

**EFEITO DA *Matricaria chamomilla* CH₁₂ NA CONCENTRAÇÃO
SÉRICA DE CORTISOL E NA RESPOSTA IMUNE HUMORAL DE
BOVINOS IMUNIZADOS COM UMA OU DUAS DOSES DE VACINA
ANTI-RÁBICA**

LUIS SOUZA LIMA DE SOUZA REIS

**EFEITO DA *Matricaria chamomilla* CH₁₂ NA CONCENTRAÇÃO
SÉRICA DE CORTISOL E NA RESPOSTA IMUNE HUMORAL DE
BOVINOS IMUNIZADOS COM UMA OU DUAS DOSES DE VACINA
ANTI-RÁBICA**

LUIS SOUZA LIMA DE SOUZA REIS

Dissertação apresentada Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Fisiopatologia Animal

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Pardo

636.208 51 Reis, Luis Souza Lima de Souza.
R375e Efeito da *Matricaria chamomilla* CH₁₂ na
concentração sérica de cortisol e na resposta
imune humoral de bovinos imunizados com uma
ou duas doses de vacina anti-rábica / Luis Souza
Lima de Souza Reis. – Presidente Prudente:
[s.n.], 2007.
100 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) –
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE:
Presidente Prudente – SP, 2007.

Bibliografia

1. *Matricaria chamomilla*. 2. Vacina. 3.
Bovinos. I. Título.

LUIS SOUZA LIMA DE SOUZA REIS

Efeito da *Matricaria chamomilla* CH₁₂ na concentração sérica de cortisol e na resposta imune humoral de bovinos vacinados com uma ou duas doses de vacina anti-rábica

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Presidente Prudente, 28 de fevereiro 2007.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Eduardo Pardo
Universidade do Oeste Paulista - Unoeste

Prof^a. Dr^a. Renata Navarro Cassu
Universidade do Oeste Paulista - Unoeste

Prof. Dr. Avelino Albas
Agência Paulista de Tecnologia Agronegócios – APTA
Pólo da Alta Sorocabana

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 estar sempre ao lado em
todos os momentos, tornando mais fácil essa caminhada,*

*A 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, a razão da minha existência,*

À minha irmã Patrícia, pelo carinho e incentivo.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Orientar significa indicar rumos...

Ao Professor Doutor Paulo Eduardo Pardo, pela orientação para a realização deste trabalho. A quem agradeço de coração os rumos indicados, incentivo, confiança, amizade, apoio e seus ensinamentos fizeram engrandecer meus conhecimentos, contribuindo significativamente na minha profissional.

AGRADECIMENTOS

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

Aos Professores do Curso de Mestrado em Ciência Animal da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE, principalmente ao Prof. Dr. Izidoro Francisco Sartor, Prof. Dr. Marcelo George Mungai Chacur, Profa. Dra. Renata Navarro Cassu, Prof. Dr. Sérgio do Nascimento Kronka que por meio de seus ensinamentos engrandeceu meus conhecimentos científicos.

À Professora Doutora Eunice Oba docente titular do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP – Botucatu, pela atenção e carisma em seus ensinamentos para a dosagem sérica de cortisol dos bovinos por meio da técnica de radioimunoensaio de fase sólida.

Ao Laboratório de Raiva do Instituto Butantan, em especial, a Doutora Neuza Maria Frazatti Gallina e a Mestre Rosana de Lima Paoli pesquisadoras da Seção de Raiva do Instituto Butantan, São Paulo, pela amizade, incentivo e seus ensinamentos na determinação dos títulos de anticorpos anti-rábicos por meio da técnica de soroneutralização em células BHK₂₁ clone 13.

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 Dr. Avelino Albas, Pólo da Alta Sorocabana – APTA Regional, pela amizade, ensinamentos na determinação dos títulos de anticorpos anti-rábcicos e participação na banca de defesa desta dissertação.

Ao Laboratório Arenales Fauna e Flora em especial a Doutora Maria do Carmo pelo apoio e patrocínio desta pesquisa.

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

Ao Edson do Departamento de Audiovisual da Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE pela montagem do datashow para as apresentações dos meus seminários, qualificação e defesa desta dissertação.

A secretária Keid da pós-graduação em Ciência Animal pelos seus atendimentos durante o curso.

A Dra. Jakeline Queiroz Ortega pela formatação do texto as Normas e Padrões para Apresentação de Trabalhos Acadêmicos e Científicos da Unoeste.

"[...] O Senhor fez a terra produzir os medicamentos... deu aos homens a ciência da medicina para ser honrado e glorificado em suas maravilhas [...]"

Ecleseástico 38 (4,6)

RESUMO

Artigo 1: Eficiência da *Matricaria chamomilla* CH₁₂ e do número de doses de vacina anti-rábica na resposta imune humoral em bovinos

Objetivou-se avaliar o efeito da *Matricaria chamomilla* CH₁₂ (Fator Estresse[®]) e do número de doses de vacina na resposta imune humoral em bovinos por meio dos títulos de anticorpos anti-rábicos. Sessenta bovinos foram divididos randomicamente em quatro grupos: os animais dos grupos FEV₁ e FEV₂ receberam *Matricaria chamomilla* CH₁₂ (Fator Estresse[®]) misturados no sal mineral e os bovinos dos grupos V₁ e V₂ receberam somente sal. Nos bovinos dos grupos FEV₂ e V₂ aplicaram-se duas doses de vacina anti-rábica nos dias 0 e 30, respectivamente; enquanto que os bovinos dos grupos FEV₁ e V₁ foram vacinados somente no dia 0. Os resultados obtidos mostram diferença não significativa nos títulos de anticorpos anti-rábicos entre os grupos tratados ou não com *Matricaria chamomilla* CH₁₂ (Fator Estresse[®]); os títulos de anticorpos aumentaram significativamente nos animais que foram imunizados com duas doses de vacina; 93,3% dos animais que receberam uma dose de vacina comercial apresentaram títulos de anticorpos < 0,50 UI/mL sessenta dias após a vacinação. Conclui-se que, a *Matricaria chamomilla* CH₁₂ adicionada ao sal mineral não aumentou a resposta imune humoral em bovinos e é necessário a aplicação de duas doses de vacina para os bovinos obter títulos protetores de anticorpos.

Palavras-Chave: bovino, raiva, *Matricaria chamomilla* CH₁₂, resposta imune.

Artigo 2: *Matricaria chamomilla* CH₁₂ reduz estresse de manejo em bezerros Nelore

Objetivou-se avaliar o efeito da *Matricaria chamomilla* CH₁₂ (Fator Estresse[®]) na prevenção do estresse de manejo em bovinos. Sessenta bezerros Nelore foram divididos randomicamente em dois grupos (30 animais/grupo): um grupo recebeu *Matricaria chamomilla* CH₁₂ adicionado ao sal mineral e o outro grupo somente sal (controle). Ambos os grupos de animais foram mantidos em situação não estressante por 30 dias para ajuste ao novo tratamento e adaptação ao pasto e no 31^o, 38^o, 45^o e 60^o dia do experimento os animais foram submetidos ao estresse. As amostras de sangue foram colhidas nestes após a imobilização dos animais. O estresse foi mensurado por meio do cortisol sérico e no 31^o (1^o dia do manejo) a concentração de cortisol mostraram-se basal. A concentração sérica de cortisol aumentou até atingir um pico no 45^o e depois diminuiu no dia 60^o. No 45^o os animais que foram tratados com *Matricaria chamomilla* CH₁₂ apresentaram redução significativa na concentração sérica de cortisol, mostrando que o produto reduziu o estresse. Esta redução na concentração sérica de cortisol pode ser uma consequência do efeito calmante e ansiolítico da *Matricaria chamomilla* CH₁₂.

Palavras-Chave: bovino, cortisol, manejo, *Matricaria chamomilla*, estresse.

ABSTRACT

Paper 1: Efficiency of *Matricaria chamomilla* CH₁₂ and number of dose of rabies vaccine in the humoral immune response in cattle.

The effect of *Matricaria chamomilla* CH₁₂ (Fator Estresse[®]) and number of doses of rabies vaccines on the humoral immune response in cattle were evaluated through rabies neutralizing antibody titers. Sixty cattle were randomly divided into four groups: animals from FEV₁ and FEV₂ received *Matricaria chamomilla* CH₁₂ (Fator Estresse[®]) mixed with mineral salt, and animals from groups V₁ and V₂ received only mineral salt. Cattle from group FEV₂ and V₂ were immunized with two rabies vaccine doses on days 0 and 30, respectively; cattle from groups FEV₁ and V₁ were vaccinated only once on day 0. The results obtained show that no significant difference was found among neutralizing-antibody titers between groups treated and not treated with *Matricaria chamomilla* CH₁₂; antibody titers were significantly higher in cattle immunized with two rabies vaccine doses; 93.3% of the animals vaccinated only once had antibody titers < 0.5 UI/mL sixty days after commencing vaccination. In conclusion, the use of *Matricaria chamomilla* CH₁₂ added to mineral salt does not change humoral immune response in cattle, and two vaccine doses are suggested for achieving antibody titers in protective level (□ 0.5UI/mL).

Key-Words: cattle, rabies, vaccine, *Matricaria chamomilla* CH₁₂, immune response.

Paper 2: *Matricaria chamomilla* CH₁₂ decreases handling stress in Nelore calves

The effect of *Matricaria chamomilla* CH₁₂ to prevent handling stress in bovines was tested. Sixty Nelore calves were randomly distributed into two groups (30 animals/group): one received feed with mineral salt supplemented with *Matricaria chamomilla* CH₁₂ and the other group without this supplement (control). In both groups the animals were maintained unstressed for 30 days for adjust to the feeding system and adaptation to pasture and then stressed on the 31th, 38th, 45th and 60th days of the experiment. Blood samples were taken on these days after immobilization of the animals. The stress was analyzed in terms of serum cortisol and showed basal values on the 31th day (first day of handling). Serum cortisol increased to highest values on the 45th day and then decreased but not to the levels on the 60th day. At the 45th day this values were significantly lower in the animals fed with *Matricaria chamomilla* CH₁₂, thus suggesting that this product decreased stress. This may be a consequence of inhibition of cortisol production by *Matricaria chamomilla* CH₁₂ as well as its calming and ansiolytic effects.

Key-Words: bovine, cortisol, handling, *Matricaria chamomilla*, stress.

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....	12
2- OBJETIVOS.....	14
3- REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3.1- Raiva.....	15
3.2- Estresse.....	20
4- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
Experimento 1: Eficiência da <i>Matricaria chamomilla</i> CH ₁₂ e do número de doses de vacina anti-rábica na resposta imune humoral em bovinos.....	50
Resumo.....	52
Abstract.....	53
Introdução.....	54
Material e Métodos.....	54
Resultados.....	57
Discussão.....	57
Agradecimentos.....	58
Referências.....	59
Figura 1.....	62
Experimento 2: <i>Matricaria chamomilla</i> CH ₁₂ reduz estresse de manejo em bezerros Nelore.....	63
Resumo.....	65
Abstract.....	66
Introdução.....	67
Material e Métodos.....	67
Resultados.....	69
Discussão.....	70
Agradecimentos.....	71
Referências.....	72
Figura 1.....	77
Anexo A – Paper 1: Efficiency of <i>Matricaria chamomilla</i> CH ₁₂ and number of dose of rabies vaccine in the humoral immune response in cattle.....	78
Anexo B – Paper 2: <i>Matricaria chamomilla</i> CH ₁₂ decreases handling stress in Nelore calves.....	89

1 INTRODUÇÃO

A pecuária, uma das principais atividades agropecuárias no Brasil, está constantemente ameaçada por zoonoses que trazem sérios prejuízos econômicos. Uma das principais zoonoses é a raiva, que tem ampla distribuição geográfica e causa a morte de 30 a 40 mil bovinos por ano. Isso representa prejuízos diretos de 15 milhões de dólares e indiretos de 22,5 milhões de dólares.

A raiva é uma enfermidade infecciosa viral do sistema nervoso central dos mamíferos, uma encefalite fatal e sem tratamento. A vacinação é o método de controle mais efetivo, importante e de menor custo para reduzir a incidência de raiva e outras doenças infecciosas em bovinos. Infelizmente, vários trabalhos publicados no Brasil, Europa e Estados Unidos da América mostram que a primovacinação com vacinas liberadas e comercializadas não conferem imunidade a todos os animais, mesmo que os fabricantes atestem seus valores normais de antigênicos.

A eficiência da vacinação de bovinos pode ser prejudicada por fatores como o estresse. O estresse reduz a resposta imunológica dos animais a microrganismos e a produção de anticorpos após vacinação. Assim, animais estressados ficam mais susceptíveis às doenças infectocontagiosas. O grau de estresse de um animal pode ser determinado pela dosagem do hormônio cortisol que é produzido pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal em resposta ao agente estressor.

As alterações fisiológicas e endócrinas provocada por agentes estressores têm outros efeitos deletérios na produtividade de carne e no bem-estar dos animais. Elas reduzem o crescimento, a engorda, a reprodução e a qualidade da carne. Na Argentina, fatores de estresse são responsáveis pela redução do nascimento de 300 mil bezerros por ano, acarretando perda econômica estimada em 50 milhões de dólares por ano.

O estresse gerado durante o manejo do gado é praticamente inevitável. Há vários estressores intrínsecos ao manejo do gado como instalações desconfortáveis, transporte, confinamento, manejo por pessoas estranhas, contenção ou imobilização, marcação a ferro quente, manejo no curral,

reagrupamento dos animais com mistura de lotes e aumento na agressividade, superpopulação, calor ou frio intenso, castração, descorna e vacinação dos animais e medo. E ainda que todos esses fatores fossem controlados, haveria de se considerar também estressores naturais como hierarquia social entre os animais do lote, gestação, parto, lactação e desmame do bezerro.

O controle do estresse pode ser feito com a aplicação de produtos fitoterápicos ou homeopáticos. Além disso, os produtos homeopáticos não possuem contra-indicação e nem deixam resíduos na carne dos animais destinados para consumo humano. A *Matricaria chamomilla* é um dos produtos utilizados para prevenir e reduzir o estresse. A apigenina, princípio ativo da camomila, diminui a concentração plasmática de cortisol e tem efeito sedativo, analgésico, ansiolítico, antiinflamatório e imunomodulatório.

2 OBJETIVOS

Objetivou-se avaliar a influência da *Matricaria chamomilla* CH₁₂ na concentração sérica de cortisol e na resposta imune humoral de bovinos imunizados com uma ou duas doses da vacina anti-rábica.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Raiva

A raiva é uma enfermidade infecciosa viral do sistema nervoso central dos mamíferos que provoca grave encefalite viral, sem tratamento em praticamente todos os casos, em animais e no homem (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 herbívoros leiteiros e de corte traz prejuízos econômicos diretos em vários países, principalmente na América Latina (ACHA e MALAGA – ALBA, 1998; OLIVEIRA et al., 2000). No Brasil, o número de casos permanece alto (ALMEIDA et al., 1997), sendo bovinos e eqüinos severamente afetados (OLIVEIRA et al., 2000). A raiva bovina é a segunda mais freqüente depois da canina (CENTRO PAN-AMERICANO DE ZONOSSES, 1989) e tem sido a maior preocupação nos países Latino-Americanos (CENTRO PAN-AMERICANO DE ZONOSSES, 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, 1998; 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 que refletem em prejuízos diretos na ordem de 15 milhões de dólares e indiretos de 22,5 milhões de dólares (OLIVEIRA et al., 2000; INSTITUTO PASTEUR, 2000; 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 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; POLACK; MORA, 1987).

A raiva traz também prejuízos para a saúde pública. Hankins e Rosekrans (2004) relatam 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.1998).

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; GARBI; AMASINO, 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 pH<4 e às bases com 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 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, radículas 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 a doenças 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, 2000; 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. 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 de um microorganismo recém descoberto, o *Lyssavirus* de um morcego australiano (McCOLL; SETIEN, 2000).

No Brasil, os morcegos hematófagos (principalmente o *Desmodus rotundus*) participam da cadeia epidemiológica da raiva transmitindo-a aos herbívoros domésticos (PEIXOTO et al., 2000; DELPIETRO; LARGHI; RUSSO, 2001; 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 que se recuperam lentamente devido à sua baixa taxa de reprodução. 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 (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, 2000;

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., 1998, INSTITUTO PASTEUR, 2000).

