weights to be given to type I and type II errors, but the case should be argued by the authors, especially for $\alpha = 0.1$.

Multiple testing: Tests should be made on comparisons appropriate to the aims of the experiment, not just suggested by the data. If multiple applications of significance testing are necessary, significance levels should be protected using methods such as those described by Ludbrook.¹⁰

Repeated measures: Where observations on the same subjects are repeated over time, it is important to recognise that the observations are correlated. Apply corrections, such as described by Ludbrook,¹¹ select a single end-measure, such as the area under the individual time-response curve, or fit a function to it.¹² Ensure that inclusion of 'repeated measures' in the repertoire of a computer package means more than its ability to handle the paired t test. Remember that repeated observations on the same subject should not be used in any calculation of the standard error (SE).

Presentation

Inclusion of data: Do not omit data referred to in the Methods. It is obviously impossible to include all raw data, but in general the reader should have enough information to verify the main conclusions.

Inclusion of information about testing: The reader's full understanding of the analysis depends on the precise description of the methods used. Indicate whether a t test was paired or not, and/or the type of analysis of variance used, including the number of factors involved, the interactions examined and the error terms used. If the analysis is complex it should be explained in terms that

are intelligible to readers and should be referenced. If a computer statistics package is used to execute the analysis, its name, version and vendor should be given.

Standard deviation (SD) and standard error (SE): Include SD when describing observations, SE where the objective is estimation or to test a hypothesis. Always include the 'n' on which statistics are based. It is important that the SEs shown should be relevant to any comparisons tested - thus where the paired t test is used the SEs of the means are not relevant to testing the differences between them - the SEs of the mean of the differences should be quoted. Where SEs have been calculated from analysis of variance it is likely that they will be based on the same residual mean square, so that it is not necessary to show individual SEs.

P values: It is preferable to show actual P values rather than point out 'significant' or 'not significant' differences (terms that need to be defined). This is particularly important where the null hypothesis is not rejected and there is a possibility of a type II error, the failure to detect a real effect.

Confidence intervals (CI) are used to indicate the range of values within which a parameter will be found at a specified probability. In many cases presentation of a CI is more informative than the yes/no result of a test of significance or an actual P value.

Precision: Avoid the spurious suggestions of precision that are produced by including too many digits. In most cases two or three significant figures are sufficient.

Conclusions

Conclusions should be justified by the results of the analysis.

The null hypothesis (NH)

(i) Failure to reject the NH, that is, the finding that the effects tested are 'not significant', does not prove that the NH is true. Calculation of the CI for the effect may afford a basis for concluding that any effect is inconsequential.

(ii) Rejection of the NH, that is, the finding 'statistically significant', is prima facie evidence for the existence of the effect investigated, but bias as a possible reason for the difference must also be examined. The proposition that it is biologically unimportant should also be supported by argument from the CI.

Discrepancies: Internal inconsistencies, for example, in the level of the end-measure between one part of the experiment and another, should be addressed in the discussion.

References

1. Hames I. Peer Review and Manuscript Management in Scientific Journals: Guidelines for good practice. Blackwell Publishing Ltd, 2007.
2. National Health and Medical Research Council. Australian Code of Practice for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes. 7th edn. NHMRC, 2004; <http://www.nhmrc.gov.au/publications/synopses/ea16syn.htm>.
3. Declaration of Helsinki (as revised in Edinburgh 2000); <http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>.
4. Style Manual for Authors, Editors and Printers. 6th edn. John Wiley & Sons Australia Ltd, 2002.
5. Council of Science Editors, Style Manual Committee. Scientific Style and Format: the CSE Manual for Authors, Editors, and Publishers. 7th edn. Reston (VA); The Council, 2006.
6. Strunk W, White E, Angell R. The Elements of Style. 4th edn. Allyn & Bacon,
7. Bruce Moore, editor. The Australian Oxford Dictionary. 2nd edn. Oxford University Press.
8. Delbridge A, Bernard JRL, Blair D et al, editors. The Macquarie Dictionary. 4th edn. Macquarie Library.
9. Petrie A, Watson P. Statistics for Veterinary and Animal Science. 2nd edn. Blackwell Publishing, 2006.
10. Ludbrook J. On making multiple comparisons in clinical and experimental pharmacology and physiology. Clin Exp Pharmacol Physiol 1991;18:379-392.
11. Ludbrook J. Repeated measurements and multiple comparisons in cardiovascular research. Cardiovasc Res 1994;28:303-311.
12. Rowell JG, Walters DE. Analyzing data with repeated observations on each experimental unit. J Agric Sci 1973;87:423-432.

Capítulo 3 Trabalho a ser enviado para a revista Australian Veterinary Journal is the official journal of the Australian Veterinary Association

Effects of selenium supplementation on serum cortisol concentrations in bovine repeatedly handled

LSLS REIS,^{ab} SB CHIACCHIO,^a E OBA,^c PE PARDO^d and NM FRAZATTI-GALLINA^e

^a Department of Veterinary Clinic, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu-SP, Brazil, CEP 18608-000.

^b Current address: Rua Osvaldo Cruz 2027, Assis-SP, Brazil, CEP 19800-081. E-mail: reis.lsls@gmail.com

^c Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu-SP, Brazil, CEP 18618-000.

^d Department of Veterinary Clinic, Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente-SP, Brazil, CEP 19067-175.

^e Instituto Butantan, São Paulo-SP, Brazil, CEP 05503-900.

Abstract

Objective This study evaluated the effect of selenium (Se) supplementation on cortisol levels in cattle subjected to repeated handling practices.

