UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

FÁBIO LUÍS HENRIQUE

**Estresse durante a gestação e desmama e sua
influência no desempenho de cordeiros**

Pirassununga

2015

FÁBIO LUÍS HENRIQUE

**Estresse durante a gestação e desmama e sua influência
no desempenho de cordeiros**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de concentração: Qualidade e Produtividade Animal.

Orientadora: Prof(a) Dr(a) Cristiane Gonçalves Titto.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

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

Henrique, Fábio Luís

H519e Estresse durante a gestação e desmama e sua

influência no desempenho de cordeiros / Fábio Luís

Henrique. -- Pirassununga, 2015.

84 f.

Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.

Departamento de Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Gonçalves Titto.

1. Cortisol 2. Comportamento materno filial

3. Lipopolissacarídeo 4. Ovinos. I. Título.

DEDICATÓRIA

A todas as pessoas que amo.

Pessoas essas que são meu incentivo e fortaleza, que merecem que eu me dedique e alcance o meu melhor, dia após dia em minha vida.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo a Deus e a Nossa Senhora do Carmo, por estarem sempre juntos de mim, me guiando, protegendo e iluminando.

Aos meus pais, Cláudio e Sônia, ao meu irmão Francisco e à minha namorada Mayara, por estarem sempre ao meu lado e fazerem parte de mais essa etapa.

Aos meus avós Luiz e Herlinda, Getúlio e Aurora, pessoas fundamentais.

Aos meus tios e tias, Toninho e Cláudia, Sidney e Lúcia, Sérgio e Tereza. E meus queridos primos, Netto, Pedro, Sidney, Bruno e Thiago.

À minha orientadora, Professora Dr(a) Cristiane Gonçalves Titto, pela oportunidade que me ofereceu para a realização do mestrado e por todo apoio e confiança depositada em mim ao longo desses dois anos.

Aos pós-graduandos do Laboratório de Biometeorologia e Etologia, Thays, Bettah, Raquel, Denis e Thuanny. E em especial aos grandes parceiros Henrique, Lina e Ana, por todo profissionalismo, comprometimento e ajuda que me ofereceram nos momentos de maiores dificuldades.

Aos demais “Labeanos”, fundamentais na execução de todo o experimento.

Ao Professor Dr. Evaldo Antonio Lencioni Titto por me “apadrinhar” nos primeiros meses de mestrado.

Ao professor Dr. Adroaldo Jose Zanella por toda colaboração intelectual, para o desenvolvimento do projeto piloto e projeto experimental, assim como pelas ideias cedidas para as análises testiculares no pós-abate.

Aos colegas de pós-graduação do “CEBER” em especial aos “Hijos” Dan, Keni e Juan, as meninas Madeline, Robertinha, Katiéli e Camila e a todos os demais Dani, Fabi, Anderson, Henrique, Jú e Tiago pelos bons momentos de diversão e descontração passados juntos.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo financiamento do projeto e por conceder a bolsa de mestrado.

*“Cada qual sabe amar a seu modo. O modo, pouco importa, o essencial
é que saiba amar.”*

Machado de Assis.

RESUMO

HENRIQUE, F. L. **Estresse durante a gestação e desmama e sua influência no desempenho de cordeiros.** 2015. 84 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de verificar a possível influência do estresse gestacional, pela indução de Lipopolissacarídeo (*E. coli*) sobre a relação materno filial e desempenho do cordeiro, assim como o estresse da desmama sobre o desempenho em confinamento e nas características da carcaça. A execução do experimento aconteceu de dezembro de 2013 a julho de 2014 no anexo do Laboratório de Biometeorologia e Etologia localizado no setor de caprino e ovinocultura da Prefeitura do Campus Administrativo da Universidade de São Paulo em Pirassununga-SP. Foram utilizadas 43 ovelhas multíparas, mestiças da raça Santa Inês e 55 cordeiros, crias provenientes da IATF dessas ovelhas com sêmen de macho White Dorper. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) tendo um fatorial 3 x 2 como o esquema de distribuição dos tratamentos composto por 3 grupos durante a gestação (controle (Gc), aplicação de LPS aos 70 (± 7 dias) dias de gestação (Gi) e o aos 120 (± 7 dias) dias de gestação (Gf)) combinando com 2 tipos de desmama (desmama controlada (Dc) e desmama abrupta (Da)). As médias foram comparadas pelo teste F e teste t de Student (PDIFF), com um nível de significância de 5%. No primeiro experimento o objetivo foi analisar a influência do estresse, gerado pelo uso de LPS, em diferentes períodos gestacionais sobre os níveis de cortisol e temperatura retal das ovelhas, o comportamento materno filial, os níveis de cortisol logo após o parto, peso ao nascer (PN) dos cordeiros e o tempo gasto para a primeira mamada. Os animais foram delineados nos 3 grupos: Gc, Gi e Gf. Na fase intermediária da gestação, analisando o ritmo circadiano do cortisol e da TR para os tratamentos Gc e Gi pela interação entre tratamento e tempo foram observados maiores valores de cortisol e TR para Gi ($P < 0,05$). Na fase final com a mesma interação entre tratamento e tempo, os maiores valores de cortisol e temperatura durante o ritmo circadiano foram de Gf ($P < 0,05$). Para as avaliação do comportamento materno filial, as observações das posturas e das atividades tanto das ovelhas quanto dos cordeiros, foram analisadas pela interação entre tratamento e tipo de parto ($P < 0,05$). Também houve interação entre tratamento e o tipo de parto para o tempo a primeira mamada tendo o tratamento Gf em situação de parto duplo apresentado o maior tempo, não sendo diferente apenas do tratamento Gi também com parto duplo ($P < 0,05$). Analisando o PN, a interação aconteceu entre tratamento e sexo com os menores valores observados para o tratamento Gf quando comparados aos demais tratamentos ($P < 0,05$). O LPS alterou os níveis de cortisol durante o ritmo circadiano, assim como o estresse durante a gestação influenciou no comportamento materno filial. Os animais submetidos ao estresse durante o terço final da gestação apresentaram maior gasto de tempo para ingerir

colostro e pesos mais leves no nascimento. No segundo experimento o objetivo foi avaliar a eficiência da desmama controlada ou abrupta em reduzir o impacto do estresse durante a gestação em relação ao desempenho de cordeiros. Foram utilizados 47 cordeiros, 22 machos e 25 fêmeas distribuídos em 6 tratamentos: GcDc, GcDa, GiDc, GiDa, GfDc e GfDa. Foram analisados os níveis de cortisol sanguíneo e a TR da desmama controlada e na comparação entre os dois tipos de desmama, peso a desmama (PD) e os dados de desempenho em confinamento pela ingestão de matéria seca (IMS), conversão alimentar (CA), eficiência alimentar (EA), ganho médio diário (GMD) e medidas pós-abate. Houve efeito fixo do estresse durante a gestação e dos dias para os níveis de cortisol durante a DC ($P<0,05$), para a temperatura retal foi observado efeito fixo de sexo, dia e tempo ($P<0,05$). No dia de entrada dos animais no confinamento houve efeito fixo de tempo (colheitas durante o dia) e tipo de desmama, com maiores valores de cortisol para a primeira colheita do dia ($P<0,05$) e para a desmama abrupta quando comparada com a controlada ($P<0,05$), neste mesmo dia para a TR foi observado efeito fixo de tempo, sendo a primeira colheita menor que as demais ($P<0,05$). Nas colheitas de 24 horas e 48 após a entrada dos animais no confinamento Da apresentou maior nível de cortisol do que DC ($P<0,05$), e feito contrario foi observado para TR. Dc apresentou maior peso a desmama que Da ($P<0,05$). Houve interação entre estresse na gestação e sexo para IMS e GMD, com menores valores para machos de Gf ($P<0,05$), não havendo diferenças significativas para CA e EA em nenhum tratamento. Nas análises pós – abate, os menores valores foram observados para Gf e Da. A desmama controlada pode reduzir os efeitos do estresse durante a gestação, melhorando o desempenho de cordeiros, assim como cordeiros machos quando desafiados na fase final da gestação são mais suscetíveis que fêmeas.

Palavras chave: Cortisol; Comportamento materno filial; Lipolissacarídeo; Ovinos

ABSTRACT

HENRIQUE, F. L. **Stress during pregnancy and weaning and their influence on lamb performance.** 2015. 84 f. Dissertation (Master). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

This study was developed with the objective to investigate the possible influence of gestational stress by inducing Lipopolysaccharide (*E. coli*) on maternal and filial relationship performance of the lamb, as well as the stress of weaning on feedlot performance and on characteristics in housing. Running the experiment took place from December 2013 to July 2014 in the Annex to Biometeorology and Ethology Laboratory located in goat and sheep production sector of Administrative Campus Hall, Universidade de São Paulo in Pirassununga-SP. We used 43 multiparous sheep, crossbred Santa Inês and 55 lambs, calves from AIFT those sheep with male White Dorper semen. The experimental design was completely randomized having a 3 x 2 factorial as the distribution pattern of treatments consists of 3 groups during pregnancy (control (Cg), application of LPS to 70 ($\pm$ 7) days of gestation (Ig) and at 120 ($\pm$ 7) days of gestation (Fg)) combined with two types of weaning (controlled weaning (Cw) and abrupt weaning (Aw)). Means were compared by F test and Student's t test (PDIFF), with a 5% significance level. In the first experiment the objective was to analyze the influence of stress, generated by the use of LPS in different gestational periods on the levels of cortisol and body temperature of sheep, filial maternal behavior, cortisol levels immediately after parturition, birth weight (BW) of the lambs and the time spent for the first feeding. The animals were allotted in three groups: Cg, Ig and Fg. In the middle stage of pregnancy, analyzing the circadian rhythm of cortisol and RT for the treatment Cg and Ig by the interaction between treatment and time showed higher cortisol levels to Ig and RT ($P < 0.05$). In the final stage with the same interaction between treatment and time increased cortisol and temperature values during the circadian rhythm were Fg ($P < 0.05$). For the evaluation of filial maternal behavior, observations of the postures and activities of both the sheep when the lambs were analyzed by the interaction between treatment and type of delivery ($P < 0.05$). There was also an interaction between treatment and the type of parturition to the time the first feeding with the Fg treatment in dual labor situation presented as long, not being different only Ig treatment also double parturition ($P < 0.05$). Analyzing the BW, the interaction occurred between treatment and sex with the lowest values observed for Fg treatment compared to the other treatments ($P < 0.05$). LPS altered levels of cortisol during the circadian rhythm, and stress during