O *Desmodus rotundus* tem uma característica que é o intenso contato corporal dos indivíduos nas colônias, que se posicionam lado a lado e/ou um sobre os outro, 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 (INSTITUTO PASTEUR, 2000; RODRIGUES da SILVA et al., 2000; PIZA et al., 2002; ALBAS et al., 2006). Os morcegos são capturados e uma pasta com anticoagulante aplicada em seu dorso, após soltos, ao retornarem aos seus agrupamentos, contaminarem e levarem à morte os demais membros da colônia (GOMES et al., 2006). Contudo, esse método não é eficaz uma vez que não é seletivo e pode matar colônias de morcegos não hematófagos (INSTITUTO PASTEUR, 2000; 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 população dos morcegos sem exterminá-los, mas apenas cortando a cadeia de transmissão da raiva (DELPIETRO et al., 2001). A exterminação seletiva com a aplicação da pasta vampiricida é um método seletivo indireto de controle da população de morcegos hematófagos sem agressão de outras espécies.

Dadas as dificuldades para o controle de morcegos, a vacinação é a melhor proteção contra a 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). Inclusive 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 estabelece uma memória em longo prazo contra os antígenos solúveis (MEGID, 2002; TIZARD, 2002).

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 (TIZAR, 1998).

3.2 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; CARROLL; DYER, 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, oxitocina, 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 músculo, 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; GOLD; CHROUSOS, 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, o sistema imunológico e inflamatório (MOBERG, 2000; BORELL, 2001; GUYTON e HALL, 2002; COPPO et al., 2003; CHARMANDARI; TSIGOS; CHROUSOS, 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 várias disciplinas interligadas. 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.

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. Em 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 a falência de órgão e a morte.

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 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), 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; DRENNAN; EARLEY, 2003), dor (BORELL, 2001), contenção ou imobilização do animal (PALMA; SUCHECKI; TUFIK, 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; SUCHECKI; TUFIK, 2000; HALE et al., 2003), manejo no curral (COOK et al., 2000; LENSINK et al., 2000; ANDRADE et al., 2001; HICKEY; DRENNAN; EARLEY, 2003), fusão de lotes, onde a agressividade é aumentada pelo encontro de animais desconhecidos (MINTON, 1994; VEISSIER et al., 2001), superpopulação (MINTON, 1994; COPPO et al., 2003), isolamento (VAN REENEN et al., 2000; EICHER, 2001; GENARO; SCHMIDEK; FRANCI, 2004), calor ou frio intenso (PALMA; SUCHECKI; TUFIK, 2000; BORELL, 2001; GUYTON e HALL, 2002; HALE et al., 2003; WEST, 2003), 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; RASBY; CLEMENS, 2003; HICKEY; DRENNAN; EARLEY, 2003), fome e sede (EICHER, 2001; BORELL, 2001; ARTHINGTON et al., 2003; VÁSQUEZ e HERRERA, 2003), vacinação (MINTON, 1994; NOCKELS; ODDE; CRAIG, 1996), fatores genéticos (ANDRADE et al., 2001; BORELL, 2001) e exercício físico (GARCIA-BELENGUER et al., 1996).

Resposta neuro-endócrina de estresse

A resposta neuroendócrina de 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 noradrenalin (MATTERI; CARROLL; DYER, 2000; AGUILERA; RABADAN-DIEHL; NIKODEMOVA, 2001; CARRASCO e VAN DE KAR, 2003; HICKEY; DRENNAN; EARLY, 2003). A ativação

do eixo HPA ocorre inicialmente com a liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e da vasopressina (AVP) pelo hipotálamo; esses 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; SCHIDEK; FRANCI, 2004; YAGI et al., 2004; CHARMANDARI; TSIGOS; CHROUSOS, 2005). A vasopressina liberada no estado de estresse atua sinergicamente ao CRH, potencializando assim a liberação do ACTH (SERRADEIL-LE GAL et al., 2002; CARRASCO e VAN de KAR, 2003; CHARMANDARI; TSIGOS; CHROUSOS, 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 a limiar da dor (RUSHEN et al., 1999). Também são liberados os hormônios: a prolactina e a ocitocina que reduzem a produção de leite e a descida 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 hipotálamo e 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; TSIGOS; CHROUSOS, 2005), minimizando assim efeitos indesejáveis como processos catabólicos, lipolíticos, anti-reprodutivos e imunossupressores (CHARMANDARI; TSIGOS; CHROUSOS, 2005).

O sistema nervoso autônomo simpático (SNS) também responde rapidamente aos agentes estressores e controla muitas funções do organismo (CHARMANDARI; TSIGOS; CHROUSOS, 2005) pela ativação do eixo simpato-adrenal (O'CONNOR; O'HALLORAN; SHANAHAN, 2000; HALE et al., 2003; HICKEY; DRENNAN; EARLY, 2003). O SNS secreta 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; DRENNAN; EARLY, 2003).

As inervações do SNS que chegam aos órgãos do organismo derivam as 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; TSIGOS; CHROUSOS, 2005).

O sistema parassimpático é antagonista do sistema nervoso simpático (CHARMANDARI; TSIGOS; CHROUSOS, 2005).

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, diminuir outros aminoácidos não essenciais. 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).

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).

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 glucocorticoide imunossupressor inibe a resposta a infecções ou danos nos tecidos (O'CONNOR; O'HALLORAN; SHANAHAN, 2000; HICKEY; DRENNAN; EARLEY, 2003). A atividade imunossupressora é exercida sobre neutrófilos, macrófagos e linfócitos (BLECHA, 2000; TIZARD, 2002).

Segundo Tizard (2002), os corticosteróides são rapidamente absorvidos no interior da célula imunológica, ligam-se a um receptor no citoplasma, são transportados para o núcleo e suprimem a atividade da proteína I κ B. A proteína I κ B, 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 B. Quando estimulam o linfócito, os complexos NF- κ B e I κ B dissociam-se; a proteína I κ B é degradada rapidamente e o NF- κ B ativo fica livre para agir. Pela estimulação da síntese de um excesso de I κ B, 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, 2002).

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, 2002).

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, 2002).

Efeito do estresse sobre o apetite

O estresse reduz o consumo de alimentos nos animais (MATTERI; CARROLL; DYER, 2000; RAHMOUNI e HAYNES, 2001; WEST, 2003; CHARMANDARI; TSIGOS; CHROUSOS, 2005). Afeta o apetite influenciando o centro da saciedade no hipotálamo. O estímulo constante do agente estressor aumenta a secreção do neuropetídeo Y (NPY) que acentua a liberação do hormônio CRH (LIU et al., 1994; CHARMANDARI; TSIGOS; CHROUSOS, 2005). O aumento de CRH na corrente circulatória causa anorexia. Ambos NPY e CRH agem concomitantemente inibindo o sistema nervoso simpático e ativando o sistema nervoso parassimpático, o que facilita a digestão e o armazenamento dos nutrientes (EGAWA; YOSHIMATSU; BRAY, 1991; CHARMANDARI; TSIGOS; CHROUSOS, 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 α -melanócito (α -MSH), que é outro anorexígeno (RAHMOUNI e HAYNES, 2001; CHARMANDARI; TSIGOS; CHROUSOS, 2005). Assim, a redução na ingestão de alimentos está associada à elevada concentração de glucocorticoide plasmático que, por sua vez, aumenta a concentração plasmática de leptina (NEWCOMER et al., 1998; MATTERI; CARROLL; DYER, 2000).

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; SCHMIDEK; FRANCI, 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; SCHMIDEK; FRANCI, 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; TSIGOS; CHROUSOS, 2005), ACTH (DOBSON e SMITH, 2000), glicocorticoides (GENARO; SCHMIDEK; FRANCI, 2004; CHARMANDARI; TSIGOS; CHROUSOS, 2005) e vassopressina (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; TSIGOS; CHROUSOS, 2005). Conseqüentemente, é inibida a secreção dos hormônios da adeno-hipófise: os 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; SCHMIDEK; FRANCI, 2004; CHARMANDARI; TSIGOS; CHROUSOS, 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; SCHMIDEK; FRANCI, 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 17β -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 17β -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; REINERTSEN; HANSEN, 1999; HANSEN et al., 2001).

Efeito do estresse no crescimento e na engorda

O estresse diminui o crescimento e engorda dos animais provavelmente devido à redução do apetite (MATTERI; CARROLL; DYER, 2000; WEST, 2003), da conversão alimentar (GALLI; MONJE; HOFER, 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; TSIGOS; CHROUSOS, 2005). Além disso, o estresse estimula a lipólise, gliconeogênese (MATTERI; CARROLL; DYER, 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; TSIGOS; CHROUSOS, 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 (CHROUSOS et al., 2000; TSIGOS e CHROUSOS, 2002). Essas alterações reduzem o crescimento e a engorda dos animais, podendo até causar o emagrecimento desses porque os tecidos muscular e gorduroso são transformados em glicose (ELSASSER et al., 2000; LENSINK et al., 2000; MATTERI; CARROLL; DYER, 2000).

Com a ativação do eixo HPA, o hipotálamo secreta somatostatina e CRH que suprimem a secreção do GH (TSIGOS e CHROUSOS, 2002;

CHARMANDARI; TSIGOS; CHROUSOS, 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) no núcleo, 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 (GUYTON e HALL, 2002). 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 condrocitos em células osteogênicas, induzindo a deposição de novo osso (GUYTON; 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; HALL, 2002).

A adrenalina estimula a lipólise e a gliconeogênese durante o estado de estresse (MATTERI; CARROLL; DYER, 2000). O cortisol também aumenta a gluconeogênese, aumentando a glicemia, diminui a captação de glicose nas células musculares e reduz a síntese de proteína nas células (BUENO; RASBY; CLEMENS, 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; 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 de 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; CARROLL; DYER, 2000).

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; CARROLL; DYER, 2000). Esse estresse diminui a produção de leite e leva as fêmeas à perda de peso (RUSHEN; DE PASSILLÉ; MUNKSGAARD, 1999; MATTERI; CARROLL; DYER, 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; CARROLL; DYER, 2000; WEST, 2003) e conversão alimentar (GALLI; MONJE; HOFER, 1995; COPPO et al., 2003), aumento de lipólise e gliconeogênese (MATTERI; CARROLL; DYER, 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 é também diminuída (ELSASSER et al., 2000; MATTERI; CARROLL; DYER, 2000). Além disso, há aumento na quantidade de células somáticas (SCC) no leite (VARNER; JOHNSON; BRITT, 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 subsequente bloqueio da descida do leite (ENCARNAÇÃO, 1989).

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, 1983, 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 láctico e assim diminui o pH na carne (PRZYBYLSKI; VERNIN; MONIN, 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).

3.2 *Matricaria chamomilla*

A homeopatia foi desenvolvida pelo Dr. Samuel Hahnemann em 1790, com a introdução de fármacos capazes de simular os sintomas exibidos pelos doentes. Os fármacos homeopáticos consistem no uso de mínimas doses de uma substância (herbal, mineral, animal), a qual é diluída até a ausência de matéria, estando presente apenas à energia. A solução é administrada a fim de estimular a força vital orgânica (BASCON, 2002). Os resultados de tratamentos homeopáticos são controversos, sendo que em alguns estudos os resultados não diferem entre o grupo placebo e os tratados (JAFFE; PATTERSON, 2004).

As plantas e ervas também podem ser utilizadas na terapia complementar ou alternativa à convencional para tratamento de inúmeras doenças (HOLLISTER et al., 1970). De fato, nas últimas décadas houve um interesse crescente no assunto, exacerbando os conhecimentos da fitoterapia por meio de estudos científicos que confirmam resultados empíricos já conhecidos e permitem possíveis esclarecimentos em relação aos mecanismos de ação de ervas (ABEBE, 2002).

Alguns estudos têm demonstrado resultados satisfatórios do uso de camomila *Matricaria chamomilla* (*M. chamomilla*) na resposta ao estresse. Ela tem efeito sedativo (HOLLISTER et al., 1970) e reduz a produção de cortisol (OHNO et al., 2002). Além do efeito sedativo (YAMADA et al., 1996; SALGUEIRO et al., 1997; ZANOLI et al., 2000), o extrato de camomila efeitos hipnótico (YAMADA et al., 1996), ansiolítico (PALADÍNE et al., 1999; ZANOLI et al., 2000), analgésico (YAMADA et al., 1996), espasmolítico, anti-flogístico, anti-microbiano, anti-térmico (VIOLA et al., 1995), anti-inflamatório (AMIRGHOFAN; AZADBAKHT; KARIMI, 2000; ZANOLI et al., 2000; GHARAGOZLOO; GHADERI; GHADERI, 2001), relaxante muscular

(SALGUEIRO et al., 1997) e imunomodulatório (AMIRGHOFRAN; AZADBAKHT; KARIMI, 2000; GHARAGOZLOO; GHADERI; GHADERI, 2001). Além disso, reduz a atividade locomotora (ZANOLI et al., 2000). Segundo Amirghofran; Azadbakht; Karimi (2000), a atividade imunoestimulante não é clara e os efeitos sobre a resposta imune têm sido mostrados pela ação anti-inflamatória. Há atividade significativa da *M. chamomilla* sobre os granulócitos, com vigoroso estímulo alogênico na proliferação de linfócitos e ativação das células T (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 1997).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Celular and Molecular Immunology**. 3. ed. London: W. B. Saunders, 1997. p.32

ABEBE, W. Herbal medication: potential for adverse interactions with analgesic drugs. **Journal of clinical pharmacy and therapeutics**, v.27, n.6, p.391-401, 2002.

ACARO Jr., I. et al. Teores plasmáticos de hormônios, produção e composição do leite em sala de espera climatizada. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.7, n.2, p.350-354, 2003.

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

AGUILAR-SETIÉN, A. et al. Vaccination of vampire bats using recombinant vaccinia-rabies vírus. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 38, n. 3, p.539-544, 2002.

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

AKEMA, T. et al. Acute immobilization stress and intraventricular injection of CRF supress naloxone-induced LH release in ovariectomized estrogen-primed rats. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 8, p. 647-652, 1996.

ALBAS, A. et al. Vacinação anti-rábica em bovinos: comparação de cinco esquemas vacinais. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 2, p.153-159, 2005.

ALBAS, A. et al. Interval between first dose and booster affected antibody production in cattle vaccinated against rabies. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 12, n. 3, p. 476-486, 2006.

ALMEIDA, M. F. et al. Resposta imune humoral de cães à vacina inativada de cérebro de camundongos lactentes utilizada nas campanhas anti-rábicas no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, n. 5, 1997.

ALVES, L. M. et al. Pathogenesis of rabies vírus by ERA and PV strains administered orally in hamsters (*M. auratus*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, n. 1, p. 79-84, 2003.

ANDRADE, O. et al. Some effects of repeated handling and the use of a mask on stress responses in Zebu cattle during restraint. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 71, n. 3, p.175-181, 2001.

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

AMIRGHOFAN, Z.; AZADBAKHT, M.; KARIMI, M. H. Evaluation of the immunomodulatory effects of five herbal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.72, n.1/2, p.167-172, 2000.

ARTHINGTON, J. D. et al. Effect of transportation and commingling on the acute-phase protein response, growth, and feed intake of newly weaned beef calves. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. 1120-1125, 2003.

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.

BADRANE, H. et al. Evidence of two Lyssavirus phylogroups with distinct pathogenicity and immunogenicity. **Journal of Virology**, v. 75, n. 7, p. 3268-3276, 2001.

BASCON, A. **Incorporating herbal medicine into clinical practice**. Philadelphia, PA:FA Davis, 2002.

BIGGERS, B. G. et al. Effect of heat stress on early embryonic development in the beef cow. **Journal of Animal Science**, 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**. 1. ed. New York: CABI Publishing, 2000. p.111-121.

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

BORELL, E. H. The biology of stress and its application to livestock housing and transportation assessment. **Journal of Animal Science**, v.79 (E. Suppl.), p.E260-E267, 2001.

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

BROCHIER, B. et al. 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. **Revue Scientifique et Technique / Office International des Épizooties**, v. 15, n. 3, p. 947-970, 1996.

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

BUENO, A. R.; RASBY, R.; CLEMENS, E. T. Age at weaning and the endocrine response to stress. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n. 1, p.1-7, 2003.

CARAMORI JUNIOR, J. G. et al. 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. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 3, p. 419-420, 2003.

CARRASCO, G. A.; VAN DE KAR, L. D. Neuroendocrine pharmacology of stress. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, p. 235-272, 2003.

CARRIERI, M. L. et al. Diagnóstico laboratorial da raiva dos eqüídeos: dados preliminares. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE RAIVA, 2003, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Brasil, 2003. p.31-32.

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

CENTRO PANAMERICANO DE ZONOSSES. Vigilancia Epidemiol. **Rabia Americ.**, 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. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 2617-2619, 1999.

CHARMANDARI, E.; TSIGOS, C.; CHROUSOS, G. Endocrinology of the stress response. **Annual Review of Physiology**, v. 67, p. 259-284, 2005.