Prodedure One year-old male Nelore calves were assigned to one of four experimental groups (N=15 each), which fed daily on diets supplemented with 0 (G_c), 3.6 (G_{3.6}), 5.4 (G_{5.4}) or 6.4 (G_{6.4}) mg Se. Stressful handling procedures and blood sampling were performed on days 0, 15, 30, 60, 90 and 120.

Results Se concentration in Gc decreased, but it increased over the course of the experiment in G_{3.6}, G_{5.4} and G_{6.4}. Cortisol concentrations increased until day 90 and decreased on day 120, irrespective of Se supplementation. Cortisol and Se levels were not markedly correlated.

Conclusion Daily Se supplementation at 3.6; 5.4 and 6.4 mg per animal does not affect cortisol concentrations; repeated handling of cattle in the corral is a stressor, but they adjust to it after 120 days.

Key words: selenium supplementation, cortisol, stress, cattle

Handling cattle in corrals is a common practice in livestock production. It is used for vaccination, control of endo and ectoparasites, separation of stocks, weighing and identification of the animals, artificial insemination, feeding and other management procedures. During these practices cattle are exposed to physical, psychological and metabolic stressors such as the vaccination itself,¹ a hostile environment² and handling procedures inside the corral,³ the presence of strangers⁴, entrance in a new environment^{4,5} and fear.⁶ These stressors activate the hypothalamus-pituitary-adrenal axis (HPA), which stimulates the adrenal glands to produce and secrete cortisol, adrenalin and noradrenalin.^{7,8,9,10,11} In addition, the sympathetic nervous system (SNS) responds to the stressors rapidly by activating the adrenal-sympathetic axis.^{12,9} The activity of both HPA and SNS axes affects cattle homeostasis, compromising cattle health and welfare. These negative effects account for economic losses.

Selenium (Se) is an essential micromineral for animals.^{13,14,15} It is found in many selenoproteins such as glutathione peroxidase (GSH-Px).^{13,14,16} During oxidative stress, GSH-Px removes hydroperoxides (free radicals) and lipid peroxides from the cellular-metabolism by converting them into oxygen and water or non-toxic fatty acid

hydroxides.^{13,16,15} However, few studies have evaluated the use of Se supplementation to attenuate stress caused by physical and psychological agents. Accordingly, the present study evaluated the effect of Se supplementation on the levels of serum cortisol in cattle repeatedly handled.

Materials and methods

The experiment was carried out from summer to autumn (Feb-Jun) 2007 in Lutécia, SP, Brasil. The climate tropical with rainy (Oct-Apr) and dry (May-Sep) seasons, mean annual rainfall of 1,300 mm, relative humidity of 64 %, mean temperature of 25°C and altitude of 602 m.

Sixty uncastrated male Nelore cattle (*Bos taurus indicus*) from 10 to 12 months of age were used. The cattle were acclimatized to the study area in an extensive pasture system, where they grazed on *Brachiaria decumbens*. The animals were randomly distributed into four experimental groups (N=15 in each group) which received different diets. The diets were offered *ad libitum*, and individual consumption was around 200 g. The control group (Gc) was fed with a protein-mineral mixture, and the other groups, denominated G_{3.6}, G_{5.4} and G_{6.4}, received this mixture supplemented with 18, 27 and 32 mg Se/kg, respectively (daily Se consumption was around 3.6, 5.4 and 6.4 mg in 200 g of mineral mixture, respectively).

The cattle were held in nonstressful conditions for 30 days to adapt them to the experimental diets and pasture, for a total of 120 observation days.

The protein mineral mixture (Top Line Recria[®]) was produced by “Matsuda Sementes e Nutrição Animal”, Álvares Machado, SP, Brazil. The mixture contained calcium, phosphorus, magnesium, sodium, cobalt, copper, sulphur, iron, iodine, manganese, nickel, zinc, vitamin A, vitamin D, vitamin E, buffer, 400 Kcal metabolizable energy, 140 mg non-protein nitrogen (maximum equivalent protein), 650 mg fluorine (maximal), 95%

phosphorous solubility in citric acid 2% (minimum). The mixture was supplemented with 0, 18, 27 and 32 mg of Se/Kg in groups G_{3.6}, G_{5.4} and G_{6.4}, respectively.

The protein mineral mixture was provided to the cattle in a covered wooden feed trough (13 cm long per animal). A waterier was placed 50 meters from the feed trough.

The four paddocks used (I, II, III and IV) had similar topography and were covered with *Brachiaria decumbens*. The grazing system was continuous and the experimental groups moved from one paddock to another every 30 days. The paddocks had stocking density of 100 kg live weight per hectare. On day 0, samples of *B. decumbens* were cut at grazing height and stored at -5 °C for subsequent determination of Se concentration.

The stressors were imposed on the cattle in the morning, before blood sampling. These stressors were the same as those present in handling practices: conveyance of the animals to the corral; entry into a new environment (corral); stay in the corral; forced exercise during handling in the corral; presence of people speaking loud and restraint in the stunning box for 5 min.

Blood samples were collected on days 0, 15, 30, 60, 90 and 120. On these days, the cattle were led to the corral in the morning and restrained in a stunning box for blood collection.

Ten mL of blood was collected from each animal in vacuum tubes without anticlotting agent by puncture of the jugular vein. The blood samples were immediately centrifuged at 2,500 rpm for 10 min. Serum samples were stored in plastic tubes (1.5 mL) at -20°C for subsequent determination of serum cortisol and Se concentrations.

