UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

JOÃO CARLOS BOCHINI

**RELAÇÃO ENTRE OS PADRÕES DE SECREÇÃO CENTRAL E
PERIFÉRICA DE OCITOCINA: IMPLICAÇÕES SOBRE
PRODUÇÃO DE LEITE EM OVELHAS**

SÃO PAULO

2008

JOÃO CARLOS BOCHINI

**Relação entre os padrões de secreção central e periférica de ocitocina:
implicações sobre produção de leite em ovelhas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de Concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. Paulo César Maiorka

Co-orientadores:

Prof. Dr. Luciano Freitas Felício

Profa. Dra. Erica Zimmerknopf

São Paulo

2008

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2014
FMVZ

Bochini, João Carlos

Relação entre os padrões de secreção central e periférica de ocitocina: implicações sobre produção de leite em ovelhas / João Carlos Bochini. – São Paulo : J. C. Bochini, 2008.
99 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, 2008.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.
Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Paulo César Maiorka.

Co-orientadores: Luciano Freitas Felício; Profa. Dra. Erica Zimmerknopf

1. Cateterização. 2. Ejeção de leite. 3. Líquido cefalorraquidiano.
4. Ocitocina. 5. Ordenha I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Relação entre os padrões de secreção central e periférica de ocitocina: implicações sobre produção de leite em ovelhas", protocolado sob o nº909/2006, utilizando 20 (vinte) ovelhas, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Luciano Freitas Felício, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião do dia 17/05/2006.

(We certify that the Research "Relation between central and peripheral oxytocin release implications on milk production in sheep", protocol number 909/2006, utilizing 20 (twenty) sheep, under the responsibility of Prof. Dr. Luciano Freitas Felício, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of the day 05/17/2006).

São Paulo, 18 de maio de 2006

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Vice-Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

CAMPUS 1: Rua General Osório, 433 • Centro • CEP 13.870-000 • Tel: (19) 3634 3300
CAMPUS 2: Av Dr Octávio Silva Bastos, s/nº • Jd Nova São João • Tel: (19) 3634 3200

São João da Boa Vista-SP
www.feob.br

São João da Boa Vista, 12 de abril de 2006.

PARECER DE TRABALHO CIENTÍFICO

Em resposta à solicitação de parecer no projeto de pesquisa **“Relação entre os padrões de secreção central e periférica de ocitocina: implicações sobre a produção de leite em ovelhas”**, a ser realizado pelo aluno João Carlos Bochini nas dependências da Faculdade de Medicina Veterinária do Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos (UNIFEOB) sob orientação do Prof. Dr. Luciano Freitas Felício e co-orientação da Profa. Dra. Erica Zimmerknopf. Assim, os membros reunidos da Comissão de Ética da referida faculdade têm a declarar:

- O trabalho de pesquisa proposto está de acordo com os princípios éticos que regem a Comissão;
- O presente trabalho tem o aval da Comissão para ser realizado imediatamente.

PARECER FAVORÁVEL

Sem mais, subscrevem os membros que constituem a Comissão de Ética da Faculdade de Medicina Veterinária do Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos.

Profa. Dra. Erica Zimmerknopf

Prof. Dr. João Flávio Panattoni Martins

Profa. Dra. Ana Flávia de Carvalho

2006.02

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BOCHINI, João Carlos

Título: Relação entre os padrões de secreção central e periférica de ocitocina:
implicações sobre produção de leite em ovelhas

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Patologia Experimental e
Comparada da Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Mestre
em Ciência

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof (a). Dr (a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof (a). Dr (a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof (a). Dr (a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

DEDICATÓRIA

Aos meus pais,

João Batistia Bochini e Orlanda Prieto Bochini

Com todo amor e carinho, por terem me apoiado nessa jornada acadêmica e por tudo que fizeram por mim em toda minha vida.

Aos meus irmãos,

Maurício César Bochini e Luís Eduardo Bochini

Por sempre estarem comigo, torcendo e me ajudando nos momentos mais difíceis.

A minha noiva,

Tatiana Lonardo

Por ter permanecido ao meu lado, sempre acreditando em mim e no meu futuro.

A minha tia madrinha,

Maria de Lourdes Domingues

Que sempre acreditou nos meus sonhos tornando-os cada vez mais realidade.

Dedico em especial,

Em memória do meu inesquecível irmão *Sérgio Ricardo Bochini*, que mesmo não estando ao meu lado, foi minha fonte de inspiração e alicerce nos momentos de dificuldades.

AMO VOCÊS

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luciano Freitas Felicio, por ter me dado apoio e atenção durante a orientação no mestrado.

Ao Prof. Dr. Paulo César Maiorka, por participar do meu sonho acadêmico em busca de um título de mestre.

Aos residentes do Departamento de Imagens e do Departamento de Patologia do Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos (UNIFEOB), pela excelente contribuição no desenvolvimento dessa dissertação.

Aos residentes do Departamento de Anestesiologia da UNIFEOB, pela extraordinária paciência e ajuda prestada nesse experimento.

Ao Saint Clair, por toda contribuição prestada principalmente a assuntos relacionados à fazenda escola UNIFEOB.

Aos professores Adauto de Carvalho Rosas Filho, Cristiano de Carvalho Baliero, José Ricardo de Carvalho Mesquita, Priscila Carvalho de Oliveira e Rogério Navarro de Abreu pela atenção e contribuição dada neste projeto.

Ao Prof. Dr. João Flávio Panattoni Martins, por me apoiar e sempre confiar em minha capacidade e dedicação.

A todos os funcionários da Faculdade de Medicina Veterinária da UNIFEOB, em especial, agradeço ao Dito, ao Paulo, ao Nei, ao Denílson e ao Glauco, por tudo que fizeram por mim durante o mestrado.

Aos meus amigos Leandro Biazzo, Livia, Jibóia e Seco que hoje fazem parte da minha família.

Aos colegas de trabalho Maurinho, Limeira, Mariana, Clara, Tati, Carol e de maneira geral ao pessoal do laboratório de Fisiologia e Farmacologia e do hospital veterinário da UNIFEOB, que sempre me ajudaram.

Aos professores da Universidade de São Paulo (USP) que ministraram excelentes aulas durante a obtenção de créditos.

A UNIFEOB por colocar a disposição à área experimental e os laboratórios.

Ao Departamento de Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/USP, por ter me acolhido e possibilitado a realização desse mestrado.

A Silvia, secretária Departamento de Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/USP, pelo grande incentivo e colaboração.

De Maneira mais que especial, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização dessa pesquisa.

AGRADEÇO DE FORMA ESPECIAL

A Profa. Dra. Erica Zimmerknopf

Uma profissional exemplar, uma Doutora na vida que contribuiu de maneira brilhante e mais que especial para meu crescimento científico e intelectual e hoje está sendo fundamental para meu futuro profissional.

Ao Prof. Jefferson Douglas Soares Alves

Pelo companheirismo, grande incentivo e estimável colaboração na realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Júlio Carvalho Baliero

Por ter sido sem dúvida, uns dos melhores professores durante minha graduação e pós-graduação e pela notável contribuição na análise estatística desse projeto.

Ao amigo Antônio Carlos Defavari Júnior (Juninho)

Pela amizade, carinho, incentivo, colaboração e convívio diário, compartilhando sucessos e fracassos, alegrias e tristezas sempre ao meu lado. Valeu!

**"Nossa maior fraqueza é a
desistência. O caminho mais
certo para o sucesso é sempre
tentar apenas uma vez mais."**

Thomas A. Edison

RESUMO

Relação entre os padrões de secreção central e periférica de ocitocina: implicações sobre produção de leite em ovelhas

BOCHINI, J. C. **Relação entre os padrões de secreção central e periférica de ocitocina**: implicações sobre produção de leite em ovelhas. [Relation between central and peripheral oxytocin release: implications on milk production in sheep]. 2008. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Esse projeto de pesquisa teve como objetivo estudar simultaneamente as concentrações da ocitocina no líquido cefalorraquidiano (LCR) e no plasma de ovelhas multíparas durante a ordenha, estabelecendo suas possíveis correlações entre os dois compartimentos corporais, bem como em relação à produção e ejeção do leite. Para tanto, foram utilizadas 10 ovelhas multíparas (*Ovis aries*) da raça Santa Inês apresentado peso médio de 40 Kg. Os animais foram divididos em quatro grupos, sendo eles: ordenha mecânica exclusiva (OME; cordeiros apartados 3 dias após o parto), manejo misto com ordenha mecânica (MMom; cordeiros permanecem com as mães durante o período diurno, após a ordenha mecânica, sendo apartados durante a noite), manejo misto com ordenha manual (MMoma) e amamentação exclusiva (AE; cordeiros apartados durante o período noturno). Para a obtenção de LCR foram realizadas a punção do espaço subaracnóideo e implantação de um cateter epidural, enquanto que o plasma foi colhido com o auxílio de um scalp. As amostras de LCR e sangue foram coletadas simultaneamente antes (-0,5 min), durante (0,5; 1 e 4 min) e após (10; 15 min) a amamentação ou ordenha para posterior quantificação das concentrações de ocitocina por ensaio imunoenzimático. Foi obtido um total de 503 amostras, sendo 241 de LCR e 262 de plasma. As estimativas de média, desvio padrão, coeficiente de variação, mínimo e máximo para as concentrações de ocitocina no LCR e plasmáticas foram $257,880 \pm 265,90$ pg/ml; 103,11%; 11,70 pg/ml e 1000,00 pg/ml, respectivamente. A análise estatística não revelou correlação significativa entre LCR e plasma para os quatro grupos experimentais avaliados. O coeficiente de correlação para os grupos OME, AE, MMom e MMoma foram, respectivamente: -0,26, -0,19, 0,05 e 0,04. Com relação ao LCR, não ocorreu diferença significativa entre os 4 grupos experimentais em relação às concentrações de ocitocina. Já para o plasma, os animais do grupo MMom

(679,80 $\pm$ 25,63) e MMoma (591,82 $\pm$ 30,56) apresentaram maiores concentrações plasmáticas médias de ocitocina em relação a OME e AE. Assim também, o grupo OME (381,04 $\pm$ 22,09) apresentou maior concentração média de ocitocina em relação ao grupo AE (218,82 $\pm$ 27,04). Conclui-se que, não existe correlação positiva entre as concentrações de ocitocina central e na circulação periférica durante a ordenha ou amamentação. Os padrões de liberação de ocitocina plasmática diferem de acordo com o tipo de manejo ao qual o animal é submetido, o que pode ter conseqüências para a ejeção do leite e conseqüentemente, para a produção. Finalmente, as concentrações de ocitocina presentes no LCR não sofrem influência do tipo de manejo de ordenha ao qual o animal foi submetido, ao contrário daquilo que foi observado para o plasma.

Palavras-chave: Cateterização. Ejeção de leite. Líquido cefalorraquidiano. Ocitocina. Ordenha.

ABSTRACT

BOCHINI, J. C. **Relation between central and peripheral oxytocin realese:** implications on milk production in sheep. [Relação entre os padrões de secreção central e periférica de ocitocina: implicações sobre produção de leite em ovelhas]. 2008. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

The aim of the present work was to study a possible relationship between central and peripheral oxytocin release and its consequences to milk production during milking in experimental ewes. Ten multiparous Santa Ines ewes (*Ovis aries*) were divided in 4 groups according to milk ejection stimuli: exclusive machine milking (OME), mixed-management of milking and suckling (MMom: lambs separated during night and reunited to their mother after morning milking; MMoma: mixed-management with manual milking) and exclusive suckling (AE: lambs separated also during night). Cerebrospinal fluid (CSF) was collected through a implanted sub-arachnoid catheter and plasma was collected from the jugular vein. Simultaneous sampling was performed at -0.5, 0.5, 1, 4, 10 and 15 min (0 min was teat attachment to either machine or manual milking system or lamb suckling). A total of 241 samples of CSF and 262 plasma samples were processed and oxytocin concentrations were quantified by immunoenzimatic assays. Estimated means, standard deviation, variation coefficient and minimum and maximum values of CSF and plasma oxytocin concentrations were, respectively: 257.880 ± 265.90 pg/ml; 103.11%; 11.70 pg/ml e 1000.00 pg/ml. No statistical strong positive correlations (OME= -0.26, AE= -0.19, MMom= 0.05 and MMoma= 0.04) were found between CSF and plasma samples. Also, CSF was not influenced by milk ejection stimuli, although plasmatic oxytocin was higher in MMom (679.80 ± 25.63) and MMoma (591.82 ± 30.56) compared to OME and AE. In addition, OME (381.04 ± 22.09) plasmatic oxytocin concentration was higher when compared to AE (218.82 ± 27.04). In conclusion, no positive correlations between central and peripheral oxytocin concentrations were observed during milking or suckling. Plasma oxytocin concentrations differ as a function of

management and have consequences to milk ejection as well as to milk production. Also, plasma, but not CSF oxytocin, was influenced by different milk ejection stimuli.

Keywords: Catheterization. Milk Ejection. Cerebrospinal Fluid. Oxytocin. Milking.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Descrição do úbere de uma cabra. Notar em (1) tecido alveolar; (2) abertura de grandes ductos do leite; (3) cisterna da teta; (4) canal da teta; (5) cisterna da glândula.	28
Figura 2 – Diagrama de um grupo de alvéolos na glândula mamária de uma cabra. Notar em (1) capilar; (2) vênula; (3) arteríola; (4) células mioepiteliais; (5) células alveolares; (6) leite; (7) alvéolo; (8) ducto do leite.	29
Figura 3 – Vias somatossensoriais no reflexo induzido pela sucção para liberação de ocitocina.	30
Figura 4 – Pesagem diária dos cordeiros utilizando uma balança digital (Kern CH 15K20) e um suporte para pesagem de cordeiros.	41
Figura 5 – Animal intubado com uma sonda endotraqueal possibilitando a manutenção anestésica inalatória.	43
Figura 6 – Colocação do mandril de um cateter intravenoso (BD Angiocath ® 14G) como auxiliar para realização de punção na articulação atlanto-occipital.	45
Figura 7 – Colocação de um cateter epidural (Portex ® 16G) no espaço subaracnóideo, usando mandril de um cateter intravenoso (BD Angiocath ® 14G) como guia.	46
Figura 8 – Imagem radiográfica da região cervical e crânio. A seta “A” indica o mandril do cateter intravenoso (BD Angiocath ® 14G). A seta “B” indica o cateter epidural (Portex ® 16G) repleto de contraste radiográfico no espaço subaracnóideo.	46
Figura 9 – Bandagem com ataduras e esparadrapo em volta do pescoço, para proteger e alojar o cateter epidural fixado no pescoço do animal.	47
Figura 10 – Após o procedimento cirúrgico, os animais permaneceram em uma baia com alimentos e água por um período de 24 horas.	47
Figura 11 – Colheita simultânea de LCR e sangue utilizando um cateter epidural (Portex® 16G) e um <i>scalp</i> (Solidor® 19G), respectivamente.	50
Figura 12 – Curva de linearidade obtida utilizando-se 9 diluições de ocitocina padrão, quais sejam 1:1000; 1:500; 1:250; 1:125; 1:62,5; 1:31,2; 1:15,6; 1:7,8 e 1:3,9 pg/mL. O eixo “x” representa a concentração de ocitocina (pg/mL) e o eixo “y” representa os valores de absorbância numa escala de 0 a 100. Nessa curva o coeficiente de correlação é de 0,993.	54

Figura 13 – Ordenhadeira (WESTFALIA SURGE® Tipo Balde ao Pé) instalada na da Fazenda Escola da Faculdade de Medicina Veterinária da UNIFEOB.	55
Figura 14 – Balde mamadeira com 5 bicos para cordeiros desmamados precocemente.....	57
Figura 15 – Representação esquemática do período preparatório e experimental dos 4 grupos avaliados (AE, OME, MMom e MMoma).	62
Figura 16 – Peso diário (g) de cordeiros filhos de ovelhas do grupo amamentação exclusiva (AE), do nascimento até o 60º dia de vida. Média de peso $\pm$ desvio padrão.	69
Figura 17 – Peso diário (g) de cordeiros filhos de ovelhas do grupo ordenha mecânica exclusiva (OME), do nascimento até o 60º dia de vida. Média de peso $\pm$ desvio padrão.	70
Figura 18 – Peso diário (g) de cordeiros filhos de ovelhas do grupo manejo misto (MMom), do nascimento até o 60º dia de vida. Média de peso $\pm$ desvio padrão.	71
Figura 19 – Peso diário (g) de cordeiros filhos de ovelhas do grupo manejo misto (MMoma), do nascimento até o 60º dia de vida. Média de peso $\pm$ desvio padrão.	72
Figura 20 – Concentrações de ocitocina (pg/ml) de acordo com o tipo de amostra dentro de cada tratamento avaliado (AE, OME, MMom e MMoma). Média $\pm$ desvio padrão.	76
Figura 21 – Pesos médios (g) dos cordeiros dentro de cada tratamento avaliado (AE, Mmoma, Mmom e OME), ao longo de 60 dias de pesagem, obtidos por meio de um modelo linear de 1º Grau.	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados da quantificação da concentração de ocitocina (pg/mL) de algumas amostras de LCR e plasma das ovelhas do experimento piloto obtidos por ensaio imunoenzimático	44
Tabela 2 - Estatística descritiva dos resultados da quantificação da concentração de ocitocina (pg/mL) das amostras de plasma no momento “baia” e momento “-0,5 min” de alguns animais, obtidos por ensaio imunoenzimático	49
Tabela 3 - Resultados da quantificação da concentração de ocitocina (pg/mL) das amostras de LCR e plasma das ovelhas do experimento 1 (AE) obtidos por ensaio imunoenzimático	64
Tabela 4 - Resultados da quantificação da concentração de ocitocina (pg/mL) das amostras de LCR e plasma das ovelhas do experimento 2 (OME) obtidos por ensaio imunoenzimático	65
Tabela 5 - Resultados da quantificação da concentração de ocitocina (pg/mL) das amostras de LCR e plasma das ovelhas do experimento 3 (MMom) obtidos por ensaio imunoenzimático	67
Tabela 6 - Resultados da quantificação da concentração de ocitocina (pg/ml) das amostras de LCR e plasma das ovelhas do experimento 4 (MMoma) obtidos por ensaio imunoenzimático	68
Tabela 7 - Resumo da análise de variância para as concentrações de ocitocina	73
Tabela 8 - Resumo do desdobramento da Interação TRAT x TA.....	73
Tabela 9 - Resumo do desdobramento da Interação TA x TRAT.....	74
Tabela 10 - Estimativas de médias de quadrados mínimos para as concentrações de ocitocina, de acordo com o tipo de amostra dentro de cada tratamento avaliado	75
Tabela 11 - Resumo da análise de variância para os pesos dos cordeiros.....	77
Tabela 12 - Resumo do desdobramento da Interação TRAT x Dia.....	77
Tabela 13 - Estimativas de β_1 para as equações lineares de 1º Grau, de acordo com o tratamento avaliado	79

SÚMARIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
2.1	Glândula Mamária	27
2.2	Ocitocina	29
2.3	Ações Periféricas da Ocitocina	31
2.4	Ações da Ocitocina no Sistema Nervoso Central	34
2.5	Variações das Concentrações Centrais e Periféricas de Ocitocina	37
3	MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1	Generalidades	40
3.2	Fármacos	41
3.3	Procedimentos Experimentais	42
3.3.1	Protocolo Anestésico para Cateterização do Espaço Subaracnóideo	42
3.3.2	Procedimento para Colheita de LCR	43
3.3.2.1	<i>Experimento piloto</i>	43
3.3.2.2	<i>Procedimento para cateterização do espaço subaracnóideo</i>	44
3.3.3	Obtenção de Sangue Através da Veia Jugular	47
3.3.4	Colheita das Amostras Propriamente Dita	48
3.3.5	Procedimentos para Dosagem de Ocitocina por Ensaio Imunoenzimático	50
3.3.5.1	<i>O Kit de ELISA</i>	51
3.3.5.2	<i>Itens fornecidos no Kit</i>	51
3.3.5.3	<i>Itens necessários, mas não fornecidos</i>	51
3.3.5.4	<i>Preparo dos reagentes</i>	52
3.3.5.5	<i>Preparo da microplaca e leitura</i>	53
3.3.5.6	<i>Validação do método imunoenzimático (curva de linearidade)</i>	54
3.3.6	Padronização das Amamentações e Ordenhas Experimentais	54
3.3.6.1	<i>Amamentação Exclusiva (AE)</i>	56
3.3.6.2	<i>Ordenha Mecânica Exclusiva (OME)</i>	56
3.3.6.3	<i>Manejo Misto – Amamentação e ordenha mecânica (MMom)</i>	57
3.3.6.4	<i>Manejo Misto – Amamentação e ordenha manual (MMoma)</i>	58
3.4	Análise Estatística	58
3.4.1	Concentrações de Ocitocina	58

3.4.2	Ganho de Peso dos Cordeiros	60
4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS	62
4.1	Etapa 1	63
4.1.1	Experimento 1: Quantificação da Concentração de Ocitocina no LCR e no Plasma de Ovelhas Lactantes Submetidas à AE.....	63
4.1.1.1	<i>Amostras obtidas.....</i>	<i>63</i>
4.1.1.2	<i>Concentrações de ocitocina</i>	<i>64</i>
4.1.2	Experimento 2: Quantificação da Concentração de Ocitocina no LCR e no Plasma de Ovelhas Lactantes Submetidas à OME.....	64
4.1.2.1	<i>Amostras obtidas.....</i>	<i>65</i>
4.1.2.2	<i>Concentrações de ocitocina</i>	<i>65</i>
4.1.3	Experimento 3: Quantificação da Concentração de Ocitocina no LCR e no Plasma de Ovelhas Lactantes Submetidas à MMom	66
4.1.3.1	<i>Amostras obtidas.....</i>	<i>66</i>
4.1.3.2	<i>Concentrações de ocitocina</i>	<i>66</i>
4.1.4	Experimento 4: Quantificação da Concentração de Ocitocina no LCR e no Plasma de Ovelhas Lactantes Submetidas à MMoma	67
4.1.4.1	<i>Amostras obtidas.....</i>	<i>67</i>
4.1.4.2	<i>Concentrações de ocitocina</i>	<i>68</i>
4.1.5	Experimento 5: Avaliação do Ganho de Peso Diário de Cordeiros Filhos das Ovelhas dos Grupos AE, OME, MMom e MMoma	68
4.1.5.1	<i>Avaliação do ganho de peso diário de cordeiros filhos das ovelhas do grupo AE</i>	<i>69</i>
4.1.5.2	<i>Avaliação do ganho de peso diário de cordeiros filhos das ovelhas do grupo OME.....</i>	<i>69</i>
4.1.5.3	<i>Avaliação do ganho de peso diário de cordeiros filhos das ovelhas do grupo MMom.....</i>	<i>70</i>
4.1.5.4	<i>Avaliação do ganho de peso diário de cordeiros filhos das ovelhas do grupo MMoma.....</i>	<i>71</i>
4.2	Etapa 2	72
4.2.1	Análises das Concentrações de Ocitocina Considerando os Diferentes Tratamentos Avaliados	72
4.2.2	Análise do Ganho de Peso dos Cordeiros Considerando os Diferentes Tratamentos Avaliados	76

5	DISCUSSÃO	81
6	CONCLUSÕES	87
	REFERÊNCIAS	89

1 INTRODUÇÃO

A produção leiteira no Brasil tem se adequadado constantemente aos mercados nacional e internacional, o que resulta em transformações para o incremento da mesma.

O Brasil é o sétimo maior produtor de leite do mundo e cresce a uma taxa anual de 4%, superior a dos países que ocupam os primeiros lugares (SANTOS et al., 2006). A produção leiteira brasileira cresceu 131% em 15 anos e transformou o Brasil de um país importador de produtos lácteos em um país exportador, sendo que hoje respondemos por 66% do volume total de leite produzido no Mercosul. Em 2002, o leite representou 19% do valor bruto da produção pecuária, revelando assim a importância da produção láctea no contexto do agronegócio nacional.

Além da sua importância nutritiva e na economia, o leite desempenha um relevante papel social, principalmente na geração de empregos. Baseado nesta realidade, o setor agropecuário brasileiro, vem investindo em estudos e aperfeiçoamento em vários segmentos que envolvem a produção de leite, desde a questão da reprodução, a saúde animal, até as novas formulações nutricionais que vêm cada dia mais aumentando o potencial energético dos animais. Neste contexto, inserem-se as questões relacionadas à fisiologia da lactação, como a ejeção do leite e o bem-estar animal nos diferentes sistemas de produção leiteira, que ainda merecem maior atenção e novas pesquisas.

A lactação é considerada por alguns autores como o processo final no ciclo da reprodução e a glândula mamária como um órgão reprodutivo anexo, uma vez que a descendência dos mamíferos depende nutricionalmente da mãe, dentre outros aspectos. Assim sendo, é fundamental que haja um melhor entendimento da fisiologia da lactação, evidenciando os principais mecanismos envolvidos e, ressaltando o papel dos hormônios na formação da glândula mamária, na produção láctea, na manutenção da lactação que, conseqüentemente, levam a uma melhora na quantidade e, principalmente, na qualidade do leite produzido.

Desta forma, este trabalho teve como objetivo estudar simultaneamente as concentrações de ocitocina no líquido cefalorraquidiano (LCR) e no plasma de ovelhas multíparas durante ordenha mecânica exclusiva e manejo misto, estabelecendo suas possíveis correlações entre os dois compartimentos corporais.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Esta revisão de literatura foi escrita baseada inicialmente em aspectos anátomo-morfológicos da glândula mamária. Em seguida foi realizada uma abordagem geral sobre o hormônio ocitocina e posteriormente seu papel periférico, central e as possíveis relações das concentrações centrais e periféricas.

2.1 Glândula Mamária

A glândula mamária é um tecido especializado, anatomo-morfológicamente adaptado a processos filtrativos e bioquimicamente complexo. Seu desenvolvimento caracteriza uma vitória dos mamíferos mediante a qual muitos processos reprodutivos puderam ser mais eficientes devido à redução do tempo de gestação. A glândula mamária, assim como as glândulas sudoríparas e sebáceas, é uma glândula cutânea e, do aspecto histológico é do tipo túbulo-alveolar, que se origina do ectoderma. Embora a glândula mamária seja basicamente similar em todos os mamíferos, há amplas variações entre as espécies quanto à sua aparência e às quantidades relativas dos componentes secretados. As localizações das glândulas mamárias também apresentam variações nas diferentes espécies, sendo que nos bovinos, ovinos, caprinos, eqüinos e baleias as glândulas mamárias situam-se na região inguinal, enquanto que nos primatas e elefantes se localizam na região torácica e nos suínos, roedores e carnívoros se apresentam ao longo da superfície ventral, tanto no tórax como no abdômen (SWENSON, 1984; DYCE et al., 1997).

No aspecto anatômico-estrutural, a glândula mamária pode ser dividida em duas porções, sendo elas a porção alveolar e a porção cisternal. A cisterna da glândula é o local onde ocorre o armazenamento de secreção láctea e é composta basicamente pelos grandes ductos, cisterna da glândula e cisterna da teta, enquanto a porção alveolar é formada por tecido alveolar contendo inúmeros alvéolos e pequenos ductos (**Figura 1**). Os alvéolos são considerados a unidade funcional da glândula mamária e são compostos por uma linha de células epiteliais rodeadas de tecido conjuntivo e por células mioepiteliais e vasos sanguíneos como mostra a

figura 2 (HAFEZ, 1988; DYCE et al., 1997). Grupos de alvéolos adjacentes formam lóbulos que são posteriormente agrupados em estruturas maiores chamadas lobos (CUNNINGHAM, 1999).

As células epiteliais são capazes de extrair nutrientes do sangue, sintetizar componentes do leite como gordura, proteína e lactose e ainda secretar leite para a luz do alvéolo. Já as células mioepiteliais são células musculares especializadas que envolvem os alvéolos e os ductos menores e se contraem em resposta ao reflexo da ejeção do leite. A inervação autônoma da glândula mamária composta pelo sistema eferente simpático inerva os músculos lisos que circundam os vasos sanguíneos, os túbulos coletores e os esfíncteres do mamilo (SWENSON, 1984).

Fonte: CUNNINGHAM, 1999.

Figura 1 – Descrição do úbere de uma cabra. Notar em (1) tecido alveolar; (2) abertura de grandes ductos do leite; (3) cisterna da teta; (4) canal da teta; (5) cisterna da glândula

Fonte: CUNNINGHAM, 1999.

Figura 2 – Diagrama de um grupo de alvéolos na glândula mamária de uma cabra. Notar em (1) capilar; (2) vênula; (3) arteríola; (4) células mioepiteliais; (5) células alveolares; (6) leite; (7) alvéolo; (8) ducto do leite

2.2 Ocitocina

Dentre os hormônios envolvidos na lactação, destaca-se a ocitocina, que é sintetizada no hipotálamo, sendo produzida principalmente no núcleo paraventricular e armazenada na hipófise posterior, possuindo ação sobre a musculatura lisa uterina e sobre as células mioepiteliais da glândula mamária (HAFEZ, 1988; SWENSON, 1984; GUYTON, 1992; KIMURA et al., 1998). Depois de produzida, é transportada dos neurônios magnocelulares para a neurohipófise, sendo secretada durante o

parto e a lactação, sob o estímulo provocado pela estimulação vagino-cervical e pela mamada (**Figura 3**), respectivamente (WAGNER et al., 1997; MIRCIC et al., 1998).

Fonte: CUNNINGHAM, 1999.

Figura 3 – Vias somatossensoriais no reflexo induzido pela sucção para liberação de ocitocina

A ocitocina estimula a produção endometrial de prostaglandina, o processo de luteólise e ainda é capaz de estimular o sistema imune (MIRCIC et al., 1998).

A ocitocina é um nonapeptídeo hidrossolúvel, que possui uma ponte cis-cis nas posições 1-6, fato importante para o reconhecimento e ligação do hormônio ao

seu receptor (SPINOSA et al., 1999; CUNNINGHAM, 1999). A ocitocina pode ser encontrada no plasma sanguíneo e também no líquido cefalorraquidiano (LCR). No sistema nervoso central, pode ser encontrada em vesículas nos terminais nervosos, agindo como neurotransmissor e como neuromodulador interagindo com receptores centrais de ocitocina (GOULD; ZINGG, 2003). Esse peptídeo parece ser necessário para a expressão de comportamentos reprodutivos tanto em machos (FILIPPI et al., 2003; HEINRICHS et al., 2003) quanto em fêmeas (FAHRBACH et al., 1986; LÉVY; POIDRON, 1987; KENDRICK et al., 1988; GIOVENARDI et al., 1998), assim como no estabelecimento de relações sociais (HOLLANDER et al., 2006; LIM; YOUNG, 2006; KENDRICK, 2000; WINSLOW et al., 2003). Nas fêmeas participa na iniciação do comportamento materno (PEDERSEN et al., 1982; FAHRBACH et al., 1986; KENDRICK et al., 1988; NELSON; PANKSEPP, 1998) e na expressão do comportamento agressivo em fêmeas lactantes (GIOVENARDI et al., 1998), e efeitos ansiolíticos também foram relatados (NEUMANN et al., 2000; MANTELLA et al., 2003). Assim, acrescenta-se ao efeito periférico inicialmente conhecido, inúmeras ações centrais da ocitocina cuja importância e complexidade devem ser mais bem compreendidas. Neste sentido, embora alguns autores não estabeleçam relações entre os níveis de ocitocina presentes no líquido cefalorraquidiano e no plasma (JONES et al., 1983; MORRIS et al., 1984), mais recentemente tem-se sugerido que estas ações possam estar inter-relacionadas (KENDRICK et al., 1997; KENDRICK, 2000; LIPSCHITZ et al., 2003).

2.3 Ações Periféricas da Ocitocina

No final da gestação, a concentração periférica de progesterona cai abruptamente, ao mesmo tempo em que se observa um pico de secreção de prolactina e de 17β -estradiol, iniciando o parto. A ocitocina, neste momento, é responsável pela sincronização dos eventos que culminam nas contrações uterinas e no parto propriamente dito (BLANKS; THORNTON, 2003), efeito este modulado pelo estradiol que causa o aumento da expressão de receptores para a ocitocina no miométrio (FRANCZAK et al., 2002; BLANKS; THORNTON, 2003). Neste período, as fêmeas apresentam modificações comportamentais importantes, demonstrando

maior interesse por filhotes e podendo em alguns casos, até adotá-los (POIDRON; LÉVY, 1990). Embora durante a expulsão do feto os níveis periféricos de ocitocina sejam extremamente elevados, algumas horas após o parto, há uma redução intensa de sua concentração periférica (HYDBRING et al., 1999). Este hormônio é considerado um agente iniciador do comportamento materno, e outros fatores, como a prolactina são mais importantes para a manutenção do mesmo (BRIDGES et al., 1985; BRIDGES et al., 1993; POINDRON; LÉVY, 1990). As interações materno-filiais após o parto são fundamentais para o estabelecimento e a manutenção do comportamento materno (LE NEINDRE et al., 1979; FLEMMING et al., 1999), tornando as fêmeas seletivas para amamentarem exclusivamente seu filhote (LÉVY et al., 1995). Contraditoriamente, durante as primeiras amamentações ou ordenhas realizadas logo após o parto não ocorrem liberações significativas de ocitocina (NEGRÃO et al., 2001; NEGRÃO; MARNET, 2003), embora o estoque daquele hormônio na neurohipófise ainda seja importante (LINCOLN e PAISLEY, 1982). Gradualmente, a ocitocina passa a ser liberada durante a amamentação ou ordenha e, após uma a duas semanas, as concentrações plasmáticas tornam-se significativas (NEGRÃO et al., 2001; NEGRÃO e MARNET, 2003). A liberação de ocitocina pode sofrer influência do tipo de estímulo, seja este a sucção exercida pelo filhote ou a ordenha mecânica (MARNET; NEGRÃO, 2000; VAN RENEEN et al., 2002), interferindo na ejeção do leite alveolar e na produção de leite (MARNET et al., 1998, WEISS et al., 2003). A fração alveolar do leite é a mais rica e mais abundante na maioria das espécies de ruminantes domésticos (BRUCKMAIER, 2005). Vários fatores podem provocar um distúrbio no reflexo de ejeção do leite, tais como a realização da ordenha em ambiente desconhecido, a presença de pessoas estranhas e o desmame (HOPSTER et al., 2002; BRUCKMAIER, 2005).

A interferência do desmame é evidente, uma vez que mesmo num sistema de manejo misto, no qual as fêmeas podem amamentar por parte do dia, ocorre perda na produção de leite no momento do desmame completo, embora a quantidade de leite produzido aumente em função de uma melhor ejeção neste tipo de manejo (MARNET; NEGRÃO, 2000). Por outro lado, nas semanas em que acontecem o manejo de ordenha misto, ocorre significativa perda no teor de gordura do leite obtido pela ordenha mecânica. Este fato poderia ser explicado pelo estímulo insuficiente causado pela ordenha mecânica ou pelo bloqueio da síntese de gordura ou ainda pela não transferência da gordura da porção alveolar para a cisternal

(MCKUSICK et al., 2002). Assim, o estímulo exercido pela sucção e a interação materno-filial são sempre mais potentes do que a ordenha mecânica em aumentar a secreção de ocitocina plasmática (MARNET; NEGRÃO, 2000), interferindo desta forma sobre o comportamento materno (LE NEINDRE et al., 1979; FLEMMING et al., 1999) e a produção de leite (MARNET; NEGRÃO, 2000).