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

CHROUSOS, G. P.; TORPY, D. J.; GOLD, P. W. Interactions between the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system: clinical implications. **Annals of Internal Medicine**, v. 129, p. 229-240, 1998.

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

COOK, C. J. et al. 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**. 1. ed. New York: CABI Publishing, 2000. p.123-146.

COPPO, J. A. et al. Absence of biochemically demonstrable stress in early weaned half-bred zebu calves. **Ciencia e Investigacion Agraria**, v.30, n.2, p.97-105, 2003.

COVENTRY, T. L. et al. Endomorphins and activation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. **Journal of Endocrinology**, v.169, p.185-193, 2001.

DAVID, D. et al. Antemortem detection and virus characterization of three human rabies fatalities in Israel between 1996-1997. **Israel Veterinary Medical Association**, v.54, n.3, 1999.

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

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

DOMINGUES, P. F., LANGONI, H. **Manejo sanitário animal: manejo sanitário de bovinos**. 1 ed. Rio de Janeiro: Publicações Biomédica, 2001.

ECHEVARRIA, J. E. et al. Screening of active lysavirus infection in wild bat populations by viral RNA detection on oropharyngeal swabs. **Journal of Clinical Microbiology**, 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 Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 260, p. R328-334, 1991.

EICHER, S. D. Transportation of cattle in the dairy industry: current research and future directions. **Journal of Dairy Science**, v. 84 (E. suppl.), p. E19-E23, 2001.

ELSASSER, T. H. et al. 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**. 1. ed. New York: CABI Publishing, 2000. p.77-110.

ENCARNAÇÃO, R. O. Estresse e produção animal. I. Crescimento, engorda, qualidade de carne e carcaça. **Ciência e Cultura**, v. 35, n. 6, p. 773-777, 1983.

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

ERIKSEN, H. R. et al. The time dependent dimension in stress responses: relevance for survival and health. **Psychiatry Research**, v. 85, p. 39-50, 1999.

ETESSAMI, R. et al. Spread and pathogenic characteristics of a Gdeficient rabies vírus recombinant: in vitro and in vivo study. **Journal of General Virology**, v. 81, p. 2147-2153, 2000.

FAVI, C. M. et al. 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. **Revista Médica de Chile**, v. 132, n. 1, p. 41-46, 2004.

FAVORETTO, S. R. et al. Antigenic typing of brasilian rabies vírus samples isolated from animals and humans, 1989-2000. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n. 2, p.91-95, 2002.

FERNANDEZ, X. et al. Effect of duration of feed withdrawal and transportation time on muscle characteristics and quality in Friesian-Holstein calves. **Journal of Animal Science**, v. 74, p.1576-1583, 1996.

FOOKS, A. R. et al. European bat lyssaviruses: an emerging zoonosis. **Epidemiology and Infection**, v.131, n. 3, p. 1029-1039, 2003.

FRANKA, R. et al. Quantification of the effectiveness of laboratory diagnostics of rabies using classical and molecular-genetic methods. **Veterinári Medicina**, 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. **Editorial INTA**, Concepción del Uruguay, Argentina, 1995. 33p.

GARCIA-BELENGUER, S. et al. Differences in the biological stress responses of two cattle breeds to walking up to mountain pastures in the Pyrenees. **Veterinary Research**, v.27, p.515-526, 1996.

GENARO, G.; SCHMIDEK, W. R.; FRANCI, C. R. Social condition affects hormone secretion and exploratory behavior in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 37, n. 6, p. 833-840, jun. 2004.

GHARAGOZLOO, E.; GHADERI, M.; GHADERI, A. Immunomodulatory effect of concentrated lime juice extract on activated human mononuclear cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, p. 85-90, 2001.

GIBBONS, R. Cryptogenic rabies, bats, and question of aerosol transmission. **Annals of Emergency Medicine**, v.39, n. 5, p.528-536, 2002.

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. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 1, p. 38-43, 2006.

GRANDIN, T. Assessment of stress during handling and transport. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 249-257, 1997.

GUIGNOT, F. et al. Relationships between post-mortem pH changes and some traits of sensory quality in veal. **Meat Science**, v. 37, p. 315-325, 1994.

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

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. cap. 67: Metabolismo dos carboidratos e formação de trifosfato de adenosina, p.720-728; cap. 71: Balanços dietéticos; regulação da alimentação; obesidade e inação; vitaminas e sais minerais, p.750-728; cap. 75: Os hormônios hipofisários e seu controle pelo hipotálamo. cap.77: Os hormônios adrenocorticais, p.820-826, p.875-880.

HABIB, K. E.; GOLD, P. W.; CHROUSOS, G. P. Neuroendocrinology of stress. **Endocrinology and metabolism clinics of North America**, v. 30, n. 3, p. 695-728, 2001.

HALE, K. D. et al. Cytokine and hormone profiles in mice subjected to handling combined with rectal temperature measurement stress and handling only stress. **Life Sciences**, v.72, p.1495-1508, 2003.

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

HANSEN, P. J. et al. Adverse impact of heart stress on embryo production: causes and strategies for mitigation. **Theriogenology**, v.55, p.91-103, 2001.

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. **Journal of Animal Science**, v.81, p.2847-2855, 2003.

HOLLISTER, L. E. Methodological considerations in evaluating anti-anxiety drugs. **Journal of Clinical Pharmacology and New Drugs Online**, v.10, n.1, p.12-18, 1970.

HOPSTER, H. et al. Effects of repeated jugular puncture on plasma cortisol concentrations in loose-housed dairy cows. **Journal of Animal Science**, v.77, n.3, p.708-714, 1999.

HUGHES, G. J. et al. Evaluation of a taqman PCR assay to detect rabies virus RNA: influence of sequence variation and application to quantification of viral loads. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 299-306, 2004.

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.

INSTITUTO PASTEUR DE SÃO PAULO. **Controle da raiva dos herbívoros**. Desenvolvido pelo Instituto Pasteur de São Paulo, 2000. Disponível em: <http://www.pasteur.saude.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**, 2000. Disponível em: <http://www.pasteur.saude.sp.gov.br/informações/anais/seminario_interna.../resumo-2-2ht>. Acesso em: 11 jun. 2003.

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

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

ITO, N. et al. Rescue of rabies virus from cloned cDNA and identification of the pathogenicity-related gene: glicoprotein gene is associated with virulence for adult mice. **Journal of Virology**, v.75, n.19, p.9121-9128, 2001.

JACKSON, A. C. et al. Management of rabies in humans. **Clinical Infectious Diseases**, v.36, p.60-63, 2003.

JAFFE, S. E.; PATTERSON, D. R. Treating sleep problems in patients with burn injuries: practical considerations. **Journal of Burn Care & Rehabilitation**, v.25, n.3, p.295-303, 2004.

JORDAN, E. R. Effects of heat stress on reproduction. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.E104-E114.

KANKANAMGE, P. J. et al. 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. **Microbiology and Immunology**, 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: Brasil, 2003. p.21-22.

LANGONI, H. et al. Rabies in the big fruit-eating bat *artibeus lituratus* from Botucatu, Southeastern Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.11, n.1, p.84-87, 2005.

LENSINK, B. J. et al. The impact of gentle contacts on case of handling, welfare, and growth of calves and on quality of veal meat. **Journal of Animal Science**, v.78, p.1219-1226, 2000.

LIMA, E. F. et al. Sinais clínicos, distribuição das lesões no sistema nervoso e epidemiologia da raiva em herbívoros na região nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.25, n.4, p.250-254, 2005.

LIU, J. P. et al. 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. **Journal of Clinical Investigation**, v.93, p.1439-1450, 1994.

MALLARD, B. A. et al. Effects of growth hormone, insulin-like growth factor-I, and cortisol on periparturient antibody response profiles of dairy cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 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 anchor type. **Journal of General Virology**, n.83, p.1465-1476, 2002.

MANI, J. et al. Magnetic resonance imaging in rabies. **Postgraduate Medical Journal**, 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 animal stress: basic**

principles and implications for animal welfare. 1. ed. New York: CABI Publishing, 2000. p.43-76.

McCOLL, K.A.; SETIEN, A. Infecciones por Lyssavirus del murciélago. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v.19, n.1, p.177-196, 2000.

McGETTIGAN, J. P. et al. Second-generation rabies virus-based vaccine vectors expressing human immunodeficiency virus type 1 gag have greatly reduced pathogenicity but are highly immunogenic. **Journal of Virology**, v.77, n.1, p.237-244, 2003.

McGUIRE, M. A. et al. 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. **Journal of Animal Science**, v.69, p.2050-2056, 1991.

McMEEKAN, C. A. et al. Effects of shallow scoop and deep scoop dehorning on plasma cortisol concentrations in calves. **New Zealand Veterinary Journal**, v.45, p.69-71, 1997.

McMEEKAN, C. A. et al. Effects of local anaesthesia of 4 or 8 h duration on the acute cortisol response to scoop dehorning in calves. **Australian Veterinary Journal**, 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.

MERCIER, P. L. et al. A novel expression cassette of Lyssavirus shows that the distantly related Mokola virus can rescue a defective rabies virus genome. **Journal of Virology**, v.76, n.4, p.2024-2027, 2002.

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

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**. 1. ed. New York: CABI Publishing, 2000. p.1-21.

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

NDIBUALONJI, B. B. et al. Response of milk yield, plasma cortisol, amino acids, urea and glucosa to a single low-dose administration of adrenocorticotrophic hormona in lactating cows. **Veterinary Research**, v.26, p.32-42, 1995.

NEGRÃO, J. A. et al. Cortisol in saliva and plasma of cattle after ACTH administration and milking. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.1713-1718, 2001.

NEWCOMER, J. W. et al. Dose-dependent cortisol-induced increases in plasma leptin concentrations in healthy humans. **Archives of General Psychiatry**, v.55, n.11, 995-1000, 1998.

NOCKELS, C. F.; ODDE, K. G.; CRAIG, A. M. Vitamin E supplementation and stress affect tissue α -tocopheral content of beef heifers. **Journal of Animal Science**, 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: Brasil, 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. **Quarterly Journal of Medicine**, v.93, p.323-333, 2000.

OHNO, S. et al. Effects of flavonoid phytochemicals on cortisol production and on activities of steroidogenic enzymes in human adrenocortical H295R cells. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v.80, p.355-363, 2002.

OLIVEIRA, A. N. et al. Immune response in cattle vaccinated against rabies. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.95, n.1, p.83-88, 2000.

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

PALADINI, A. C. et al. Flavonoids and the central nervous system: from forgotten factors to potent anxiolytic compounds. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.51, p.519-526, 1999.

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

PASSOS, A. D. C. et al. Epizootia de raiva na área urbana de Ribeirão Preto, SP, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.14, n.4, p.1-7, 1998.

PASSOS, E. C. et al. Isolamento do vírus rábico em morcego insetívoro, *Nyctinomops macrotis*, no município de Diadema, SP (Brasil). **Revista de Saúde Pública**, v.32, n.1, p.74-76, 1998.

PASSOS, E. C. et al. Vírus rábico isolado de morcegos frugívoro (*Artibeus lituratus*), capturado em 1997 no município de Rio Claro, SP. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.36, n.1, 1999.

PEIXOTO, Z. M. P. et al. Rabies laboratory diagnosis: peculiar features of samples from equine origin. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, n.1, p.1-8, 2000.

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

PIZA, A. T. et al. Effect of the contents and form of rabies glycoprotein of hte potency of rabies vaccination in cattle. **Memórias do Instituto 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. **Journal of Muscle Foods**, v.5, p.245-255, 1994.

QUEIROZ DA SILVA, L. H. et al. Comparison between the counter immunoelectrophoresis test and mouse neutralization test for the detection of antibodies against rabies viruses in dog. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, n.2, p.259-261, 2002.

QUEIROZ DA SILVA, L.H. et al. Pesquisa de anticorpos anti-rábicos em bovinos vacinados da região de Araçatuba, SP. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.70, n.4, p.407-413, 2003.

RAHMOUNI, K.; HAYNES, W. G. Leptin signaling pathways in the central nervous system: interactions 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. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária** v.23, n.6, p.246-249, 2001.

RIBAS, M. A. et al. Detección de anticuerpos antirrábicos en personal de riesgo con el empleo de la técnica de neutralización por reducción del número de placas. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v.55, n.2, p.91-95, 2003.

RODRIGUES da SILVA, A. C. et al. Antibody response in cattle after vaccination with inactivated and attenuated rabies vaccines. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.42, n.2, p.95-98, 2000.

RUSHEN, J. et al. Opioid peptides and behavioral and physiological responses of dairy cows to social isolation in unfamiliar surroundings. **Journal of Animal Science**, 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. **Journal of Animal Science**, v.82, p.720-727, 1999.

SALGUEIRO, J. B. et al. Anxiolytic natural and synthetic flavonoid ligands of the central benzodiazepine receptor have no effect on memory tasks in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.58, n.4, p.887-891, 1997.

SAPOLSKY, R.M. Stress hormones: good and bad. **Neurobiology of Disease**, v.7, p.540-542, 2000.

SATO, G. et al. Genetic and phylogenetic analysis of glycoprotein of rabies virus isolated from several species in Brazil. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.66, n.7, p.747-753, 2004.

SCHEFFER, K. C. et al. Vírus da raiva em quirópteros naturalmente infectados no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de 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. et al. European bat Lyssavirus infection in Spanish bat populations. **Emerging Infections Diseases**, v.8, n.4, 2002.

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

SMITH, R. F. et al. Identification of stimulatory and inhibitory inputs to the hypothalamic-pituitary-adrenal axis during hypoglycaemia or transport in ewes. **Journal of Neuroendocrinology**, v.15, p.572-585, 2003.

SOARES, R. M. et al. A heminested polymerase chain reaction for the detection of Brazilian rabies isolates from vampire bats and herbivores. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, n.1, p.109-111, 2002.

SUTHERLAND, M. A. et al. Cortisol responses to dehorning of calves given a 5-h local anaesthetic regimen plus phenylbutazone, ketofen, or adrenocorticotrophic hormone prior to dehorning. **Research Veterinary Science**, v.73, p.115-123, 2002.

TSIGOS, C.; CHROUSOS, G. P. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. **Journal of Psychosomatic Research**, v.53, p.865-871, 2002.

TIZARD, I. **Imunologia Veterinária- uma introdução**. 5. ed. São Paulo: Roca, 1998, p.284.

TIZARD, I. R. O fenômeno da imunidade. In: TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária- uma introdução**. 6. ed. São Paulo: Roca, 2002. Capítulo 1, p.1-8.

TIZARD, I. R. Vacinação e Vacinas. In: TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária- uma introdução**. 6ª ed. São Paulo: Editora Roca, 2002. Capítulo 21, p.271-274.

UMEHARA, O. et al. Rabies vírus neutralizing antibody profile in cattle vaccinated with inactivated vaccine adjuvanted with either aluminum hydroxide alone or combined with avridine. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 69, n.1, p.23-28, 2002.

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

VAN REENEN, C. G. et al. Social isolation may influence responsiveness to infection with bovine herpesvirus 1 in veal calves. **Veterinary Microbiology**, 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. **Journal of Animal Science**, 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. **Ciência Rural**, v.33, n.4, p.743-747, 2003.

VEISSIER, I.; REENEN, C. G.; ANDANSON, S.; LEUSHUIS, I. E. Calves responses to repeated social regrouping and relocation. **Journal of Animal Science**, v.79, p.2580-2593, 2001.

VELASCO-VILLA, A. et al. Antigenic diversity and distribution of rabies virus in Mexico. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 951-958, 2002.

VIOLA, H. et al. Apigenin, a component of *Matricaria recutia* flowers, is a central benzodiazepine receptors-ligand with anxiolytic effects. **Planta Medica**, v.61, p.213-216, 1995.

VOISNET, B. D. et al. Bos indicus-cross feedlot cattle with excitable temperaments have tougher meat and a higher incidence of borderline dark cutters. **Meat Science**, 46, p.367-377, 1997.

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

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

WISE, M. E. et al. Hormonal alterations in the lactating dairy cow in response to thermal stress. **Journal of Dairy Science**, v.71, p.2480-2485, 1988.

WOLFENSON, D. et al. Seasonal and acute heat stress effect on steroid production by dominant follicles in cows. **Animal Reproduction Science**, v.47, p.9-19, 1997.

WRIGHT, A. et al. Molecular characterization of rabies virus isolates from Trinidad. **Veterinary Microbiology**, v.87, p.95-102, 2002.

WU, X. et al. Both viral transcription and replication are reduced when the rabies virus nucleoprotein is not phosphorylated. **Journal of Virology**, v.76, n.9, p.4153-4161, 2002.

YAGI, Y. et al. Transport stress increases somatic cell counts in milk, and enhances the migration capacity of peripheral blood neutrophils of dairy cows. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.66, n.4, p.381-387, 2004.