Serum cortisol levels were determined with a commercial kit for solid phase radioimmunoassay (DPC-Diagnostic Products Corporation, USA) and counted in a Cobra II Auto-Gamma Counter (Packard Bio Sciences Company, USA).

Se concentration was determined in both cattle serum and *Brachiaria decumbens* forage by graphite furnace atomic absorption spectrophotometry.

Serum cortisol concentrations were compared among the groups (Gc, G_{3.6}, G_{5.4} and G_{6.4}) as well as days of observation (D₀, D₁₅, D₃₀, D₆₀, D₉₀ and D₁₂₀) by repeated measures analysis of variance followed by the LSD test to compare significant differences.¹⁷

Non-parametric procedures were applied to compare Se levels among the groups and over the course of the experiment because data distribution violated normality predictions (Shapiro-Wilk test). Kruskal-Wallis analysis of variance (H) was used to compare groups Gc, G_{3.6}, G_{5.4} and G_{6.4} on each observation day, whereas Friedman analysis of variance (χ^2_r) compared Se levels on the experiment days (0, 60 and 120) in each group.¹⁷

Significant differences were compared by Nemenyi multiple comparisons test.¹⁷

Associations between the concentrations of Se and cortisol in serum samples were tested by Spearman's Rank Correlation test (r_s).¹⁷ For all the analyses, the alpha error was set at 5%.

Results

Serum cortisol concentrations were not affected by Se supplementation ($F_{(3,65)} = 0.35$; $P = 0.79$; data pooled for each day of observation) nor by any interactions between Se concentration and time ($F_{(15,280)} = 1.41$; $P = 0.14$) (Figure 1). However, serum cortisol concentrations increased gradually over the experiment ($F_{(5,280)} = 32.65$; $P < 0.01$; data pooled for each group); a peak on day 90 was followed by a cortisol drop on day 120 (Figure 2).

Se concentrations were higher in Gc than in G_{5.4} and G_{6.4} on day 0 ($H_{0.05; 15; 15; 15} = 12.916$; $P = 0.005$), but no difference was found among the groups on the other experiment days. The groups had different Se concentration profiles over the course of the experiment. Se decreased only in Gc from day 60 on ($(\chi^2_r)_{3, 15} = 11.200$; $P < 0.004$). In G_{3.6} Se levels increased progressively ($(\chi^2_r)_{3, 15} = 26.133$; $P < 0.000$). In G_{5.4} Se concentrations were

higher on day 120 than on day 0 ($(\chi^2_r)_{3,15} = 16.133$; $P < 0.000$), whereas in G_{6.4} they were high from day 60 ($(\chi^2_r)_{3,15} = 12.933$; $P < 0.002$) (Table 1).

Only one of the 12 associations tested was statistically significant: a negative correlation between serum cortisol and Se concentrations in G_{6.4} on day 0 ($(r_s) = -0.514$; $P = 0.05$; Table 2).

Se levels, determined from *Brachiaria decumbens* collected from each paddock, were the same (0.04 mg Se/Kg dry matter).

Discussion

Serum cortisol concentrations were within the normal levels on day 0 in groups G_c (2.20 ± 0.86 µg/dL), G_{3.6} (2.75 ± 0.97 µg/dL), G_{5.4} (2.39 ± 0.42 µg/dL) and G_{6.4} (2.62 ± 0.69 µg/dL) após a colheita de sangue. Indeed, Aragón et al.¹⁸ and Vásquez and Herrera³ reported mean baseline concentrations of serum cortisol of 3.29 µg/dl in Zebu cattle. Reis et al.¹⁹ found that the mean baseline concentration of cortisol in Nelore cattle is 3.68 µg/dL. Thus, the procedures used for blood collection did not stress the cattle. In addition, the rotation of the calves among the paddocks every 30 days and the similarity in Se levels in the paddock forages (0.04 mg Se/Kg dry matter) ensured the same grazing conditions for all the groups. Thus, variations in cattle serum cortisol levels were obtained exclusively from the treatments.

Serum cortisol concentrations changed over the experiment, suggesting that this hormone is a good stress chronic indicator. Cortisol is already used as a acute stress^{12,20,21,19,22} and chronic stress indicator in cattle,^{10,23} and animals with high cortisol concentrations in the circulatory system are considered stressed.^{19,23,24,25,26}

The decrease in serum concentrations of Se in cattle from G_c (Table 1) confirms that the forage of both paddocks (0.04 mg de Se/Kg de MS) were Se deficient. In fact, according to

the National Research Council,²⁷ beef cattle require 0.1 mg Se/Kg dry matter a day to supply their nutritional needs.

As expected, serum Se concentrations in G_{3.6}, G_{5.4} and G_{6.4} increased, although they showed different variation profiles over the course of the experiment. These findings show the efficiency of the Se supplementation regime used. However, serum cortisol concentrations were not affected by Se levels or supplementation time. Thus, the variations detected over the course of the experiment were not a function of Se supplementation.