Na primeira semana pós-parto, a relação materno-filial se consolida (LÉVY et al., 1995) e o desmame promove estresse, causando alterações comportamentais, aumento dos níveis circulantes de cortisol, redução dos níveis de ocitocina e inibição do reflexo neuroendócrino de ejeção do leite (NEGRÃO; MARNET, 2003). Alguns estudos comportamentais sugerem que a amamentação é fundamental para manutenção do comportamento materno, demonstrando que a redução do número de amamentações diárias é normalmente associada à redução das interações materno-filiais e ao desmame natural (BAR-PELED et al., 1995; FLEMMING et al., 1999). Contudo, a liberação de prolactina e do hormônio do crescimento variam pouco durante o início da lactação, sendo liberados sempre que a glândula mamária é estimulada (NEGRÃO e MARNET, 2002). Até o final da lactação os níveis de ocitocina liberados durante a amamentação ou ordenha se mantêm elevados enquanto os de prolactina e hormônio de crescimento reduzem substancialmente no final da lactação (NEGRÃO; MARNET, 2002).

Foi identificado e clonado apenas um tipo de receptor de ocitocina ligado à proteína G presente nas células mioepiteliais da glândula mamária, no endométrio uterino, assim como no sistema nervoso central (GOULD; ZINGG, 2003). A expressão de receptores de ocitocina na glândula mamária é modulada pela presença tanto de estrógenos como de progestágenos, sendo que o primeiro aumenta, enquanto o segundo diminui a expressão deste tipo de receptor, em várias espécies (AMICO et al., 2002; ROBINSON et al., 2001). A expressão de receptores para ocitocina no endométrio e na glândula mamária e sua relação com o parto e a lactação, respectivamente, é evidente. Receptores de ocitocina também estão presentes nestes tecidos em outros momentos e podem ter funções distintas como, por exemplo, a indução da liberação de prostaglandina $F2\alpha$ na ausência de progesterona no final da fase luteínica (BOGACKI et al., 2002). A ação periférica da ocitocina já foi relacionada ao desenvolvimento de folículos ovarianos (JO; FORTUNE, 2003), sugerindo-se também uma função modulatória do peptídeo em relação ao fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I); (SIROTKIN et al.,

2003), conhecido por sua ação sobre o crescimento folicular (HSUEH, 1986; SPICER, 2004).

2.4 Ações da Ocitocina no Sistema Nervoso Central

Grupos neuronais que contém ocitocina identificados através de imunohistoquímica e hibridização *in situ* localizam-se no hipotálamo, sistema límbico, tálamo, mesencéfalo, tronco cerebral e medula espinhal (SOFRONIEW, 1985; CROWLEY et al., 1995), sendo que a maior parte se concentra nos núcleos paraventricular e supraóptico do hipotálamo, os quais estão envolvidos com a secreção deste hormônio pela neurohipófise (KENDRICK et al., 1986; KENDRICK, 2000) e de onde partem projeções para outras áreas do sistema nervoso central (NUMAN et al., 1977; FLEMMING et al., 1980; NUMAN; NAGLE, 1983), como o sistema límbico (FLEMMING et al., 1996) e bulbo olfatório (KENDRICK et al., 1986; 1988). Estudos recentes que quantificam a expressão de RNAm, indicam que a distribuição dos neurônios ocitocinérgicos pode ser mais ampla do que aquela determinada inicialmente (BROAD et al., 1999). Os alvos extra-hipotalâmicos dos neurônios magnocelulares alcançam o bulbo olfatório, tenia tectis, septo medial e ventral, várias regiões da amígdala, núcleo supramamilar, córtex etorrinal, núcleo do trato solitário e medula espinhal (INSEL, 1990), onde se encontram também neurônios que podem aparentemente secretar ocitocina independente da neurohipófise (INSEL, 1990; GOULD; ZINGG, 2003). O tipo de receptor para ocitocina, encontrado no sistema nervoso central é igual ao encontrado nos tecidos periféricos (ADAN et al., 1995; GOULD; ZINGG, 2003). Estas vias neuronais parecem estar envolvidas com a expressão de comportamentos sociais e reprodutivos cujo estabelecimento está intimamente ligado a estímulos olfativos (FLANAGAN et al., 1993). Dentre estes comportamentos, destaca-se o comportamento materno (LÉVY et al., 1995; FLEMMING et al., 1999; KENDRICK, 2000; LIPSCHITZ et al., 2003).

A participação da ocitocina no desencadeamento do comportamento materno está intimamente ligada ao cenário hormonal presente no terço final da gestação. Tanto a estimulação olfativa exercida pelo filhote que se inicia logo após o parto,

quanto à estimulação vagino-cervical que ocorre durante o mesmo, levam à secreção de ocitocina (INSEL, 1990), que então atua sobre regiões cerebrais como a amígdala (FLEMMING et al., 1980), mesencéfalo (NUMAN; NAGLE, 1983), área pré-óptica do hipotálamo (NUMAN et al., 1977), sistema límbico e córtex (FLEMMING et al., 1996) além do bulbo olfatório (KENDRICK et al., 1986; 1988), desencadeando o comportamento materno. Estudos neuroquímicos revelaram que em consequência do parto e da estimulação vagino-cervical, ocorre a liberação de vários neurotransmissores no bulbo olfatório e substância negra (KENDRICK; KEVERNE, 1991; KENDRICK et al., 1988). Esta alça de retro alimentação positiva para o bulbo olfatório modifica a percepção dos estímulos olfativos pela mãe e contribui para o início das mudanças comportamentais que resultam no cuidado materno (KENDRICK et al., 1986; 1988; LÉVY; POIDRON, 1987). As ações da ocitocina dependem da prévia exposição destas áreas cerebrais a hormônios esteróides presentes no terço final da gestação. Em ratos, os neurônios ocitocinérgicos apresentam receptores para estrógenos (BURBACH et al., 1995), que juntamente com progestágenos são responsáveis pelas modificações na atividade ocitocinérgica (BROAD et al., 1999; ADAN et al., 1993). Durante a gestação, o número de receptores para estrógenos aumenta em regiões relevantes para o desenvolvimento do comportamento materno (FAHRBACH et al., 1986; WAGNER e MORRELL, 1995). No mesmo sentido, observa-se uma diminuição dos níveis de receptores de dopamina nos núcleos estriado e acumbens (BAKOWSKA; MORRELL, 1995), sensibilizando estas regiões cerebrais às ações da ocitocina e favorecendo o estabelecimento do cuidado materno. Interessante notar que esta a modulação exercida pelos esteróides no sistema nervoso central também é responsável por mudanças em relação à sensibilidade de células presentes no endométrio uterino e na glândula mamária, como descrito anteriormente. Muito dos estudos no sistema nervoso central foram conduzidos em ovelhas e como as mudanças neuroquímicas, neste período, estão localizadas em regiões límbicas e não no neocórtex (FLEMMING et al., 1996), deve haver grande semelhança em várias outras espécies primatas e não-primatas, embora os mecanismos neurais que ativam estas vias e a sensibilidade das mesmas possam ser diversos (FLEMING; KORSMIT, 1996; KENDRICK et al., 1986, 1988).

O papel da ocitocina no comportamento materno parece ser muito mais facilitatório do que essencial, uma vez que camundongos knockout para o gene da

ocitocina expressam o comportamento na presença de filhotes (YOUNG et al., 1997). Inicialmente foi demonstrado que a injeção intracerebroventricular de ocitocina é capaz de diminuir a latência para a expressão do comportamento materno (FAHRBACH et al., 1985). Por outro lado, uma lesão na principal fonte de projeções neuronais ocitocinérgicas, o núcleo paraventricular do hipotálamo, faz com que haja um aumento na latência para o início do cuidado materno, porém quando ele já está estabelecido, uma lesão neste núcleo não tem mais consequência imediata (INSEL; HARBAUGH, 1989). Neste sentido, a prolactina exerce um papel essencial no desencadeamento da resposta materna, contribuindo para a manutenção da mesma (BRIDGES et al., 1985; BRIDGES et al., 1990; BRIDGES et al., 1993; POIDRON; LÉVY, 1990). Outros hormônios e sistemas de neurotransmissão, como os lactogênios placentários (BRIDGES; FREEMARK, 1995), a colecistocinina (FELICIO et al., 1991; MIRANDA-PAIVA, 1999), os sistemas opioidérgico (MANN et al., 1989; MIRANDA-PAIVA et al., 2001) e dopaminérgico (NUMAN; NAGLE, 1983; STERN; PROTOMASTRO, 2000) também são importantes para o comportamento materno.

Da interação entre fatores hormonais e neuroquímicos fica estabelecida a memória materna, que modifica a latência para expressão do comportamento em fêmeas experientes (BYRNES; BRIDGES, 2000). A atividade dos grupos neuronais relacionados ao comportamento materno, assim como a expressão de receptores de ocitocina ou de seu RNAm pode ser modificada pelo parto e também durante a lactação (INSEL; SHAPIRO, 1992; CROWLEY et al., 1995). Assim, foi demonstrado que a experiência reprodutiva pode interferir na expressão de RNAm para receptores de ocitocina em ovelhas, sendo que fêmeas nulíparas são conhecidas por terem maior dificuldade em mostrarem-se maternas (HATTON e ELLISMAN, 1982; BROAD et al., 1999) e pela maior retenção de leite após o parto (NEGRÃO et al., 2001, NEGRÃO; MARNET, 2002). Em ovelhas, fêmeas experientes apresentam maiores níveis circulantes de ocitocina e liberação de neurotransmissores no bulbo olfatório em consequência do parto do que aqueles observados em fêmeas primíparas (LÉVY et al., 1995), sendo sugestivo da facilitação para expressão do comportamento materno.

2.5 Variações das Concentrações Centrais e Periféricas de Ocitocina

Já foi sugerido anteriormente que as ações centrais e periféricas do peptídeo poderiam ser complementares (KENDRICK, 2000; LIPSCHITZ et al., 2003), assim como ocorre para outros neuropeptídeos como angiotensina, colecistocinina, hormônio liberador de corticotrofina, hormônio luteinizante e vasopressina. Por outro lado, a atividade de grupos de neurônios ocitocinérgicos de efeito bastante significativo para o sistema nervoso central, pode estar dissociada das concentrações periféricas do hormônio de maneira que as concentrações plasmáticas de ocitocina pouco interfeririam com as concentrações no líquido cefalorraquidiano, uma vez que o peptídeo não atravessa a barreira hemato-encefálica (JONES et al., 1983; MORRIS et al., 1984; INSEL, 1990). Contudo, existem evidências de que a permeabilidade da barreira hemato-encefálica pode ser modificada pelo estresse e conseqüentemente pela presença de hormônios adrenocorticais circulantes, que ocorrem no período pré-parto e durante o parto (LONG; HOLADAY, 1985). Ainda, a sintonia das ações centrais e periféricas parece estar em evidência quando se observam os resultados obtidos após a injeção intracerebroventricular de um antagonista de receptores de ocitocina (LIPSCHITZ et al., 2003). No final da gestação, a estimulação dos receptores centrais de ocitocina leva a uma reorganização anatômica do sistema magnocelular que modifica a sensibilidade do mesmo ao reflexo de ejeção do leite. Se isso não ocorrer, em conseqüência da injeção de antagonista de receptores de ocitocina (LIPSCHITZ et al., 2003), embora sejam observados picos sistêmicos do hormônio, o padrão de secreção e a resposta ao reflexo produzido pela sucção exercida pelos filhotes são modificados, comprometendo o crescimento dos mesmos (LIPSCHITZ et al., 2003).

Demonstrou-se ainda que a infusão intracerebroventricular de antagonistas ocitocinérgicos (VAN LEENGOED et al., 1987; FAHRBACH et al. 1985) ou a utilização do antisoro (PEDERSEN et al.; 1985) podem aumentar a latência para o início do comportamento materno após o parto. Assim, a ocitocina seria responsável por ações sincronizadas, causando perifericamente contrações uterinas e ejeção do leite, enquanto que centralmente, promovendo o comportamento materno (KENDRICK, 2000) sendo que estas ações ocorreriam de forma complementar ou integrada. No mesmo sentido, a utilização de anestesia epidural causa o bloqueio

da liberação de ocitocina tanto central quanto periférica, levando a inibição das contrações uterinas e também retardando o início da expressão do comportamento materno, sem que haja supressão do mesmo (WILLIAMS et al., 2001). Além disso, a estimulação vagino-cervical e o parto são capazes de aumentar as concentrações de ocitocina central e periférica de forma sincrônica na ovelha, embora pareça existir uma pequena diferença temporal entre ambas na vaca, sendo que o pico de liberação no sistema nervoso central ocorre pouco depois do parto (WILLIAMS et al., 2001), apesar dos alvos hipotalâmicos parecerem ser os mesmos, assim como seu envolvimento com o estabelecimento do comportamento materno (WILLIAMS et al., 2001). Assim como alguns autores comentam sobre uma possível inter-relação entre as concentrações centrais e periféricas de ocitocina, outros já citaram anteriormente que sob várias condições experimentais, as concentrações no líquido cefalorraquidiano e no plasma não estão correlacionadas (JONES et al., 1983; KENDRICK et al., 1986, INSEL, 1990). Por outro lado, a co-localização de neurônios ocitocinérgicos no núcleo paraventricular do hipotálamo que se projetam tanto para alvos no sistema nervoso central quanto para a neurohipófise e que, portanto, estão relacionados às concentrações de ocitocina centrais e periféricas, respectivamente, pode ser sugestivo de uma inter-relação (LUDWIG; LENG, 2006).

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A descrição dos materiais e métodos utilizados compreendeu generalidades (número de animais utilizados, alimentação administrada e local onde foram realizados os experimentos), fármacos, procedimentos e análise estatística.

3.1 Generalidades

Os experimentos foram conduzidos nas dependências da Fazenda e do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da UNIFEOB utilizando 23 ovelhas (*Ovis aries*) leiteiras da raça Santa Inês com peso e número de lactações semelhantes e 33 cordeiros. As ovelhas tiveram livre acesso à água e ao suplemento mineral e vitamínico. As ovelhas receberam uma mistura de grãos (milho e farelo de soja) e silagem de milho em função de seu potencial produtivo. Os animais experimentais que não estavam em experimentação eram mantidos em regime de semi-confinamento, sendo confinados em apriscos durante a noite, tendo acesso livre a um piquete (entre 10h e 16h) com grama *coast-cross* com água e sombra.

Em todos os grupos experimentais foram estabelecidos no nascimento dos cordeiros, a cura do umbigo com iodo a 2% e a identificação através de brincos contendo ao número da mãe no lado de dentro e o número do cordeiro no lado de fora. Foi padronizada ainda a pesagem diária do nascimento ao desmame do cordeiro aos 60 dias de vida. A pesagem foi feita através de uma balança digital “Kern CH 15K20”. Para realizar a pesagem dos cordeiros foi necessária a utilização de um suporte acoplado a balança, o qual envolveu o tronco do animal, suspendendo-o do chão (**Figura 4**).

O protocolo experimental foi elaborado de acordo com as Normas Éticas da UNIFEOB e da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP-SP vigentes no período do experimento.

Figura 4 – Pesagem diária dos cordeiros utilizando uma balança digital (Kern CH 15K20) e um suporte para pesagem de cordeiros

3.2 Fármacos

Os fármacos utilizados durante o experimento estão citados abaixo:

- Acepromazina (Acepromazina – Acepran 2% -UNIVET S/A;20mg/mL);
- Benzilpenicilina Benzatina – Benzetacil® (BAYER)– 1.200.000 U/4mL;
- Halotano (Halotano - Tanohalo® - CRISTALIA; Frasco c/ 100mL);
- Heparina (Heparina Sódica - Parinex® - HIPOLABOR;500 U.I./mL);
- Iodixanol (Iodixanol - Visipaque ® - AMERSHAM HEALTH; 270mg I/mL);
- Meperidina (Cloridrato de Petidina – Dolosal® - CRISTALIA;50mg/mL);
- Quetamina (Cloridrato de Quetamina– Vetaset® - FORT DODGE; 10g/10mL):
associação anestésica;
- Xilazina (Cloridrato de 2-2,6-Xilidino-5,6-Dihidro-4-H-1,3-Tiazina- Rompum® - BAYER; 2g/100mL).

3.3 Procedimentos Experimentais

Os procedimentos experimentais foram divididos em: protocolo anestésico para cateterização do espaço subaracnóideo, procedimento para cateterização do espaço subaracnóideo, obtenção de sangue através da veia jugular, colheita das amostras propriamente dita, procedimentos para dosagem de ocitocina por ensaio imunoenzimático, padronização das amamentações e ordenhas experimentais.

3.3.1 Protocolo Anestésico para Cateterização do Espaço Subaracnóideo

As ovelhas que foram submetidas a cateterização do espaço subaracnóideo passaram por um jejum hídrico e alimentar obtido da seguinte maneira: três dias antes do procedimento anestésico, a alimentação foi reduzida pela metade e a água permaneceu à vontade. Dois dias antes do procedimento anestésico, a alimentação foi retirada totalmente e a água permaneceu à vontade. Um dia antes do procedimento anestésico, foram retirados alimento e água.

Após a realização do jejum completo, foi realizado o protocolo anestésico composto por uma medicação pré-anestésica (MPA), contendo uma associação anestésica de acepromazina (Acepran 2%), na dose de 0,2 mg/Kg + meperidina (Dolosal®), na dose de 2 mg/Kg, aplicada de forma intramuscular. Por volta de 20 minutos depois da MPA, foi realizado o procedimento de Indução, através de uma associação anestésica contendo quetamina (Vetaset®), na dose de 10 mg/Kg + xilazina (Rompum®), na dose de 0,5 mg/Kg, aplicada de forma intramuscular. Assim que o animal apresentou perda do reflexo laringotraqueal, foi realizado a intubação com uma sonda endotraqueal número 10 possibilitando a manutenção anestésica inalatória através do uso do halotano (Tanohalo®; **Figura 5**).