YAMADA, K. et al. Effect of inhalation of Chamomilla oil vapour on plasma ACTH level in ovariectomized-rat under restriction stress. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.19, p.1244-1246, 1996.

ZANOLI, P.; AVALLONE, R.; BARALDI, M. Behavioral characterisation of the flavonoids apigenin and chrysin. **Fitoterapia**, v.71, p.117-123, 2000.

Experimento 1:

Eficiência da *Matricaria chamomilla* CH₁₂ e do número de doses de vacina anti-rábica na resposta imune humoral em bovinos

Artigo a ser enviado para publicação no Journal of Veterinary Science. Revista da Korean Society of Veterinary Science, College of Veterinary Medicine, Seoul National University.

Eficiência da *Matricaria chamomilla* CH₁₂ e do número de doses de vacina anti-rábica na resposta imune humoral em bovinos

Autores: Luis Souza Lima de Souza Reis¹, Neuza Maria Frazatti-Gallina², Rosana de Lima Paoli², Rogerio Giuffrida³, Avelino Albas⁴, Eunice Oba⁵, Paulo Eduardo Pardo¹

Afiliações: ¹ Departamento de pós-graduação na Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE, Presidente Prudente-SP, Brasil, CEP 19067-175.

² Seção de Raiva do Instituto Butantan, São Paulo-SP, Brasil, CEP 05503-900.

³ Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva 1, Universidade do Oeste Paulista, UNOESTE, Presidente Prudente, SP, CEP 19067-175, Brazil.

⁴ Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil, CEP 19100-000

⁵ Departamento de Reprodução Animal e Radiologia na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho–UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil, CEP 18618-000.

Autor correspondente: Luis Souza Lima de Souza Reis; Rua Osvaldo Cruz, 2027, CEP: 19800-081, Assis, SP, Brasil. Telephone: +55-18-9776.2550; e-mail: reis.lsls@gmail.com.br

Resumo

Objetivou-se avaliar o efeito da *Matricaria chamomilla* CH₁₂ (Fator Estresse[®]) e do número de doses de vacina na resposta imune humoral em bovinos por meio dos títulos de anticorpos anti-rábico. Sessenta bovinos foram divididos randomicamente em quatro grupos: os animais dos grupos FEV1 e FEV2 receberam *Matricaria chamomilla* CH₁₂ (Fator Estresse[®]) misturados no sal mineral e os bovinos dos grupos V1 e V2 receberam somente sal. Nos bovinos dos grupos FEV2 e V2 aplicaram-se duas doses de vacina anti-rábica nos dias 0 e 30, respectivamente; enquanto que os bovinos dos grupos FEV1 e V1 foram vacinados somente no dia 0. Os resultados obtidos mostram diferença não significativa nos títulos de anticorpos anti-rábicos entre os grupos tratados ou não com *Matricaria chamomilla* CH₁₂ (Fator Estresse[®]); os títulos de anticorpos aumentaram significativamente nos animais que foram imunizados com duas doses de vacina; 93,3% dos animais que receberam uma dose de vacina comercial apresentaram títulos de anticorpos < 0,50 UI/ml sessenta dias após a vacinação. Conclui-se que, a *Matricaria chamomilla* CH₁₂ adicionada ao sal mineral não aumentou a resposta imune humoral em bovinos e é necessário a aplicação de duas doses de vacina para os bovinos obter títulos protetores de anticorpos.

Abstract

The effect of *Matricaria chamomilla* CH₁₂ (Fator Estresse[®]) and number of doses of rabies vaccines on the humoral immune response in cattle were evaluated through rabies neutralizing antibody titers. Sixty cattle were randomly divided into four groups: animals from FEV₁ and FEV₂ received *Matricaria chamomilla* CH₁₂ (Fator Estresse[®]) mixed with mineral salt, and animals from groups V₁ and V₂ received only mineral salt. Cattle from group FEV₂ and V₂ were immunized with two rabies vaccine doses on days 0 and 30, respectively; cattle from groups FEV₁ and V₁ were vaccinated only once on day 0. The results obtained show that no significant difference was found among neutralizing-antibody titers between groups treated and not treated with *Matricaria chamomilla* CH₁₂; antibody titers were significantly higher in cattle immunized with two rabies vaccine doses; 93.3% of the animals vaccinated only once had antibody titers < 0.5 UI/ml sixty days after commencing vaccination. In conclusion, the use of *Matricaria chamomilla* CH₁₂ added to mineral salt does not change humoral immune response in cattle, and two vaccine doses are suggested for achieving antibody titers in protective level (\square 0,5UI/ml).

Key words: rabies, cattle, vaccine, *Matricaria chamomilla*, immune response.

Introdução

A raiva é considerada uma das mais importantes zoonoses do mundo por ser uma encefalite fatal, acometer todos os mamíferos e apresentar ampla distribuição geográfica [20,22,5,9,11]. É causada por um vírus da família Rhabdoviridae do gênero *Lyssavirus* [13,21], sendo o morcego hematófago *Desmodus rotundus*, o principal agente transmissor para os herbívoros na América Latina [14,19,17,21].

No Brasil a raiva bovina é endêmica em várias regiões, sendo que nos últimos anos tem sido registrado um número crescente de casos de raiva nos bovinos [19]. Estima-se que entre 30.000 a 40.000 bovinos são mortos anualmente acometidos com raiva, acarretando prejuízos econômicos diretos de 15 milhões e indiretos de 22,5 milhões de dólares [14,17]. Esta perda econômica é decorrente da falta de vacinação adequada dos animais [16]. Resultados de pesquisas realizadas por Ciuchini *et al.*[10]; Albas *et al.*[2]; Lodmel *et al.*[15]; Almeida *et al.*[4] demonstraram que, em alguns animais, não há resposta imune adequada após a administração de apenas uma dose de vacinas usadas comercialmente apesar das mesmas apresentarem, segundo seus fabricantes, valores antigênicos, suficientes para isso. O controle da raiva está baseado em ações profiláticas destinadas a reduzir as populações de reservatórios do vírus rábico, que no Brasil, são os morcegos hematófagos e a vacinação maciça dos animais [14,16,17,18] em regiões consideradas endêmicas ou epidêmicas [18].

Há evidências que a *Matricaria chamomilla* tem efeitos, imunomodulatório [29,6,12] e estímulo alogênico na proliferação de linfócitos e na ativação das células T, entretanto, estes efeitos ainda não são claramente conhecidos [6].

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da *Matricaria chamomilla* CH₁₂ (Fator Estresse[®]) e de duas doses de vacina anti-rábica na resposta imune humoral de bovinos.

Material e Métodos

Sessenta bezerros Nelore (*Bos taurus indicus*), com aproximadamente 12 meses de idade, pertencentes a uma fazenda situada em Lutecia, SP, Brasil, foram estudados. Estes bezerros foram alimentados com *Brachiaria decumbens* em sistema de pastejo extensivo e suplementados com sal mineral comercial de forma

ad libitum.

O experimento foi desenvolvido durante a primavera (Setembro a Outubro de 2003) de clima tropical, caracterizado por uma estação chuvosa de Outubro a Abril e uma estação seca de Maio a Setembro, com precipitação anual média de 1300 mm, umidade relativa do ar de 64%, temperatura média de 25 °C e altitude de 602 m. Os bovinos Nelore são altamente adaptados a estas condições.

***Matricaria chamomilla* CH₁₂**

A *Matricaria chamomilla* CH₁₂ (Fator Estresse[®]; Arenales Fauna & Flora, Brasil) é composto por *Matricaria chamomilla* CH₁₂, leite CH₁₂, 0,75 g *Bixa orellana* em 100 g sucrose.

Administração do Fator Estresse[®]

Os bovinos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos (15 animais/grupo). Os bovinos dos grupos FEV₁ e FEV₂ receberam o *Matricaria chamomilla* CH₁₂ (Fator Estresse[®]) misturada ao sal mineral durante 90 dias; os animais dos grupos V₁ e V₂ receberam somente o sal. Nos primeiros 30 dias, os animais foram mantidos para adaptação à pastagem ajustes e estabelecimento do consumo da *Matricaria chamomilla* CH₁₂ (Fator Estresse[®]) adicionada no sal mineral.

A quantidade desse produto a ser adicionado no sal mineral foi calculada de maneira que cada animal ingerisse cerca de 2 g por dia. A determinação do consumo do Fator Estresse[®]/animal feita no primeiro mês do experimento, foi da seguinte maneira: o sal mineral suplementado com o Fator Estresse[®] era pesado e colocado no cocho e após de 24 horas, retirado e pesado novamente. A diferença entre a primeira pesagem e a segunda, dividida pelo número de animais que utilizaram o cocho foi considerada como consumo médio de sal/bovino durante 24 horas.

Imunização dos animais

Utilizou-se uma vacina comercial anti-rábica líquida, composta de uma suspensão

de vírus rábico fixo PV (Pasteur Vírus), cultivado em cultura de células de BHK₂₁, inativado pela Beta-propiolactona, adsorvido em adjuvante e preservado com timerosal a 1:10.000. A vacina tinha os valores antigênicos dentro dos parâmetros recomendados para uma resposta imunológica eficiente e devidamente aprovada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Todos os animais (grupos FEV₁, FEV₂, V₁ e V₂) foram vacinados no dia 0 e os bovinos dos grupos FEV₂ e V₂ receberam uma segunda dose (reforço) da vacina no dia 30.

Colheita de sangue

As amostras de sangue foram colhidas nos dias 0, 30 e 60. Os bovinos foram levados no período da manhã para o curral, contidos em tronco tipo Brete. Colheu-se 10 ml de sangue de cada animal por meio da punção da veia jugular em tubos à vácuo sem anticoagulante. Após a centrifugação a 2500 rpm por 10 minutos, as amostras de soro foram acondicionadas e armazenadas em freezer a -20 °C para posterior determinação dos títulos de anticorpos neutralizantes anti-rábicos em células BHK₂₁.

Determinação do Título de Anticorpos Neutralizantes Anti-rábicos

Os títulos individuais de anticorpos neutralizantes foram determinados pela técnica de soroneutralização em células BHK₂₁ clone 13. Esse teste é baseado no Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test – RFFIT [25] e no Fluorescent Inhibition Microtest – FIMT [30].

Análise Estatística

Para comparar os títulos de anticorpos anti-rábicos entre os 4 grupos experimentais nos dias 30 e 60 aplicou-se a análise de variância acompanhada pelo teste de Tukey-Kramer. Para comparar os títulos de anticorpos dos animais de cada grupo experimental entre os dias 30 e 60 utilizou-se o teste t de Student pareado. Em todas as análises Em todas as análises, a significância dos dados foi estabelecida a 5% [7].

Resultados

Os soros dos bovinos dos grupos FEV₁, FEV₂, V₁ e V₂ foram não reativos no dia 0. Os títulos médios determinados nos dias 30 e 60 são apresentados na Fig.1. Observa-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos no dia 30. No dia 60, os bovinos dos grupos FEV₂ e V₂ que receberam duas doses de vacina tiveram aumento significativo nos títulos de anticorpos comparado com o dia 30 e com os grupos que receberam apenas uma dose de vacina (FEV₁ e V₁). Também não houve diferença significativa entre os grupos suplementado ou não com *Matricaria chamomilla* CH₁₂ (FEV₁ x V₁; FEV₂ x V₂).

Observou-se que os animais que receberam apenas uma dose de vacina no dia 0, 93,3% dos animais apresentaram títulos de anticorpos inferiores a 0,5 UI/ml 60 dias após a vacinação.

Discussão

A titulação de anticorpos neutralizantes anti-rábicos é freqüentemente utilizada para avaliar a resposta imune humoral após a vacinação anti-rábica em bovinos [23,2,16,19,18] e outros mamíferos, como, cães [24] e morcegos [1], além de ser recomendada pela Centers for Disease Control and Prevention - CDC (Compendium of Animal Rabies prevention and Control 2004).

Os soros de todos os animais utilizados no experimento, colhidos no dia 0, foram não reativos para raiva, indicando que estes animais não haviam tido contato com o vírus rábico ou vacina anti-rábica. Assim, as variações encontradas nas concentrações de anticorpos neutralizantes anti-rábicos nos soros dos animais durante o experimento, foram induzidas pela vacinação anti-rábica administrada no dia 0.

Neste experimento observou-se que a *Matricaria chamomilla* CH₁₂ (Fator Estresse[®]) não estimulou a produção de anticorpos neutralizantes anti-rábicos (Fig.1). Estes resultados sugerem que o efeito imunomodulatório da *Matricaria chamomilla* relatada por Tubaro *et al.*[27], Amirghofram *et al.*[6] e Gharagozloo *et al.*[12] em seres humanos, não se aplica aos bovinos imunizados contra raiva.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) preconiza que é necessário o título de

anticorpos neutralizantes anti-rábicos igual ou superior a 0,5 Unidade Internacional/ml para proteger humanos dos riscos da contaminação com o vírus rábico. Alguns autores defendem a teoria de que este título de anticorpos neutralizantes anti-rábicos é o mínimo protetor para bovinos [23,2,8,19] e cães [4]. Baseando-se nessa afirmação pode-se considerar que, independente do tratamento com a *Matricaria chamomilla* CH₁₂ (Fator Estresse[®]) 30 dias após a primeira vacinação anti-rábica a maioria dos bovinos não estavam protegidos da contaminação pelo vírus da raiva (FEV₁=80%; FEV₂=100%; V₁=100% e V₂=86,67%). Estes resultados corroboram com os obtidos por Sihvonon *et al.*[23], Almeida *et al.*[4], Benišek *et al.*[8], Queiroz da Silva *et al.*[24] onde ficou demonstrado que o uso de apenas uma dose de vacina induz uma resposta imune humoral ineficiente para a proteção contra vírus rábico, pois na resposta primária a quantidade de anticorpos formados é muito pequena [26].

Os bovinos dos grupos FEV₂ e V₂ que tomaram duas doses da vacina anti-rábica nos dias 0 e 30 apresentaram títulos de anticorpos neutralizantes anti-rábicos acima de 0,5 UI/ml, demonstrando que em ambos os grupos 100% dos animais ficaram protegidos. Esses dados confirmam os encontrados por outros pesquisadores em bovinos [23,3,8,16,19,28,18] e cães [4] onde foram observados aumentos significativos na concentração de anticorpos anti-rábicos após a aplicação da 2ª dose de vacina.

Com os resultados encontrados neste estudo, conclui-se, que o uso da *Matricaria chamomilla* CH₁₂ (Fator Estresse[®]) adicionado ao sal mineral não alterou a resposta imune humoral e confirmam que para obtenção de um título de anticorpos anti-rábicos protetor (\geq 0,5UI/ml), são necessárias duas doses de vacina anti-rábica inativada.

Agradecimentos

Esta pesquisa foi patrocinada pelo Laboratório Homeopático Arenales Fauna e Flora Ltda.

Referências

1. **Aguilar-Setien A, Leon YC, Tesoro EC, Kretschmer R, Brochier B, Pastoret PP.** Vaccination of vampire bats using recombinant vaccinia-rabies vírus. *J Wildl Dis* 2002, **38**, 539-544.
2. **Albas A, Alberti H, Alberti ALL, Pardo PE, Giometti J.** Ausência de resposta imune em bovinos vacinados contra a raiva na região de Presidente Prudente, SP, Brasil. *Hora Vet* 1995, **86**, 64-66.
3. **Albas A, Pardo PE, Gomes AAB, Bernardi F, Ito FH.** Effect of a booster-dose of rabies vaccine on the duration of virus neutralizing antibody titers in bovines. *Rev Soc Bras Med Trop* 1998, **31**, 367-371.
4. **Almeida MF, Aguiar EAC, Martorelli LAF, Presotto D, Brandão MM, Pereira OAC.** Resposta imune humoral de cães à vacina inativada de cérebro de camundongos lactentes utilizada nas campanhas anti-rábicas no Brasil. *Rev Saúde Pública* 1997, **31**, 502-507.
5. **Alves LM, Soares RM, Cortez A, Richtzenhain LJ, Ito FH.** Pathogenesis of rabies vírus by ERA and PV strains administered orally in hamsters (*M. auratus*). *Braz J Vet Res Anim Sci* 2003, **40**, 79-84.
6. **Amirghofran Z, Azadbakht M, Karimi MH.** Evaluation of the immunomodulatory effects of five herbal plants. *J Ethnopharmacol* 2000, **72**, 167-172.
7. **Banzatto DA, Kronka SN.** Experimentação agrícola. 3rd ed. pp. 247, FUNEP, Jaboticabal, 1995.
8. **Benišek Z, Süli J, Švrtek Š, Mojžišova J, Takáková D, Zavadová J, Ondrejka R, Ondřejková A.** Experimental inactivated purified concentrated adjuvant rabies vaccine: evaluation of its efficacy in cattle. *Acta Vet Brno* 2000, **69**, 39-44.
9. **Caramori Junior JG, Lubas MAS, Kawatake MS, Sales KG, Guedes JC, Schmitt AC.** 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* 2003, **36**, 419-420.
10. **Ciuchini F, Irsara A, Pestalozza S, Trani L, Antonucci G.** Risposta immunitaria in bovini vaccinati contro la rabia com virus attenuato ceppo ERA. *Riv Zôo Vet* 1981, **9**, 176-184.