Daily Se supplementation with 3.6; 5.4 and 6.4 mg per animal with *ad libitum* feeding failed to attenuate the stress caused by the physical and/or psychological stressors imposed (Figure 1). Similarly, Gupta et al.²¹ observed that plasma cortisol concentrations of post-parturition cows were not decreased by the injection of 30 mg Se. The lack of association between serum cortisol and Se concentrations (Table 2) reinforces the absence of a biological interactive effect of these variables, i.e., Se and cortisol levels are independent of each other. Given that the negative correlation between cortisol and Se concentrations in G_{6.4} is weak, isolated, and occurred only at the beginning of the experiment (day 0), when the animals had not been subjected to the stressors, it is likely a casual rather than a biological effect. After handling stressors were imposed, this correlation did not persist. Despite the different pathways used for Se administration, both studies indicate that Se is not likely to be a stress-attenuating agent against physical and/or psychological stressors. From day 0 to 15, after the cattle had been handled inside the corral on two consecutive occasions, serum cortisol levels did not increase significantly ($P < 0.01$; Figure 2). During this period the animals were not stressed, given that cortisol concentrations in all the groups were under the baseline levels determined by Aragón et al.,¹⁸ Vasquez and Herrera,³ Reis et al.¹⁹ and Giometti et al.²⁶ Therefore, corral handling on two consecutive occasions did not affect animal well-being.

After day 15, serum cortisol increased gradually over the experiment period ($P < 0.01$) and reached a peak on day 90. Thus, repeated cattle handling inside the corral is a stress agent for cattle, irrespective of Se supplementation. This corroborates Cook et al.,²⁸ Lensink et al.,⁴ Andrade et al.²⁴ and Reis et al.¹⁹ who also considered handling inside the corral as a cattle stressor. In addition, these results indicate that cattle that have difficulty in dealing with the hostile environment of the corral and those with greater difficulty to adjust to the exposed agents also showed higher blood cortisol levels.

Calves are exposed to a variety of stressors during handling, such as being led to the corral,^{30,2,6} handling inside the corral^{28,4,24,19} with forced exercise and thus physiological stress, the presence of people speaking loudly and treating cattle aggressively,^{30,31} entering a new environment, which is a psychological stressor,^{32,33,5,3} and fear.^{34,2,6} These stressors activate the hypothalamus-pituitary-adrenal axis (HPA), which stimulates the adrenal glands to produce and secrete cortisol, adrenaline and noradrenaline.^{7,8,9,11} These neuroendocrine and metabolic changes³⁵ affect body homeostasis³⁶, thus compromising health and welfare. Hence, the increased serum cortisol concentrations in the cattle during the experimental period (Figure 2) was a response to the stressors listed above. It suggests that cattle cannot be handled inside the corral repeatedly.

On day 120, serum cortisol concentrations dropped significantly ($P < 0.01$; Figure 2), irrespective of Se supplementation, possibly because the cattle adaptation to the usual handling procedures. However, cortisol concentration did not reach the baseline levels described by Aragón et al.,¹⁸ Vasquez and Herrera³ and Reis et al..¹⁹ The adaptation of cattle to handling procedures was also observed by Andrade et al.,²⁴ Mellor et al.,⁶ Hickey et al.,¹² Solano et al.,³⁷ and Reis et al..¹⁹ These adaptation to stressors are caused by changes in the central nervous system: hypothalamus and pituitary function, neurosteroids and neurotransmitters, limbic system (especially amygdalae and hippocampus), and HPA axis activity.²⁸ All these changes decrease the response of the HPA axis to stressors.^{38,40}

Other factors that contribute to the adaptation of cattle to stressors are genetic,^{34,38} breed (*Bos taurus indicus* adapt easier than do *Bos taurus taurus*)⁴⁰ and temperament related (docile animals adapt faster).⁴⁰

On the basis of the experimental conditions and the results obtained we conclude that: Se supplementation with 3.6; 5.4 and 6.4 mg per animal per day does not affect serum cortisol concentrations in cattle; repeated handling inside the corral is a stress agent; cattle adapt to the handling procedures after 120 days, but serum cortisol concentration does not return to baseline values after 120 days.

Acknowledgements

To “Matsuda Sementes e Nutrição Animal”, Álvares Machado, SP, Brazil, for supporting and encouraging this research.

References

1. Nockels CF, Odde KG, Craig AM. Vitamin E supplementation and stress affect tissue a-tocopheral content of beef heifers. *J Anim Sci* 1996;74:672-677.
2. Borell EH. The biology of stress and its application to livestock housing and transportation assessment. *J Anim Sci* 2001;79(E. Suppl.):E260-E267.
3. Vásquez EFA, Herrera APN. Concentração plasmática de cortisol, uréia, cálcio e fósforo em vacas de corte mantidas a pasto suplementadas com levedura de cromo durante a estação de monta. *Ciência Rural* 2003;33:743-747.
4. Lensink BJ, Fernandez X, Boivin X, Pradel P, Neindre PL, Veissier I. The impact of gentle contacts on case of handling, welfare, and growth of calves and on quality of veal meat. *J Anim Sci* 2000;78:1219-1226