Figura 5 – Animal intubado com uma sonda endotraqueal possibilitando a manutenção anestésica inalatória

3.3.2 Procedimento para Colheita de LCR

Para a obtenção de LCR das ovelhas, foi necessária a introdução de um cateter epidural (Portex® 16G) no espaço subaracnóideo. Com o objetivo de padronizar o procedimento de colheita de LCR e validar o ensaio imunoenzimático foi realizado um experimento piloto.

3.3.2.1 Experimento piloto

No experimento piloto, 06 ovelhas multíparas lactantes foram anestesiadas, cateterizadas e as amostras de LCR foram coletadas, congeladas (-20°C) e utilizadas posteriormente para a validação do ensaio imunoenzimático.

Durante a padronização da técnica de cateterização muitas dificuldades foram encontradas em vários momentos do experimento. Durante o procedimento de cateterização, alguns animais apresentaram aspiração de conteúdo ruminal durante a anestesia geral e foram retirados do projeto. Durante a fase de colheita de material, foram obtidas amostras tanto de LCR quanto de plasma, porém essas

amostras nem sempre foram pareadas devido a dificuldades encontradas no momento da colheita com o eventual entupimento do cateter epidural.

No final do experimento piloto foi obtido 180 amostras entre LCR e plasma, sendo somente uma parte dessas amostras analisada e posteriormente utilizada para a validação do ensaio imunoenzimático, como já mencionado anteriormente.

As estimativas de média, desvio padrão, coeficiente de variação, mínimo e máximo para as concentrações de ocitocina no LCR e plasma de alguns animais do experimento piloto estão expresso na **tabela 1**.

Tabela 1 - Resultados da quantificação da concentração de ocitocina (pg/mL) de algumas amostras de LCR e plasma das ovelhas do experimento piloto obtidos por ensaio imunoenzimático

Amostra	N	Média	D.P.	C.V. (%)	Min.	Max.
LCR	17	44,10	17,59	39,88	12,64	72,17
Plasma	17	256,34	211,98	82,70	90,27	588,01

3.3.2.2 Procedimento para cateterização do espaço subaracnóideo

Após o animal apresentar um plano anestésico adequado, este foi posicionado em decúbito lateral direito, onde foram realizadas a tricotomia e anti-sepsia da região cervical e posterior introdução de um cateter intravenoso (BD Angiocath® 14G) - somente o mandril do cateter - entre as vértebras cervicais C1 e C2, até atingir o espaço subaracnóideo e observar a saída do LCR (**Figura 6**). Posteriormente foi introduzida parte do cateter epidural - aproximadamente 12 cm - através do mandril cateter intravenoso até o espaço acima citado (**Figura 7**). Em seguida fez-se a administração de contraste radiográfico positivo não iônico a base de iodixanol (Visipaque®), e realizou-se um exame radiográfico da região cervical, para ter certeza da localização do cateter epidural (**Figura 8**). Após essa confirmação, retirou-se o mandril do cateter intravenoso do forame magno, deixando

somente o cateter epidural no espaço subaracnóideo para se ter acesso de forma periódica ao LCR. O cateter epidural foi preenchido com água deionizada.

Posteriormente realizou-se uma sutura tipo “sandália romana” usando fio nylon 2-0 agulhado, fixando o cateter epidural na epiderme, de forma a garantir que este não saísse do espaço subaracnóideo. Foi realizada uma sutura com padrão *sultan*, ancorando o cateter epidural na pele para ajudar na fixação. Utilizo-se ainda um pedaço de esparadrapo ao redor do cateter epidural para facilitar a fixação do mesmo na pele.

Para proteger e alojar o cateter epidural fixado no pescoço do animal foi feito uma bandagem com ataduras e esparadrapo em volta do pescoço, facilitando a colheita do LCR e minimizando o risco dos cordeiros ou outros animais terem contato com a sonda (**Figura 9**).

Por se tratar de um procedimento invasivo, e que de certa forma, apresentava um risco de contaminação microbiana no espaço subaracnóideo, optou-se por utilizar-se da antibioticoterapia com benzilpenicilina benzatina (40.000 UI/Kg, i.m.; Benzetacil®), a cada 24 horas durante 3 dias.

Os animais permaneceram em uma baia com alimentos e água disponível até 24 horas após o procedimento cirúrgico (**Figura 10**). Depois foram levadas para a fazenda escola onde foram realizadas a ordenha e colheita de material.

Figura 6 – Colocação do mandril de um cateter intravenoso (BD Angiocath ® 14G) como auxiliar para realização de punção na articulação atlanto-occipital

Figura 7 – Colocação de um cateter epidural (Portex ® 16G) no espaço subaracnóideo, usando mandril de um cateter intravenoso (BD Angiocath ® 14G) como guia

Figura 8 – Imagem radiográfica da região cervical e crânio. A seta “A” indica o mandril do cateter intravenoso (BD Angiocath ® 14G). A seta “B” indica o cateter epidural (Portex ® 16G) repleto de contraste radiográfico no espaço subaracnóideo

Figura 9 – Bandagem com ataduras e esparadrapo em volta do pescoço, para proteger e alojar o cateter epidural fixado no pescoço do animal

Figura 10 – Após o procedimento cirúrgico, os animais permaneceram em uma baia com alimentos e água por um período de 24 horas

3.3.3 Obtenção de Sangue Através da Veia Jugular

Para a colheita de sangue foi padronizada a utilização de *scalp* (Solidor® 19G), o qual foi colocado na veia jugular no início do procedimento e retirado 20

minutos depois, após a obtenção de 6 amostras de sangue em momentos distintos conforme o delineamento experimental. Isso se repetiu durante os 5 dias de colheita. O scalp depois de colocado foi fixado na pele utilizando-se cola rápida (Super-Bonder®), para facilitar a fixação e retirada do mesmo. Entre uma colheita e outra, o scalp foi heparinizado (100 UI de heparina -Parinex®/mL de água para injeção). As veias jugulares esquerda ou direita foram alternadas entre os dias para obtenção do sangue, minimizando assim a possibilidade de flebite.

3.3.4 Colheita das Amostras Propriamente Dita

A cada sessão de colheita de material foi mantida a mesma rotina. Todos os animais foram habituados à sala de ordenha, mantidos em canzil, onde foram realizadas as colheitas simultâneas de plasma e LCR sem serem anestesiados, podendo movimentar-se lateralmente, deitar e levantar, tendo acesso a alimento. Em função do delineamento experimental que segue, o manejo de desmame ocorreu de forma variada, dependendo dos grupos experimentais em questão. As amostragens de LCR e sangue, quando possível, foram realizadas simultaneamente (**Figura 11**), de modo que será possível a posterior comparação do padrão de secreção de ocitocina central e periférica no mesmo momento. As colheitas foram realizadas antes (-0,5 min) durante (0,5, 1 e 4 min) e após (10, 15 min) a amamentação ou ordenha. Portanto, teoricamente, deveriam ser obtidas um total de 6 amostras de LCR e 6 amostras de sangue pareadas por animal a cada ordenha ou amamentação, porém, em alguns animais isso não foi possível devido ao fracasso na retirada de LCR em alguns momentos e/ou em alguns animais durante os 5 dias de colheita.

Com relação a colheita de plasma, foi realizado um pequeno experimento no qual a primeira colheita de plasma ocorreu dentro da baia das ovelhas – momento “baia” – e as outras colheitas ocorreram antes (-0,5 min) durante (0,5, 1 e 4 min) e após (10, 15 min) a amamentação ou ordenha, conforme o protocolo experimental. O objetivo desse pequeno experimento foi descartar a possibilidade das ovelhas já estarem liberando ocitocina antes mesmo do início da ordenha devido a algum estímulo sonoro ou visual. Para isso foi realizada uma comparação entre as

concentrações médias de ocitocina no momento “baia” e no momento “-0,5 min” antes do início da ordenha como mostra a **tabela 2**.

Tabela 2 - Estatística descritiva dos resultados da quantificação da concentração de ocitocina (pg/mL) das amostras de plasma no momento “baia” e momento “-0,5 min” de alguns animais, obtidos por ensaio imunoenzimático

Momento	N	Média	D.P.	C.V. (%)	Min.	Max.
Baia	27	478,28	197,54	41,30	92,74	822,56
-0,5 min	27	470,27	204,14	43,41	75,11	838,69

Não houve diferença estatística entre o momento “baia” e o momento “-0,5 min” ($P > 0,05$, segundo o Teste t de Student para Amostras Independentes), descartando a necessidade de se realizar a primeira colheita de plasma fora do canzil.

Para as colheitas de LCR através da cateterização do espaço subaracnóideo, foram utilizadas seringas descartável de 5 mL que foram conectadas ao adaptador do cateter epidural. As amostras de LCR foram então retiradas e armazenadas em *eppendorfs*, após o espaço morto do sistema ser descartado. Em média foi obtido 0,5 mL de LCR por amostra, quando essa foi possível de se realizar. Uma seringa descartável de 10 mL foi conectada ao scalp para a retirada de sangue. Todo o sistema de colheita de sangue foi previamente heparinizado e o volume morto do sistema foi descartado. Só então foram obtidas amostras de 6 mL de sangue que foram colocadas em tubos heparinizados *Falcon* de 10 mL. As amostras de sangue foram centrifugadas a 3000 g por 15 min, a 4° C aproximadamente 30 minutos após o fim da colheita do dia. O plasma foi transferido para *eppendorfs* previamente identificados sendo armazenados e congelados (-20° C).

Figura 11 – Colheita simultânea de LCR e sangue utilizando um cateter epidural (Portex® 16G) e um *scalp* (Solidor® 19G), respectivamente

3.3.5 Procedimentos para Dosagem de Ocitocina por Ensaio Imunoenzimático

As amostras foram analisadas no Laboratório de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina Veterinária da UNIFEOB – São João da Boa Vista. A quantificação da ocitocina foi realizada por meio de teste imunoenzimático. A reação cruzada do antisoro utilizado é de 100% para a ocitocina, 131% para mesotocina, 42,2% para vasotocina, 15,4% para OT-SH, 0,6% para vasopressina e inferior a 0,04% para as seguintes moléculas: GH, TRH e VIP. O limite de detecção do método é de 11,7 pg/mL e seus coeficientes de variação inter e intra-dosagens são respectivamente de 14,5% e 9,1% para concentrações de ocitocina de 19,3 a 21,4 pg/mL e de 12,4% e 5,2% para concentrações de ocitocina de 300 pg/mL.

3.3.5.1 O Kit de ELISA

O kit utilizado para quantificação imunoenzimática (ELISA) de ocitocina foi produzido pela Assay Designs®, empresa situada nos Estados Unidos e Canadá.

3.3.5.2 Itens fornecidos no Kit

- ✓ 5 microplacas impregnadas com anticorpo de cabra específico para IgG de coelho com 96 pocinhos cada uma;
- ✓ 1 frasco contendo 28mL de ocitocina conjugada à fosfatase alcalina (solução azul);
- ✓ 1 frasco contendo 28mL de anticorpo policlonal de coelho contra ocitocina (solução amarela);
- ✓ 1 frasco contendo 30mL de solução tampão concentrado contendo proteínas e sódio como preservativo;
- ✓ 1 frasco contendo 100mL de solução tampão concentrada para lavagem das microplacas;
- ✓ 3 frascos contendo 0,5mL de ocitocina padrão na concentração de 10,000 pg/mL;
- ✓ 1 frasco contendo 100mL de substrato a base de p-nitrophenyphosphate, pronta para usar;
- ✓ 1 frasco contendo 30mL de solução “stop” a base de fosfato trissódico;
- ✓ 5 adesivos para fechar as microplacas;
- ✓ 1 manual de instruções.

3.3.5.3 Itens necessários, mas não fornecidos

- ✓ Água deionizada;
- ✓ Pipetas de precisão para os volumes de 5 μ L e 1,000 μ L;

- ✓ Dispensadores para os volumes de 50 μ L e 200 μ L;
- ✓ Becker para diluir as soluções concentradas;
- ✓ Provetas graduadas;
- ✓ Papel absorvente (papel toalha);
- ✓ Leitora de microplacas, com filtro de 405 nm e correção entre 570 e 590 nm.

3.3.5.4 *Preparo dos reagentes*

1. Preparar a solução tampão diluindo 10mL de solução tampão concentrado em 90mL de água deionizada, que poderá ser estocado a temperatura ambiente por 3 meses.
2. Para preparar a curva padrão será usado 9 diluições diferentes da ocitocina concentrada que deverão estar dentro de pequenos tubos, como por exemplo *eppendorfs* de 2mL. Estes tubos deverão estar numerados de 1 à 9. Pipete 900 μ L da solução tampão preparada anteriormente e coloque dentro do tubo 01. Coloque 500 μ L da solução tampão dentro dos tubos 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08 e 09. Agora adicione 100 μ L de ocitocina concentrada (10,000 pg/mL) dentro do tubo 01. Mexa no vortex e depois pipete 500 μ L do tubo 01 e adicione no tubo 02. Mexa o tubo 02 no vortex e depois pipete 500 μ L do tubo 02 e adicione no tubo 03. Repita este procedimento até o tubo 09. Note que a concentração de ocitocina dentro do tubo 01 ao 09 são respectivamente 1,000; 500; 250; 125; 62,5; 31,5; 15,6; 7,8 e 3,9 pg/mL. Depois de preparada, a curva padrão deve ser utilizada em no máximo 60 minutos.
3. A ocitocina conjugada deve ser mantida a -20°C antes do seu uso. Para usá-la deve-se manter na temperatura de 4°C.
4. O preparo da solução de lavagem é feito diluindo 10mL de solução de lavagem concentrado em 190mL de água deionizada. Essa solução poderá ser armazenada por 3 meses em temperatura ambiente.

3.3.5.5 *Preparo da microplaca e leitura*

1. Todos os ensaios deverão ser realizados em duplicata;
2. Pipete 100µL da solução tampão concentrada e coloque nos pocinhos NSB e Bo (de E1 à H1);
3. Pipete 100µL de cada tubo da curva padrão (1-9), e coloque nos pocinhos apropriados (de A2 à B4);
4. Pipete 100µL das amostras de plasma ou LCR e coloque nos pocinhos apropriados (de C4 à H12);
5. Pipete 50µL da solução tampão concentrada e coloque dentro dos pocinhos NSB (E1 e F1);
6. Pipete 50µL do conjugado azul dentro de todos os 96 pocinhos, exceto nos pocinhos TA e Blank;
7. Pipete 50µL de anticorpo amarelo dentro de todos os 96 pocinhos, exceto nos pocinhos TA, Blank e NSB; Neste momento, note que todos os pocinhos deverão apresentar uma coloração esverdeada, exceto o NSB que deverá ficar azul e o Blank e TA deverão estar vazios até este momento.
8. Coloque o adesivo sobre a microplaca e movimente-a levemente. Incubar a microplaca por 18-24 horas à 4°C;
9. Após a incubação, esvaziar e lavar a microplaca, adicionando e retirando 400µL de solução de lavagem em cada pocinho. Repetir o procedimento para um total de 3 lavagens;
10. Após a lavagem, esvaziar os pocinhos e retirar o excesso com o papel toalha;
11. Pipete 5µL do conjugado azul e coloque dentro dos pocinhos TA (C1 e D1);
12. Pipete 200µL de substrato em todos os 96 pocinhos e incubar por 1 hora em temperatura ambiente, sem movimentar a microplaca;
13. Adicionar 50µL de solução "Stop" em todos os 96 pocinhos e ler a placa imediatamente em um leitor Imunoenzimático;
14. Utilizar a densidade óptica de 405nm, com correção entre 570nm e 590nm;
15. Após a leitura o programa irá informar a concentração de ocitocina em cada um dos pocinhos. O resultado será informado em pg/mL.

3.3.5.6 Validação do método imunoenzimático (curva de linearidade)

A validação do método para dosagem de ocitocina no LCR e no plasma foi realizada em comparação com a curva padrão (1.000 pg/mL a 3,9 pg/mL) por meio da demonstração das curvas de paralelismo e de dose-resposta (**Figura 12**). Para isso, foram utilizadas a curva padrão fornecida pelo kit e algumas amostras de LCR e plasma do experimento piloto.

Figura 12 – Curva de linearidade obtida utilizando-se 9 diluições de ocitocina padrão, quais sejam 1:1000; 1:500; 1:250; 1:125; 1:62,5; 1:31,2; 1:15,6; 1:7,8 e 1:3,9 pg/mL. O eixo “x” representa a concentração de ocitocina (pg/mL) e o eixo “y” representa os valores de absorvância numa escala de 0 a 100. Nessa curva o coeficiente de correlação é de 0,993

3.3.6 Padronização das Amamentações e Ordenhas Experimentais

Os procedimentos experimentais relacionados à amamentação e ordenhas foram adotados com base em estudos anteriores (NEGRÃO, 1996). Uma mesma equipe de ordenhadores realizou todas as ordenhas experimentais. A mesma rotina foi seguida a cada amamentação ou ordenha. O ordenhador colocou os copos das teteiras da ordenhadeira (**Figura 13**) nos tetos e aguardou por volta de 3 minutos

para retirá-las. No grupo experimental em que a ovelha foi submetida à amamentação exclusiva (AE), o mesmo procedimento foi realizado e no lugar da ordenha, o cordeiro realizou a sucção do teto da mãe. Tanto nos grupo “ordenha mecânica” e ordenha manual, quanto no grupo “AE”, o procedimento de ordenha e colheita de material foi realizado ovelha a ovelha, sendo que todas estavam dentro do canzil. Para uma melhor eficiência da ordenha mecânica durante os experimentos, foram realizados períodos de adaptação com duração de 20 dias. A adaptação das ovelhas foi realizada na fase final de gestação, possibilitando uma habituação das ovelhas com a sala de ordenha e ordenhadores.