11. **Coleman PG, Fevre EM, Cleave Land S.** Estimating the public health impact of rabies. *Emerg Infect Dis* 2004, **10**, 140-142.
12. **Gharagozloo E, Ghaderi M, Ghaderi A.** Immunomodulatory effect of concentrated lime juice extract on activated human mononuclear cells. *J Ethnopharmacol* 2001, **77**, 85-90.
13. **Hankins DG, Rosekrans JA.** Overview, prevention and treatment of rabies. *Mayo Clin Proc* 2004, **79**, 671-676.
14. **Kotait I, Gonçalves CA, Peres NF, Souza MCAM, Targueta MC.** Controle da raiva dos herbívoros, Manual Técnico 1. pp. 1-11, Instituto Pasteur, São Paulo, 1998.
15. **Lodmell DL, Smith JS, Esposito JJ, Ewalt LC.** Cross-protection of mice against a global spectrum of rabies virus variants. *J Virol* 1995, **9**, 4957-4962.
16. **Oliveira NA, Andrade MCR, Silva MV, Moura WC, Contreras EC.** Immune response in cattle vaccinated against rabies. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000, **95**, 83-88.
17. **Piza AT, Pieri KMS, Lusa GM, Caporale GMM, Terreran MT, Macahdo LA, Zanetti CR.** Effect of the contents and form of rabies glycoprotein of the potency of rabies vaccination in cattle. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002, **97**, 265-268.
18. **Queiroz da Silva LH, Cardoso TC, Perri SHV, Pinheiro DM, Carvalho C.** Pesquisa de anticorpos anti-rábicos em bovinos vacinados da região de Araçatuba, SP. *Arq Int Biol* 2003, **70**, 407-413.
19. **Rodrigues da Silva AC, Caporale GMM, Gonçalves CA, Targueta MC, Comin F, Zanetti CR, Kotait I.** Antibody response in cattle after vaccination with inactivated and attenuated rabies vaccines. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2000, **42**, 95-98.
20. **Rupprecht CE, Blass L, Smith K, Orciari LA, Niezgoda M, Whitfield SG, Gibbons RV, Guerra M, Hanlon C.** Human infection due to recombinant vaccinia-rabies glycoprotein virus. *N Engl J Med* 2001, **345**, 582-586.
21. **Sato G, Itou T, Shoji Y, Mikami T, Ito M, Sâmara SI, Carvalho AAB, Nociti DP, Ito FH, Sakai T.** Genetic and phylogenetic analysis of glycoprotein of rabies vírus isolated from several species in Brazil. *J Vet Med Sci* 2004, **66**, 747-753.
22. **Serra-Cobo J, Amengual B, Abellán C, Bourhy H.** European bat Lyssavirus

infection in Spanish bat populations. *Emerg Infect Dis* 2002, **8**, 413-420.

23. **Sihvonen L, Kulonen K, Neuvonen E.** Immunization of cattle against rabies using inactivated cell culture vaccines. *Acta Vet Scand* 1994, **35**, 371-376.

24. **Silva LHQ, Bissoto CE, Carvalho C, Cardoso TC, Pinheiro DM, Perri SHV.** Comparison between the Counter Immunoelectrophoresis test and mouse neutralization test for the detection of antibodies against rabies virus in dog. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002, **97**, 259-261.

25. **Smith JS, Yager PA, Baer GM.** A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determining rabies virus-neutralizing antibody. In: Mestlin FX, Kaplan MM, Koprowski H (eds.). *Laboratory techniques in rabies*. 4th ed. pp. 181-192, World Health Organization, Geneva, 1996.

26. **Tizard IR.** O fenômeno da imunidade. In: Tizard IR (ed). *Imunologia Veterinária*. 6th ed. pp. 1-8, Editora Roca, São Paulo, 2002.

27. **Tubaro A, Zilli C, Redaelli C, Della Loggia R.** Evaluation of anti-inflammatory activity of Chamomile extract topical application. *Planta med* 1984, **50**, 359-363.

28. **Umehara O, De Lucca Neto D, Moro E, Bernardi F, Ito FH, Rodrigues CA.** Rabies virus neutralizing antibody profile in cattle vaccinated with inactivated vaccine adjuvanted with either aluminum hydroxide alone or combined with avidine. *Arq Inst Biol* 2002, **69**, 23-28.

29. **Yamada K, Miura T, Mimaki Y, Sashida Y.** Effect of inhalation of Chamomilla oil vapour on plasma ACTH level in ovariectomized-rat under restriction stress. *Biol Pharm Bull* 1996, **19**, 1244-1246.

30. **Zalan E, Wilson C, Pukitis D.** A microtest for the quantitation of rabies virus neutralizing antibodies. *J Biol Stand* 1979, **7**, 213-220.

Legenda da figura

Fig. 1- Títulos médios de anticorpos neutralizantes anti-rábicos (+dp) de bovinos da raça Nelore nos 30 e 60. Bovinos dos grupos FEV₁ e FEV₂ receberam *Matricaria chamomilla* CH₁₂ (Fator Estresse[®]) adicionado ao sal mineral com um e duas doses de vacina anti-rábica, respectivamente. Bovinos dos grupos V1 e V2 receberam somente sal mineral e uma e duas doses de vacina anti-rábica, respectivamente. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os grupos num mesmo dia. * indica diferença estatística significativa entre os dias (30 e 60) num mesmo grupo.

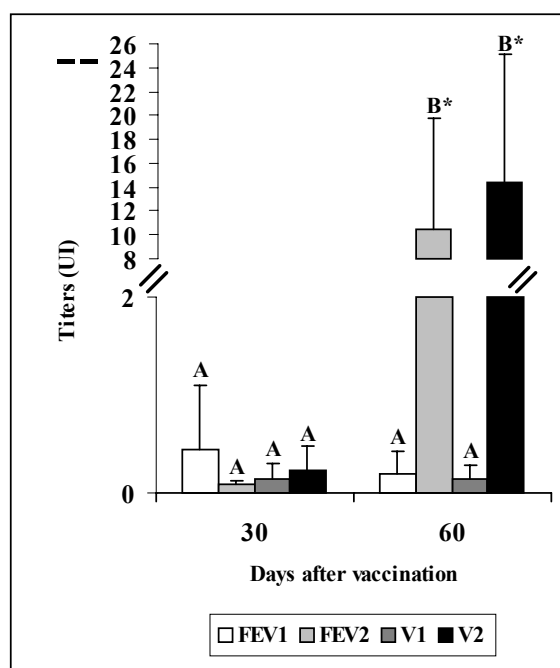


Figura 1

Experimento 2:

***Matricaria chamomilla* CH₁₂ reduz estresse de manejo em bezerros Nelore**

Artigo a ser enviado para publicação no Journal of Veterinary Science. Revista da Korean Society of Veterinary Science, College of Veterinary Medicine, Seoul National University.

***Matricaria chamomilla* CH₁₂ reduz estresse de manejo em bezerros Nelore**

Autores: Luis Souza Lima de Souza Reis^{1*}, Paulo Eduardo Pardo¹, Eunice Oba², Sergio do Nascimento Kronka³, Neuza Maria Frazatti-Gallina⁴

Afiliações: ¹ Departamento de Pós-graduação, Universidade do Oeste Paulista, UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brazil. CEP 19067-175.

² Departamento de Reprodução Animal e Radiologia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Botucatu, SP, Brazil. CEP 19067-175.

³ Departamento de Pós-graduação em Agronomia, Universidade do Oeste Paulista, UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brazil. CEP 19067-175.

⁴ Seção de Raiva, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil. CEP 05503-900.

* **Autor correspondente:** Luis Souza Lima de Souza Reis; Rua Osvaldo Cruz, 2027, CEP: 19800-081, Assis, SP, Brasil. Telephone: +55-18-9776.2550; e-mail: reis.lsls@gmail.com.br

Resumo

Objetivou-se avaliar o efeito da *Matricaria chamomilla* CH₁₂ (Fator Estresse®) na prevenção do estresse de manejo em bovinos. Sessenta bezerros Nelore foram divididos randomicamente em dois grupos (30 animais/grupo): um grupo recebeu *Matricaria chamomilla* CH₁₂ adicionado ao sal mineral e o outro grupo somente sal (controle). Ambos os grupos de animais foram mantidos em situação não estressante por 30 dias para ajuste ao novo tratamento e adaptação ao pasto e no 31°, 38°, 45° e 60° dia do experimento os animais foram submetidos ao estresse. As amostras de sangue foram colhidas nestes após a imobilização dos animais. O estresse foi mensurado por meio do cortisol sérico e no 31° (1° dia do manejo) a concentração de cortisol mostraram-se basal. A concentração sérica de cortisol aumentou até atingir um pico no 45° e depois diminuiu no dia 60°. No 45° os animais que foram tratados com *Matricaria chamomilla* CH₁₂ apresentaram redução significativa na concentração sérica de cortisol, mostrando que o produto reduziu o estresse. Esta redução na concentração sérica de cortisol pode ser uma consequência do efeito calmante e ansiolítico da *Matricaria chamomilla* CH₁₂.

Palavras-Chave: bovino, cortisol, manejo, *Matricaria chamomilla*, estresse.

Abstract

The effect of *Matricaria chamomilla* CH₁₂ to prevent handling stress in bovines was tested. Sixty Nelore calves were randomly distributed into two groups (30 animals/group): one received feed with mineral salt supplemented with *Matricaria chamomilla* CH₁₂ and the other group without this supplement (control). In both groups the animals were maintained unstressed for 30 days for adjust to the feeding system and adaptation to pasture and then stressed on the 31th, 38th, 45th and 60th days of the experiment. Blood samples were taken on these days after immobilization of the animals. The stress was analyzed in terms of serum cortisol and showed basal values on the 31th day (first day of handling). Serum cortisol increased to highest values on the 45th day and then decreased but not to the levels on the 60th day. At the 45th day this values were significantly lower in the animals fed with *Matricaria chamomilla* CH₁₂, thus suggesting that this product decreased stress. This may be a consequence of inhibition of cortisol production by *Matricaria chamomilla* CH₁₂ as well as its calming and anxiolytic effects.

Key words: bovine, cortisol, handling, *Matricaria chamomilla*, stress

Introdução

Resposta neuroendócrina do estresse é regulada pelo eixo hypothalamic-hipófise-adrenal (HPA), com liberação de cortisol [38,26]. Esta resposta é muito importante para o organismo adaptar-se ao meio ambiente hostil [19].

Os agentes estressores dos bovinos podem ser físicos ou psicológicos. Sendo que os mais freqüentes são: a vacinação [30], contenção [19], manejo no curral [37], as instalações [5], medo [28], presença de pessoas estranhas [23], transporte [7], privação de alimentos e água [37], ambiente frio ou calor [5], procedimento cirúrgico [6], superpopulação [7], isolamento [9], confinamento [11] e alterações fisiológicas como parto, lactação e desmame [37].

O efeito do estresse dos bovinos na economia e produção é expressivo. Na Argentina, causa perda econômica de 50 milhões de dólares por ano [7]. Este efeito é maior em sistemas modernos de criação de bovinos, principalmente em sistema intensivo que impõem estresse severo [37] e requer elevados investimentos [11]. Nestas condições, o estresse reduz o crescimento, o ganho de peso, produção de leite e a qualidade da carne dos bovinos [11,10,26,37].

Os produtos fitoterápicos ou homeopáticos, dentre eles a *Matricaria chamomilla*, tem sido utilizada para reduzir o estresse. A apigenina que é princípio ativo da camomila, diminui a concentração plasmática de cortisol [41] e tem efeito sedativo [39], analgésico [3], ansiolítico [39], antiinflamatório [33] e imunomodulatório [1].

Embora o efeito fitoterapêutico da camomila seja bem documentado, seu efeito anti-estresse em bovinos ainda não é bem conhecido. Assim, o presente estudo avaliou um produto à base de camomila, a *Matricaria chamomilla* CH₁₂, para verificar se previne ou reduz a resposta do estresse de manejo em bovinos Nelore.

MATERIAL E MÉTODO

Animais

Sessenta bezerros Nelore (*Bos taurus indicus*), com aproximadamente 12 meses de idade, pertencentes a uma fazenda situada no município de Lutezia, SP, Brasil, foram estudados. Estes bezerros foram alimentados com *Brachiaria decumbens* em

sistema de pastejo extensivo e suplementados com sal mineral comercial de forma *ad libitum*.

O experimento foi desenvolvido durante a primavera (Setembro a Outubro de 2003) de

clima tropical, caracterizado por uma estação chuvosa de Outubro a Abril e uma estação seca de Maio a Setembro, com precipitação anual média de 1300 mm, umidade relativa do ar de 64%, temperatura média de 25 °C e altitude de 602 m. Os bovinos Nelore são altamente adaptados a estas condições.

***Matricaria chamomilla* CH₁₂**

A *Matricaria chamomilla* CH₁₂ (Fator Estresse[®]; Arenales Fauna & Flora, Brasil) é composto por *Matricaria chamomilla* CH₁₂, leite CH₁₂, 0,75 g *Bixa orellana* em 100 g sucrose.

Administração da *Matricaria chamomilla* CH₁₂

Os animais foram distribuídos randomicamente em dois grupos (30 animais/grupo): um recebeu sal mineral suplementado com *Matricaria chamomilla* CH₁₂ e o outro grupo sem este suplemento (controle). Em ambos os grupos os animais foram mantidos não estressados por 30 dias para ajuste do sistema de alimentação e adaptação do pasto e no 31^o, 38^o, 45^o e 60^o dia do experimento os animais foram estressados. Cada animal do grupo que consumiu *Matricaria chamomilla* CH₁₂ ingeriu 2 g do produto por dia. A quantidade consumida do produto pelos animais foi estimada misturando a *Matricaria chamomilla* CH₁₂ no sal mineral e todo dia era calculado o consumo médio individual do sal (a diferença diária entre o peso do sal oferecido e o que sobrava no coxo depois de 24 h era dividido pelo número de animais do grupo).

As amostras de sangue foram colhidas nos dias 31^o, 38^o, 45^o e 60^o após a contenção dos animais. Para isto os bezerros eram levados no curral no período da manhã e os animais eram contidos em tronco de contenção. Depois da imobilização, era colhida a amostra de sangue (10 mL) da veia jugular em tubos à vácuo sem

anticoagulante. Estes tubos foram acondicionados em caixa térmica contendo gelo e depois centrifugado a 2.500 rpm/10 min. As amostras de soro foram armazenadas a -20 °C para posterior determinação do cortisol sérico.

Estressores impostos aos animais

Os agentes estressores impostos aos bovinos foram: manejo no curral, presença de pessoas estranhas durante o manejo, imobilização dos animais em tronco de contenção por 5 minutos e a colheita de sangue.

Determinação do cortisol sérico

A concentração sérica de cortisol foi determinada utilizando-se kit comercial de radioimuniensaio em fase sólida (DPC-Diagnostic Products Corporation, USA) e contados em contador Auto-Gamma Count Cobra II (Packard Bio Sciences Company, USA).

Análise estatística

Os dados foram normalizados por $[(x + 0.5)^{1/2}]$ e o efeito significativo foi detectado por ANOVA para medidas repetidas e comparado pelo teste de Tukey. A probabilidade de erro utilizada foi de 5% [4].

Resultados

Ambos grupos de animais a concentração sérica de cortisol aumentou até atingir o valor máximo no 45° dia; então, a partir daí a concentração de cortisol reduziu, chegando próximo dos valores basais no 60° dia (Fig. 1). O aumento na concentração sérica de cortisol (45° dia) ocorreu em ambos grupos, mas reduziu significativamente nos animais tratados com o *Matricaria chamomilla* CH₁₂ (ANOVA, $F = 8,54$; $p < 0,01$).

Discussão

O manejo imposto aos bovinos no curral é um agente estressor, elevando a concentração sérica de cortisol. O manejo imposto aos bezerros no curral é um agente estressor, elevando a concentração sérica de cortisol. A concentração sérica de cortisol foi reduzida próximo da concentração basal após a adaptação dos animais aos agentes estressores. O estresse dos bovinos foi atenuado pelo produto homeopático administrado a base de camomila, *Matricaria chamomilla* CH₁₂, possivelmente porque a camomila reduziu a concentração do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) além de possuir efeito sedativo, ansiolítico e propriedades miorelaxante.