5. Arthington JD, Eicher SD, Kunkle WE, Martin FG. Effect of transportation and commingling on the acute-phase protein response, growth, and feed intake of newly weaned beef calves. *J Anim Sci* 2003;81:1120-1125.
6. Mellor DJ, Stafford KJ, Todd SE, Lowe TE, Gregory NG, Bruce RA, Ward RN. A comparison of catecholamine and cortisol responses of young lambs and calves to painful husbandry procedures. *Aust Vet J* 2002;80:228-233.
7. Carrasco GA, Van De Kar LD. Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur J Pharmacol* 2003;28,463:235-272
8. Dickerson SS, Kemeny ME. Acute stressors and cortisol responses: a theoretical integration and synthesis of laboratory research. *Psychol Bull* 2004;130:355-391.
9. Charmandari E, Tsigos C, Chrousos G. Endocrinology of the stress response. *Annu Rev Physiol* 2005;67:259-284.
10. Gupta S, Earley B, Crowe MA. Pituitary, adrenal, immune and performance responses of mature Holstein x Friesian bulls housed on slatted floors at various space allowances. *Vet J* 2007;173:594-604.
11. Curley Jr. KO, Neuendorff DA, Lewis AW, Cleere JJ, Welsh Jr. TH, Randel RD. Functional characteristics of the bovine hypothalamic–pituitary–adrenal axis vary with temperament. *Horm Behav* 2008;53:20-27.
12. Hickey MC, Drennan M, Earley B. The effect of abrupt weaning of suckler calves on the serum concentrations of cortisol, catecholamines, leukocytes, acute-phase proteins and in vitro interferon-gamma production. *J Anim Sci* 2003;81:2847-2855.
13. Kommisrud E, Osteras O, Vatn T. Blood selenium associated with health and fertility in Norwegian dairy herds. *Acta Vet Scand* 2005;46:229-240.
14. Haddad CM, Alves FV. Minerais para gado de corte. In: Bittar C, Moura JC, Faria VP, Mattos WRS, editors. *Minerais e Aditivos Para Bovinos*. Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz – FEALQ, Piracicaba, 2006:63-76.

15. Carroll JA, Forsberg NE. Influence of stress and nutrition on cattle immunity. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2007;23:105-149.
16. Paschoal JJ, Zaneti MA, Cunha JA. Contagem de células somáticas no leite de vacas suplementadas no pré-parto com selênio e vitamina E. *Ciência Rural* 2006;36:1462-1466.
17. Zar, J. H. *Biostatistical Analysis*. 4th edn. Prentice Hall, New Jersey, 1999.
18. Aragón VEF, Graça DS, Norte AL, Santiago GS, Paula OJ. Suplementação com cromo e desempenho reprodutivo de vacas primíparas mantidas a pasto. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2001;53:624-628.
19. Reis LSLS, Pardo PE, Oba E, Kronka SN, Frazatti-Gallina NM. *Matricaria chamomilla* CH12 decreases handling stress in Nelore calves. *J Vet Sci* 2006;7:189-192.
20. Yagi Y, Shiono H, Chikayama Y, Ohnuma A, Nakamura I, Yayou KI. Transport stress increases somatic cell counts in milk, and enhances the migration capacity of peripheral blood neutrophils of dairy cows. *J Vet Med Sci* 2004;66:381-387.
21. Gupta S, Gupta HK, Soni J. Effect of vitamin E and selenium supplementation on concentration of serum cortisol and erythrocyte lipid peroxides and the incidence of retained fetal membranes in crossbred dairy cattle. *Teriogenology* 2005a;64:1273-1286.
22. Saco Y, Fina M, Gime´nez M, Pato R, Piedrafita J, Bassols A. Evaluation of serum cortisol, metabolic parameters, acute phase proteins and faecal corticosterone as indicators of stress in cows. *Vet J* 2007;*in press*.
23. Walker SL, Smith RF, Jones DN, Routly JE, Dobson H. Chronic stress, hormone profiles and estrus intensity in dairy cattle. *Horm Behav* 2008;53:493-501.
24. Andrade O, Orihuela A, Solano J, Galina CS. Some effects of repeated handling and the use of a mask on stress responses in Zebu cattle during restraint. *Appl Anim Behav Sci* 2001;71:175-181.

25. Acaro Jr. I, Acaro Jr P, Pozzi CR, Fagundes H, Matarazzo SV, Oliveira CA. Teores plasmáticos de hormônios, produção e composição do leite em sala de espera climatizada. *Rev Bras Eng Agríc Ambient* 2003;7:350-354.
26. Giometti J, Chiacchio SB, Albas A, Pardo PE, Bremer Neto H, Giometti AI, Reis LSLS. Efeito da suplementação com levedura de crômio no cortisol sérico de bovinos. *Arch Zootec* 2007;56:79-82.
27. National Research Council. Minerals. In: NRC, editor. *Nutrient Requirements of Beef Cattle*. 7th edition. National Academy Press, Washington, 1996:54-74.
28. Cook CJ, Mellor DJ, Harris PJ, Ingram JR, Matthews LR. Hands-on and hands-off measurement of stress. In: Morberg GP, Mench JA, editors. *The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare*. CABI Publishing, New York, 2000:123-146.
29. Eicher SD. Transportation of cattle in the dairy industry: current research and future directions. *J Anim Sci* 2001;84(E. suppl.):E19-E3.
30. Pajor EA, Rushen J, De Passillé AM. Aversion learning techniques to evaluate dairy cattle handling practices. *Appl Anim Behav Sci* 2000;69:89-102.
31. Hemsworth PH, Coleman GJ, Barnett JL, Borg S, Dowling S. The effects of cognitive behavioral intervention on the attitude and behavior of stockpersons and the behavior and productivity of commercial dairy cows. *J Anim Sci* 2002;80:68-78.
32. Grandin T. Assessment of stress during handling and transport. *J Anim Sci* 1997;75:249-227.
33. Morrow CJ, Kolver ES, Verkerk GA, Matthews LR. Fecal glucocorticoid metabolites as a measure of adrenal activity in dairy cattle. *Gen Comp Endocrinol* 2002;126:229-241.
34. Grandin T. Handling methods and facilities to reduce stress on cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1998;14:325-241.