Figura 13 – Ordenhadeira (WESTFALIA SURGE® Tipo Balde ao Pé) instalada na da Fazenda Escola da Faculdade de Medicina Veterinária da UNIFEOP

3.3.6.1 *Amamentação Exclusiva (AE)*

No manejo de ordenha AE, os cordeiros permaneceram todo o tempo com as mães até o 15º dias de vida. A partir do 16º dia foram separados das mães por volta das 18:00 h e foram levados a uma baia que se localiza distante da baia das ovelhas nas dependências da Fazenda Escola da UNIFEOB. No dia seguinte as ovelhas foram colocadas no canzil e ao invés de serem ordenhadas, elas receberam os filhotes que permaneceram ali mamando por volta de 4 minutos e depois tanto as ovelhas mães quanto os seus respectivos filhotes foram abrigados novamente na baia das ovelhas onde permaneceram até serem separados novamente as 18:00 h. Esse manejo se repetiu até o desmame do cordeiro que ocorreu com 60 dias de vida. Na baia, os cordeiros tiveram livre acesso à água, capim, sal mineral e farelo de milho.

3.3.6.2 *Ordenha Mecânica Exclusiva (OME)*

Neste grupo, os cordeiros após o nascimento, permaneceram durante 3 dias com as mães onde tiveram condições apropriadas para a ingestão completa de colostro. A partir do 4º dia, foram submetidos ao desmame precoce. Portanto, durante 57 dias, os cordeiros ficaram separados das mães e não tiveram mais contacto. No 4º dia após o nascimento, os filhotes foram separados das mães e levados a uma baia localizada nas dependências do Hospital Veterinário da UNIFEOB, com o objetivo de evitar qualquer contato entre mãe e cordeiro. Esta baia ofereceu a estes animais um maior conforto térmico, por serem fechadas com paredes que minimizaram a incidência de ventos laterais e também facilitou o manejo, pois se localiza mais próximo da Faculdade. O protocolo de alimentação desses cordeiros desmamados de forma precoce foi baseado na literatura atual. Segundo PUGH 2004, os cordeiros receberam mamadeiras com uma mistura de leite materno e substituto lácteo (Terneron ®) em quatro momentos distintos, sendo eles, as 08:00 h, 12:00 h, 16:00 h e as 19:00 h. Nesses períodos foram oferecidas mamadeiras com leite contendo em média 5% do peso vivo por mamadeira, levando

a 20 % do peso vivo no final das quatro mamadas. No período noturno (19:00 h até 08:00 h) foi disponibilizado na baia, baldes com 5 bicos para cordeiros (**Figura 14**) contendo somente o substituto lácteo que foi substituído a cada 12 horas. Diariamente foi disponibilizada, água fresca e silagem de milho misturado com concentrado a base de milho e farelo de soja.

Figura 14 – Balde mamadeira com 5 bicos para cordeiros desmamados precocemente

3.3.6.3 Manejo Misto – Amamentação e ordenha mecânica (MMom)

Após o nascimento, os cordeiros permaneceram durante 3 dias com as mães onde tiveram condições apropriadas para a ingestão completa de colostro. A partir do 4º dia, foram submetidos ao manejo misto que durou até 60 dias de vida, onde ocorreu a desmama do cordeiro. Portanto, durante 57 dias, os cordeiros foram separados das mães por volta das 18:00 h sendo levados a uma baia “creche” que se localizava distante da baia das ovelhas nas dependências da Fazenda Escola da UNIFEOD. No dia seguinte os cordeiros foram colocados novamente com suas respectivas mães por volta da 08h00min, onde permaneciam até as 18:00 h. As ovelhas, durante esses 57 dias, foram ordenhadas mecanicamente as 07:00 h possibilitando, portanto um manejo misto com amamentação e ordenha mecânica.

Na baia “creche”, os cordeiros tinham livre acesso à água, capim, sal mineral e farelo de milho.

3.3.6.4 Manejo Misto – Amamentação e ordenha manual (MMoma)

Após o nascimento, os cordeiros permaneceram durante 3 dias com as mães onde tiveram condições apropriadas para a ingestão completa de colostro. A partir do 4º dia, foram submetidos ao manejo misto que durou até 60 dias de vida, onde ocorreu a desmama do cordeiro. Portanto, durante 57 dias, os cordeiros foram separados das mães por volta das 18:00 h sendo levados a uma baia “creche” que se localizava distante da baia das ovelhas nas dependências da Fazenda Escola da UNIFEOB. No dia seguinte os cordeiros foram colocados novamente com suas respectivas mães por volta da 08h00min, onde permaneciam até as 18:00 h. As ovelhas, durante esses 57 dias, foram ordenhadas manualmente as 07:00 h possibilitando, portanto um manejo misto com amamentação e ordenha manual. Na baia “creche”, os cordeiros tinham livre acesso à água, capim, sal mineral e farelo de milho.

3.4 Análise Estatística

As concentrações de ocitocina e o ganho de peso dos cordeiros foram analisados por ANOVA usando o PROC GLM do programa SAS.

3.4.1 Concentrações de Ocitocina

Para avaliação das concentrações de ocitocina nos diferentes tipos de “tratamento”, “tipos de amostras”, “dias de colheita” e “momentos de colheita”, adotou-se o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijklm} = \mu + O_i + L_j + M_k + OL_{ij} + OM_{ik} + LM_{jk} + OLM_{ijk} + D_l + e_{ijklm}$$

em que,

Y_{ijkl} = é o valor observado para a concentração de ocitocina no animal $\underline{m}$, no dia $\underline{l}$, no momento $\underline{k}$, no tipo de amostra $\underline{j}$ e no tipo de ordenha $\underline{i}$;

μ = constante inerente a todas as observações;

O_i = é o efeito do i -ésimo tipo de tratamento, sendo $\underline{i}=1$ (AE), 2(OME), 3(MMom) e 4(MMoma);

L_j = é o efeito do j -ésimo tipos de amostras, sendo $\underline{j}=1$ (LCR) e 2(plasma);

M_k = é o efeito do k -ésimo momento de colheita, sendo $\underline{k}= 1$ (-0,5 min.), 2(0,5 min.), 3(1,0 min.), 4(4,0 min.), 5(10,0 min.) e 6(15,0 min.);

OL_{ij} = é o efeito da interação dupla do tipo de tratamento $\underline{i}$ com o tipo de amostra $\underline{j}$;

OM_{ik} = é o efeito da interação dupla do tipo de tratamento $\underline{i}$ com o momento de colheita $\underline{k}$;

LM_{jk} = é o efeito da interação dupla do tipo de amostra $\underline{j}$ com o momento de colheita $\underline{k}$;

OLM_{ijk} = é o efeito da interação tripla do tipo de tratamento $\underline{i}$ com o $\underline{j}$ e com o momento de colheita $\underline{k}$;

D_l = é o efeito do l -ésimo dia de colheita, sendo $\underline{l}=1$ (dia 1), 2(dia 2),..., 5(dia 5), incluído no modelo como efeito de bloco;

e_{ijklm} = é o erro aleatório associado ao valor observado para a concentração de ocitocina no animal $\underline{m}$, no dia $\underline{l}$, no momento $\underline{k}$, no tipo de amostra $\underline{j}$ e no tipo de tratamento $\underline{i}$.

Em virtude de ter sido verificado efeitos significativos para a fonte de variação interação dupla do tipo de tratamento com o tipo de amostra, foram realizados os desdobramentos da interação, visando estudar comportamento dos locais de colheita dentro de cada tipo de tratamento, bem como, o desdobramento para avaliar o tipos de tratamento dentro de cada tipo de amostra. Para avaliar os tipos de tratamento dentro de cada tipo de amostra, utilizou-se como procedimento de comparações múltiplas, o Teste t de Student. Essas análises foram realizadas, considerando os diferentes animais como efeitos aleatórios e com as particulares mensurações de ocitocina repetidas no tempo. Por outro lado, para avaliar os locais

de colheita dentro de cada tratamento, utilizou-se como procedimento de comparação somente o teste F , em virtude de nesse caso ser discriminatório.

3.4.2 Ganho de Peso dos Cordeiros

Para avaliação ganhos de peso dos cordeiros nos diferentes tipos de tratamento, adotou-se o modelo estatístico abaixo:

$$Y_{ijkl} = \mu + O_i + S_j + D_k + OS_{ij} + OD_{ik} + SD_{jk} + OSD_{ijk} + D_l + e_{ijkl}$$

em que,

Y_{ijkl} = é o valor observado para ganho de peso do animal l , no dia k , no sexo j e no tipo de tratamento i ;

μ = constante inerente a todas as observações;

O_i = é o efeito do i -ésimo tipo de tratamento, sendo $i=1$ (AE), 2(OME), 3(MMom) e 4(MMoma);

S_j = é o efeito do j -ésimo sexo do cordeiro, sendo $j=1$ (macho) e 2(fêmea);

D_k = é o efeito do k -ésimo dia de pesagem, sendo $k= 1$ (dia 1), 2(dia 7), 3(dia 15), 4(dia 30), 5(dia 45) e 6(dia 60);

OS_{ij} = é o efeito da interação dupla do tipo de tratamento i com o sexo do cordeiro j ;

OD_{ik} = é o efeito da interação dupla do tipo de tratamento i com o dia de pesagem k ;

SD_{jk} = é o efeito da interação dupla do sexo do cordeiro j com o dia de pesagem k ;

OSD_{ijk} = é o efeito da interação tripla do tipo de tratamento i com o sexo do cordeiro j e com o dia de pesagem k ;

e_{ijkl} = é o erro aleatório associado ao valor observado para ganho de peso do animal l , no dia k , no sexo j e no tipo de tratamento i .

Em virtude de ter sido verificado efeitos significativos para a fonte de variação interação dupla do tipo de tratamento com o dia de pesagem, foi realizado o desdobramento da interação, visando estudar o comportamento dos dias dentro de cada tipo de tratamento. Como o fator dia de pesagem é considerado um fator quantitativo, foram realizadas análises de regressão, visando obter a relação funcional entre a variação dos ganhos de pesos em cada tratamento em função da variação dos dias de pesagem.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

Figura 15 – Representação esquemática do período preparatório e experimental dos 4 grupos avaliados (AE, OME, MMom e MMoma)

Para a realização desse projeto de pesquisa, os animais foram divididos em 5 experimentos, sendo eles:

- **experimento 1:** quantificação da concentração de ocitocina no LCR e no plasma de ovelhas lactantes submetidas à AE;
- **experimento 2:** quantificação da concentração de ocitocina no LCR e no plasma de ovelhas lactantes submetidas à OME;
- **experimento 3:** quantificação da concentração de ocitocina no LCR e no plasma de ovelhas lactantes submetidas à MMom;
- **experimento 4:** quantificação da concentração de ocitocina no LCR e no plasma de ovelhas lactantes submetidas à MMoma;
- **experimento 5:** avaliação do ganho de peso diário de cordeiros filhos das ovelhas dos grupos AE, OME, MMom e MMoma.

Os resultados foram divididos em duas etapas: Etapa 1 (estatística descritiva) e Etapa 2 (estatística indutiva).

4.1 Etapa 1

Os resultados descritos na etapa 1 refere-se à estatística descritiva do projeto, ou seja, organização e descrição dos resultados encontrados em cada experimento.

4.1.1 Experimento 1: Quantificação da Concentração de Ocitocina no LCR e no Plasma de Ovelhas Lactantes Submetidas à AE

Foram utilizadas 05 ovelhas multíparas com 30 dias de lactação (± 5 dias) submetidas ao manejo AE conforme já descrito anteriormente nos procedimentos. As ovelhas foram cateterizadas e as amostras foram armazenadas e congeladas (-20°C) para posterior análise.

Como resultados do experimento 1, temos: número de amostras obtidas e valores das concentrações de ocitocina no LCR e no plasma.

4.1.1.1 Amostras obtidas

Ao final do experimento 1 foi possível coletar e analisar 60 amostras de LCR e 98 amostras de plasma. Conforme o protocolo de colheita proposto, a maior parte dessas amostras foram precisamente pareadas possibilitando uma análise futura da correlação entre ocitocina central e periférica.

4.1.1.2 Concentrações de ocitocina

As estimativas de média, desvio padrão, coeficiente de variação, mínimo, máximo e coeficiente de correlação para as concentrações de ocitocina no LCR e no plasma estão expressas na **tabela 3**. O coeficiente de correlação foi calculado apenas em amostras de LCR e Plasma que estavam pareadas.

Tabela 3 - Resultados da quantificação da concentração de ocitocina (pg/mL) das amostras de LCR e plasma das ovelhas do experimento 1 (AE) obtidos por ensaio imunoenzimático

Amostra	N	Média	D.P.	C.V. (%)	Min.	Max.	Coef. Correlação*
LCR	60	68,46	53,83	78,63	12,07	247,75	-0,19
Plasma	98	237,77	215,97	90,83	13,06	880,25	

* O coeficiente de correlação foi calculado utilizando-se apenas amostras de LCR e plasma pareadas

4.1.2 Experimento 2: Quantificação da Concentração de Ocitocina no LCR e no Plasma de Ovelhas Lactantes Submetidas à OME

Foram utilizadas 03 ovelhas multíparas com 30 dias de lactação (± 5 dias) submetidas ao manejo OME, conforme já descrito anteriormente nos procedimentos. As ovelhas foram cateterizadas e a colheita das amostras tanto de plasma como de LCR ocorreram conforme o esperado. As amostras foram armazenadas e congeladas (-20°C) para posterior análise.

Como resultados do experimento 2, temos: número de amostras obtidas e valores das concentrações de ocitocina no LCR e no plasma.

4.1.2.1 Amostras obtidas

Ao final do experimento 2 foi possível coletar e analisar 80 amostras de LCR e 89 amostras de plasma. Conforme o protocolo de colheita proposto, a maior parte dessas amostras foram precisamente pareadas possibilitando uma análise futura da correlação entre ocitocina central e periférica.

4.1.2.2 Concentrações de ocitocina

As estimativas de média, desvio padrão, coeficiente de variação, mínimo, máximo e coeficiente de correlação para as concentrações de ocitocina no LCR e no plasma estão expressas na **tabela 4**. O coeficiente de correlação foi calculado apenas em amostras de LCR e Plasma pareadas.

Tabela 4 - Resultados da quantificação da concentração de ocitocina (pg/mL) das amostras de LCR e plasma das ovelhas do experimento 2 (OME) obtidos por ensaio imunoenzimático

Amostra	N	Média	D.P.	C.V. (%)	Min.	Max.	Coef. Correlação*
LCR	80	45,00	27,41	60,91	14,65	138,51	-0,26
Plasma	89	375,42	189,97	50,60	75,11	874,37	

* O coeficiente de correlação foi calculado utilizando-se apenas amostras de LCR e plasma pareadas

4.1.3 Experimento 3: Quantificação da Concentração de Ocitocina no LCR e no Plasma de Ovelhas Lactantes Submetidas à MMom

Foram utilizadas 07 ovelhas multíparas com 30 dias de lactação (± 5 dias) submetidas ao manejo MMom, conforme já descrito anteriormente. As ovelhas foram cateterizadas e as amostras foram armazenadas e congeladas (-20°C) para posterior análise.

Como resultados do experimento 3, temos: número de amostras obtidas e valores das concentrações de ocitocina no LCR e no plasma.

4.1.3.1 Amostras obtidas

Ao final do experimento 3 foi possível coletar e analisar 39 amostras de LCR e 183 amostras de plasma. Conforme o protocolo de colheita proposto, a maior parte dessas amostras foram precisamente pareadas possibilitando uma análise futura da correlação entre ocitocina central e periférica.

4.1.3.2 Concentrações de ocitocina

As estimativas de média, desvio padrão, coeficiente de variação, mínimo, máximo e coeficiente de correlação para as concentrações de ocitocina no LCR e no plasma estão expressas na **tabela 5**. O coeficiente de correlação foi calculado apenas em amostras de LCR e Plasma que estavam pareadas.

Tabela 5 - Resultados da quantificação da concentração de ocitocina (pg/mL) das amostras de LCR e plasma das ovelhas do experimento 3 (MMom) obtidos por ensaio imunoenzimático

Amostra	N	Média	D.P.	C.V. (%)	Min.	Max.	Coef. Correlação *
LCR	39	44,40	21,84	49,19	12,59	132,90	0,05
Plasma	183	326,33	282,88	86,69	21,15	982,98	

* O coeficiente de correlação foi calculado utilizando-se apenas amostras de LCR e plasma pareadas

4.1.4 Experimento 4: Quantificação da Concentração de Ocitocina no LCR e no Plasma de Ovelhas Lactantes Submetidas à MMoma

Foram utilizadas 02 ovelhas multíparas com 30 dias de lactação (± 5 dias) submetidas ao manejo MMoma, conforme já descrito anteriormente. As ovelhas foram cateterizadas e as amostras foram armazenadas e congeladas (-20°C) para posterior análise.

Como resultados do experimento 4, temos: número de amostras obtidas e valores das concentrações de ocitocina no LCR e no plasma.

4.1.4.1 Amostras obtidas

Ao final do experimento 4 foi possível coletar e analisar 41 amostras de LCR e 45 amostras de plasma. Conforme o protocolo de colheita proposto, a maior parte dessas amostras foram precisamente pareadas possibilitando uma análise futura da correlação entre ocitocina central e periférica.

4.1.4.2 Concentrações de ocitocina

As estimativas de média, desvio padrão, coeficiente de variação, mínimo, máximo e coeficiente de correlação para as concentrações de ocitocina no LCR e no plasma estão expressas na **tabela 6**. O coeficiente de correlação foi calculado apenas em amostras de LCR e Plasma que estavam pareadas.