pregnancy the influenced filial maternal behavior. The animals subjected to stress during the final third of gestation had higher expenditure of time to ingest colostrum and lighter weights at birth. In the second experiment the objective was to evaluate the efficiency of the subsidiary or abrupt weaning to reduce the impact of stress during pregnancy in relation to the performance of lambs. We used 47 lambs, 22 male and 25 female, comprised of 6 treatments: CgCw, CgAw, IgCw, IgAw, FgCw and FgAw. Blood cortisol levels were analyzed and the TR controlled weaning and the comparison between the two types of weaning, weaning weight (WW) and performance data in confinement for dry matter intake (DMI), feed conversion (FC), feed efficiency (FE), average daily gain (ADG) and post-slaughter measures. There was fixed effect of stress during pregnancy and days to cortisol levels during the Cw ($P<0.05$) for the rectal temperature was observed fixed effect sex, day and time ($P<0.05$). On receipt of the animals was fixed effect confined in time (during harvest day) and type of weaning, with higher cortisol values for the first harvest day ($P<0.05$) and the abrupt weaning compared with controlled ($P<0.05$) in the same day for the TR was observed fixed effect of time, the first harvest less than the others ($P<0.05$). At harvest 24 hours and 48 hours after entering of animals in the feedlot had higher cortisol levels than Cw ($P<0.05$) and made opposite was observed for TR. Dc showed higher weaning weight that Aw ($P<0.05$). There was interaction between stress during pregnancy and sex for DMI and ADG, with lower values for males of Gf ($P<0.05$), with no significant differences for FC and FE in any treatment. In analysis post - slaughter, the lowest values were observed for Fg and Aw. From Controlled weaning can reduce the effects of stress during pregnancy, improving the performance of lambs males, and lambs when challenged in late pregnancy are more susceptible than females.

Keywords: Cortisol; Filial maternal behavior; Lipopolysaccharide; Sheep

SUMÁRIO

1.	Introdução	11
2.	Objetivo	13
2.1.	Objetivo Geral	13
2.2.	Objetivos Específicos	13
3.	Revisão de Literatura	14
3.1.	Conceitos sobre o estresse.....	14
3.2.	Atributos ao uso do Lipopolissacarídeo (LPS).....	15
3.3.	Comportamento materno filial	17
3.4.	Tipos distintos de desmamas e o desempenho de cordeiros confinados.....	18
4.	Material e Métodos Geral	20
4.1.	Local.....	20
4.2.	Animais	20
4.2.1.	Ovelhas.....	20
4.2.2.	Cordeiros	21
4.3.	Tratamentos.....	21
4.3.1.	Projeto Piloto	22
4.3.2.	Grupo durante a gestação	23
4.3.3.	Tipos de desmamas	24
4.4.	Comportamento materno filial	25
4.5.	Descrição dos manejos de desmama.....	26
4.6.	Níveis de cortisol e medidas de temperatura retal (TR).....	27
4.7.	Fase de confinamento.....	28
4.8.	Análise de dados	31

5. Experimento 1: Efeito da administração de Lipopolissacarídeo (<i>E. coli</i>) em ovelhas gestantes: influência materna e sobre cordeiro no pós-parto.....	33
5.1. Introdução.....	34
5.2. Material e Métodos	35
5.2.1. Local e animais.....	35
5.2.2. Projeto Piloto	36
5.2.3. Ritmo circadiano do cortisol e temperatura retal durante a gestação	37
5.2.4. Comportamento materno filial e análises pós-parto.....	38
5.2.5. Análise de dados	39
5.3. Resultados	40
5.3.2. Fase intermediária da gestação.....	41
5.3.3. Fase final da gestação.....	43
5.3.4. Análises pós-parto: comportamento materno filial, tempo à primeira mamada e níveis de cortisol	46
5.3.4.1. Postura.....	46
5.3.4.2. Atividades	48
5.4. Discussão	52
5.5. Conclusão	55
6. Experimento II: Relação entre o estresse durante a gestação e o estresse da desmama sobre o desempenho de cordeiros.....	56
6.1. Introdução.....	58
6.2. Material e Métodos	59
6.2.1. Local e animais.....	59
6.2.2. Tratamentos.....	60
6.2.3. Análises de dados	63
6.3. Resultados	64

6.3.1. Análise comparativa entre a desmama controlada e a desmama abrupta.....	66
6.3.2. Análise do desempenho dos cordeiros confinados em baias individuais.....	67
6.3.3. Medidas pós-abate dos cordeiros machos	69
6.4. Discussão	72
6.5. Conclusão	76
7. Referências Bibliográficas.....	78

1. Introdução

O estresse em animais está vinculado com possíveis mudanças não habituais, que empobrecem a situação de bem estar do indivíduo. Essas alterações geralmente relacionadas ao ambiente ou a própria fisiologia do animal, fazem com que o organismo em desequilíbrio desencadeie algumas reações como resposta ao estresse.

Cada animal possui uma variabilidade quanto ao nível de estresse, dependendo da adversidade encontrada e seu real potencial de adaptação a ela. Diversificando individualmente também sua zona de conforto, ou seja, o nível de bem-estar animal em que ele se encontra.

Levando em consideração a criação de ovinos, o estresse pode ser desencadeado devido à presença de agentes patogênicos responsáveis pela ocorrência de toxicidades e infecções no organismo do animal. Além de aumentar o nível de cortisol na corrente sanguínea, gera total desconforto e inibi o comportamento natural do animal, que na maioria das vezes resulta na queda de desempenho do ovino – que pode ser mais ou menos acentuada- de acordo com a idade, sanidade, fase da criação, entre outros.

O Lipopolissacarídeo (LPS - *E. coli*) quando presente na circulação sanguínea de uma ovelha prenhe é um desses fatores. De maneira ativa o LPS incita as células de defesa do organismo, principalmente os monócitos e macrófagos, manifestando uma resposta imunológica através do desencadeamento de ações no sistema nervoso central até a ativação do eixo hipotálamo – pituitário – adrenal, ocasionando a liberação de hormônios que descrevem a situação de estresse, sendo o cortisol o hormônio com maior conceituação para essa resposta. As semanas gestacionais das ovelhas se faz um dos períodos mais críticos quanto à submissão das fêmeas a fatores estressantes. Estas devem ser blindadas ao máximo para que o desenvolvimento do feto não possa vir a ser comprometido.

O alto nível de cortisol na corrente sanguínea de uma ovelha, gerado pelo estresse na gestação, também pode interferir no desenvolvimento fetal. Tal situação adversa traz consequências muitas vezes indesejáveis tanto para a ovelha quanto para o cordeiro, podendo inclusive gerar uma espécie de

competição entre mãe e filho devido ao desencadeamento de alguns hormônios e a inibição da absorção de alguns nutrientes.

Teve-se como hipótese que o estresse gerado pela inoculação de LPS em ovelhas, em diferentes semanas da gestação, poderia vir a provocar alterações nos níveis de cortisol e na temperatura retal (TR) nessas fêmeas tendo influenciado também na relação materno filial momentos após o parto. Assim também, quando relacionado com diferentes tipos de desmama, o estresse gerado na gestação, venha interferir no desempenho dos cordeiros. Visto isso, a presente dissertação buscou avaliar a relação entre o estresse gerado pelo LPS, no terço médio e final da gestação, e associada a desmama controlada e abrupta sobre o comportamento materno filial e o desempenho dos cordeiros em confinamento.

2. Objetivo

2.1. Objetivo Geral

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de verificar a possível influência do estresse gestacional sobre a relação materno filial e desempenho do cordeiro, assim como o estresse da desmama sobre o desempenho em confinamento e nas características na carcaça.

2.2. Objetivos Específicos

Experimento 1: Efeito da administração de Lipopolissacarídeo (*E. coli*) em ovelhas gestantes: influência materna e sobre cordeiro no pós-parto.

Experimento 2: Relação entre o estresse durante a gestação e o estresse da desmama sobre o desempenho de cordeiros.

3. Revisão de Literatura

3.1. Conceitos sobre o estresse

O estresse é o principal indicador para se avaliar a falta de bem-estar animal. O termo estresse foi usado pelo austríaco Selye em 1936, que o definiu como sendo o estado orgânico, em resposta a ações de agente de qualquer natureza, com uma série de reações não específicas de adaptação (ENCARNAÇÃO, 1997). A utilização do termo estresse, segundo Broom (1993) deve ser restrita a seu uso comum para se referir a efeitos deletérios sobre um indivíduo.

Um critério preciso para o que é adverso a um animal é difícil de ser estabelecido, mas um indicador é a existência de um efeito em sua adaptação biológica (BROOM e MOLENTO, 2004).

A primeira reação ao estresse é o reconhecimento do agente estressor com alteração do comportamento (LEME, 2009). De acordo com Morberg (2000) os animais têm reações comportamentais a serem expostos a estímulos estressantes na tentativa de escapar ou aliviar-se do estressor. Como forma de defesa do animal a ativação do sistema nervoso central vem como uma segunda resposta frente a uma situação de estresse, ocorrendo à liberação de substâncias como neurotransmissores (adrenalina), glicocorticoides (cortisol) e opióides endógenos (β -endorfinas) na corrente sanguínea (ELOY, 2007).

A ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) em situações de estresse, é iniciada no sistema nervoso central (SNC) pela liberação dos hormônios liberadores das corticotrofinas (CRH) dentro da veia porta. Após serem liberadas para a pituitária anterior, as CRH estimulam a secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), o qual, por sua vez, resulta na liberação dos glicocorticoides pelas adrenais (BROWN, 1994). Embora as concentrações dos hormônios, seus receptores ou das enzimas envolvidas em sua síntese ou metabolização venham sendo utilizados no estudo do estresse (AXELROD; REISINE, 1984; HERD, 1989; LEFCOURT; AKERS, 1991; COSTE, 1994), a variação dos níveis de cortisol na corrente sanguínea continua sendo utilizada como indicador universal de estresse, sendo que seu aumento se contrapõe

aos conceitos de conforto e bem-estar (MORBERG, 1987; HERD, 1989; BROOM, 1991; MÖSTL; PALME, 2002). Os glicocorticoides (cortisol) exercem função catabólica, inibindo a multiplicação celular de aminoácidos e glicose, bloqueando a síntese de proteínas que resulta na diminuição da taxa de metabolismo. Também suprimem, em vez de acentuarem, o mecanismo normal de defesa do organismo, e é um meio de proteção, não contra a fonte de estresse em si, mas contra as reações normais de defesa que são ativadas pelo estresse (ELOY, 2007).

Os níveis de cortisol variam devido à situações estressantes muitas vezes geradas por elementos meteorológicos como a temperatura e a umidade do ar elevadas, alta intensidade de radiação solar, vento (COLLIER et al., 1982) ou diversas práticas de manejo mau realizadas (LEFCOURT; AKERS, 1984; BRUCKMAIER et al., 1993; MARNET; NEGRÃO, 2000; RUSHEN et al., 2001).

A concentração plasmática média de cortisol em ovinos encontra-se entre 6 e 14 ng.ml⁻¹ segundo Encarnação (1989), podendo este valor dobrar ou até quadruplicar em casos de estresse crônico (GRANDIN, 1994). Segundo Bell et al. (1989) ovelhas submetidas ao estresse prolongado entre os dias 64 e 141 de gestação, apresentam uma queda nas concentrações séricas de cortisol nos primeiros vinte dias, que se mantêm constante logo após este período. De acordo com Hafez e Hafez (2004) as ovelhas possuem uma duração normal de gestação de aproximadamente 150 dias, dividida em três fases: fase I – 1-68 dias; fase II – 69-120 dias e fase III – 121-150 dias (DUPRÉ, 2009), variando segundo a raça e a própria fêmea, com ocorrência de 70% do crescimento do feto acontecendo entre 40–50 dias finais de gestação (MEXIA et al., 2006).

3.2. Atributos ao uso do Lipopolissacarídeo (LPS)

A atuação de agentes patógenos pode alterar e interferir no ambiente gestacional, como por exemplo, inflamações geradas por bactérias gram-negativas (KABAROFF et al., 2006). A membrana celular externa dessas bactérias, conhecida como lipopolissacarídeos (LPS) ou também denominada

como endotoxina, são altamente tóxicas e são liberadas após a multiplicação da bactéria ou quando ela é fagocitada pelas células de defesa (TUIN et al., 2006). Evidenciado pela sigla LPS, essa endotoxina é uma molécula que possui uma camada hidrofílica e outra hidrofóbica por ser constituída basicamente por uma fração lipídica – responsável pela maior ação antigênica - e outras frações formadas por um núcleo e uma cadeia lateral polissacarídica (açúcares) (RAETZ; WHITFIELD, 2002; SASSI et al., 2009).

Os vertebrados têm receptores específicos de LPS na superfície de alguns fagócitos monocelulares, sendo que a administração de LPS imita a resposta comportamental, neuroquímica e neuroendócrina produzida pelo sistema imune em resposta à infecção (HOOD; DRESCHER; GRANGER, 2003). Um único desafio com LPS tem influência em longo prazo na resposta imunológica (IWASA et al., 2009).

Algumas proteínas participam da ativação celular induzida por LPS, através de vias de sinalização intracelular, como é o caso do receptor TLR4 (do inglês, Toll-like receptor 4), a LBP (do inglês, lipopolysaccharide binding protein) e os co-receptores MD-2 e CD14 (do inglês, cluster differentiation 14) (CRUZ-MACHADO, 2010). A injeção experimental induz o estresse e sintomas de doença imunitária através de uma cascata de síntese e liberação de citocinas (ELMQUIST et al., 1997) podendo interromper ou modificar a exibição de comportamentos normais.

As citocinas são diferentes, em vários aspectos importantes, dos hormônios convencionais. Seus efeitos ocorrem em um vasto número de células e tecidos, não afetando apenas um único órgão-alvo, como a maioria dos hormônios clássicos. As células raramente secretam somente uma citocina por vez. Por exemplo, a interação do LPS com as células do sistema imune resultam na liberação de: IL-1 (intraleucina-1), IL-6 (intraleucina-6), IL-12 (intraleucina-12) e TNF- α (Tumoral Necrose Factor- α). Diversas citocinas podem apresentar funções similares entre elas, generalizando-se biologicamente em algumas de suas ações. Por exemplo, a IL-1, TNF- α , TNF- β , IL-6 provocam a febre (TIZARD, 2002).

Estas ligações entre o LPS e os fagócitos monocelulares, levam a indução de respostas inflamatórias que são caracterizadas pela liberação de

alguns mediadores pró-inflamatórios (citocinas) (TAKEDA; KAISHO; AKIRA, 2003; DONN; RAY, 2004), ativando assim o eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal havendo a liberação do cortisol pela glândula adrenal (glicocorticoide predominante em ovinos) (CHROUSOS, 1995), para atuar como inibidor parcial da inflamação, induzindo a transcrição de moléculas anti-inflamatórias (ADCOCK; CARAMORI, 2001; ELLIOTT; JOHNSTONE, 2004).

3.3. Comportamento materno filial

Para os mamíferos os primeiros cuidados maternos momentos após o nascimento são essenciais para a sobrevivência da cria, possuindo fundamental importância para aprimorar a aptidão materna da mãe e a única forma de garantir alimento para o filhote nos primeiros dias de vida (NOWAK, 2000).

O papel desses cuidados também pode ser demonstrado, por sua influência na regulação e desenvolvimento do eixo hipotálamo-pituitário-adrenal, mediante a liberação de ACTH e conseqüentemente nos níveis de cortisol (LEVINE, 2001; LEVINE 2002).

Em espécies como os ovinos, o sucesso dessa relação é uma interação comportamental entre ovelha e cordeiro (DWYER, 2003).

No terço final da gestação, ocorrem algumas mudanças fisiológicas que facilitam o reconhecimento do cordeiro pela mãe após o parto (POINDRON et al., 1980; NOWAK; LINDSAY 1990). A relação entre mãe e filhote deve fluir como uma parceria bem sucedida, para que a cria possa ter um bom desenvolvimento durante toda a gestação, no parto e na lactação. Ou seja, o desempenho do cordeiro depende das condições e comportamentos da ovelha, antes, durante e depois da parição (NOWAK, 1996).

Logo após o parto há uma interação comportamental natural tanto por parte da ovelha (cheira, facilita primeira mamada, lambe) quanto por parte do cordeiro (lambe, cheira, procura o teto) para que ambos se identifiquem (POINDRON et al., 1980). Essa manutenção do comportamento materno filial é facilitada pela ação hormonal (estradiol, prolactina, ocitocina) e sensorial

(audição, olfato e visão) (MARIZ et al., 2007), que resulta na limpeza do cordeiro, balidos de baixa intensidade e aceitação do cordeiro ao úbere.

Já é comprovado também que os cuidados maternos nos primeiros momentos de vida são mais acentuados com filhotes que, por algum motivo, passaram por alguma situação aversiva, como a dor, por exemplo, podendo inclusive minimizar as possíveis consequências ao longo da vida desse filhote modulando essa experiência adversa (BLASS et al., 1995; WALKER et al., 2003; HILD; ANDERSEN; ZANELLA, 2010).

Essa aceitação de ambas as partes se faz tão importante, que de acordo com Alexander e Peterson (1961) a relação entre a taxa de mortalidade e o comportamento materno filial nas primeiras horas de vida, possui 52% da responsabilidade para a interação ovelha cordeiro, atribuindo 14% das mortes para o comportamento apenas da ovelha e 33% para o do cordeiro.

Essa relação entre mãe e cria está diretamente ligada com a primeira mamada, ou ingestão do colostro pelo cordeiro, fato que agrega não apenas reservas energéticas, mas proporciona imunidade ao filhote, aumentando as chances de sobrevivência (NOWAK; POIDRON, 2006).

3.4. Tipos distintos de desmamas e o desempenho de cordeiros confinados

A ação da desmama é um fator causador de estresse para o cordeiro. Segundo Orgeur et al. (1998) esta fase se faz crítica, devido à separação da mãe, em primeiro lugar, e em segundo pela mudança no hábito alimentar do filhote. A liberação do cortisol, resultante da ativação do sistema imunológico, causado pelo estresse da desmama, pode ter relação com a diminuição do hormônio do crescimento (GH) influenciando no crescimento do cordeiro (KUHN; PAUK; SCHANBERG, 1990; ORGEUR et al. 1998). A prática da desmama usualmente é realizada quando o cordeiro atinge a idade entre 45 e 50 dias (NAPOLITANO; DE ROSA; SEVI, 2008) podendo chegar até os 70 dias de idade.

Entretanto a forma com que ocorre essa desmama pode ter uma grande influencia sobre o estresse dos cordeiros.

Há formas distintas de se realizar a desmama, sendo uma delas a desmama abrupta, variando a idade do filhote e o objetivo do sistema produtivo, havendo casos que o cordeiro não chega a ter contato social algum com a ovelha (ORIHUELA; SUÁREZ; VÁZQUEZ, 2004). A forma abrupta é considerada por Grubb e Jewell (1966) como a que causa menores impactos sociais nos grupos de ovelhas e cordeiros, quando não realizada de maneira precoce.