No 31° dia do experimento, após o ajuste ao sistema de tratamento, a concentração sérica de cortisol 3,16 µg/dl nos bezerros tratados com *Matricaria chamomilla* CH₁₂ e 3,68 µg/dl nos animais do grupo controle. Estes valores estão próximos da concentração basal de cortisol para bovinos Zebu, 3.29 µg/dl, conforme descrito por Aragón et al. [2] and Vásquez and Herreira [37].

Neste experimento, vários fatores causaram o aumento na concentração sérica de cortisol. De fato, o manejo é o maior agente estressor para os animais de fazenda, além de diminuir o bem-estar [5,9,21,28]. A condução dos bovinos para o curral é um exercício forçado [12,22,34], e a contenção no tronco tipo 'Brete' também é um agente estressor [19,35]. Além disso, a colheita de sangue [28] e a presença de pessoas estranhas durante o manejo no curral [9,16,17,23] é uma estressor adicional. O manejo no curral, lugar novo para os animais [20,29,38], os gritos e as agressões das pessoas [16,32], e o medo gerado por estas condições nos animais [5,14,28] também são agentes estressores que estavam presentes neste experimento.

A resposta neuroendócrina do estresse consiste na ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), resultando na secreção do hormônio cortisol pelas glândulas adrenais [8,26,38]. Isto possivelmente ocorreu nos resultados obtidos do 38° dia até o final do experimento nos animais dos grupos controle e do tratado com *Matricaria chamomilla* CH₁₂. Apesar de não haver diferença estatística, a concentração sérica de cortisol estava maior do que a concentração basal descrita por Aragón et al. [2] and Vásquez and Herreira [37], assim os bezerros estavam estressados.

No 45° dia, os animais do grupo controle mostrou que a concentração sérica de cortisol estava 38,4% mais elevada do que os bovinos do grupo tratado com camomila. Estes resultados corroboram com Ohno et al. [31], que relatam que *Matricaria chamomilla* diminuiu a produção de cortisol em 47,5% nas células adrenocorticais H295R em seres humanos. Em outros animais, a apiginina, um flavonoide contido na *Matricaria chamomilla* [25,33,40,42] sabe-se que esta substância também atua no sistema nervoso por diversos mecanismos complexos e que ainda não está totalmente esclarecido [27,13].

No 60° dia do experimento, a concentração sérica de cortisol reduziu em ambos os grupos experimentais, a valores próximos da concentração basal. Esta redução do cortisol, ocorreu possivelmente devido a adaptação dos animais ao manejo imposto [18,28,36]. A adaptação aos agentes estressores são causadas por mudanças no sistema nervoso central em diferentes níveis: efeito sobre o hipotálamo e função da hipófise; sobre os neurotransmissores; sobre o sistema límbico (principalmente na amígdala e hipocampo) e sobre o eixo HPA [6], diminuindo a resposta deste eixo aos agentes estressores [19]. A capacidade de adaptação dos bovinos aos agentes estressores difere entre eles devido a genética [15,19] e temperamento de forma que animais mais dóceis adaptam-se mais facilmente [15].

Os resultados obtidos neste estudo mostram que a *Matricaria chamomilla* CH₁₂ diminuiu o estresse dos bovinos. Os possíveis mecanismos envolvidos na redução na produção de cortisol são os efeitos: calmante e ansiolítico produzidos pela camomila.

Agradecimentos

Esta pesquisa foi patrocinada pelo Laboratório Homeopático Arenales Fauna e Flora Ltda.

Referências

1. **Amirghofran Z, Azadbakht M, Karimi MH.** Evaluation of the immunodulatory effects of five herbal plants. *J Ethnopharmacol* 2000, **72**, 167-172.
2. **Aragón VEF, Graca DS, Norte AL, Santiago GS, Paula OJ.** Suplementação com cromo e desempenho reprodutivo de vacas zebu primíparas mantidas a pasto. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2001, **53**, 624-628.
3. **Avallone R, Zanolli P, Puia G, Kleinschnitz M, Schreier P, Baraldi M.** Pharmacological profile of apigenin, a flavonoid isolated from *Matricaria chamomilla*. *Biochem Pharmacol* 2000, **59**, 1387-1394.
4. **Banzatto DA, Kronka SN.** Experimentação agrícola. 3th ed. pp. 247, FUNEP, Jaboticabal, 1995.
5. **Borell, EH.** The biology of stress and its application to livestock housing and transportation assessment. *J Anim Sci* 2001, **79** (E. Suppl.), E260-E267.
6. **Cook CJ, Mellor, DJ, Harris, PJ, Ingram JR, Matthews, LR.** Hands-on and hands-off measurement of stress. In: Morberg GP, Mench JA (eds.). *The Biology of Animals Stress: Basic Principles And Implications for Animal Welfare*. pp.123-146, CABI Publishing, New York, 2000.
7. **Coppo JA, Mussart NB, Revidatti MA, Capellari A.** Absence of biochemically demonstrable stress in early weaned half-bred zebu calves. *Ciencia e Investigación Agraria*, 2003, **30**, 97-105.
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. **Eicher SD.** Transportation of cattle in the dairy industry: current research and future directions. *J Anim Sci* 2001, **84** (E. suppl.), E19-E23.
10. **Elsasser TH, Klasing, KC, Filipov N, Thompson F.** The metabolic consequences of stress: targets for stress and proprieties of nutrient use. In: Morberg GP, Mench JA (eds.). *The Biology of Animals Stress: Basic Principles And Implications for Animal Welfare*. pp.77-110, CABI Publishing, New York, 2000.

11. **Encarnação RO.** Estresse e produção animal. In: Costa MJRP (ed). 1º Ciclo internacional de palestras sobre bioclimatologia animal: pp.111-129, FUNEP, Jaboticabal. 1989.
12. **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* 1996, **27**, 515-526.
13. **Goutman JD, Waxemberg MD, Doñate-Oliver F, Pomato PE, Calvo DJ.** Flavonoid modulation of ionic currents mediated by GABAA and GABAC receptors. *Eur J Neurosci* 2003, **461**, 79-87.
14. **Grandin T.** Evaluación del estrés durante el manejo y transporte. *J Anim Sci* 1997 **75**, 249-257.
15. **Grandin T.** Handling methods and facilities to reduce stress on cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1998, **14**, 325-341.
16. **Hemsworth PH, Coleman GJ, Barnett JL, Borg S.** Relationships between human-animal interactions and productivity of commercial dairy cows. *J Anim Sci* 2000, **78**, 2821-2831.
17. **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.
18. **Hickey MC, 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* 2003, **81**, 2847-2855.
19. **Hopster H, Van Der Werf JTN, Erkens JHF, Blokhuis HJ.** Effects of repeated jugular puncture on plasma cortisol concentrations in loose-housed dairy cows. *J Anim Sci* 1999, **77**, 708-714.
20. **Joca SRL, Padovan CM, Guimarães FS.** Estresse, depressão e hipocampo. *Rev Bras Psiquiatr* 2003, **25**(supl. 2), 46-51.
21. **Knowles TG, Warriss PD.** Stress physiology during transport. In: Grandin T (ed.). *Livestock Handling and Transport*. 2nd ed. pp. 385-407, CAB International, Wallingford, 2000.

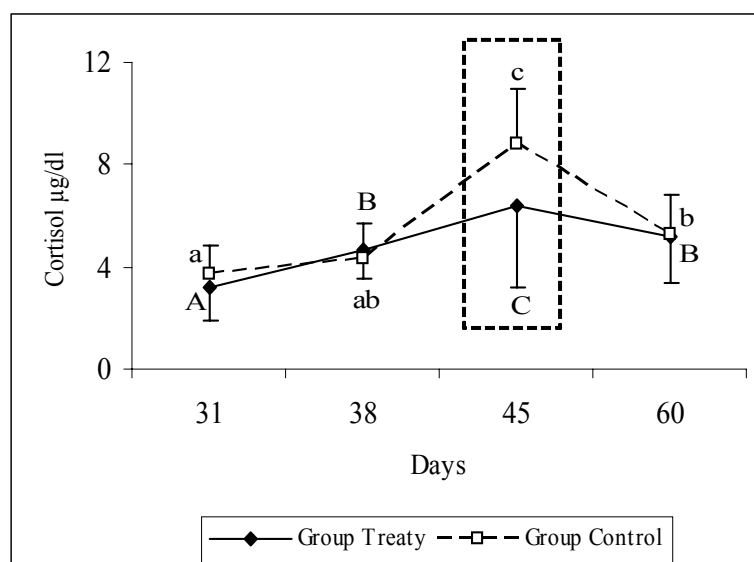
22. **Kurosawa M, Nagata S, Takeda F, Mima K, Hiraga A, Kai M, Taya K.** Plasma catecholamine, adrenocorticotropin and cortisol responses to exhaustive incremental treadmill exercise of the Thoroughbred horse. *J Equi Sci* 1998, **9**, 9-18.
23. **Lensink BJ, Fernandez X, Boivin X, Pradel P, Neindre 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.
24. **Marder M, Paladini AC.** GABA(A)-receptor ligands of flavonoid structure. *Curr Top Med Chem* 2002, **2**, 853-867.
25. **Marder M, Viola H, Wasowski C, Fernández S, Medina JH, Paladini AC.** 6-methylapigenin and hesperidin: new valeriana flavonoids with activity on the CNS. *Pharmacol Biochem Behav* 2003, **75**, 537-545.
26. **Matteri RL, Carroll JA, Dyer CJ.** Neuroendocrine responses to stress. In: Morberg GP, Mench JA (eds). *The Biology of Animals Stress: Basic Principles And Implications for Animal Welfare*. pp. 43-76, CABI Publishing, New York, 2000.
27. **Medina JH, Viola H, Wolfman C, Marder M, Wasowski C, Calvo DJ, Paladini AC.** Neuroactive flavonoids: new ligands for the benzodiazepine receptors. *Phytomedicine* 1998, **5**, 235-243.
28. **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.
29. **Morrow JC, Kolver ES, Verkerk GA, Matthews L.** Fecal glucocorticoid metabolites as a measure of adrenal activity in dairy cattle. *Gen Comp Endocrinol* 2002, **126**, 229-241.
30. **Nockels CF, Odde KG, Craig AM.** Vitamin E supplementation and stress affect tissue α -tocopherol content of beef heifers. *J Anim Sci* 1996, **74**, 672-677.
31. **Ohno S, Shinoda S, Toyoshima S, Nakazawa H, Makino T, Nakajin S.** Effects of flavonoid phytochemicals on cortisol production and on activities of steroidogenic enzymes in human adrenocortical H295R cells. *J Steroid Biochem* 2002, **80**, 355-363.

32. **Pajor EA, Rushen J, Passile AMB.** Aversion learning techniques to evaluative dairy cattle handling practices. *Appl Anim Behav Sci* 2000, **69**, 89-102.
33. **Paladine AC, Marder M, Viola H, Wolfman C, Wasowski C, Medina JH.** Flavonoids and the central nervous system: from forgotten factors to potent anxiolytic compounds. *J Pharm Pharmacol* 1999, **51**, 519-526.
34. **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.
35. **Sánchez JM, Castro MJ, Alonso ME, Gaudioso VR.** Adaptive metabolic responses in females of the fighting breed submitted to different sequences of stress stimuli. *Physiol Behav* 1996, **60**, 1047-1052.
36. **Solano J, Galindo F, Orilueta 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.
37. **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 (Santa Maria)* 2003, **33**, 743-747.
38. **Veissier I, Reenen CG, Andanson S, Leushuis IE.** Adrenocorticotrophic hormone and cortisol in calves after corticotropin-releasing hormone. *J Anim Sci* 1999, **77**, 2047-2053.
39. **Viola HWC, Stein LM, Wolfman C, Silveira R, Dajas F, Medina JH, Çaladini AC.** Apigenin, a component of *Matricaria recutita* flowers, is a central benzodiazepine receptors-ligand with anxiolytic effects. *Planta Med* 1995, **61**, 213-216.
40. **Wasowski C, Marder M, Viola H, Medina JH, Paladini AC.** Isolation and identification of 6-methylapigenin a competitive ligand for the brain GABAA receptors from *Valeriana wallichii*. *Planta Med* 2002, **68**, 934-936.
41. **Yamada K, Miura T, Mimaki Y, Sashida Y.** Effect of inhalation of Chamomilla oil vapour on plasma ACTH level in ovariectomized-rat under restriction stress. *Biol Pharm Bull* 1996, **19**, 1244-1246.

42. **Zanoli P, Avaloni R, Baraldi M.** Behavioral characterisation of the flavonoids apigenin and chrysin. *Fitoterapia* 2000, **71**, S117-S123.

Legenda da figura

Fig. 1. Efeito da *Matricaria chamomilla* CH₁₂ na concentração sérica de cortisol dos bezerros. Médias da concentração de cortisol (\pm desvio padrão) dos grupos controle e tratados (30 animais/grupo). Médias delimitadas pela caixa pontilhada apresentam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$). Médias seguidas de pelo menos uma letra selhante não apresentam diferença estatística entre os dias num mesmo grupo.

**Figura 1**

Anexo A – Paper 1:**Efficiency of *Matricaria chamomilla* CH₁₂ and number of dose of rabies vaccine in the humoral immune response in cattle**

Authors: Luis Souza Lima de Souza Reis¹, Neuza Maria Frazatti-Gallina², Rosana de Lima Paoli², Rogerio Giuffrida³, Avelino Albas⁴, Eunice Oba⁵, Paulo Eduardo Pardo¹

Affiliations: ¹ Departamento de pós-graduação na Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE, Presidente Prudente-SP, Brasil, CEP 19067-175.

² Seção de Raiva do Instituto Butantan, São Paulo-SP, Brasil, CEP 05503-900.

³ Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva 1, Universidade do Oeste Paulista, UNOESTE, Presidente Prudente, SP, CEP 19067-175, Brazil.

⁴ Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil, CEP 19100-000

⁵ Departamento de Reprodução Animal e Radiologia na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho–UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil, CEP 18618-000.

Corresponding author: Luis Souza Lima de Souza Reis; Rua Osvaldo Cruz, 2027, CEP: 19800-081, Assis, SP, Brasil. Telephone: +55-18-9776.2550; e-mail: reis.lsls@gmail.com.br

Abstract

The effect of *Matricaria chamomilla* CH₁₂ (Fator Estresse[®]) and number of doses of rabies vaccines on the humoral immune response in cattle were evaluated through rabies neutralizing antibody titers. Sixty cattle were randomly divided into four groups: animals from FEV₁ and FEV₂ received *Matricaria chamomilla* CH₁₂ (Fator Estresse[®]) mixed with mineral salt, and animals from groups V₁ and V₂ received only mineral salt. Cattle from group FEV₂ and V₂ were immunized with two rabies vaccine doses on days 0 and 30, respectively; cattle from groups FEV₁ and V₁ were vaccinated only once on day 0. The results obtained show that no significant difference was found among neutralizing-antibody titers between groups treated and not treated with *Matricaria chamomilla* CH₁₂; antibody titers were significantly higher in cattle immunized with two rabies vaccine doses; 93.3% of the animals vaccinated only once had antibody titers < 0.5 UI/ml sixty days after commencing vaccination. In conclusion, the use of *Matricaria chamomilla* CH₁₂ added to mineral salt does not change humoral immune response in cattle, and two vaccine doses are suggested for achieving antibody titers in protective level (□ 0,5UI/ml).

Key words: rabies, cattle, vaccine, *Matricaria chamomilla*, immune response.

Introduction

Rabies is one of the most serious zoonoses in the world because it consists of a fatal encephalitis that may be found in mammals, and occurs in a wide geographical range [20,22,5,9,11]. It is caused by virus belonging to the genus *Lyssavirus* the family *Rhabdoviridae* [13,21], and transmitted mainly by the hematophagous bat *Desmodus rotundus* in Latin America [14,19,17,21].

In Brazil, cattle rabies is endemic in many areas and has increased in the last few years [19]. According to estimates, 30,000 to 40,000 cattle die from rabies each year, resulting in 15 and 22.5 million dollars of direct and indirect losses, respectively [14,17]. This economic damage is attributed to inadequate rabies vaccination [16]. Results of the studies carried out by Ciuchini *et al.* [10]; Albas *et al.* [2]; Lodmel *et al.* [15]; and Almeida *et al.* [4] have shown that the adequate immune response is not achieved with one single rabies vaccination in some animals with vaccine producers state that the antigenic levels per vaccine dose are within the normal range. Rabies control is based on preventive measures focused on population control of rabies reservoirs such as the hematophagous bats in Brazil, and massive cattle vaccination [14,16,17,18] in endemic or epidemic areas [18].