Tabela 6 - Resultados da quantificação da concentração de ocitocina (pg/ml) das amostras de LCR e plasma das ovelhas do experimento 4 (MMoma) obtidos por ensaio imunoenzimático

Amostra	N	Média	D.P.	C.V. (%)	Min.	Max.	Coef. Correlação *
LCR	41	33,31	20,21	60,67	12,78	81,37	0,04
Plasma	45	579,40	109,91	18,97	361,99	838,69	

* O coeficiente de correlação foi calculado utilizando-se apenas amostras de LCR e plasma pareadas

4.1.5 Experimento 5: Avaliação do Ganho de Peso Diário de Cordeiros Filhos das Ovelhas dos Grupos AE, OME, MMom e MMoma

Foram utilizados 33 cordeiros divididos em 4 grupos experimentais (AE, OME, MMom e MMoma) submetidos a pesagem diária do nascimento até o desmame com 60 dias de vida.

Como resultados do experimento 5, temos a avaliação do ganho de peso diário dos cordeiros em cada tratamento.

4.1.5.1 Avaliação do ganho de peso diário de cordeiros filhos das ovelhas do grupo AE

Nesse grupo de ovelhas foram acompanhados 06 filhotes com peso médio ao nascimento de 3197,00 g com o objetivo de avaliar quaisquer interferências dos procedimentos experimentais sobre o desenvolvimento dos cordeiros. As pesagens foram realizadas durante 60 dias consecutivos no período da manhã com o auxílio de uma balança digital. As estimativas de média de peso e desvio padrão nas semanas 01, 05 e 09 foram, respectivamente: $3469,29 \pm 267,36$; $7894,29 \pm 305,72$ e $11760,00 \pm 243,23$. A **figura 16** representa a curva de ganho de peso diário desses cordeiros durante os 60 dias de pesagem.

Figura 16 – Peso diário (g) de cordeiros filhos de ovelhas do grupo amamentação exclusiva (AE), do nascimento até o 60º dia de vida. Média de peso $\pm$ desvio padrão

4.1.5.2 Avaliação do ganho de peso diário de cordeiros filhos das ovelhas do grupo OME

Nesse grupo de ovelhas foram acompanhados 10 filhotes com peso médio ao nascimento de 3350,00 g com o objetivo de avaliar quaisquer interferências dos procedimentos experimentais sobre o desenvolvimento dos cordeiros. As pesagens

foram realizadas durante 60 dias consecutivos no período da manhã com o auxílio de uma balança digital. As estimativas de média de peso e desvio padrão nas semanas 01, 05 e 09 foram, respectivamente: $3726,79 \pm 79,82$; $5113,21 \pm 42,13$ e $9645,63 \pm 60,60$. A **figura 17** representa a curva de ganho de peso diário desses cordeiros durante os 60 dias de pesagem.

Figura 17 – Peso diário (g) de cordeiros filhotes de ovelhas do grupo ordenha mecânica exclusiva (OME), do nascimento até o 60º dia de vida. Média de peso $\pm$ desvio padrão

4.1.5.3 Avaliação do ganho de peso diário de cordeiros filhotes das ovelhas do grupo MMom

Nesse grupo de ovelhas foram acompanhados 10 filhotes com peso médio ao nascimento de 3304,00 g com o objetivo de avaliar quaisquer interferências dos procedimentos experimentais sobre o desenvolvimento dos cordeiros. As pesagens foram realizadas durante 60 dias consecutivos no período da manhã com o auxílio de uma balança digital. As estimativas de média de peso e desvio padrão nas semanas 01, 05 e 09 foram, respectivamente: $3578,29 \pm 263,15$; $7412,57 \pm 373,69$ e $12223,00 \pm 370,60$. A **figura 18** representa a curva de ganho de peso diário desses cordeiros durante os 60 dias de pesagem.

Figura 18 – Peso diário (g) de cordeiros filhotes de ovelhas do grupo manejo misto (MMom), do nascimento até o 60º dia de vida. Média de peso $\pm$ desvio padrão.

4.1.5.4 Avaliação do ganho de peso diário de cordeiros filhotes das ovelhas do grupo MMoma

Nesse grupo de ovelhas foram acompanhados 07 filhotes com peso médio ao nascimento de 3709,00 g com o objetivo de avaliar quaisquer interferências dos procedimentos experimentais sobre o desenvolvimento dos cordeiros. As pesagens foram realizadas durante 60 dias consecutivos no período da manhã com o auxílio de uma balança digital. As estimativas de média de peso e desvio padrão nas semanas 01, 05 e 09 foram, respectivamente: $4026,12 \pm 280,43$; $7920,82 \pm 323,89$ e $11656,43 \pm 240,75$. A **figura 19** representa a curva de ganho de peso diário desses cordeiros durante os 60 dias de pesagem.

Figura 19 – Peso diário (g) de cordeiros filhotes de ovelhas do grupo manejo misto (MMoma), do nascimento até o 60º dia de vida. Média de peso $\pm$ desvio padrão

4.2 Etapa 2

Os resultados descritos na etapa 2 refere-se a estatística indutiva do projeto, ou seja, resultados obtidos por meio de análises e interpretações.

4.2.1 Análises das Concentrações de Ocitocina Considerando os Diferentes Tratamentos Avaliados

Para a realização da análise estatística foram utilizados somente animais com pelo menos dois dias de colheita e com amostras tanto de LCR quanto de plasma.

As estimativas de média, desvio padrão, coeficiente de variação, mínimo e máximo para as concentrações de ocitocina dos animais analisados foram $257,880 \pm 265,906$ pg/ml, 103,112%, 11,700 pg/ml e 1000,000 pg/ml, respectivamente.

O resumo da análise de variância para as concentrações de ocitocina está expresso na tabela 7

Tabela 7 - Resumo da análise de variância para as concentrações de ocitocina

Fonte de Variação	GL	GL _{RES}	F _{calc}	Pr>F	
Dia	4	30	0,76	0.5615	n.s.
Tratamento (TRAT)	3	6	20,63	0.0015	*
Tipo de amostra (TA)	1	6	566,50	<.0001	**
Momento (MOM)	5	30	2,30	0.0693	n.s.
Interação TRAT x TA	3	6	39,01	0.0002	*
Interação TRAT x MOM	15	30	0,60	0.8554	n.s.
Interação TA x MOM	5	30	1,87	0.1298	n.s.
Interação TRAT x TA x MOM	15	30	0,88	0.5898	n.s.

n.s. = $P > 0,05$ (resultado não-significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F);

* = $P < 0,05$ (resultado significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F);

** = $P < 0,01$ (resultado significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F).

Através da **tabela 7**, verifica-se que as fontes de variação “Dia” e “Momento” foram não-significativas ($P > 0,05$), assim como as interações “TRAT x MOM”, “TA x MOM” e “TRAT x TA x MOM” também não foram significativas. Por outro lado, a interação “TRAT x TA” foi significativa ($P < 0,05$) indicando a existência de dependência dos locais de colheita nos diferentes tratamentos utilizados. O resumo do desdobramento da Interação “TRAT x TA” encontra-se na **tabela 8**.

Tabela 8 - Resumo do desdobramento da Interação TRAT x TA

Fonte de Variação	GL	GL _{RES}	F _{calc}	Pr>F	
TRAT/ LCR	3	6	0,63	0.63	n.s.
TRAT/PLASMA	3	6	61,77	<.0001	**

** = $P < 0,01$ (resultado significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F);

n.s. = $P > 0,05$ (resultado não-significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F).

Por meio da **tabela 8**, verifica-se que os tratamentos dentro do tipo de amostra “Plasma” teve resultado significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F e, portanto, existem diferenças ao se comparar às concentrações plasmáticas de ocitocina nos quatro tratamentos testados (OME, AE, MMom e

MMoma). Já para o efeito de tratamento dentro do tipo de amostra “LCR” verificou-se resultado não-significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F. Portanto não existência de diferenças estatísticas ao se comparar as concentrações de ocitocina presentes no LCR nos quatro tratamentos testados (OME, AE, MMom e MMoma). O resumo do desdobramento da Interação “TA x TRAT” encontra-se na **tabela 9**.

Tabela 9 - Resumo do desdobramento da Interação TA x TRAT

Fonte de Variação	GL	GL _{RES}	F _{calc}	Pr>F	
TA/AE	1	6	18,34	0,0052	**
TA/OME	1	6	127,73	<.0001	**
TA/Mmom	1	6	331,06	<.0001	**
TA/MMoma	1	6	194,05	<.0001	**

** = P< 0,01 (resultado significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F);

Por meio da **tabela 9**, verifica-se que os locais de colheita dentro dos 4 tratamentos testados apresentaram resultados significativos ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F e, portanto, existe diferenças ao se comparar as concentrações plasmáticas com as concentrações de ocitocina presentes no LCR em cada tratamento testado (OME, AE, MMom e MMoma). As estimativas de médias de quadrados mínimos para as concentrações de ocitocina, de acordo com o tipo de amostra dentro de cada tratamento, encontram-se na **tabela 10**.

Tabela 10 - Estimativas de médias de quadrados mínimos para as concentrações de ocitocina, de acordo com o tipo de amostra dentro de cada tratamento avaliado

Tratamento				LCR	Plasma
Manejo	Misto	ordenha	Mecânica	60,87 a,B	679,80 a,A
(MMom)					
Manejo Misto ordenha Manual (MMoma)				40,17 a,B	591,82 a,A
Ordenha Mecânica Exclusiva (OME)				19,10 a,B	381,04 b,A
Amamentação Exclusiva (AE)				10,32 a,B	218,82 c,A

Médias em uma mesma coluna e seguidas por pelo menos uma mesma letra minúscula, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste t de Student;

Médias em uma mesma linha e seguidas por uma mesma letra maiúscula, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

Conforme se verifica na **tabela 10** e **figura 20**, os níveis das concentrações de ocitocina no plasma apresentaram diferenças estatisticamente significativa para os tratamentos avaliados. Os animais do grupo MMom e MMoma foram os de maiores estimativas de concentrações de ocitocina no plasma, diferindo do grupo OME, o qual apresentou estimativa intermediária de concentração de ocitocina plasmática. O grupo AE mostrou-se o de menor estimativa de concentração de ocitocina no plasma. Entretanto, para o LCR, as concentrações de ocitocina não diferiram entre si para os tratamentos avaliados. Com relação ao tipo de amostra, em todos os tratamentos testados, houve diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações de ocitocina plasmáticas e concentrações de ocitocina presente no LCR.

Figura 20 – Concentrações de ocitocina (pg/ml) de acordo com o tipo de amostra dentro de cada tratamento avaliado (AE, OME, MMom e MMoma). Média $\pm$ desvio padrão

4.2.2 Análise do Ganho de Peso dos Cordeiros Considerando os Diferentes Tratamentos Avaliados

Para a realização da análise estatística do ganho de peso dos cordeiros dentro dos diferentes tipos de tratamentos (AE, OME, MMom e MMoma), foi utilizado os pesos referente aos dias 1, 7, 15, 30, 45 e 60 após o nascimento (6 dias de pesagem), o que resultou em 186 amostras de peso.

As estimativas de média, desvio padrão, coeficiente de variação, mínimo e máximo para os pesos dos cordeiros analisados foram $6653,0645 \pm 3582,8745$ g, 53,85 %, 1000,0000 g e 17900,0000 g, respectivamente.

O resumo da análise de variância para os pesos dos cordeiros analisados esta expresso na **tabela 11**.

Tabela 11 - Resumo da análise de variância para os pesos dos cordeiros

Fonte de Variação	GL	GL _{res}	F _{cal}	Valor de F	
Sexo	1	23	1,53	0.2287	n.s.
Tratamento (TRAT)	3	23	0,73	0.5462	n.s.
Dia (1, 7, 15, 30, 45 e 60)	5	115	172,54	<.0001	**
Interação Sexo x TRAT	3	23	1,12	0.3596	n.s.
Interação Sexo x Dia	5	115	1,52	0.1903	n.s.
Interação TRAT x Dia	15	115	3,00	0.0004	**
Interação Sexo x TRAT x Dia	15	115	0,82	0.6485	n.s.

n.s. = $P > 0,05$ (resultado não-significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F);

** = $P < 0,01$ (resultado significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F).

Através da **tabela 11**, verifica-se que as fontes de variação “Sexo” e “TRAT” foram não-significativas ($P > 0,05$), assim como as interações “Sexo x TRAT”, “Sexo x Dia” e “Sexo x TRAT x Dia” também não foram significativas. Por outro lado, a interação “TRAT x Dia” foi significativa ($P < 0,05$) indicando a existência de dependência dos tratamentos em relação aos dias de pesagem dos animais (1, 7, 15, 30, 45 e 60). Este fato implica em respostas diferenciadas nos ganhos de peso dos cordeiros dentro dos diferentes tratamentos avaliados. O resumo do desdobramento da Interação “TRAT x Dia” encontra-se na **tabela 12**.

Tabela 12 - Resumo do desdobramento da Interação TRAT x Dia

Tratamentos	Equações de predição para os ganhos de peso	
Mmom	$Y_{MMom} = 2982,20 + 161,70X$	a
AE	$Y_{AE} = 3077,90 + 148,90X$	a
Mmoma	$Y_{MMoma} = 3593,50 + 138,10X$	a b
OME	$Y_{OME} = 2998,80 + 117,60X$	b

Equações seguidas por pelo menos uma mesma letra, não diferem entre si pela análise de regressão por meio de um modelo linear de 1º grau.

Por meio da **tabela 12** e **figura 21**, verifica-se que a melhor equação para explicar a dependência dos tratamentos em relação aos dias de pesagem dos

animais é o modelo linear de 1º Grau, onde o modelo estatístico para esta situação é: $Y_i = \beta_0 + \beta_1 x_i + e_i$ em que:

Y_i = valor observado para a variável dependente Y (peso em gramas) no i-ésimo nível da variável independente x (dia da pesagem).

β_0 = constante de regressão. Representa o intercepto da reta com o eixo dos Y.

β_1 = coeficiente de regressão. Representa a variação de Y (peso em gramas) em função da variação de uma unidade da variável x.

x_i = i-ésimo nível da variável independente x ($i = 1, 2, \dots, n$).

e_i = é o erro que está associado à distância entre o valor observado Y_i e o correspondente ponto na curva, do modelo proposto, para o mesmo nível i de x.

Figura 21 – Pesos médios (g) dos cordeiros dentro de cada tratamento avaliado (AE, MMoma, MMom e OME), ao longo de 60 dias de pesagem, obtidos por meio de um modelo linear de 1º Grau.

De acordo com a **tabela 13**, verifica-se que o contraste entre o β_1 do tratamento AE com o β_1 do tratamento MMom foi não-significativo ($P > 0,05$), assim como os contrastes de β_1 entre os tratamentos AE x MMoma, OME x MMoma e MMom x MMoma também não foram significativos, indicando não diferença entre esses contrastes testados com relação ao ganho de peso dos cordeiros ao longo dos

primeiros 60 dias de vida . Por outro lado, o contraste entre o β_1 do tratamento AE com o β_1 do tratamento OME foi significativo ($P < 0,05$) indicando superioridade no ganho de peso os cordeiros do tratamento AE comparados aos cordeiros do tratamento OME. O mesmo ocorreu com o contraste entre o β_1 do tratamento OME com o β_1 do tratamento MMom que foi significativo ($P < 0,01$) indicando superioridade no ganho de peso os cordeiros do tratamento MMom comparados aos cordeiros do tratamento OME.

Tabela 13 - Estimativas de β_1 para as equações lineares de 1º Grau, de acordo com o tratamento avaliado

Contrastes entre os Coeficientes de Regressão	GL _{RES}	F _{calc}	Pr>F
β_{1AE} <i>versus</i> β_{1OME}	151	4,00	0,0472 *
β_{1AE} <i>versus</i> β_{1MMom}	151	0,72	0,3963 ns
β_{1AE} <i>versus</i> β_{1MMoma}	151	0,45	0,5019 ns
β_{1OME} <i>versus</i> β_{1MMom}	151	10,26	0,0017 **
β_{1OME} <i>versus</i> β_{1MMoma}	151	0,45	0,5019 ns
β_{1MMom} <i>versus</i> β_{1MMoma}	151	2,73	0,1008 ns

n.s. = $P > 0,05$ (resultado não-significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F);

* = $P < 0,05$ (resultado significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F);

** = $P < 0,01$ (resultado significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F).

5 DISCUSSÃO

Os resultados nos mostram que é possível quantificar a ocitocina no LCR, assim como tem-se realizado no plasma (NEGRÃO et al., 2001; NEGRÃO; MARNET, 2003), de forma que foi possível fazer a comparação entre os padrões de secreção central e periférica do hormônio durante a ordenha e verificar que a ocitocina central não se comporta como a periférica, i.e., não observa-se variações na liberação do hormônio em função do manejo de ordenha, sendo estas observações inéditas na literatura atual.