A outra maneira de se realizar a desmama é a denominada controlada ou artificial, que pode induzir a um maior estresse, devido as constantes separações (ORGEUR et al., 1998) notando-se por comportamentos como um aumento na atividade locomotora e no balido, como forma de comunicação para não perderem contato (ALEXANDER, 1977; TORRES-HERNANDEZ; HOHENBOKEN, 1979). Entretanto, esse tipo de desmama antecipa a substituição do leite por alimentos sólidos (que normalmente possuem em torno de 25% de proteína bruta em base de matéria seca) antes da separação definitiva da ovelha e possibilita que mãe e filhote se acostumem com a separação de maneira gradativa (; NAPOLITANO et al., 1995; ORGEUR et al., 1998).

Os atributos que classificam a forma da desmama empregada são de extrema influência no peso que os cordeiros atingem no final a desmama. A taxa de crescimento do cordeiro é influenciada por diversos fatores que diretamente estão ligados a desmama, como o desencadeamento ou inibição hormonal, fatores ambientais e nutricionais (WIDDOWSON, 1980; GLUCKMAN, 1986). Owens; Dubeski; Hanson (1993) afirmam que o desempenho e desenvolvimento corporal desses animais podem ficar abaixo do determinado geneticamente, devido à inibição da divisão celular gerada pelos fatores citados.

Esse desempenho normalmente é mensurado através de medidas de alimento ingerido em valores de matéria seca, ganho de peso durante a vida do cordeiro, aproveitamento do alimento pela conversão e eficiência alimentar e por fim o rendimento de carcaça.

4. Material e Métodos Geral

4.1. Local

O experimento foi realizado no anexo do Laboratório de Biometeorologia e Etologia localizado no setor de caprino e ovinocultura da Prefeitura do Campus Administrativo da Universidade de São Paulo em Pirassununga-SP, em área sob as coordenadas 21° 59' de latitude sul e 47° 26' de longitude oeste (W.Gr) e altitude média de 635 metros. O clima da região é classificado, segundo Koppen, como Cwa, mesotérmico com chuvas predominantemente no verão, apresentando inverno seco e verões quentes, com temperatura média anual de 22°C e pluviosidade média anual próxima a 1363 mm.

4.2. Animais

4.2.1. Ovelhas

Inicialmente foram utilizadas 59 ovelhas mestiças da raça Santa Inês, pluríparas, que foram inseminadas com sêmen de macho da raça White Dorper, adotando-se o procedimento de inseminação artificial em tempo fixo (IATF), com idade média de 5 anos e 60 kg de peso vivo (PV), mantidas em pastagem de Coast-cross (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.) sobre a exploração de sistema rotacionado, com livre acesso a sombra, água e a suplementação mineral.

Para a sincronização do estro foram utilizadas esponjas intravaginais com 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP) (Progespon®, Intervet/Schering Plough Animal Health, São Paulo-SP, Brasil) em protocolo de 14 dias, seguindo da aplicação via intramuscular de 1,5 ml (300 UI) de gonadotrofina coriônica equina (eCG/PMSG) (Novormon®, Intervet/Schering Plough Animal Health, São Paulo-SP, Brasil) no dia da retirada das esponjas intravaginais (Figura 1a).

A inseminação artificial aconteceu 12 horas após a observação do estro, através do método de laparoscopia. A realização da ultrassonografia para o diagnóstico da gestação ocorreu aos 50 dias após as fêmeas terem sido

inseminadas, constatou-se prenhez em 43 ovelhas, as quais foram consideradas animais experimentais (Figura 1b).

4.2.2. Cordeiros

Entre machos e fêmeas as 43 ovelhas pariram 61 cordeiros, dos quais 46 foram desmamados, havendo uma taxa de perda de aproximadamente 23%, com 6 natimortos, 8 cordeiros mortos antes da desmama e 1 após a desmama.

Os nascimentos ocorreram na primeira quinzena de março de 2014 e os cordeiros foram mantidos no piquete maternidade até os sete dias de vida, posteriormente deslocados juntos das mães, para os piquetes explorados de forma rotacionada, formados de pastagem de Coast-cross (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.). Todos os filhotes tiveram acesso ao *creep-feeding* e o contato com suas mães até o momento do desmama.

Figura 1. a) Introdução da esponja vaginal. b) Inseminação artificial por laparoscopia.

4.3. Tratamentos

Os tratamentos foram constituídos pelo sistema fatorial 3 x 2 e delineado de maneira aleatória, com o esquema de distribuição sendo composto por 3 grupos submetidos ou não ao desafio com LPS durante diferentes fases de gestação das ovelhas (controle (Gc), aplicação de LPS aos 70 dias de gestação (Gi), aos 120 dias de gestação (Gf)) combinado com 2 tipos de

desmama (desmama abrupta (Da) e desmama controlada (Dc)), resultando assim em 6 tratamentos:

- GcDa: Controle (sem aplicação de LPS) e a realização da desmama abrupta;
- GcDc: Controle (sem aplicação de LPS) e a realização da desmama controlada;
- GiDa: Submissão dos animais à aplicação de LPS no 70º dia de gestação e a desmama abrupta;
- GiDc: Submissão dos animais à aplicação de LPS no 70º dia de gestação e a desmama controlada;
- GfDa: Submissão dos animais à aplicação de LPS no 120º dia de gestação e a desmama abrupta;
- GfDc: Submissão dos animais à aplicação de LPS no 120º dia de gestação e a desmama controlada.

4.3.1. Projeto Piloto

Para a determinação da dosagem de LPS a se aplicar nas ovelhas durante o período experimental, foi realizado um projeto piloto com 6 ovelhas não prenhes, com idade média de 5 anos e 60 kg de PV, mantidas em baias individuais de 1,3 m de comprimento x 1,2 m de largura, para o teste com dosagens de $0,2 \mu\text{g.kg}^{-1}$ PV (n=2); $0,4 \mu\text{g.kg}^{-1}$ PV (n=2) e $0,8 \mu\text{g.kg}^{-1}$ PV (n=2). Esses animais passaram por um período de adaptação de 5 dias nas baias antecedendo o dia das colheitas. Em todos os dias os animais tiveram acesso à alimentação *ad libitum* e água de boa qualidade.

As colheitas de sangue foram realizadas pelo sistema a vácuo através da punção venosa intrajugular, para determinação do cortisol e as medidas de temperatura retal foram colhidas com o uso de termômetro digital.

Momento antes da aplicação do LPS foi colhida a primeira amostra de sangue classificada como basal. A partir daí, após a aplicação do LPS, as três primeiras colheitas seguiram com intervalos de 60 minutos cada (5h00min; 6h00min; 7h00min), passando esse intervalo para 120 minutos até o complemento das 12 horas. A última colheita aconteceu as 5h00min do outro dia, para a averiguação do nível de cortisol 24 horas após aplicação do LPS.

Concomitantemente às colheitas de sangue aconteceram também as medições da temperatura retal (TR °C), que foram realizadas por termômetro digital.

4.3.2. Grupo durante a gestação

Durante a gestação as 43 ovelhas foram divididas em 3 grupos experimentais, onde foram submetidos ou não à estresse imunológico pela aplicação de Lipopolissacarídeo (*E. coli*) (Figuras 2a e 2b).

- Grupo Controle (Gc): composto por 15 ovelhas, o grupo que não sofreu aplicação de LPS. Porém, para se neutralizar qualquer efeito da introdução da agulha, o grupo recebeu doses de placebo nos dias de colheita.
- Grupo fase intermediária (Gi): composto por 14 ovelhas, o grupo foi submetido a um estresse simulado devido à aplicação intravenosa de 0,8µg/kg PV de LPS (*E.coli* 0127:B8, Sigma Aldrich, EUA) durante a fase intermediária da gestação (70±7 dias). Na fase final de gestação receberam dose de placebo como o grupo controle.
- Grupo fase final (Gf): composto por 14 ovelhas, esse grupo também foi desafiado pela manipulação intravenosa de 0,8µg.kg⁻¹ PV de LPS (*E.coli* 0127:B8, Sigma Aldrich, EUA), porém durante a fase final da gestação (120 ± 7 dias).

É importante ressaltar que tanto o grupo fase intermediária (Gi) quanto o grupo fase final (Gf) receberam placebo, durante a colheita em que não foram desafiados com o LPS.

Figura 2. a) Baías individuais para aplicação do LPS e colheita de sangue.
b) Aplicação intravenosa do LPS.

4.3.3. Tipos de desmamas

Todos os cordeiros permaneceram com suas mães no piquete de maternidade até os sete dias de vida sendo alocados posteriormente aos piquetes de manejo rotacionado, onde tiveram acesso ao concentrado no *creep-feeding* (Tabela 1) – composto por milho moído (63,1%), farelo de soja (31,1%), calcário calcítico (0,8%) e núcleo (5%) - até a ocorrência do desmama que aconteceu aos 45 dias de vida, sendo realizadas de duas maneiras:

- Desmama controlada (Dc) – a partir dos 39 dias de vida os cordeiros tiveram acesso ao leite materno apenas no período noturno até a desmama com 45 dias.
- Desmama abrupta (Da) - os cordeiros tiveram acesso ao leite materno até completarem 45 dias de vida quando foram separados de suas mães.

Tabela 1. Composição nutritiva do concentrado ofertado no *creep-feeding*

Nutrientes	Quantidade
Proteína Bruta	24,9%
NDT (estimado)	80,0%
Energia Metabolizável no Rúmen	2.860 Mcal/kg MS

4.4. Comportamento materno filial

A averiguação do comportamento materno filial se deu no intuito de analisar a existência ou não da influência dos níveis de cortisol no vínculo maternal entre a ovelha e o cordeiro recém-nascido (Figura 3). Seguindo a metodologia adaptadas de McGlone e Strobart (1986), Roda, Santos e Oliveira (1989), Mobini et al. (2005) e Toledo et al. (2007) para a observação ao parto, e para as demais observações foi utilizada a metodologia adaptada de Paranhos da Costa e Cromberg (1998).