There are evidences that *Matricaria chamomilla* extract has immunomodulatory [29,6,12] and allogeneic properties on lymphocyte proliferations and activation of T cells, although further elucidation is needed [6].

The aim of this work was to evaluate the effect of *Matricaria chamomilla* CH₁₂ (Fator Estresse[®]) and number of doses of rabies vaccine on the humoral immune response in cattle.

Materials and Methods

Animals

Sixty Nelore calves (*Bos indicus*), about 12 months old, belonging to a farm situated in Lutezia, SP, Brazil, were studied. These calves were fed on *Brachiaria decumbens* from an extensive pasture system and supplemented with commercial mineral salt in an *ad libitum regime*.

The experiment was carried out during the spring (September to October 2003) in a tropical area, which is characterized by a rainy season from October to April and a dry season from May to September, annual precipitation about 1300 mm, relative humidity approximately 64%, mean temperature 25°C and 602 m altitude. The Nelore cattle are highly adapted to these conditions.

***Matricaria chamomilla* CH₁₂**

The *Matricaria chamomilla* CH₁₂ (Fator Estresse®), was produced by the homeopathic veterinary laboratory Arenales Fauna & Flora, Presidente Prudente, SP, Brazil. This product was composed of *Matricaria chamomilla* CH₁₂, milk CH₁₂, 0.75 g *Bixa orellana* and 100 g sucrose.

Fator Estresse® administration

Cattle were randomly divided into four groups, 15 animals each. Cattle from FEV₁ and FEV₂ groups received *Matricaria chamomilla* CH₁₂ (Fator Estresse®) mixed with mineral salt for 90 days, and animals from groups V₁ and V₂ received only salt. In the first 30 days, cattle were held for adaptation to pasture conditions and determination of the consumption of *Matricaria chamomilla* CH₁₂ (Fator Estresse®) ingested with the salt.

The determination of Fator Estresse® consumption per animal was performed in the first month of the experiment as follows: the mineral salt supplemented with Fator Estresse® was weighed, put in the feeder and, after 24 h, removed to be weighed again. The difference between the first and the second weighing divided by the number of animals which fed at the feeder was considered the average salt consumption per calf in 24h. From the calculation the amount of *Matricaria chamomile* (Fator Estresse®) consumes by each cattle determined as about 2 g a day.

Immunization

We used a commercial liquid rabies vaccine containing a suspension of fixed rabies PV (Pasteur Virus) cultured on BHK-21 cells, inactivated by beta-propiolactone, adsorbed to an adjuvant aluminum hydroxide and preserved with thimerosol at 1:10,000. The vaccine had antigen levels within the range recommended to reach an efficient immunological response, which was approved by the Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA). All the animals (groups FEV₁, FEV₂, V₁ and V₂) were vaccinated on day 0; cattle from groups FEV₂ and V₂ received a second dose on day 30.

Blood sampling

For blood sampling on days 0, 30 and 60, cattle were taken to the corral in the morning and restrained individually in a Brete chute. Blood (10 mL) was collected from the jugular vein in vacuum tubes with no anticoagulant. After the blood samples were clotted and centrifuged 2500 rpm, 10 min, serum samples were stored at -20°C for further determination of rabies-neutralizing antibodies in BHK-21 cells.

Determination of Rabies-Neutralizing Antibodies

The neutralizing antibodies were determined by serum neutralization in BHK-21 clone 13 cells. This test is based on the Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT) [25] and the Fluorescent Inhibition Microtest (FIMT RFFIT) [30].

Statistical Analyses

Analysis of variance followed by Tukey-Kramer method was used to compare serum titers among the 4 groups on days 30 and 60. To compare, within each group (groups FEV₁, FEV₂, V₁ and V₂), serum titers between days 30 and 60, Student t-test for paired samples was used. For all the analyses significance level was set at 5% [7].

Results

Serum of cattle from FEV₁, FEV₂, V₁ and V₂ groups was not reactive for rabies on day 0. The titers determined on days 30 and 60 are shown in Fig. 1. No difference was observed among the treatments on day 30. On day 60, the cattle from groups FEV₂ and V₂ that received two vaccine doses had higher rabies-neutralizing antibody titers compared to those on day 30 and to the groups vaccinated only once. No significant difference was found between cattle that received *Matricaria chamomilla* CH₁₂ (Fator Estresse[®]) and the respective treatment without supplementation (FEV₁ x V₁; FEV₂ x V₂).

A descriptive analysis shows that 93.3% of the cattle that received only one vaccine dose (FEV₁ and V₁) had antibody titers under 0.5 UI/ml.

Discussion

Rabies neutralizing antibody titers typically are used to evaluate humoral immune response in cattle after rabies vaccination [23,2,16,19,18] and other mammals such as dogs [24] and bats [1]. Moreover, it is recommended by the Centers for Disease Control and Prevention – CDC.

The first serum samples collected from all cattle tested on day 0 were not reactive for rabies, indicating that these animals had no prior contact with rabies virus or vaccine. Thus, all antibody titers found here were induced by the rabies vaccination during the study.

In this study *Matricaria chamomilla* CH₁₂ (Fator Estresse[®]) did not stimulate the production of rabies neutralizing antibodies (Fig. 1). This result suggests that the immunomodulatory effect of *Matricaria chamomilla*, found by Tubaro *et al.* [27], Amirghofram *et al.* [6] and Gharagozloo *et al.* [12] in human, does not occur in cattle for rabies immunization.

The World Health Organization (WHO) recommends rabies-neutralizing antibody titers of at least 0.5 IU/ml for effective prevention in humans against rabies virus contamination. Some studies defend that this neutralizing antibody titer is the minimal level required to protect cattle [23,2,8,19] and dogs [4] against rabies. However, most

of cattle were not titers protective against rabies 30 days after vaccination ($FEV_1=80\%$; $FEV_2=100\%$; $V_1=100\%$ and $V_2= 86.67\%$), independently of the treatment with *Matricaria chamomilla* CH₁₂ (Fator Estresse[®]). This agrees with the results found by Sihvonen *et al.* [23], Almeida *et al.* [4], Benišek *et al.* [8] and Queiroz da Silva *et al.* [24], who show that the humoral response induced by a single rabies vaccination is inefficient in protecting cattle against rabies virus because the antibodies are not produced in high quantities [26].

All the cattle from groups FEV_2 and V_2 , which were injected with rabies vaccine on days 0 and 30, had rabies-neutralizing antibody titers above 0.5 UI/ml, i.e., 100% of the cattle were immunized against rabies. Indeed, other studies on cattle [23,3,8,16,19,28,18] and dogs [4] show a significant increase in rabies-neutralizing antibodies after the second dose of rabies vaccine inactivated.

The results found in the present study lead to the conclusion that the use of *Matricaria chamomilla* CH₁₂ (Fator Estresse[®]) added to mineral salt does not affect the humoral immune response. In addition, they confirm that two doses of rabies vaccine are required for rabies protection (\square 0.5UI/ml) in cattle.

References

1. **Aguilar-Setien A, Leon YC, Tesoro EC, Kretschmer R, Brochier B, Pastoret PP.** Vaccination of vampire bats using recombinant vaccinia-rabies virus. *J Wildl Dis* 2002, **38**, 539-544.
2. **Albas A, Alberti H, Alberti ALL, Pardo PE, Giometti J.** Ausência de resposta imune em bovinos vacinados contra a raiva na região de Presidente Prudente, SP, Brasil. *Hora Vet* 1995, **86**, 64-66.
3. **Albas A, Pardo PE, Gomes AAB, Bernardi F, Ito FH.** Effect of a booster-dose of rabies vaccine on the duration of virus neutralizing antibody titers in bovines. *Rev Soc Bras Med Trop* 1998, **31**, 367-371.
4. **Almeida MF, Aguiar EAC, Martorelli LAF, Presotto D, Brandão MM, Pereira OAC.** Resposta imune humoral de cães à vacina inativada de cérebro de camundongos lactentes utilizada nas campanhas anti-rábicas no Brasil. *Rev Saúde Pública* 1997, **31**, 502-507.

5. **Alves LM, Soares RM, Cortez A, Richtzenhain LJ, Ito FH.** Pathogenesis of rabies virus by ERA and PV strains administered orally in hamsters (*M. auratus*). *Braz J Vet Res Anim Sci* 2003, **40**, 79-84.
6. **Amirghofran Z, Azadbakht M, Karimi MH.** Evaluation of the immunomodulatory effects of five herbal plants. *J Ethnopharmacol* 2000, **72**, 167-172.
7. **Banzatto DA, Kronka SN.** Experimentação agrícola. 3rd ed. pp. 247, FUNEP, Jaboticabal, 1995.
8. **Benišek Z, Süli J, Švrtek Š, Mojžišova J, Takáková D, Zavadová J, Ondrejka R, Ondřejková A.** Experimental inactivated purified concentrated adjuvant rabies vaccine: evaluation of its efficacy in cattle. *Acta Vet Brno* 2000, **69**, 39-44.
9. **Caramori Junior JG, Lubas MAS, Kawatake MS, Sales KG, Guedes JC, Schmitt AC.** 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* 2003, **36**, 419-420.
10. **Ciuchini F, Irsara A, Pestalozza S, Trani L, Antonucci G.** Risposta immunitaria in bovini vaccinati contro la rabia con virus attenuato ceppo ERA. *Riv Zôo Vet* 1981, **9**, 176-184.
11. **Coleman PG, Fevre EM, Cleave Land S.** Estimating the public health impact of rabies. *Emerg Infect Dis* 2004, **10**, 140-142.
12. **Gharagozloo E, Ghaderi M, Ghaderi A.** Immunomodulatory effect of concentrated lime juice extract on activated human mononuclear cells. *J Ethnopharmacol* 2001, **77**, 85-90.
13. **Hankins DG, Rosekrans JA.** Overview, prevention and treatment of rabies. *Mayo Clin Proc* 2004, **79**, 671-676.
14. **Kotait I, Gonçalves CA, Peres NF, Souza MCAM, Targueta MC.** Controle da raiva dos herbívoros, Manual técnico 1. pp. 1-11, Instituto Pasteur, São Paulo, 1998.
15. **Lodmell DL, Smith JS, Esposito JJ, Ewalt LC.** Cross-protection of mice against a global spectrum of rabies virus variants. *J Virol* 1995, **9**, 4957-4962.
16. **Oliveira NA, Andrade MCR, Silva MV, Moura WC, Contreras EC.** Immune

response in cattle vaccinated against rabies. Mem Inst Oswaldo Cruz 2000, **95**, 83-88.

17. **Piza AT, Pieri KMS, Lusa GM, Caporale GMM, Terreran MT, Macahdo LA, Zanetti CR.** Effect of the contents and form of rabies glycoprotein of the potency of rabies vaccination in cattle. Mem Inst Oswaldo Cruz 2002, **97**, 265-268.

18. **Queiroz da Silva LH, Cardoso TC, Perri SHV, Pinheiro DM, Carvalho C.** Pesquisa de anticorpos anti-rábicos em bovinos vacinados da região de Araçatuba, SP. Arq Int Biol 2003, **70**, 407-413.

19. **Rodrigues da Silva AC, Caporale GMM, Gonçalves CA, Targueta MC, Comin F, Zanetti CR, Kotait I.** Antibody response in cattle after vaccination with inactivated and attenuated rabies vaccines. Rev Inst Med Trop S Paulo 2000, **42**, 95-98.

20. **Rupprecht CE, Blass L, Smith K, Orciari LA, Niezgoda M, Whitfield SG, Gibbons RV, Guerra M, Hanlon C.** Human infection due to recombinant vaccinia-rabies glycoprotein virus. N Engl J Med 2001, **345**, 582-586.

21. **Sato G, Ito T, Shoji Y, Mikami T, Ito M, Sâmara SI, Carvalho AAB, Nociti DP, Ito FH, Sakai T.** Genetic and phylogenetic analysis of glycoprotein of rabies vírus isolated from several species in Brazil. J Vet Med Sci 2004, **66**, 747-753.

22. **Serra-Cobo J, Amengual B, Abellán C, Bourhy H.** European bat Lyssavirus infection in Spanish bat populations. Emerg Infect Dis 2002, **8**, 413-420.

23. **Sihvonen L, Kulonen K, Neuvonen E.** Immunization of cattle against rabies using inactivated cell culture vaccines. Acta Vet Scand 1994, **35**, 371-376.

24. **Silva LHQ, Bissoto CE, Carvalho C, Cardoso TC, Pinheiro DM, Perri SHV.** Comparison between the Counter Immunoelectrophoresis test and mouse neutralization test for the detection of antibodies against rabies virus in dog. Mem Inst Oswaldo Cruz 2002, **97**, 259-261.

25. **Smith JS, Yager PA, Baer GM.** A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determining rabies virus-neutralizing antibody. In: Mestlin FX, Kaplan MM, Koprowski H (eds.). Laboratory techniques in rabies. 4th ed. pp. 181-192, World Health Organization, Geneva, 1996.

26. **Tizard IR.** O fenômeno da imunidade. In: Tizard IR (ed). Imunologia Veterinária. 6th ed. pp. 1-8, Editora Roca, São Paulo, 2002.

27. **Tubaro A, Zilli C, Redaelli C, Della Loggia R.** Evaluation of anti-inflammatory activity of Chamomile extract topical application. *Planta med* 1984, **50**, 359-363.
28. **Umehara O, De Lucca Neto D, Moro E, Bernardi F, Ito FH, Rodrigues CA.** Rabies virus neutralizing antibody profile in cattle vaccinated with inactivated vaccine adjuvanted with either aluminum hydroxide alone or combined with avridine. *Arq Inst Biol* 2002, **69**, 23-28.
29. **Yamada K, Miura T, Mimaki Y, Sashida Y.** Effect of inhalation of Chamomilla oil vapour on plasma ACTH level in ovariectomized-rat under restriction stress. *Biol Pharm Bull* 1996, **19**, 1244-1246.
30. **Zalan E, Wilson C, Pukitis D.** A microtest for the quantitation of rabies virus neutralizing antibodies. *J Biol Stand* 1979, **7**, 213-220.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1- Mean rabies-neutralizing antibody titers (+sd) from Nelore cattle on days 30 and 60. Cattle from groups FEV₁ and FEV₂ received *Matricaria chamomilla* CH₁₂ (Fator Estresse[®]) mixed with the mineral salt and were vaccinated with one and two doses of rabies vaccine, respectively. Cattle from groups V₁ and V₂ had only mineral salt and one and two doses of rabies vaccine, respectively. Different letters indicate significant statistical difference among the groups in a same day. * indicates significant statistical difference between observation days (30 and 60) within each group.

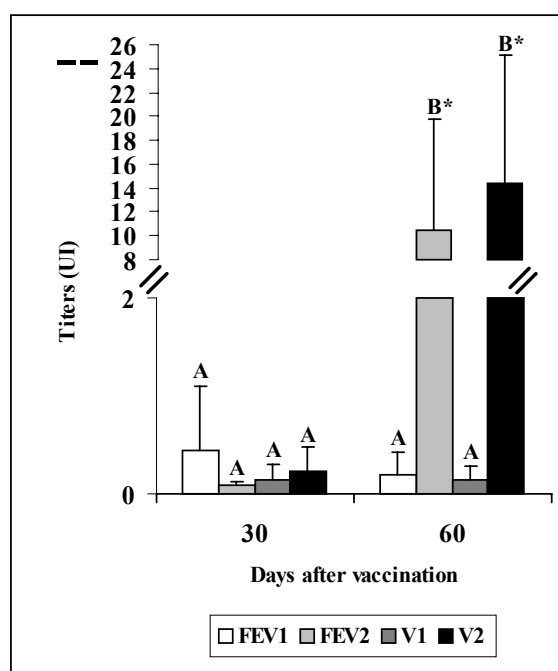


FIGURE 1

Anexo B – Paper 2:***Matricaria chamomilla* CH₁₂ decreases handling stress in Nelore calves**

Luis Souza Lima de Souza Reis¹, Paulo Eduardo Pardo¹, Eunice Oba², Sergio do Nascimento Kronka³, Neuza Maria Frazatti-Gallina⁴

¹Departamento de Pós-graduação, Universidade do Oeste Paulista, UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brazil. CEP 19067-175.

²Departamento de Reprodução Animal e Radiologia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Botucatu, SP, Brazil. CEP 19067-175.

³Departamento de Pós-graduação em Agronomia, Universidade do Oeste Paulista, UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brazil. CEP 19067-175.

⁴Seção de Raiva, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil. CEP 05503-900.