35. Bruckmaier RM, Blum JW. Responses of calves to exercise during β -adrenergic agonist administration. *J Anim Sci* 1992;70:2809-2821.
36. Paludo GR, Mcmanus C, Melo RQ, Cardoso AG, Mello FPS, Moreira M, Fuck BH. Efeito do estresse térmico e do exercício sobre parâmetros fisiológicos de cavalos do exército brasileiro. *R Bras Zootec* 2002;31:1130-1142.
37. Solano J, Galindo F, Orihuela A, Galina CS. The effect of social rank on the physiological response during repeated stressful handling in Zebu cattle (*Bos indicus*). *Physiol Behav* 2004;82:679-683.
38. Hopster H, Van Der Werf JTN, Erkens JHF, Blokhuis HJ. Effects of repeated jugular puncture on serum cortisol concentrations in loose-housed dairy cows. *J Anim Sci* 1999;77:708-714.
39. Gupta S, Gupta HK, Soni J. Effect of vitamin E and selenium supplementation on concentrations of serum cortisol and erythrocyte lipid peroxides and the incidence of retained fetal membranes in crossbred dairy cattle. *Theriogenology* 2005b;64:1273-1286.
40. Beatty DT, Barnes A, Taylor E, Pethick D, Mccarthy M, Maloney SK. Physiological responses of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle to prolonged, continuous heat and humidity. *J Anim Sci* 2006;84:972-985

Figure Legends

Figure 1. Effect of the supplementations with 0 (G_c), 3.6 (G_{3.6}), 5.4 (G_{5.4}) or 6.4 (G_{6.4}) mg Se per animal per day on the serum cortisol levels (+ sd) of Nelore cattle. No statistical difference was found among the treatments ($F_{(3,56)} = 0.35$; $P = 0.79$).

Figure 2. Effect of handling stressor on serum cortisol levels (\pm sd) after repeated handling on days 0, 15, 30, 60, 90 and 120. Means followed by different letters indicate significant differences ($F_{(5,280)} = 32.65$; $P < 0.01$; LSD, $P < 0.01$) Data from groups G_c, G_{3.6}, G_{5.4} and G_{6.4} were pooled.