O etograma de trabalho utilizado (Tabela 2) considera os comportamentos característicos do pós-parto, classificando-os em duas classes de observação: postura e atividade. Para cada observação serão registrados simultaneamente um tipo de postura e um tipo de atividade para cada animal e seu par (mãe-cria), para se estabelecer o perfil de comportamento de ovelhas e seus filhos no pós-parto.

Tabela 2. Etograma de trabalho

	Comportamento	Descrição
<i>Postura</i>	01 Em pé	Com os 4 apoios no chão
	02 Deitado	Em decúbito ventral ou dorsal
	03 Em deslocamento	Alternância de local
<i>Atividade</i>	Ovelha	
	01 Contato com o cordeiro	Toque com o focinho ou cabeça
	02 Limpeza do cordeiro	Ato de lambar e ingerir membranas aderidas no corpo do cordeiro
	03 Ingerindo membranas	Ingerindo membranas não aderidas no corpo do cordeiro
	04 Facilitando a mamada	Permitindo a procura e o acesso aos tetos
	05 Estimulando a mamada	Ações como cheirar, lambar ou outra forma de aliciamento
	05 Dificultando a mamada	Não permitindo acesso aos tetos através de seus movimentos
	06 Afastando-se da cria	Distância que não permite contato com a

		cria
	07 Agredindo a cria	Ações como cabeçadas e empurrões
	08 Outras atividades	Qualquer ação não descrita acima
<i>Atividade</i>	Cordeiro	
	01 Tentando levantar	Mantém pelo menos uma parte do corpo fora do chão
	02 Levantar	Cordeiros com apoio sobre as quatro patas
	03 Procurando úbere	Tentativa de encontrar os tetos
	04 Tentando mamar	Tentativa de sugar o leite dos tetos
	06 Mamada	Ação de sucção do colostro
	07 Outras	Qualquer ação não descrita acima

Houve treinamento prévio da equipe que utilizou o etograma de trabalho, com o intuito de minimizar a discrepância nas observações, tornando-as o mais uniforme possível.

Foram avaliados os tipos de partos, segundo a quantidade de cordeiros nascidos (simples ou duplo) e observados e registrados de maneira continua os comportamentos das matrizes e cordeiros entre o parto e até a primeira mamada (tempo para a primeira mamada) do filhote ou até a primeira hora de vida do cordeiro.

4.5. Descrição dos manejos de desmama

Ambos os tipos de desmamas foram realizados aos 45 dias de vida dos cordeiros (machos e fêmeas), sendo os animais distribuídos para a escolha do tipo de desmama que iriam ser submetidos de maneira aleatória. Tendo em vista alcançar a proporcionalidade equivalente de cordeiros foi considerado os grupos que eram pertencentes durante a gestação (Gc, Gi e Gf), para que houvesse a maior similaridade do número de animais entre todos os tratamentos (3 grupos na gestação x 2 tipos de desmama).

Durante o processo de desmama, foram realizadas colheitas de sangue dos cordeiros, para a avaliação dos níveis de cortisol.

Na Desmama controlada (Dc) as colheitas de sangue foram realizadas durante os seis dias do processo de desmama. Do 39º ao 44º dias de vida dos cordeiros foram realizadas três colheitas por dia – 1ª após a separação, porém ainda com a possibilidade de contato sonoro com a mãe (as 7 horas), a segunda 60 minutos após a separação diária da mãe (as 8 horas) e a terceira 180 minutos após a separação diária da mãe (as 10 horas). No 45º houve a separação definitiva da mãe, com as três colheitas no tempo 0, 60 minutos após a separação e 180 minutos após a separação da mãe. No 46º e 47º dias as colheitas foram realizadas apenas no horário das 7 horas, 24 horas após a 1ª colheita e 48 horas depois, respectivamente. Na Desmama abrupta (Da) foram realizadas três coletas no 45º dia de vida dos cordeiros antes da entrada no confinamento – 1ª durante o último contato com a mãe; 2ª 60 minutos após a entrada no confinamento; 3ª 180 minutos após a entrada no confinamento. Uma colheita no 46º dia de vida do cordeiro, 24 horas após a 1ª coleta e outra no 47º dia 48 horas depois.

Para as colheitas de sangue e medidas de TR, os animais foram selecionados aleatoriamente no primeiro horário do primeiro dia de avaliação. Seguindo a mesma ordem de animais nos demais horários e dias em todas as colheitas dos tipos de desmama (colheitas ordenadas).

4.6. Níveis de cortisol e medidas de temperatura retal (TR)

As colheitas de sangue para a determinação dos níveis de cortisol foram realizadas no projeto piloto, durante a gestação, momentos após o parto e durante os manejos de desmama, pelo sistema a vácuo através da punção venosa intrajugular. Todas as amostras de sangue foram centrifugadas em uma centrífuga de bancada com rotação de 3000 giros por 15 minutos, para a realização das análises de cortisol pelo método de eletroquimioluminescência.

Durante a gestação, cada colheita aconteceu durante um período de 24 horas para a determinação do ritmo circadiano do cortisol. Desta forma foi possível averiguar a curva completa do hormônio, como sinalizador do estresse induzido com a aplicação do LPS. Tanto na fase intermediária (70 dias) quanto na fase final (120 dias) todas as ovelhas prenhes foram alojadas em baias

individuais de 1,30 m de comprimento por 1,20 m de largura para que fosse possível a colheita sanguínea. Os animais passaram por uma fase de adaptação de cinco dias antes da data das colheitas com acesso à água de boa qualidade e alimento *ad libitum* (Figura 4 a).

Momento antes da aplicação do LPS foi colhida a primeira amostra de sangue classificada como basal. A partir daí, após a aplicação do LPS, as três primeiras colheitas seguiram com intervalos de 60 minutos cada (5h00min; 6h00min; 7h00min), passando esse intervalo para 120 minutos até a última colheita no complemento das 24 horas. Concomitantemente às colheitas de sangue aconteceram também as medições da temperatura retal (TR °C), que foram realizadas por termômetro digital (Figura 4 b).

Para os animais que não recebiam a aplicação de LPS no dia das colheitas, foram injetadas também de forma intravenosa doses de placebo de solução salina para neutralizar qualquer efeito que a invasão da agulha pudesse gerar.

Logo após as observações do comportamento materno filial – momentos pós-parto - foram colhidas amostras sanguíneas tanto da mãe quanto do(s) filhotes(s) recém-nascidos, para a determinação dos níveis de cortisol naquele instante, sendo possível relacioná-los com tal comportamento e analisar a possível interferência que esses níveis poderiam gerar.

Na desmama o cortisol e a temperatura retal, de todos os cordeiros, foram medidos com o intuito de comparar o estresse instituído pela separação de ovelha e cordeiro, e verificar qual tipo de desmama – se a controlada ou a abrupta – acusaria maior interferência no desempenho desses cordeiros após a entrada desses animais no confinamento.

4.7. Fase de confinamento

Logo após a desmama os cordeiros foram alojados em baias individuais de 1,20m de comprimento por 1,30m de largura, onde permaneceram 73 dias em regime de confinamento, precedidos de sete de adaptação (Figura 5 a). A dieta ofertada (Tabela 3) foi uniforme para todos os tratamentos, tendo a silagem de milho como alimento volumoso, na proporção de 30% em base de

matéria seca (MS) e o concentrado – composto por milho moído (49,6%), farelo de soja (17,7%), sal mineral (1,8%) e calcário calcítico (0,9%) - na proporção de 70% também em base de matéria seca (MS). O fornecimento foi realizado duas vezes ao dia (07h00min e às 16h00min) (Figura 5 b).

Cada animal recebeu sua alimentação de forma individual, e assim diariamente foram pesados a silagem e o concentrado e a quantidade ofertada foi resultante do consumo verificado no dia anterior (as sobras foram pesadas diariamente), com um acréscimo de 20% de sobras, para não impedir a seleção dos alimentos. Diariamente os bebedouros individuais foram limpos e abastecidos, mantendo sempre água de boa qualidade à disposição dos animais. Semanalmente as sobras foram amostradas, e estas foram congeladas para posterior determinação da matéria seca (MS), conforme procedimento descrito pela AOAC (1990). Assim foi possível avaliar o desempenho do cordeiro no confinamento de acordo com a ingestão de matéria seca (IMS: calculada pela soma das quantidades de MS de concentrado e volumoso fornecido por animal, subtraído pela MS da sobra), a conversão alimentar (CA: calculada pela divisão entre a ingestão de matéria seca e o ganho de peso sendo ambos ao longo de todo o período do confinamento) e a eficiência alimentar (EA: calculada pela divisão do ganho médio diário pela média diária da ingestão de matéria seca). Os animais também foram pesados semanalmente, em uma balança de até 150 kg com variação de 1g, para a obtenção dos valores do ganho médio diário (GMD: valor atribuído ao peso vivo do cordeiros de saída do confinamento menos o peso vivo de entrada, dividido pelo número de dias que os animais permaneceram confinados). Após o abate as carcaças foram avaliadas quanto aos seus rendimentos quente e frio.

Tabela 3. Composição nutritiva da dieta de cordeiros confinados

Nutrientes	Quantidade
Proteína Bruta	15,35 %
NDT (estimado)	77,0 %
Energia Metabolizável no Rúmen	2.795,00 Mcal/kg MS

Figura 3. Observação do comportamento materno filial.

Figura 4. a) Colheita de sangue durante a gestação. b) Medida de TR ($^{\circ}\text{C}$) na gestação.

Figura 5. a) Baías individuais de confinamento. b) Pesagem e oferta de alimento.

4.8. Análise de dados

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) tendo um fatorial 3 x 2 como o esquema de distribuição dos tratamentos composto por 3 grupos durante a gestação (controle (Gc), aplicação de LPS aos 70 dias de gestação (Gi) e o aos 120 dias de gestação (Gf)) combinando com 2 tipos de desmama (desmama controlada (Dc) e desmama abrupta (Da)).