Corresponding author: Luis Souza Lima de Souza Reis; Rua Osvaldo Cruz, 2027, CEP: 19800-081, Assis, SP, Brasil. Telephone: +55-18-9776.2550; e-mail: resi.lsls@gmail.com.br

Abstract

The effect of *Matricaria chamomilla* CH₁₂ to prevent handling stress in bovines was tested. Sixty Nelore calves were randomly distributed into two groups (30 animals/group): one received feed with mineral salt supplemented with *Matricaria chamomilla* CH₁₂ and the other group without this supplement (control). In both groups the animals were maintained unstressed for 30 days for adjust to the feeding system and adaptation to pasture and then stressed on the 31th, 38th, 45th and 60th days of the experiment. Blood samples were taken on these days after immobilization of the animals. The stress was analyzed in terms of serum cortisol and showed basal values on the 31th day (first day of handling). Serum cortisol increased to highest values on the 45th day and then decreased but not to the levels on the 60th day. At the 45th day this values were significantly lower in the animals fed with *Matricaria chamomilla* CH₁₂, thus suggesting that this product decreased stress. This may be a consequence of inhibition of cortisol production by *Matricaria chamomilla* CH₁₂ as well as its calming and anxiolytic effects.

Key words: bovine, cortisol, handling, *Matricaria chamomilla*, stress

Introduction

Neuroendocrine stress responses are regulated by the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA), which promotes plasmatic cortisol release [38,26]. Such a response is very important to the organism in coping with a challenging environment [19].

Bovine stressors may be either physical or psychological. The most referenced stressors are vaccination [30], immobilization [19], handling in the corral [37], the installation [5], fear [28], presence of unfamiliar people [23], transportation [7], food and water deprivation [37], hot or cold environment [5], cirurgical procedures [6], crowding [7], isolation [9], confinement [11] and natural physiological changes (parturition, lactation, weaning) [37].

The effect of stress on both bovine economy and production is remarkable. In Argentina, it accounts for losses estimated at 50 million dollar per year [7]. This effect is increased when bovines are held in modern regimes, mainly intensive systems that impose severe stress [37] and require higher investments [11]. In such conditions, stress impairs cattle growth, weight gains, milk production and meat quality [11,10,26,37].

Phytotherapy or homeopathic products, such as the chamomile, *Matricaria chamomilla*, have been used to decrease stress. Apigenin is the active principle of chamomile, which decreases cortisol plasmatic concentration [41] and provides sedative [39], analgesic [3], anxiolytic [39], anti inflammatory [33] and immunomodulatory effects [1].

Although the phytotherapeutic effects of chamomile are well documented, its anti-stress effect on bovines isn't well known. Thus, the present study evaluated whether the chamomile-based product, *Matricaria chamomilla* CH₁₂, prevents or reduces handling stress response in Nelore bovine.

Materials and Methods

Animals

Sixty Nelore calves (*Bos indicus*), about 12 months old, belonging to a farm

situated in Lutezia, SP, Brazil, were studied. These calves were fed on *Brachiaria decumbens* from an extensive pasture system and supplemented with commercial mineral salt in an ad libitum regime.

The experiment was carried out during the spring (September to October 2003) in a tropical area, which is characterized by a rainy season from October to April and a dry season from May to September, annual precipitation about 1300 mm, relative humidity approximately 64%, mean temperature 25°C and 602 m altitude. The Nelore cattle are highly adapted to these conditions.

***Matricaria chamomilla* CH₁₂**

The *Matricaria chamomilla* CH₁₂ (Fator Estresse[®]; Arenales Fauna & Flora, Brazil) is composed of *Matricaria chamomilla* CH₁₂, milk CH₁₂, 0,75 g Bixa orellana and 100 g sucrose.

***Matricaria chamomilla* CH₁₂ administration**

The animals were randomly distributed into two groups (30 animals/group): one received feed with mineral salt supplemented with *Matricaria chamomilla* CH₁₂ and the other group without this supplement (control). In both groups the animals were maintained unstressed by 30 days for adjust to the feeding system and adaptation to pasture and then stressed on the 31th, 38th, 45th and 60th days of the experiment. Each animal from the *Matricaria chamomilla* CH₁₂ group ingested about 2 g of this product daily. The quantity of this supplement consumed by the animals was estimated by incorporating of *Matricaria chamomilla* CH₁₂ of mineral salt every day and calculating the mean individual salt consumption (daily difference between salt weight offered and amount left after 24h divided by number of animals eating).

Blood samples were taken on days 31th, 38th, 45th and 60th after immobilization of the animals. For it, the animals were led to the corral in the morning days sampling and restraining each animal in a trunk contention. After immobilization, blood samples were taken (10 ml) from the jugular vein and stored in vacuum tubes with no anticoagulant. These tubes were kept in an insulated container with ice and soon

centrifuged (2,500 rpm/10 min). Serum samples were stored at -20 °C for subsequent determination of serum cortisol.

Serum cortisol determination

Serum cortisol was determined by kit commercial solid-phase radioimmunoassay (DPC-Diagnostic Products Corporation, USA) and counted by Auto-Gamma Count Cobra II (Packard Bio Sciences Company, USA).

Statistical Analysis

The data were normalized by $[(x + 0.5)^{1/2}]$ and significant effect was detected by repeated measure ANOVA and compared by Tukey test. The error probability was set at 5% [4].

Results

Animals from both groups increased serum cortisol from the beginning of the experiment until reaching highest values at the 45th day; then, cortisol levels decreased, but not to the basal values at 60th day (Fig. 1). The highest values of cortisol (45th day) occurred in both groups, but it was significantly lower in animals treated with *Matricaria chamomilla* CH₁₂ (ANOVA, $F = 8.54$; $p < 0.01$).

Discussion

The handling procedures imposed on cattle in the holding pen is a stress agent, increasing serum cortisol. The cortisol levels are almost completely reestablished after animals are adjusted to the system. The cattle stress is attenuated by the chamomile-based product *Matricaria chamomilla* CH₁₂, possibly because this product decreases the levels of the adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and has sedative, anxiolytic and miorelaxing properties.

On the 31th experiment day, when the animals were adjusted to the feeding system, the cortisol level was 3.16 µg/dl for animals under *Matricaria chamomilla* CH₁₂ treatment and 3.68 µg/dl for control animals. These values are close to the

basal cortisol level of 3.29 µg/dl found for Zebu cattle by Aragón et al. [2] and Vásquez and Herreira [37].

In this experiment, many factors may have caused cortisol increase. In fact, handling is the main stressor for farm animals and impairs welfare [5,9,21,28]. Leading the cattle to the holding pen is a forced physical exercise [12,22,34], and restraint in a 'Brete' chute is also stressful [19,35]. Moreover, blood sampling [28] and the presence of unfamiliar people during handling [9,16,17,23] impose additional stress. The handling pen, which was a novelty for the animals [20,29,38], human shouts and physical aggression [16,32], and fear caused by the conditions referenced above [5,14,28] were also stressors present in the conditions of this study.

The neuroendocrine stress response consists of the activation of the hypothalamic pituitary axis (HPA), which results in secretion of the cortisol hormone by the adrenal gland [8,26,38]. This is a possible explanation for our results obtained from the 38th day to the end of the experiment in both control group and group treated with *Matricaria chamomilla* CH₁₂. Despite no statistical difference was found, the serum cortisol level was higher than the basal concentration obtained by Aragón et al. [2] and Vásquez and Herreira [37], thus supporting the animals were slight stressed.

On the 45th day, the control animals were stressed and showed cortisol levels 38.4% higher than those of the animals treated with chamomile. This response is in agreement with results reported by Ohno et al. [31], who found that *Matricaria chamomilla* decreases cortisol production by about 47.5% in human adreno-cortical H295R cells. In other mammals, flavonoid apigenin contained in *Matricaria chamomilla* [25,33,40,42] has been shown to act on the nervous system by diverse and complex mechanisms [27,13].

On the 60th day of the experiment, cortisol levels had dropped off in animals from both groups, almost reaching basal values. This cortisol reduction is possibly a consequence of cattle adjustment to handling procedures [18,28,36]. Adjustments to stressors are caused by changes in the central nervous system at different levels: effects on hypothalamus and pituitary function; on neurosteroids and neurotransmitters; on the limbic system (mainly in the amygdala and hippocampus)

and on the hypothalamic pituitary axis (HPA) [6], decreasing the axis response to the stressors [19]. Capacity of bovines to adjust to stress differs among individuals due to both genetic [15,19] and temperament features; docile animals adjust more easily [15].

The results of the present study evidence that *Matricaria chamomilla* CH₁₂ decreased stress in bovine. The possible mechanisms involved are inhibition of cortisol production as well as the calming and anxiolytic effects.

Acknowledgments

This research supported by the Homeopathic Laboratory Arenales Fauna e Flora Ltda.

References

1. **Amirghofran Z, Azadbakht M, Karimi MH.** Evaluation of the immunodulatory effects of five herbal plants. *J Ethnopharmacol* 2000, **72**, 167-172.
2. **Aragón VEF, Graca DS, Norte AL, Santiago GS, Paula OJ.** Suplementação com cromo e desempenho reprodutivo de vacas zebu primíparas mantidas a pasto. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2001, **53**, 624-628.
3. **Avallone R, Zanolli P, Puia G, Kleinschnitz M, Schreier P, Baraldi M.** Pharmacological profile of apigenin, a flavonoid isolated from *Matricaria chamomilla*. *Biochem Pharmacol* 2000, **59**, 1387-1394.
4. **Banzatto DA, Kronka SN.** Experimentação agrícola. 3th ed. pp. 247, FUNEP, Jaboticabal, 1995.
5. **Borell, EH.** The biology of stress and its application to livestock housing and transportation assessment. *J Anim Sci* 2001, **79** (E. Suppl.), E260-E267.
6. **Cook CJ, Mellor, DJ, Harris, PJ, Ingram JR, Matthews, LR.** Hands-on and hands-off measurement of stress. In: Morberg GP, Mench JA (eds.). *The Biology of Animals Stress: Basic Principles And Implications for Animal Welfare*. pp.123-146, CABI Publishing, New York, 2000.

7. **Coppo JA, Mussart NB, Revidatti MA, Capellari A.** Absence of biochemically demonstrable stress in early weaned half-bred zebu calves. *Ciencia e Investigación Agraria*, 2003, **30**, 97-105.
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. **Eicher SD.** Transportation of cattle in the dairy industry: current research and future directions. *J Anim Sci* 2001, **84** (E. suppl.), E19-E23.
10. **Elsasser TH, Klasing, KC, Filipov N, Thompson F.** The metabolic consequences of stress: targets for stress and proprieties of nutrient use. In: Morberg GP, Mench JA (eds.). *The Biology of Animals Stress: Basic Principles And Implications for Animal Welfare*. pp.77-110, CABI Publishing, New York, 2000.
11. **Encarnação RO.** Estresse e produção animal. In: Costa MJRP (ed). 1º Ciclo internacional de palestras sobre bioclimatologia animal: pp.111-129, FUNEP, Jaboticabal. 1989.
12. **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* 1996, **27**, 515-526.
13. **Goutman JD, Waxemberg MD, Doñate-Oliver F, Pomato PE, Calvo DJ.** Flavonoid modulation of ionic currents mediated by GABA_A and GABA_C receptors. *Eur J Neurosci* 2003, **461**, 79-87.
14. **Grandin T.** Evaluación del estrés durante el manejo y transporte. *J Anim Sci* 1997, **75**, 249-257.
15. **Grandin T.** Handling methods and facilities to reduce stress on cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1998, **14**, 325-341.
16. **Hemsworth PH, Coleman GJ, Barnett JL, Borg S.** Relationships between human-animal interactions and productivity of commercial dairy cows. *J Anim Sci* 2000, **78**, 2821-2831.
17. **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.

18. **Hickey MC, 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* 2003, **81**, 2847-2855.
19. **Hopster H, Van Der Werf JTN, Erkens JHF, Blokhuis HJ.** Effects of repeated jugular puncture on plasma cortisol concentrations in loose-housed dairy cows. *J Anim Sci* 1999, **77**, 708-714.
20. **Joca SRL, Padovan CM, Guimarães FS.** Estresse, depressão e hipocampo. *Rev Bras Psiquiatr* 2003, **25**(supl. 2), 46-51.
21. **Knowles TG, Warriss PD.** Stress physiology during transport. In: Grandin T (ed.). *Livestock Handling and Transport*. 2nd ed. pp. 385-407, CAB International, Wallingford, 2000.
22. **Kurosawa M, Nagata S, Takeda F, Mima K, Hiraga A, Kai M, Taya K.** Plasma catecholamine, adrenocorticotropin and cortisol responses to exhaustive incremental treadmill exercise of the Thoroughbred horse. *J Equi Sci* 1998, **9**, 9-18.
23. **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.
24. **Marder M, Paladini AC.** GABA(A)-receptor ligands of flavonoid structure. *Curr Top Med Chem* 2002, **2**, 853-867.
25. **Marder M, Viola H, Wasowski C, Fernández S, Medina JH, Paladini AC.** 6-methylapigenin and hesperidin: new valeriana flavonoids with activity on the CNS. *Pharmacol Biochem Behav* 2003, **75**, 537-545.
26. **Matteri RL, Carroll JA, Dyer CJ.** Neuroendocrine responses to stress. In: Morberg GP, Mench JA (eds). *The Biology of Animals Stress: Basic Principles and Implications for Animal Welfare*. pp. 43-76, CABI Publishing, New York, 2000.
27. **Medina JH, Viola H, Wolfman C, Marder M, Wasowski C, Calvo DJ, Paladini AC.** Neuroactive flavonoids: new ligands for the benzodiazepine receptors. *Phytomedicine* 1998, **5**, 235-243.

28. **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.

29. **Morrow JC, Kolver ES, Verkerk GA, Matthews L.** Fecal glucocorticoid metabolites as a measure of adrenal activity in dairy cattle. *Gen Comp Endocrinol* 2002, **126**, 229-241.

30. **Nockels CF, Odde KG, Craig AM.** Vitamin E supplementation and stress affect tissue α -tocopherol content of beef heifers. *J Anim Sci* 1996, **74**, 672-677.

31. **Ohno S, Shinoda S, Toyoshima S, Nakazawa H, Makino T, Nakajin S.** Effects of flavonoid phytochemicals on cortisol production and on activities of steroidogenic enzymes in human adrenocortical H295R cells. *J Steroid Biochem* 2002, **80**, 355-363.

32. **Pajor EA, Rushen J, Passile AMB.** Aversion learning techniques to evaluate dairy cattle handling practices. *Appl Anim Behav Sci* 2000, **69**, 89-102.

33. **Paladine AC, Marder M, Viola H, Wolfman C, Wasowski C, Medina JH.** Flavonoids and the central nervous system: from forgotten factors to potent anxiolytic compounds. *J Pharm Pharmacol* 1999, **51**, 519-526.

34. **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.

35. **Sánchez JM, Castro MJ, Alonso ME, Gaudioso VR.** Adaptive metabolic responses in females of the fighting breed submitted to different sequences of stress stimuli. *Physiol Behav* 1996, **60**, 1047-1052.

36. **Solano J, Galindo F, Oriluella 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.

37. **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 (Santa Maria)* 2003, **33**, 743-747.

38. **Veissier I, Reenen CG, Andanson S, Leushuis IE.** Adrenocorticotrophic hormone and cortisol in calves after corticotropin-releasing hormone. *J Anim Sci* 1999, **77**, 2047-2053.
39. **Viola HWC, Stein LM, Wolfman C, Silveira R, Dajas F, Medina JH, Çaladini AC.** Apigenin, a component of *Matricaria recutia* flowers, is a central benzodiazepine receptors-ligand with anxiolytic effects. *Planta Med* 1995, **61**, 213-216.
40. **Wasowski C, Marder M, Viola H, Medina JH, Paladini AC.** Isolation and identification of 6-methylapigenin a competitive ligand for the brain GABA_A receptors from *Valeriana wallichii*. *Planta Med* 2002, **68**, 934-936.
41. **Yamada K, Miura T, Mimaki Y, Sashida Y.** Effect of inhalation of *Chamomilla* oil vapour on plasma ACTH level in ovariectomized-rat under restriction stress. *Biol Pharm Bull* 1996, **19**, 1244-1246.
42. **Zanoli P, Avaloni R, Baraldi M.** Behavioral characterisation of the flavonoids apigenin and chrysin. *Fitoterapia* 2000, **71**, S117-S123.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Effect of *Matricaria chamomilla* CH₁₂ in calf serum cortisol. Mean cortisol levels (\pm SD) of treaty and control groups (30 animals/group). The means delimited by dotted box are statistically different from each other ($p < 0.05$). Means with at least one same lower case letter are similar to each other inside the group.