FIGURE 1

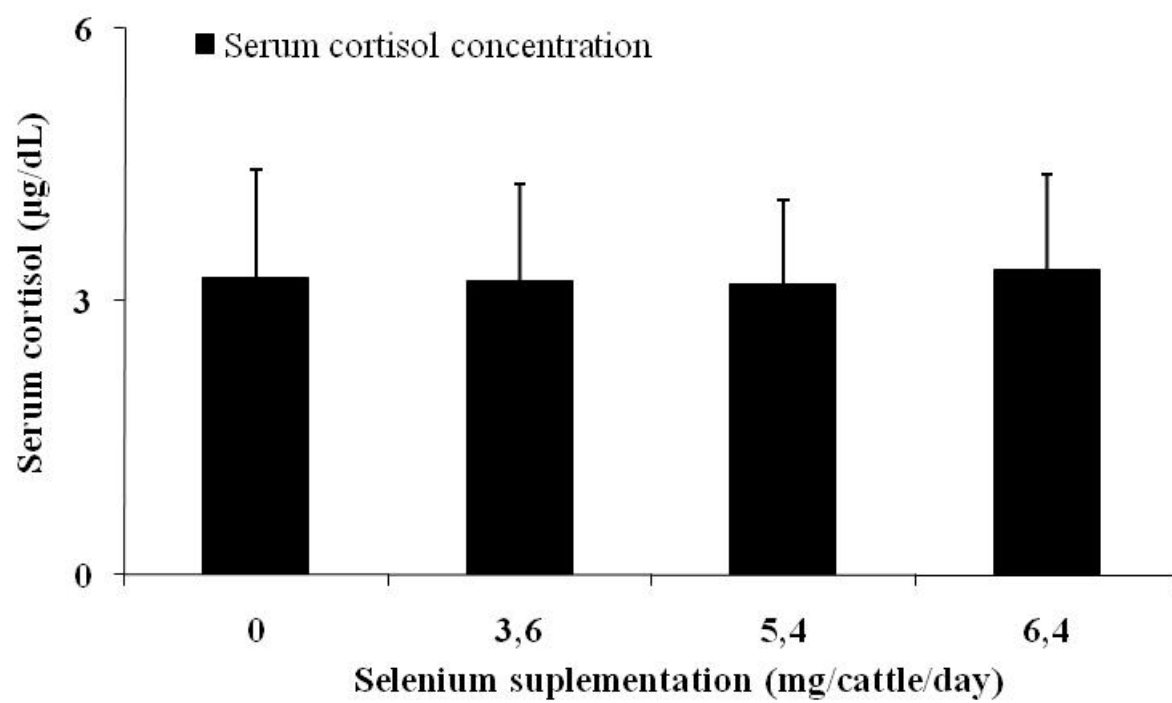


FIGURE 2

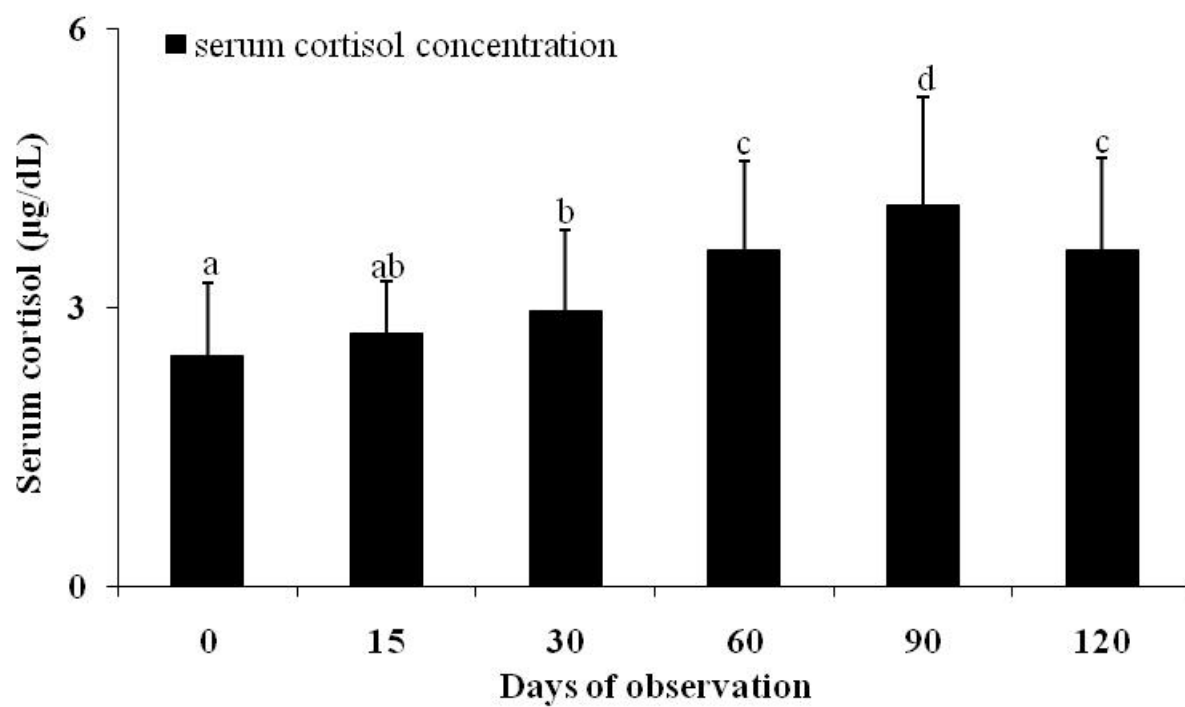


Table 1. Effect of the supplementations with 0 (Gc), 3.6 (G_{3.6}), 5.4 (G_{5.4}) or 6.4 (G_{6.4}) mg Se per animal per day on the serum Se levels (\pm sd) of Nelore cattle.

Group	Serum Se concentrations ($\mu\text{g/L}$)		
	day 0	day 60	day 120
Gc	105.68 ^A \pm 51.87	80.91 ^{AB} \pm 33.73	81.08 ^B \pm 40.92
G _{3.6}	67.69 ^A \pm 26.31	84.96 ^B \pm 38.09	103.09 ^C \pm 47.29
G _{5.4}	59.02 ^A \pm 24.29	78.23 ^{AB} \pm 41.74	95.37 ^B \pm 37.89
G _{6.4}	63.20 ^A \pm 30.42	87.78 ^B \pm 40.87	87.65 ^B \pm 31.22

Distinct letters indicate different results for a same group over the experiment days, (Gc: $P < 0.004$; G_{3.6}: $P < 0.000$; G_{5.4}: $P < 0.000$; G_{6.4}: $P < 0.002$).

Table 2. Correlation coefficient (r_s) between serum concentrations of cortisol and Se.

Group	Correlation Coefficient		
	day 0	day 60	day 120
Gc	-0.068 ($P > 0.81$)	-0.070 ($P > 0.805$)	0.357 ($P > 0.191$)
G _{3.6}	-0.123 ($P > 0.661$)	-0.193 ($P > 0.491$)	-0.071 ($P > 0.800$)
G _{5.4}	0.186 ($P > 0.567$)	-0.339 ($P > 0.216$)	0.450 ($P > 0.092$)
G _{6.4}	-0.514* ($P > 0.050$)	-0.186 ($P > 0.507$)	0.055 ($P > 0.844$)

*Significant Spearman's rank correlation

1 **Capítulo 4 Trabalho a ser enviado para a revista Veterinary Record, British Veterinary**
2 **Association, London, England**

5 **Selenium supplementation promotes the persistence of rabies antibody titers in cattle**

7 L.S.L.S. REIS, S.B. CHIACCHIO, E. OBA, P.E. PARDO, N.M. FRAZATTI-GALINA

9 L.S.L.S Reis, PhD student, Department of Veterinary Clinic, Faculdade de Medicina Veterinária e
10 Zootecnia, UNESP, Botucatu-SP, Brazil, CEP 18608-000.

11 S.B. Chiacchio, Department of Veterinary Clinic, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia,
12 UNESP, Botucatu-SP, Brazil, CEP 18608-000.

13 E. Oba, Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, Faculdade de Medicina
14 Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu-SP, Brazil, CEP 18618-000.

15 P.E. Pardo, Department of Veterinary Clinic, Universidade do Oeste Paulista, UNOESTE,
16 Presidente Prudente-SP, Brazil, CEP 19067-175.