Para análise dos dados de cortisol e temperatura retal durante a gestação foi realizada análise de variância (MIXED-SAS) com divisão entre as fases de gestação. Na fase intermediária (70 dias) foram incluídos efeitos fixos de tempo de colheita (14 medidas em 24 horas), aplicação ou não de LPS e suas interações, assim como efeito aleatório de pico de cortisol sobre a temperatura retal e de pico de temperatura retal sobre o cortisol. As médias foram comparadas pelo teste F e teste t de Student (PDIFF). Na fase final de gestação (120 dias) as análises foram semelhantes, porém foi incluído como efeito aleatório o pico de cortisol observado na fase intermediária de gestação.

No parto, para análise de cortisol do cordeiro foram incluídos efeitos fixos de desafio de estresse via LPS na gestação (controle, intermediária e final), sexo e níveis de cortisol gerados pelo LPS e suas interações, assim como efeito aleatório de peso ao nascer, nível de cortisol da ovelha no parto e pico de cortisol e temperatura retal na gestação. As médias foram comparadas pelo teste F e teste t de Student (PDIFF). Para peso ao nascer foi realizada a mesma análise, e foram incluídos os mesmos efeitos fixos e aleatórios utilizados na análise do cortisol, porém trocando o efeito aleatório de peso ao nascer por cortisol do cordeiro no parto.

Para a análise dos dados de comportamento materno-filial foram realizadas análises exploratórias com o propósito de caracterizar a forma de distribuição dos dados e as fontes de variação mais relevantes, sendo que a partir destes resultados foi utilizado o modelo ajustado utilizando-se a teoria de modelos lineares generalizados, utilizando-se o procedimento GLIMMIX do software SAS. Para avaliação das variáveis comportamentais, a partir das porcentagens das frequências de ocorrência das diferentes variáveis categóricas relacionadas ao etograma de trabalho, foi realizada a

transformação de escala dos dados para “arco-seno raiz de porcentagem”, procedendo-se à análise de variância. O modelo estatístico contemplou os efeitos de desafio de estresse via LPS na gestação (controle, intermediária e final) e tipo de parto (simples ou duplo), bem como a interação estresse na gestação e tipo de parto, e o procedimento para comparações múltiplas (PDIFF) com os transformados. Para apresentação dos resultados os dados foram retornados à escala original. O tempo de mamada foi analisado por variância com efeito fixo de desafio de estresse via LPS na gestação (controle, intermediária e final), tipo de parto e sua interação, com comparação de médias pelo teste F e teste t de Student (PDIFF).

A desmama foi dividida em três análises distintas. Na primeira análise da desmama controlada para cortisol e temperatura retal foram incluídos os seis primeiros dias de separação do cordeiro de sua mãe, com efeito fixo de sexo, dia de separação (1 a 6), tempo de colheita (0h; 1 hora depois, 3 horas depois da separação), desafio de estresse via LPS na gestação (controle, intermediária e final) e suas interações. A segunda análise foi realizada no dia da separação final para a desmama controlada e abrupta, com efeitos fixos de sexo, tempo de colheita (0h; 1 hora depois, 3 horas depois da separação), desafio de estresse via LPS na gestação (controle, intermediária e final) e tipo de desmama, bem como suas interações. A terceira análise foi realizada para os três dias subsequentes à separação final do par, com efeitos fixos de sexo, dia de separação (1, 2, 3), desafio de estresse via LPS na gestação (controle, intermediária e final), tipo de desmama e suas interações. As médias foram comparadas pelo teste F e teste t de Student (PDIFF).

Para as variáveis de desempenho foram realizadas análise de variância com efeitos fixos de desafio de estresse via LPS na gestação (controle, intermediária e final), sexo, tipo de desmama e suas interações. Foi incluído como efeito aleatório o peso ao nascer e peso à desmama. As médias foram comparadas pelo teste F e teste t de Student (PDIFF).

5. Experimento 1: Efeito da administração de Lipopolissacarídeo (*E. coli*) em ovelhas gestantes: influência materna e sobre cordeiro no pós-parto.

RESUMO

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de analisar a influência do estresse, gerado pelo uso de LPS, em diferentes períodos gestacionais sobre os níveis de cortisol e temperatura retal das ovelhas, o comportamento materno filial, os níveis de cortisol logo após o parto, peso ao nascer (PN) dos cordeiros e o tempo gasto para a primeira mamada. O experimento foi realizado no anexo do Laboratório de Biometeorologia e Etologia localizado no setor de caprino e ovinocultura da Prefeitura do Campus Administrativo da Universidade de São Paulo em Pirassununga-SP. Foram utilizados 43 ovelhas, mestiças da raça Santa Inês, e 55 cordeiros, proveniente da IATF com sêmen de macho White Dorper, divididos em 3 tratamentos: Grupo Controle (Gc) que não sofreu aplicação de LPS; Grupo fase intermediária (Gi) submetido a um estresse devido à aplicação intravenosa LPS durante a fase intermediária da gestação (70 ± 7 dias); Grupo fase final (Gf) grupo que também foi desafiado pela manipulação de LPS, porém durante a fase final da gestação (120 ± 7 dias). As médias foram comparadas pelo teste F e teste t de Student (PDIFF), com um nível de significância de 5%. Na fase intermediária da gestação, analisando o ritmo circadiano do cortisol e da TR para os tratamentos Gc e Gi pela interação entre tratamento e tempo foram observados maiores valores de cortisol e TR para Gi ($P < 0,05$). Na fase final com a mesma interação entre tratamento e tempo, os maiores valores de cortisol e temperatura durante o ritmo circadiano foram de Gf ($P < 0,05$). Para as avaliação do comportamento materno filial, as observações das posturas e das atividades tanto das ovelhas quando dos cordeiros, foram analisadas pela interação entre tratamento e tipo de parto ($P < 0,05$). Também houve interação entre tratamento e o tipo de parto para o tempo a primeira mamada tendo o tratamento Gf em situação de parto duplo apresentado o maior tempo, não sendo diferente apenas do tratamento Gi também com parto duplo ($P > 0,05$). Analisando o PN, a interação aconteceu entre tratamento e sexo com os menores valores observados para o tratamento

Gf quando comparados aos demais tratamentos ($P < 0,05$). O LPS alterou os níveis de cortisol durante o ritmo circadiano, assim como o estresse durante a gestação influenciou no comportamento materno filial. Os animais submetidos ao estresse durante o terço final da gestação apresentaram maior gasto de tempo para ingerir colostro e pesos mais leves no nascimento.

Palavras chave: Cortisol; ovinos; peso ao nascer; primeira mamada.

5.1. Introdução

Situações estressantes durante a gestação ovina comprometem o desenvolvimento fetal (COULON et al., 2012). A fase da gestação em que esse estresse agride os indivíduos pode ser determinante para a sobrevivência do feto. Se considerarmos a fase de maior desenvolvimento do cordeiro, o estresse no terço final da gestação torna-se um problema ainda mais agravante no que diz respeito à manutenção à vida e ao crescimento desse animal (HILD et al., 2011).

As primeiras respostas do animal na tentativa de evitar uma situação de estresse é a mudança de seu comportamento normal e a ativação do sistema nervoso central (MORBERG, 2000; ELOY, 2007).

Inflamações geradas por bactérias gram-negativas, ou a parte externa dessas, também denominadas Lipopolissacarídeos, podem trazer alterações danosas ao ambiente gestacional (KABAROFF et al., 2006; TUIN et al., 2006). Com apenas um desafio de LPS ao organismo, as respostas imunológicas podem ser influentes em longo prazo (IWASA et al., 2009), podendo interromper ou modificar a exibição dos comportamentos normais. Segundo Hood, Dreschel e Granger (2003) receptores específicos de LPS são encontrados em macrófagos de vertebrados.

Respostas inflamatórias são induzidas pela ligação entre o LPS e esses receptores (TAKEDA; KAISHO; AKIRA, 2003; DONN; RAY, 2004), e a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal ocorre resultando na liberação de cortisol (CHROUSOS, 1995) para induzir na transcrição de moléculas anti-inflamatórias (ADCOCK; CARAMORI, 2001; ELLIOTT; JOHNSTONE, 2004).

De acordo com Poindron et al. (1980) e Nowak e Lindsay (1990) o conhecimento da mãe pelo cordeiro, ainda durante a gestação, também acontece no terço final da gestação devido à algumas mudanças fisiológicas. Sem que haja interferência, o comportamento entre ovelha e cordeiro tido como normal logo após o parto parte de ações correspondentes tanto maternas (limpa, lambe, facilita a mamada, cheira) quanto filiais (aproxima, procura o teto, cheira, mama) para que ambos possam se identificar (POINDRON et al., 1980) como mãe e filhote sem que haja perdas ou adversidades entre eles. Já é comprovado também que os cuidados maternos nos primeiros momentos de vida são mais acentuados com filhotes que, por algum motivo, passaram por alguma situação aversiva, como a dor, por exemplo, podendo minimizar as possíveis consequências ao longo da vida desse filhote modulando essas experiências adversas (BLASS et al., 1995; WALKER et al., 2003; HILD; ANDERSEN; ZANELLA, 2010).

O objetivo do experimento foi analisar a influência do estresse, gerado pelo uso de LPS, em diferentes períodos gestacionais sobre os níveis de cortisol e temperatura retal das ovelhas, o comportamento materno filial, os níveis de cortisol logo após o parto, o peso ao nascer (PN) dos cordeiros e o tempo gasto para a primeira mamada.