A quantificação das concentrações de ocitocina pelo método imunoenzimático nos revelou que as concentrações de ocitocina encontradas no plasma foram em sua totalidade superiores do que aquelas presentes no LCR, independente do tratamento adotado. Esse resultado está de acordo com a literatura, uma vez que é bem conhecido que a maior parte desse hormônio é produzida principalmente no núcleo paraventricular do hipotálamo, sendo transportado dos neurônios magnocelulares direto para a neurohipófise (GUYTON, 1992; WAGNER et al., 1997; MIRCIC et al., 1998), a qual será responsável pela sua secreção na corrente circulatória em repostas a estímulos definidos. Esse fato implica em uma superioridade da concentração de ocitocina periférica comparada com a ocitocina presente no sistema nervoso central como já mencionado anteriormente. Por outro lado, há relatos de outras áreas do SNC que podem secretar ocitocina independente da neurohipófise (INSEL 1990; GOULD; ZINGG, 2003), sendo que essa ocitocina estaria atuando como um neurotransmissor, interagindo com receptores centrais de ocitocina (GOULD; ZINGG, 2003) relacionado principalmente com o comportamento materno (LÉVY et al., 1995; FLEMMING et al., 1999; KENDRICK, 2000) e relações sociais (KENDRICK, 2000; HOLLANDER et al., 2006) e, portanto, ainda assim, se apresente em concentrações menores do que as plasmáticas. Por outro lado, a melatonina ao ser secretada a partir da glândula pineal, pode ser encontrada em diferentes concentrações de acordo com o ventrículo cerebral estudado (LONGATTI et al., 2007) e, embora a melatonina não atue como neurotransmissor como é o caso da ocitocina central, pode ser possível que em determinados momentos, i.e., frente a um estímulo específico para liberação de ocitocina, esta possa também ser encontrada em concentrações diferentes em cada ventrículo de acordo com a

proximidade entre a área cerebral e o ventrículo em si. Desta forma, poderia-se pensar que as concentrações por nós obtidas foram diluídas ao longo do trajeto a partir do ventrículo específico, possivelmente o 3º ventrículo, até o local de coleta, ao nível das porções iniciais da medula espinal, levando a um mascaramento de quaisquer oscilações pontuais relacionadas a ordenha.

É importante salientar ainda, que os órgãos-alvos da ocitocina liberada pela neurohipófise não se restringem somente ao útero e glândula mamária (HAFEZ, 1988; SWENSON, 1984; GUYTON, 1992), mas a ocitocina também está envolvida com o desenvolvimento de folículos ovarianos (JO e FORTUNE, 2003) e pode ainda ser relacionada ao sistema imune (MIRCIC et al., 1998), o que explicaria a necessidade de se apresentar periféricamente em quantidades superiores ao sistema nervoso central.

Com relação ao dias de coleta, não houve diferença estatística entre as concentrações de ocitocina encontradas nos diferentes dias (dia 1 ao dia 5), sugerindo que o padrão de liberação de ocitocina em nossas condições foi sempre o mesmo. Esse resultado está de acordo com a literatura, pois as ovelhas foram cateterizadas por volta de 30 dias pós-parto, quando as concentrações plasmáticas de ocitocina já são significativas (NEGRÃO et al., 2001; NEGRÃO; MARNET, 2003), e devem permanecer em níveis altos até o final da lactação (NEGRÃO; MARNET, 2002).

Em relação aos momentos de colheita tanto de plasma como de LCR, não houve diferença significativa entre as concentrações de ocitocina presente nos diferentes momentos (antes (-0,5 min), durante (0,5; 1 e 4 min) e após (10; 15 min) a amamentação ou ordenha). Esse resultado relacionado a ocitocina presente no LCR ainda é desconhecido. Por outro lado, a falta de diferenças entre as concentrações plasmáticas de ocitocina não era esperada (GOREWIT et al., 1992; MARNET et al., 1998; CUNNINGHAM, 1999). Possivelmente ocorreu uma inibição do pico de ocitocina em decorrência a um estresse experimental indesejado, lembrando que picos de catecolaminas, cortisol e substâncias opiáceas podem comprometer e prejudicar tanto a ejeção de leite como a produção e liberação de ocitocina (TANCIN et al., 1995; MARNET NEGRÃO, 2000).

Quando verificamos o comportamento da ocitocina plasmática diante dos diferentes tipos de manejo de ordenha testados, temos que os grupos MMom e MMoma foram os de maiores concentrações de ocitocina, diferindo do grupo OME, o qual

apresentou concentração intermediária de ocitocina plasmática, enquanto o grupo AE, mostrou-se o de menor concentração de ocitocina no plasma. Neste sentido, tem-se demonstrado que a liberação de ocitocina pode sofrer influência do tipo de estímulo, seja este a sucção exercida pelo filhote ou a ordenha mecânica (MARNET; NEGRÃO, 2000; VAN RENEEN et al., 2002), interferindo na ejeção do leite alveolar e na produção de leite (MARNET et al., 1998, WEISS et al., 2003).

No manejo misto, no qual as fêmeas podem amamentar por parte do dia, a quantidade de leite produzido aumenta em função de uma melhor ejeção nestas condições, pois o estímulo exercido pela sucção do cordeiro e a interação materno-filial são sempre mais potentes do que a ordenha mecânica em aumentar a secreção de ocitocina plasmática, interferindo desta forma sobre a produção de leite (MARNET; NEGRÃO, 2000). Este fato justifica a superioridade das concentrações de ocitocina plasmática dos grupos MMom e MMoma com relação ao grupo OME, o qual apresentou concentração intermediária de ocitocina plasmática. Por outro lado, o mesmo não se aplica com o grupo AE, no qual as fêmeas, supostamente, deveriam apresentar as maiores concentrações de ocitocina plasmática por terem amamentado de forma exclusiva os seus filhotes e mostraram-se com a de menor concentrações de ocitocina no plasma. Isso poderia ser explicado pelo fato dos cordeiros não terem estimulado a glândula mamária de forma eficaz durante a mamada experimental, já que eram submetidos, apesar de terem sido adaptados, a uma situação que parece não ter favorecido liberações fisiológicas do hormônio, novamente observando-se inibição em consequência ao estresse experimental.

Com relação ao LCR, as concentrações de ocitocina não diferiram entre si para os tratamentos avaliados, ou seja, independente do tipo de manejo utilizado, as estimativas das concentrações de ocitocina encontradas em todos os grupos foram estatisticamente iguais, indicando que o manejo de ordenha não modifica a liberação central de ocitocina. As vias de estímulo para a liberação da ocitocina central parecem não sofrer influência do tipo de manejo de ordenha adotado, e sim de outros estímulos, como os olfativos (FLANAGAN et al., 1993).

Os resultados demonstram ainda uma correlação entre ocitocina central e a plasmática muito baixa, fato que está de acordo com alguns autores que não estabelecem relações entre as concentrações de ocitocina presente no LCR e no plasma (JONES et al., 1983; MORRIS et al., 1984). Por outro lado, mais recentemente, outros autores têm sugerido uma possível inter-relação entre a

ocitocina central e periférica (KENDRICK et al., 1997; KENDRICK, 2000; LIPSCHITZ et al., 2003), não observada em nossos experimentos.

Com relação à pesagem diária dos cordeiros, os resultados demonstram que o tipo de manejo de ordenha/amamentação adotado nos diferentes grupos experimentais interfere no ganho de peso dos animais no que diz respeito ao acompanhamento diário de pesagens. Este fato implica em respostas diferenciadas em relação ao ganho de peso dos cordeiros dentro dos diferentes tratamentos avaliados, mesmo não sendo observadas diferenças significante em relação ao peso inicial e final dos cordeiros, ou seja, os 4 grupos de cordeiros partiram de um mesmo peso médio inicial e atingiram o mesmo peso médio final ao desmame, porém a curva de crescimento se comporta de maneira diferente de acordo com o tipo de manejo adotado, revelando uma superioridade dos grupos MMom, MMoma e AE em relação ao OME.

Nos grupos MMom e MMoma, nos quais foi adotado o manejo misto, os cordeiros tiveram um ganho de peso diferenciado, ganhando peso mais precocemente, possivelmente devido a maior ingestão de leite, já que nesse tipo de manejo ocorre um aumento da quantidade de leite produzido pelas ovelhas em função de uma melhor ejeção (MARNET; NEGRÃO, 2000). Além disso, a interação materno-filial pode ter estimulado o comportamento maternal (Levy et al., 2004) e conseqüentemente melhorado a ingestão de leite, quer por frequência de amamentações, quer por quantidade ingerida. Neste mesmo sentido, caminhou o grupo AE, onde os cordeiros possivelmente apresentaram uma maior ingestão láctea devido à exclusividade da amamentação. Curiosamente, o ganho de peso nos cordeiros submetidos à AE não apresentaram curvas de crescimento superiores aos grupos MMom e MMoma, que cujas mães também foram ordenhadas. Esse fato pode implicar uma superioridade do manejo misto em comparação a amamentação exclusiva, sendo possível que haja uma soma de efeitos, ou seja, o estímulo da ordenha somada ao estímulo da amamentação. Por outro lado, segundo PUGH 2004, caso a produção láctea seja insuficiente, os cordeiros poderiam compensar sua dieta aumentando o consumo de alimentos sólidos disponíveis na baia. No entanto, como a digestibilidade desses alimentos é menor do que a do leite, os animais lactantes acabam não consumindo quantidade suficiente de alimento para suprir a carência de leite e, portanto, poderiam apresentar taxa de crescimento até abaixo do normal. No entanto, o fato desses cordeiros entrarem em contato mais

precocemente com alimentos sólidos (OLIVEIRA et al., 2007), parece ser suficiente para estimular a formação precoce do rúmen, e, portanto, melhorar o ganho de peso nos grupos de manejo misto, somado ao fato de que possivelmente esses cordeiros consumiram leite materno em quantidade semelhante aos cordeiros da amamentação exclusiva.

Já para o grupo OME, o qual apresentou-se como o de menor ganho de peso durante os intervalos de pesagens, como já esperado, pois um desmame precoce no quarto dia de vida tem como consequência a necessidade de adaptar os cordeiros a amamentação artificial. Essa situação propiciou aparentemente a inferioridade no ganho de peso nesse grupo de animais. Poucos experimentos têm sido realizados para demonstrar a viabilidade do desmame precoce em relação ao desenvolvimento dos filhotes (LOBATO et al., 2007). Sendo assim, é difícil atribuir quais fatores poderiam ter influenciado no ganho de peso dos cordeiros ao decorrer dos dias de pesagens no grupo OME. Por outro lado, é importante ressaltar que mesmo as ovelhas do grupo OME terem permanecido somente por 3 dias pós-parto junto com sua prole, esse período possivelmente foi suficiente para gerar o reconhecimento materno-filial e a ausência da mãe após esse período de contato inicial pode ter gerado um estresse prolongado, influenciando negativamente no ganho de peso dos filhotes, já que em cabras e em ovelhas, alguns minutos de contato garantem a ativação do comportamento materno-filial, mantendo-se mesmo após uma separação forçada; o vínculo é individualizado e estabelecido por experiências vividas durante a gestação, o parto e os contatos iniciais com as crias (POIDRON; LÉVY, 1990; COSTA; CROMBERG, 1998).

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados, pode-se concluir que:

- ✓ O ensaio imunoenzimático utilizado foi capaz de quantificar ocitocina tanto no LCR como no plasma;
- ✓ O método para a cateterização do espaço subaracnóideo apresentou-se como método viável e eficaz para obtenção contínua de LCR por períodos prolongados;
- ✓ O procedimento experimental adotado pode ter influenciado e ocultado os picos ocitocinérgicos plasmáticos e no LCR, em consequência do estresse associado;
- ✓ As concentrações médias de ocitocina encontradas no plasma foram maiores do que aquelas presentes no LCR, independente do tratamento adotado;
- ✓ A liberação de ocitocina plasmática pode sofrer influência do tipo de estímulo, seja este a sucção exercida pelo filhote ou a ordenha mecânica;
- ✓ Não existiu uma correlação positiva significativa entre a ocitocina presente no LCR e a plasmática;
- ✓ As concentrações de ocitocina presente no LCR não variaram em decorrência dos diferentes momentos, dias de colheita e nem dos diferentes tratamentos estudados, i.e., o manejo de ordenha não modificou a liberação central de ocitocina;
- ✓ O tipo de manejo de ordenha/amamentação modificou a resposta em relação ao ganho de peso dos cordeiros, sem interferir no peso final de desmame;
- ✓ O manejo misto pode ser utilizado sem que ocorra comprometimento do desenvolvimento dos filhotes;
- ✓ O desmame precoce pode influenciar negativamente na curva de crescimento dos cordeiros;

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ADAN, R. A.; COX, J. J.; BEISCHLAG, T. V.; BURBACH, J. P. A composite hormone response element mediates the transactivation of the rat oxytocin gene by different classes of nuclear hormone receptors. **Molecular Endocrinology**, v. 7, n. 1, p. 47-57, 1993.

ADAN, R. A.; VAN LEEUWEN, F. W.; SONNEMANS, M. A.; BROUNS, M.; HOFFMAN, G.; VERBALIS, J. G.; BURBACH, J. P. Rat oxytocin receptor in brain, pituitary, mammary gland, and uterus: partial sequence and immunocytochemical localization. **Endocrinology**, v. 136, n. 9, p. 4022-4028, 1995.

AMICO, J. A.; RAUK, P. N.; CAI, H. Estradiol and progesterone regulate oxytocin receptor binding and expression in human breast cancer cell lines. **Endocrine**, v. 18, n. 1, p. 79-84, 2002.

BAOKWSKA, J. C.; MORRELL, J. I. Quantitative autoradiographic analysis of D1 and D2 dopamine receptors in rat brain in early and late pregnancy. **Brain Research**, v. 703, n. 1-2, p. 191-200, 1995.

BAR-PELED, U.; MALTZ, E.; BRUCKENTAL, L.; FOLMAN, Y.; KALI, Y.; GACITUA, H.; LEHRER, A. R.; KNIGHT, C. H.; ROBINSON, B.; VOET, H.; TAGARI, H. Relationships between frequent milking or suckling in early lactation and milk production of high producing dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 78, p. 2726-2736, 1995.

BLANKS, A. M.; THORNTON, S. The role of oxytocin in parturition. **British Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 110, n. 20, p. 46-51, 2003.

BOGACKI, M.; SILVIA, W. J.; REKAWIECKI, R.; KOTWICA, J. Direct inhibitory effect of progesterone on oxytocin-induced secretion of prostaglandin F (2alpha) from bovine endometrial tissue. **Biology of Reproduction**, v. 67, n. 1, p. 184-188, 2002.

BRIDGES, R. S.; FREEMARK, M. S. Human placental lactogen infusions into the medial preoptic area stimulate maternal behavior in steroid-primed nulliparous female rats. **Hormones and Behavior**, v. 29, p. 216-226, 1995.

BRIDGES, R. S.; DIBIASE, R.; LOUNDES, D. D.; DOHERTY, P. C. Prolactin stimulation of maternal behavior in female rats. **Science**, v. 227, p. 782-784, 1985.

BRIDGES, R. S.; RONSHEIM, P. M. Prolactin (PRL) regulation of maternal behavior in rats: bromocriptine treatment delays and PRL promotes the rapid onset of behavior. **Endocrinology**, v.126, n. 2, p. 837-848, 1990.

BRIDGES, R. S.; FELICIO, L. F.; PELLERIN, L. J.; STUER, A. M.; MANN, P. E. Prior parity reduces post-coital diurnal and nocturnal prolactin surges in rats. **Life Science**, v. 53, p. 439-445, 1993.

BROAD, K. D.; LÉVY, F.; EVANS, G.; KIMURA, T.; KEVERNE, E. B.; KENDRICK, K. M. Previous maternal experience potentiates the effect of parturition on oxytocin receptor mRNA expression in the paraventricular nucleus. **European Journal of Neuroscience**, v. 11, n. 10, p. 3725-3737, 1999.

BRUCKMAIER, R. M. Normal and disturbed milk ejection in dairy cows. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 29, n. 2, p. 268-273, 2005.

BURBACH, J. P.; VAN SCHAICK, H. S.; BREE, F. M.; LOPES, S. S.; ADAN, R. A. Functional domains in the oxytocin gene for regulation of expression and biosynthesis of gene products. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 395, p. 9-21, 1995.

BYRNES, E. M.; BRIDGES, R. S. Endogenous opioid facilitation of maternal memory in rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 114, n. 4, p.797-804, 2000.

COSTA, M. J. R. P.; CROMBERG, V. U.; **Comportamento materno em mamíferos, bases teóricas e aplicações aos ruminantes domésticos**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Etologia, 1998. 272 p.

CROWLEY, R.S.; INSEL, T. R.; O'KEEFE, J. A.; KIM, N. B.; AMICO, J. A. Increased accumulation of oxytocin messenger ribonucleic acid in the hypothalamus of the female rat: induction by long term estradiol and progesterone administration and subsequent progesterone withdrawal. **Endocrinology**, v. 136, n. 1, p. 224-231, 1995.

CUNNINGHAM, J. G. **Tratado de fisiologia veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1999.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. **Tratado de anatomia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1997.

FAHRBACH, S. E.; MORRELL, J. I.; PFAFF, D. W. Possible role for endogenous oxytocin in estrogen-facilitated maternal behavior in rats. **Neuroendocrinology**, v. 40, n. 6, p. 526-532, 1985.

FAHRBACH, S. E.; PFAFF, D. W. Effect of preoptic region implants of dilute estradiol on the maternal behavior of ovariectomized, nulliparous rats. **Hormones and Behavior**, v. 20, n. 3, p. 354-363, 1986.

FELICIO, L. F.; MANN, P. E.; BRIDGES, R. S. Intracerebroventricular cholecystokinin infusions block beta-endorphin-induced disruption of maternal behavior. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 39, n. 1, p. 201-204, 1991.

FILIPPI, S.; VIGNOZZI, L.; VANNELI, G. B.; LEDDA, F.; FORTI, G.; MAGGI, M. Role of oxytocin in the ejaculatory process. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 26, n. 3, p. 82-86, 2003. Supplement.

FLANAGAN, L.M.; PFAUS, J. G.; PFAFF, D. W.; MCEWEN, B. S. Induction of FOS immunoreactivity in oxytocin neurons after sexual activity in female rats. **Neuroendocrinology**, v. 58, n. 3, p. 352-358, 1993.

FLEMMING, A. S.; VACCARINO, F.; LUEBKE, C. Amygdaloid inhibition of maternal behavior in nulliparous female rats. **Physiology and Behavior**, v. 25, p. 731-743, 1980.

FLEMMING, A. S.; Korsmit, M. Plasticity in the maternal circuit: effects of maternal experience on Fos-Lir in hypothalamic, limbic, and cortical structures in the postpartum rat. **Behavioral Neuroscience**, v. 110, n. 3, p. 567-582, 1996.