17 N.M. Frazatti-Gallina, Instituto Butantan, São Paulo-SP, Brazil, CEP 05503-900.

19 Reis' present address is Rua Osvaldo Cruz 2027, Assis-SP, Brazil, CEP 19800-081. E-mail:
20 reis.lsls@gmail.com

22 Rabies is untreatable and spread worldwide, and regular vaccination is the most effective and
23 inexpensive procedure for controlling it in cattle (Albas and others 2005). Because Selenium (Se)
24 enhances cattle immunity to infectious diseases (Carroll and Forsberg 2007), we investigated
25 whether this element enhances the humoral immune response of cattle after rabies
26 primovaccination. We used 60 male, uncastrated Nelore calves (~ 12 mo) grazing on a *Brachiaria*

1 *decumbens* pasture which was Se deficient (0.04 mg Se/kg dry matter) according the National
2 Research Council (NRC) (1996). Cattle were immunized with one dose of liquid, inactivated
3 commercial rabies vaccine (potency of 1.31 IU/mL) and fed on mineral mixture (Matsuda Top Line
4 Recria®) supplemented by Se at daily concentrations of 0 mg (G_c; N=15), 3.6 mg (G_{3.6}; N=15), 5.4
5 mg (G_{5.4}; N=15), or 6.4 mg (G_{6.4}; N=15). Blood samples were collected on days 0, 30, 60, 90 and
6 120 for determination of rabies neutralizing antibody titers by Rapid Fluorescent Focus Inhibition
7 Test (RFFIT) and Fluorescent Inhibition Microtest (FIMT RFFIT). Serum content was determined
8 from serum samples by graphite furnace atomic absorption spectrophotometry.

9 As analyzed within each experiment day, the titers of rabies neutralizing antibodies were not
10 different among the groups G_c, G_{3.6}, G_{5.4} and G_{6.4} (Kruskal-Wallis test, alpha error of 0.05; Table
11 1). However, the groups had different profiles of titers persistence along the experiment (Friedman
12 test, alpha error of 0.05; Table 1). Taking that antibody titers must be equal or above 0.5 IU/mL to
13 be protective against rabies (WHO; Albas and others, 2005), only cattle from group G_{3.6} were
14 protected against rabies over the entire experimental period. Rabies antibody titers decreased
15 drastically in G_c and more moderately in both G_{5.4} and G_{6.4}, but none of these groups was protected
16 against rabies 60 days after vaccination (Table 1). On day 120, the frequency of unprotected cattle
17 was 73% in G_c, 60% in G_{5.4} and 80% in G_{6.4}.

18 Serum Se levels in G_c reached 81.08 ± 40.92 µg Se/L on day 120, which indicates marginal
19 Se deficiency (Underwood and Suttle, 1999). This reinforces that the pasture was deficient for
20 Nelore cattle and indicate that it compromises the humoral response of cattle to rabies vaccination.
21 On the other hand, serum Se reached excessive levels in groups G_{5.4} (95.37 ± 37.89 µg Se/L) and
22 G_{6.4} (87.65 ± 31.22 µg Se/L), which were 180% and 213.3% higher than recommended by the NRC
23 (1996), respectively. This supplementation with elevated Se levels compromised the anti-rabies
24 immune response as indicated by a negative correlation between these variables found in group G_{6.4}
25 on day 60 (Spearman's Correlation, (r_s) = -0.580; P= 0.023). The elucidation of the physiological
26 mechanisms involved in this association need further investigations.

1 The best anti-rabies humoral immune response was achieved in G_{3.6}, which maintained
 2 protective titers of rabies antibody throughout the entire experiment (Table 1). At the end of the
 3 experiment, 53.3% of G_{3.6} animals had satisfactory soro-conversion rate. This indicate that daily
 4 oral supplementation of cattle with 3.6 mg Se promotes the persistency of rabies neutralizing
 5 antibody levels. However, supplementation with the other concentrations tested may be excessive
 6 and even cause immune suppression.

7

8 Table 1- Rabies neutralizing antibody titers (IU) in primovaccinated cattle receiving daily Selenium
 9 concentrations of 0 (G_c), 3.6 (G_{3.6}), 5.4 (G_{5.4}) and 6.4 (G_{6.4}) mg.

Group	Antibody titers after vaccination			
	day 30	day 60	day 90	day 120
G _c	1.22±0.42 ^c	0.49±0.42 ^{bc}	0.31±0.42 ^{ab}	0.25±0.42 ^a
G _{3.6}	0.70±0.35 ^a	0.62±0.35 ^b	0.70±0.35 ^{ab}	0.60±0.35 ^a
G _{5.4}	0.51±0.30 ^b	0.37±0.30 ^{ab}	0.40±0.30 ^{ab}	0.35±0.30 ^c
G _{6.4}	0.60±0.56 ^b	0.42±0.56 ^{ab}	0.40±0.56 ^{ab}	0.35±0.56 ^a

10 No difference among the groups was found on a same day (Kruskal-Wallis test, P>0.05).

11 Different letters indicate statistical differences among the observation days (Friedman test, P<0.05).

12

13 References

14 ALBAS, A., PARDO, P.E., BREMER-NETO, H., GALLINA, N.M.F., MOURÃO FUCHES, R.M.

15 & SARTORI, A. (2005). Vacinação anti-rábica em bovinos: comparação de cinco esquemas
 16 vacinais. Arquivos do Instituto Biológico 72, 153-159.

17 CARROLL, J. A. & FORSBERG, N. E. (2007). Influence of stress and nutrition on cattle
 18 immunity. Veterinary clinics of North America. Food animal practice 23, 105-149.

- 1 NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC), 1996: Minerals. In: NATIONAL RESEARCH
2 COUNCIL (ed.), Nutrient requirements of beef cattle. National Academy Press, Washington. 54-
3 74.
- 4 UNDERWOOD, E. J. & SUTLLE, N. F. Selenium. In: The mineral nutrition of livestock, 3rd ed.
5 Wallingford, Oxon: CAB International, 1999: 421-475.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)