5.2. Material e Métodos

5.2.1. Local e animais

O experimento foi realizado no anexo do Laboratório de Biometeorologia e Etologia localizado no setor de caprino e ovinocultura da Prefeitura do Campus Administrativo da Universidade de São Paulo em Pirassununga-SP, em área sob as coordenadas 21° 59' de latitude sul e 47° 26' de longitude oeste (W.Gr) e altitude média de 635 metros. O clima da região é classificado, segundo Koppen, como Cwa, mesotérmico com chuvas predominantemente no verão, apresentando inverno seco e verões quentes, com temperatura média anual de 22°C e pluviosidade média anual próxima a 1363 mm.

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FZEA/USP, nº protocolo 13.1.2109.74.8.

Foram utilizadas 43 ovelhas mestiças da raça Santa Inês, múltíparas, com idade média de 5 anos e 60 kg de peso vivo (PV), mantidas em pastagem de Coast-cross (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.) sob a exploração de sistema rotacionado, com livre acesso a sombra, água e a suplementação mineral. Todas as fêmeas experimentais tiveram o cio sincronizado para a realização de inseminação artificial (IA) com sêmen de machos da raça White Dorper.

As fêmeas foram divididas em 3 tratamentos de maneira aleatória, submetidas ou não à estresse imunológico pela aplicação de Lipopolissacarídeo (*E. coli*).

- A) Grupo Controle (Gc): composto por 15 ovelhas, o grupo que não sofreu aplicação de LPS. Porém para neutralizar qualquer efeito invasivo da agulha, o grupo recebeu doses de placebo nos dias de colheita.
- B) Grupo fase intermediária (Gi): composto por 14 ovelhas, o grupo foi submetido a um estresse simulado devido à aplicação intravenosa de $0,8\mu\text{g.kg}^{-1}$ PV de LPS (*E.coli* 0127:B8, Sigma Aldrich, EUA) durante a fase intermediária da gestação (70 ± 7 dias).
- C) Grupo fase final (Gf): composto por 14 ovelhas, esse grupo também foi desafiado pela manipulação intravenosa de $0,8\mu\text{g.kg}^{-1}$ PV de LPS (*E.coli* 0127:B8, Sigma Aldrich, EUA), porém durante a fase final da gestação (120 ± 7 dias).

5.2.2. Projeto Piloto

Para a determinação da dosagem de LPS a se aplicar nas ovelhas durante o período experimental, foi realizado um projeto piloto com 6 ovelhas não prenhes, com idade média de 5 anos e 60 kg de PV, mantidas em baias individuais de 1,3 m de comprimento x 1,2 m de largura, para o teste com dosagens de $0,2\mu\text{g.kg}^{-1}$ PV (n=2); $0,4\mu\text{g.kg}^{-1}$ PV (n=2) e $0,8\mu\text{g.kg}^{-1}$ PV (n=2). Esses animais passaram por um período de adaptação de 5 dias nas baias antecedendo o dia das colheitas. Em todos os dias os animais tiveram acesso à alimentação *ad libitum* e água de boa qualidade.

As colheitas de sangue foram realizadas pelo sistema a vácuo através da punção venosa intrajugular, para determinação do cortisol e as medidas de temperatura retal foram colhidas com o uso de termômetro digital.

Momento antes da aplicação do LPS foi colhida a primeira amostra de sangue classificada como basal. A partir daí, após a aplicação do LPS, as três primeiras colheitas seguiram com intervalos de 60 minutos cada (5h00min; 6h00min; 7h00min), passando esse intervalo para 120 minutos até o complemento das 12 horas. A última colheita aconteceu as 5h00min do outro dia, para a averiguação do nível de cortisol 24 horas após aplicação do LPS. Concomitantemente às colheitas de sangue aconteceram também as medições da temperatura retal (TR °C), que foram realizadas por termômetro digital.

5.2.3. Ritmo circadiano do cortisol e temperatura retal durante a gestação

As colheitas de sangue e temperatura retal foram realizadas em dois dias distintos, um em cada fase de gestação das ovelhas (aos 70 dias e aos 120 dias) durante 24 horas, com o intuito de mensurar o ritmo circadiano do cortisol. As 43 fêmeas foram alojadas em baias individuais de 1,30 m de comprimento por 1,20 m de largura para que fosse possível a colheita sanguínea. Os animais passaram por uma fase de adaptação de cinco dias antes da data das colheitas, com água de boa qualidade e alimento *ad libitum*. As colheitas de sangue foram realizadas em tubos a vácuo através da punção venosa intrajugular, a partir da denominada amostra basal (05h00min). Neste mesmo horário o grupo Gi recebeu a aplicação intravenosa do LPS aos 70 dias de gestação e o grupo Gf recebeu a aplicação aos 120 dias de gestação. Para simular o efeito invasivo criado pela introdução da agulha, os animais que não recebiam a dose de LPS receberam doses de placebo nesse mesmo horário, ou seja na fase intermediária da gestação (70 ± 7 dias) Gc e Gf receberam as doses de placebo após a mensuração basal, e na fase final (120 ± 7 dias) Gc e Gi foi quem recebeu. Em um intervalo de 60 minutos ocorreram mais duas colheitas (06h00min e 07h00min), na sequência as colheitas foram realizadas em intervalos de 120 minutos até o complemento das 24 horas (05h00min). A

TR foi mensurada por termômetro digital (V966F/V965F Vicks® ComfortFlex® Digital) concomitantemente às colheitas de sangue.

Durante o período experimental os dados meteorológicos temperatura do ar (Tar), umidade relativa (UR) e temperatura de globo negro (TGN) do galpão foram medidos com o uso de data logger (HOBO® U12-013 Data Logger), (Tabela 4).

Tabela 4. Média dos dados meteorológicos observados durante a fase intermediária (70 dias) e fase final (120 dias) de gestação das ovelhas.

	Fase Intermediária			Fase Final		
	Tar (°C)	UR (%)	TGN (°C)	Tar (°C)	UR (%)	TGN (°C)
5h00min	18,7	84,2	18,1	20,3	79,3	20,6
6h00min	18,1	84,4	17,7	20,7	81,9	20,6
7h00min	18,3	85,6	18,4	20,1	83,4	20,0
9h00min	22,3	73,5	22,4	23,8	75,6	24,2
11h00min	27,8	57,5	28,7	30,5	47,5	31,1
13h00min	31,1	50,1	32,4	33,7	35,7	34,4
15h00min	31,8	46,0	33,4	32,8	40,1	33,5
17h00min	32,2	42,6	33,9	35,4	34,6	36,7
19h00min	30,1	46,1	31,3	31,7	41,6	32,1
21h00min	23,6	70,4	23,5	27,6	54,3	27,8
23h00min	22,7	75,2	22,8	25,9	64,5	26,0
1h00min	20,8	82,4	20,8	23,7	72,3	23,6
3h00min	19,9	85,4	19,8	22,2	80,7	22,0
5h00min	19,6	87,0	19,6	22,2	84,7	22,0

Tar (°C): Temperatura do ar; UR (%): Umidade Relativa; TGN (°C): Temperatura de Globo Negro.

5.2.4. Comportamento materno filial e análises pós-parto

Os 55 cordeiros que foram utilizados tiveram seus partos concentrados em quinze dias, sendo mantidos no piquete maternidade até os sete dias de vida, juntos de suas respectivas mães, sendo transferidos para os piquetes rotacionados após a primeira semana.

As observações de comportamento foram realizadas do momento do parto até a primeira mamada do cordeiro ou com as observações sendo encerradas com um tempo limite de uma hora após o parto, estabelecendo-se assim o perfil comportamental entre a ovelha e seu(s) filhote(s). O

comportamento foi observado pelo método focal de forma contínua, utilizando-se o etograma de trabalho (Tabela 2), que considerou os comportamentos característicos do pós-parto em conjunto (mãe-filhote(s)), para as posturas (em pé, deitado, em deslocamento) e atividades de cada “par” animal (ovelha-cordeiro) (adaptadas de McGlone; Stobart, 1886; Roda et al., 1989; Mobini et al., 2005; Toledo et al., 2007; Paranhos da Costa; Cromberg, 1998).

Houve treinamento prévio da equipe que utilizou o etograma de trabalho, com o intuito de minimizar a discrepância nas observações, tornando-as o mais uniforme possível.

Também foram avaliados os tipos de parto, segundo a quantidade de cordeiros nascidos (simples ou duplo).

Logo após a primeira mamada do colostro ou ao atingir o tempo limite de uma hora após o parto foram colhidas amostras sanguíneas com o uso de tubos à vácuo através da punção venosa intrajugular da mãe e do(s) filhotes(s) recém-nascidos, para a determinação dos níveis de cortisol.

5.2.5. Análise de dados

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) com os animais divididos em 3 tratamentos durante a gestação (controle (Gc), aplicação de LPS aos 70 dias de gestação (Gi) e o aos 120 dias de gestação (Gf)).

Para análise dos dados de cortisol e temperatura retal durante a gestação foi realizada análise de variância (MIXED-SAS) com divisão entre as fases de gestação. Na fase intermediária (70 dias) foram incluídos efeitos fixos de tempo de colheita (14 medidas em 24 horas), aplicação ou não de LPS e suas interações, assim como efeito aleatório de pico de cortisol sobre a temperatura retal e de pico de temperatura retal sobre o cortisol. As médias foram comparadas pelo teste F e teste t de Student (PDIFF). Na fase final de gestação (120 dias) as análises foram semelhantes, porém foi incluído como efeito aleatório o pico de cortisol observado na fase intermediária de gestação.

No parto, para análise de cortisol do cordeiro foram incluídos efeitos fixos de desafio de estresse via LPS na gestação (controle, intermediária e

final), sexo e níveis de cortisol gerados pelo LPS e suas interações, assim como efeito aleatório de peso ao nascer, nível de cortisol da ovelha no parto e pico de cortisol e temperatura retal na gestação. As médias foram comparadas pelo teste F e teste t de Student (PDIFF). Para peso ao nascer foi realizada a mesma análise, e foram incluídos os mesmos efeitos fixos e aleatórios utilizados na análise do cortisol, porém trocando o efeito aleatório de peso ao nascer pelos níveis de cortisol do cordeiro no parto.