FLEMMING, A.S.; O'DAY, D.H.; KRAEMER, G.W. Neurobiology of mother-infant interactions: experience and central nervous system plasticity across development and generations. **Neuroscience and Behavioral Reviews**, v. 23, p. 673-685, 1999.

FRANCZAK, A.; STASZKIEWICZ, J.; KOZIOROWSKI, M.; KOTWICA, G. The influence of estradiol and progesterone on the concentrations of uterine oxytocin receptors and plasma PGFM in response to oxytocin in ovariectomized gilts. **Reproduction Nutrition Development**, v. 42, n. 4, p. 327-338, 2002.

GIOVENARDI, M.; PADOIN, M. J.; CADORE, L. P.; LUCION, A. B. Hypothalamic paraventricular nucleus modulates maternal aggression in rats: effects of ibotenic

acid lesion and oxytocin antisense. **Physiology and Behavior**, v. 63, n. 3, p. 351-359, 1998.

GOREWIT, R. C.; SUENNERSTEN, R.; BUTLER, W. R.; UVNAS-MORBERG K. Endocrine responses in cows milked by hand an machine. **Journal of Dairy Science**, v.75, p. 443 – 448, 1992.

GOULD, B. R.; ZINGG, H. H. Mapping oxytocin receptor gene expression in the mouse brain and mammary gland using an oxytocin receptor – LacZ reporter mouse. **Neuroscience**, v. 122, n. 1, p. 155-167, 2003.

GUYTON, A.C.; **Tratado de fisiologia medica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1992.

HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 4. ed. Zaragoza: Acríbia, 1988.

HATTON, J. D.; ELLISMAN, M. H. A restructuring of hypothalamic synapses is associated with motherhood. **Journal of Neuroscience**, v. 2, n. 6, p. 704-707, 1982.

HEINRICHS, M.; BAUMGARTNER, T.; KIRSCHBAUM, C; EHLERT, U. Social support and oxytocin interact to suppress cortisol and subjective responses to psychosocial stress. **Biological Psychiatry**, v. 54, n. 12, p. 1389-1398, 2003.

HOLLANDER, E.; BARTZ, J.; CHAPLIN, W.; PHILLIPS, A.; SUMNER, J.; SOORYA, L.; ANAGNOSTOU, E.; WASSERMAN, S. **Oxytocin increases retention of social cognition in autism**. Biol Psychiatry. Aug 10, 2006. Disponível em: <<http://web.mit.edu/autism/oxytocin%20social%20cognition.pdf>>. Acesso em:10 janeiro 2007.

HOPSTER, H. Stress responses during milking; comparing conventional and automatic milking in primiparous dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 12, p. 3206-3216, 2002.

HSUEH, A. J. Paracrine mechanisms involved in granulosa cell differentiation. Clinical **Endocrinology and Metabolism**, v. 15, n. 1, p. 117-134, 1986.

HYDBRING, E.; MADEJ, A.; MACDONALD, E.; DRUGGE-BOHOLM, G.; BERGLUND, B.; OLSSON, K. Hormonal changes during parturition in heifers and

goats are related to the phases and severity of labour. **Journal of Endocrinology**, v. 160, n. 1, p. 75-85, 1999.

INSEL, T. R.; HARBAUGH, C. R. Lesions of the hypothalamic paraventricular nucleus disrupt the initiation of maternal behavior. **Physiology and Behavior**, v. 45, n. 5, p. 1033-1041, 1989.

INSEL, T. R. Oxytocin and maternal behavior. In: KRASNEGOR, N. A.; BRIDGES, R. S. **Mammalian parenting: biochemical, neurobiological and behavioral determinants**, New York: Oxford University Press, p. 260-280, 1990.

INSEL, T. R.; SHAPIRO, L. E. Oxytocin receptor distribution reflects social organization in monogamous and polygamous voles. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v. 89, n. 13, p. 5981-5985, 1992.

JO, M.; FORTUNE, J. E. Changes in oxytocin receptor in bovine preovulatory follicles between the gonadotropin surge and ovulation. **Molecular Cell Endocrinology**, v. 200, n. 1-2, p. 31-43, 2003.

JONES, P. M.; ROBINSON, I. C. A. F.; HARRIS, M. C. Release of oxytocin into blood and cerebrospinal fluid by electrical stimulation of the hypothalamus or neural lobe in the rat. **Neuroendocrinology**, v. 37, p. 454-458, 1983.

KENDRICK, K. M.; KEVERNE, E. B.; BALDWIN, B. A.; SHARMANA, D. F. Cerebrospinal fluid levels of acetylcholinesterase, monoamines and oxytocin during labour, parturition, vaginocervical stimulation, lamb separation and suckling in sheep. **Neuroendocrinology**, v. 44, n. 2, p. 149-156, 1986.

KENDRICK, K. M.; KEVERNE, E. B.; CHAPMAN, C.; BALDWIN, B. A. Intracranial dialysis measurement of oxytocin, monoamines and uric acid release from the olfactory bulb and substantia nigra of sheep during parturition, suckling, separation from lambs and eating. **Brain Research**, v. 439, p. 1-10, 1988.

KENDRICK, K. M.; KEVERNE, E. B. Importance of progesterone and estrogen priming for the induction of maternal behavior by vaginocervical stimulation in sheep: effects of maternal experience. **Physiology and Behavior**, v. 49, n. 4, p. 745-750, 1991.

KENDRICK, K. M.; COSTA, A. P. C.; BROAD, K. D.; OHKURA, S.; GUEVARA, R.; LÉVY, F.; KEVERNE, E. B. Neural control of maternal behavior and olfactory recognition of offspring. **Brain Research Bulletin**, v. 44, n. 4, p. 383-395, 1997.

KENDRICK, K. M. Oxytocin, motherhood and bonding. **Experimental Physiology**, v. 85, p. 111-124, 2000.

KIMURA, T.; ITO, Y.; EINSPIANIER A.; TOHYA, K.; NOBUNAGA, T.; TOCUGAWA, Y.; TAKEMURA, M.; KUBOTA, Y.; IVELL, R.; MATSUURA, N.; SAJI, F.; MURATA, Y. Expression and immunolocalization of the oxytocin receptor in human lactating and non – lactating mammary glands. **Human Reproduction**, v. 13, n. 9, p. 2645-2653, 1998.

LE NEINDRE, P.; POINDRON, P.; DELOUIS, C. Hormonal induction of maternal behavior in non-pregnant ewes. **Physiology and Behavior**, v. 22, p. 731-734, 1979.

LÉVY, F.; POINDRON, P. The importance of amniotic fluid for the establishment of maternal behavior in experienced and non-experienced ewes. **Animal Behavior**, v. 35, p. 1188-1192, 1987.

LÉVY, F.; KENDRICK, K. M.; GOODE, J. A.; GUEVARA-GUZMAN, R.; KEVERNE, E. B. Oxytocin and vasopressin release in the olfactory bulb of parturient ewes: changes with maternal experience and effects on acetylcholine, γ -aminobutyric acid, glutamate and noradrenaline release. **Brain Research**, v. 669, p. 197-206, 1995.

LEVY, F.; KELLER, M.; POINDRON, P. Olfactory regulation of maternal behavior in mammals. **Hormones and Behavior**, v.46, n.3, p.284-302, 2004.

LIM, M. M.; YOUNG, L. J. Neuropeptidergic regulation of affiliative behavior and social bonding in animals. **Hormones and Behavior**, v. 50, n. 4, p. 506-517, 2006.

LINCOLN, D. W.; PAISLEY, A.C. Neuroendocrine control of milk ejection. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 65, n. 2, p. 571-586, 1982.

LIPSCHITZ, D. L.; CROWLEY, W. R.; BEALER, S. L. Central blockade of oxytocin receptors during late gestation disrupts systemic release of oxytocin during suckling in rats. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 15, p. 743-748, 2003.

LOBATO, J. F. P.; ALMEIDA, L. S. P.; OSÓRIO, E. B.; MÜLLERIV, A. Efeito da idade de desmame no desenvolvimento e nas características de carcaça de novilhos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 3, p. 596-602, 2007.

LONG, J. B.; HOLADAY, J. W. Blood-brain barrier: endogenous modulation by adrenal-cortical function. **Science**, v. 227, n. 4694, p. 1580-183, 1985.

LONGATTI, P.; PERIN, A.; RIZZO, V.; COMAI, S.; GIUSTI, P.; COSTA, C. V. Ventricular cerebrospinal fluid melatonin concentrations investigated with an endoscopic technique. **Journal of Pineal Research**, v. 42, n. 2, p. 113-118, 2007.

LUDWIG, M.; LENG, G. Dendritic peptide release and peptide-dependent behaviours. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, n. 7, p. 126-136, 2006.

MANN, P. E.; KINSLEY, C. H.; RONSHEIM, P. M.; BRIDGES, R. S. Long-term effects of parity on opioid behavioral and endocrine responses. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 34, p. 83-88, 1989.

MANTELLA, R. C.; VOLLMER, R. R.; LI, X.; AMICO, J. A. Female oxytocin-deficient mice display enhanced anxiety-related behavior. **Endocrinology**, v. 144, n. 6, p. 2291-2296, 2003.

MARNET, P. G.; NEGRÃO, J. A.; LABUSSIÈRE, J. Oxytocin release and milk ejection parameters during milking of dairy ewes in and out of natural season of lactation. **Small Ruminant Research**, v. 28, n. 2, p. 183-191, 1998.

MARNET, P. G.; NEGRÃO, J. A. The effect of a mixed – management system on the release of oxytocin, prolactin and cortisol in ewes during suckling and machine milking. *Reproduction Nutrition Development*, v.40, n.3, p. 271-281, 2000.

MIRANDA-PAIVA, C. M.; FELICIO, L. F. Differential role of cholecystokinin receptor subtypes in opioid modulation of ongoing maternal behavior. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 64, n. 1, p. 165-169, 1999.

MIRANDA-PAIVA, C. M.; NASELLO, A. G.; YIN, A. J.; FELICIO, L. F. Morphine pretreatment increases opioid inhibitory effects on maternal behavior. **Brain Research Bulletin**, v. 55, n. 4, p. 501-505, 2001.

MIRCIC, G. M.; BELESLIN, D. B.; JANCOVIC, S. M. Hormoni zadnjeg reznja zlezde hipofize. **Srp Arh Celok Lek**, v. 126, n. 3-4, p. 111-118, 1998.

MORRIS, M.; BARNARD JR., R. R.; SAIN, L. E. Osmotic mechanisms regulating cerebrospinal fluid vasopressin and oxytocin in the conscious rat. **Neuroendocrinology**, v. 39, p. 377-383, 1984.

MCKUSICK, B. C.; THOMAS, D. L.; ROMERO, J. E.; MARNET, P. G. Effect of weaning system on milk composition and distribution of milk fat within the udder of east friesland dairy ewes. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 10, p. 2521-2528, 2002.

NEGRÃO, J. A. Réponse endocrinne lors de l'adaptation à la traite mécanique chez la bebris laitière. 1996. 142 p. **Doctoral thesis, École Nationale Supérieure Agronomique de Rennes**, 1996.

NEGRÃO, J. A.; MARNET, P. G.; LABUSSIÈRE, J. Effect of milking frequency on oxytocin release and milk production in dairy ewes. **Small Ruminants Research**, v. 39, n. 2, p. 181-187, 2001.

NEGRÃO, J. A.; MARNET, P. G. Effect of calf suckling on oxytocin, prolactin, growth hormone and milk yield in crossbred Gir x Holstein cows during milking. **Reproduction Nutrition Development**, v. 42, n. 4, p. 373-380, 2002.

NEGRÃO, J. A.; MARNET, P. G. Cortisol, adrenalin, noradrenalin and oxytocin release and milk yield during first milkings in primiparous ewes. **Small Ruminant Research**, v. 47, p. 69-75, 2003.

NELSON, E. E.; PANKSEPP, J. Brain substrates of infant – mother attachment: Contributions of opioids, oxytocin, and norepinephrine. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 22, n. 3, p. 437-452, 1998.

NEUMANN, I. D.; TORNER, L.; WIGGER, A. Brain oxytocin: differential inhibition of neuroendocrine stress responses and anxiety-related behavior in virgin, pregnant and lactating rats. **Neuroscience**, v. 95, n. 2, p. 567-575, 1999.

NUMAN, M.; ROSENBLATT, J. S.; KOMISARUK, B. R. Medial preoptic area and the onset of maternal behavior in the rat. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 91, p. 146-164, 1977.

NUMAN, M.; NAGLE, D. S. Preoptic area and substantia nigra interact in the control of maternal behavior in the rat. **Behavioral Neuroscience**, v. 97, p. 120-139, 1983.

OLIVEIRA, J. S.; ZANINI, A. M.; SANTOS, E. M. Fisiologia, manejo e alimentação de bezerras de corte. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar**, Umuarama, v. 10, n. 1, p. 39-48, 2007.

PEDERSEN, C.A.; ASCHER, J. A.; MONROE, Y. L.; PRANGE JR, A. J. Oxytocin induces maternal behavior in virgin female rats. **Science**, v. 216, p. 648-649, 1982.

PEDERSEN, C. A.; CALDWELL, J. D.; JOHNSON, M. F.; FORT, S. A.; PRANGE JR., A. J. Oxytocin antiserum delays onset of ovarian steroid-induced maternal behavior. **Neuropeptides**, v. 6, n. 2, p. 175-182, 1985.

POINDRON, P.; LÉVY, F. Physiological, sensory, and experiential determinants of maternal behavior in sheep. In: KRASNEGOR, N. A.; BRIDGES, R. S. **Mammalian Parenting**, New York: Oxford University Press, p. 133-156, 1990.

ROBINSON, R.S.; MANN, G. E.; LAMMING, G. E.; WATHES, D. C. Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout the oestrous cycle and early pregnancy in cows. **Reproduction**, v. 122, n. 6, p. 965-979, 2001.

PUGH, D. G. **Clínica de ovinos e caprinos**. São Paulo: Roca, 2004.

SANTOS, D. F.; BARROS, G. S. A. C. Importações brasileiras de leite: Impactos micro e macroeconômicos. **Economia Aplicada**, v. 10, n. 4, p. 541-559, 2006.

SAS. User's guide: **basic and statistic**. Cary: SAS, 1995. 1686 p.

SIROTKIN, A.V.; FLORKOVICOVÁ, I.; MAKAREVICH, A. V.; SCHAEFFER, H.; KOTWICA, J.; MARNET, P. G.; SANISLO, P. Oxytocin mediates some effects of insulin-like growth factor-I on porcine ovarian follicles. **Journal of Reproduction and Development**, v. 49, n. 2, p. 141-149, 2003.

SOFRONIEW, M. V. Vasopressin- and neurophysin-immunoreactive neurons in the septal region, medial amygdala and locus coeruleus in colchicine-treated rats. **Neuroscience**, v. 15, n. 2, p. 347-358, 1985.

SPICER, L. J. Proteolytic degradation of insulin-like growth factor binding proteins by ovarian follicles: a control mechanism for selection of dominant follicles. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 5, p. 1223-1230, 2004.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M.; **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1999.

STERN, J. M.; PROTOMASTRO, M. Effects of low dosages of apomorphine on maternal responsiveness in lactating rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 66, n. 2, p. 353-359, 2000.

SWENSON, M. J. **Dukes / fisiologia dos animais domésticos**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1984.

TANCIN, V.; HARCEK, L.; BROUCEK, J.; UHRINCAT, M.; MIHINA, S.; Effect of suckling during early lactation and changeover to machine milking on plasma oxytocin and cortisol levels and milking characteristics in Holstein cows. **Journal of Dairy Research**, v.62, p.249 – 256, 1995.

VAN LEENGOED, E.; KERKER, E.; SWANSON, H.H. Inhibition of post-partum maternal behaviour in the rat by injecting an oxytocin antagonist into the cerebral ventricles. **J Endocrinology**, v. 112, n. 2, p. 275-282, 1987.

VAN REENEN, C. G.; VAN DER WERF, J. T. N.; BRUCKMAIER, R. M.; HOPSTER, H.; ENGEL, B.; NOORDHUIZEN, J. P. T. M.; BLOKHUIS, H. J. Individual differences in behavioral and physiological responsiveness of primiparous dairy cows to machine milking. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 10, p. 2551-2561, 2002.

WAGNER, C. K.; MORRELL, J. I. In situ analysis of estrogen receptor mRNA expression in the brain of female rats during pregnancy. **Brain Research Molecular Brain Research**, v. 33, n. 1, p. 127-135, 1995.

WAGNER, K. U.; YOUNG, W. S.; LIU, X.; GINNS, E. I.; LI, M.; FURTH, P. A.; HENNIGHAUSEN, L. Oxytocin and milk removal are required for post – partum mammary – gland development. **Genes Funct**, v. 1, n. 4, p. 233-244, 1997.

WEISS, D.; DZIDIC, A.; BRUCKMAIER, R. M. Effect of stimulation intensity on oxytocin release before, during and after machine milking. **Journal of Dairy Research**, v. 70, n. 3, p. 349-354, 2003.

WILLIAMS, G. L.; GAZAL, O. S.; LESHIN, L. S.; STANKO, R. L.; ANDERSON, L. L. Physiological regulation of maternal behavior in heifers: Roles of genital stimulation,

intracerebral oxytocin release, and ovarian steroids. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 295-300, 2001.

WINSLOW, J. T.; NOBLE, P. L.; LYONS, C.K.; STERK, S. M.; INSEL, T. R. Rearing effects on cerebrospinal fluid oxytocin concentration and social buffering in rhesus monkeys. **Neuropsychopharmacology**, v. 28, n. 5, p. 910-918, 2003.

YOUNG, L. J.; MUNS, S.; WANG, Z.; INSEL, T. R. Changes in oxytocin receptor mRNA in rat brain during pregnancy and the effects of estrogen and interleukin-6. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 9, n. 11, p. 859-865, 1997.