Para a análise dos dados de comportamento materno-filial foram realizadas análises exploratórias com o propósito de caracterizar a forma de distribuição dos dados e as fontes de variação mais relevantes, sendo que a partir destes resultados foi utilizado o modelo ajustado utilizando-se a teoria de modelos lineares generalizados, utilizando-se o procedimento GLIMMIX do software SAS. Para avaliação das variáveis comportamentais, a partir das porcentagens das frequências de ocorrência das diferentes variáveis categóricas relacionadas ao etograma de trabalho, foi realizada a transformação de escala dos dados para “arco-seno raiz de porcentagem”, procedendo-se à análise de variância. O modelo estatístico contemplou os efeitos de desafio de estresse via LPS na gestação (controle, intermediária e final) e tipo de parto (simples ou duplo), bem como a interação estresse na gestação e tipo de parto, e o procedimento para comparações múltiplas (PDIFF) com os dados transformados. Para apresentação dos resultados os dados foram retornados à escala original. O tempo de mamada foi analisado por variância com efeito fixo de desafio de estresse via LPS na gestação (controle, intermediária e final), tipo de parto e sua interação, com comparação de médias pelo teste F e teste t de Student (PDIFF).

5.3. Resultados

5.3.1. Projeto Piloto

Na comparação das três dosagens de LPS é possível observar que a dosagem de $0,8\mu\text{g.kg}^{-1}$ PV foi a que apresentou resposta visualmente mais

expressiva tanto para os níveis de cortisol quanto para as medidas de temperatura retal (Figura 6 e 7).

Figura 6. Médias dos níveis de cortisol durante o projeto piloto, avaliando três doses de LPS.

Figura 7. Médias das medidas de temperatura retal durante o projeto piloto, avaliando três doses de LPS.

5.3.2. Fase intermediária da gestação

Os valores do ritmo circadiano do cortisol na fase intermediária sofreram efeito da aplicação de LPS, fato evidenciado pelo aumento do cortisol sanguíneo no tratamento Gi (Figura 8). Nesta etapa foram analisados apenas os dados dos tratamentos Gc e Gi, devido o Gf ter recebido apenas o placebo, como no Gc. Esta medida evita o confundimento dos tratamentos. O cortisol das ovelhas gestantes sofreu efeito do tempo (colheitas), dos tratamentos e da temperatura retal (co-variável), havendo interação entre tempo e tratamento no comparativo das médias.

Figura 8. Ritmo circadiano do cortisol em ovelhas gestantes submetidas à aplicação de lipopolissacarídeo (*E. coli*) dos grupos Gc e Gi durante a fase intermediária da gestação.

É possível observar que os valores basais do cortisol antes da aplicação do LPS de $2,44 \pm 0,702 \mu\text{g.dL}^{-1}$ Gc e $2,11 \pm 0,721 \mu\text{g.dL}^{-1}$, respectivamente para Gc e Gi, foram semelhantes entre os dois tratamentos ($P > 0,05$). Às 6h00min já se nota um aumento considerável deste nível para Gi alcançando o valor médio de $9,19 \pm 0,717 \mu\text{g.dL}^{-1}$ quando comparado com o seu próprio valor basal ($P < 0,01$). Ainda na segunda colheita o valor de Gc é de $2,10 \pm 0,700 \mu\text{g.dL}^{-1}$ não diferindo do seu anterior ($P > 0,05$), mas com distinção relevante ($P < 0,01$) quando comparado com Gi no mesmo horário.

Em ascensão contínua o nível de cortisol do tratamento Gi atinge o pico às 7h00min com valor de $13,00 \pm 0,712 \mu\text{g.dL}^{-1}$, se mantendo sem alterações significativas até as 9h00min $12,92 \pm 0,723 \mu\text{g.dL}^{-1}$ ($P > 0,05$). Posteriormente, inicia-se a diminuição a partir das 11h00min, quando o nível de cortisol de Gi alcança média de $8,68 \pm 0,720 \mu\text{g.dL}^{-1}$ ($P < 0,01$). Já os valores de Gc não são diferentes entre si nestes mesmos horários ($P > 0,05$), porém apresentam valores inferiores aos de Gi até as 13h00min ($P < 0,01$), quando voltam a serem semelhantes estatisticamente as 15h00min ($P > 0,05$) e permanecem até o complemento do ritmo circadiano, voltando ao seu nível basal.

Assim como ocorreu com os valores de cortisol, as temperaturas retais basais não diferiram estatisticamente ($P > 0,05$) entre os tratamentos, e ainda a

curva da temperatura não acompanhou a do cortisol em relação aos horários em que atingiram o pico (Figura 9).

Figura 9. Ritmo circadiano da temperatura retal (°C) em ovelhas gestantes submetidas à aplicação de lipopolissacarídeo (*E. coli*) dos grupos Gc e Gi durante a fase intermediária da gestação.

Considerando que a faixa de normalidade de temperatura retal para ovinos deslanados adultos seja entre 37,5 e 38,5, às 9h00min foi o primeiro horário em que as ovelhas do tratamento Gi ultrapassaram esse intervalo se mantendo acima dessa faixa durante todo o restante do dia, e, apesar de ter havido diferença significativa entre os valores de Gc e Gi, $38,07 \pm 0,113$ °C e $38,62 \pm 0,165$ °C respectivamente ($P < 0,05$), o pico de temperatura foi alcançado às 21h00min com $39,48 \pm 0,134$ °C para Gi e $39,03 \pm 0,131$ °C para Gc no mesmo horário ($P < 0,05$).

5.3.3. Fase final da gestação

Na fase final da gestação foi possível avaliar os 3 tratamentos Gc, Gi e Gf, pois apesar de não ter havido diferença significativa ($P > 0,05$) entre os valores dos níveis de cortisol e temperatura retal entre Gc e Gi (tratamentos que não sofreram estresse), houve efeito aleatório do tratamento e interação entre tempo (colheita) e tratamento considerando tanto a temperatura retal como variável dependente quanto os níveis de cortisol.

A curva dos valores de cortisol nesta fase (Figura 10) foi similar aos obtidos na fase intermediária, levando-se em conta o tratamento que foi submetido à aplicação de LPS e os que receberam doses de placebo.

Figura 10. Ritmo circadiano do cortisol em ovelhas gestantes submetidas à aplicação de lipopolissacarídeo (*E. coli*) dos grupos Gc, Gi e Gf durante a fase final da gestação.

Não foram encontradas diferenças nas suas colheitas basais ($P > 0,05$) entre os três tratamentos. Também não foi observado nos animais do Gi influência da aplicação do LPS na fase intermediária sobre os níveis do mesmo tratamento na fase final. Entre Gi e Gc foi observada diferença dos níveis de cortisol às 9h00min, onde o primeiro tratamento apresentou $2,64 \pm 0,350 \mu\text{g.dL}^{-1}$ e o último $1,57 \pm 0,322 \mu\text{g.dL}^{-1}$ ($P < 0,05$), porém estando esses dois níveis bem abaixo do valor de Gf no mesmo horário ($P < 0,01$).

É possível observar que o efeito do LPS sobre o sistema imunológico das ovelhas do tratamento Gf traz uma maior resposta quanto ao nível de cortisol de duas a quatro horas após sua aplicação. Fato que também é verídico na fase intermediária. O ápice do nível de cortisol para este tratamento aconteceu das 7h00min às 9h00min com valores de $9,72 \pm 0,341 \mu\text{g.dL}^{-1}$ e $8,98 \pm 0,334 \mu\text{g.dL}^{-1}$ respectivamente ($P > 0,05$), enquanto Gc apresentou $1,51 \pm 0,330 \mu\text{g.dL}^{-1}$ e Gi $1,13 \pm 0,349 \mu\text{g.dL}^{-1}$ às 7h00min, sem diferença significativa entre eles ($P > 0,05$), mas diferentes em relação à Gf neste horário

($P<0,01$). Houve uma diferença de $8,50 \mu\text{g.dL}^{-1}$ entre a colheita no basal e o pico do nível do cortisol para Gf.

As diferenças mais expressivas na evolução do ritmo circadiano do cortisol aconteceram entre às 6h00min e 13h00min, quando os valores de cortisol desencadeado pela ação do LPS em Gf foram muito superiores aos dos demais tratamentos ($P<0,01$). Às 15h00min o nível de cortisol sanguíneo de Gf começou a se normalizar, sendo diferente apenas de Gc nesse horário, com valores de $1,93 \pm 0,326 \mu\text{g.dL}^{-1}$ e $0,94 \pm 0,348 \mu\text{g.dL}^{-1}$ respectivamente ($P<0,05$). A partir deste momento não foram mais observadas diferenças significativas ($P>0,05$) entre os três tratamentos para o cortisol.

A curva da temperatura retal na fase final, assim como na fase intermediária, não seguiu os valores da curva do cortisol (Figura 11). Em momentos de pico de cortisol a temperatura retal atingiu seu menor valor para o tratamento Gf, ascendendo de maneira contínua até estabilizar-se atingindo sua maior contagem, para começar a descender, mas não atingir novamente seu valor inicial ($P<0,05$).

Figura 11. Ritmo circadiano da temperatura retal (°C) em ovelhas gestantes submetidas à aplicação de lipopolissacarídeo (*E. coli*) dos grupos durante a fase final da gestação.

A resposta ao estresse observado na temperatura retal para Gf ocorreu a partir das 7h00min, sendo diferente estatisticamente dos demais tratamentos às 9h00min quando atingiu $39,36 \pm 0,150$ °C ($P < 0,01$). Neste horário os animais do Gc apresentavam $38,43 \pm 0,102$ °C e os animais do Gi $38,68 \pm 0,114$ °C. Essa diferença continuou até às 15h00min. O pico de temperatura foi alcançado pelo tratamento Gf às 19h00min com 39,64 °C, onde voltou a diferir-se significativamente de Gc com 39,3 °C e Gi 39,31 °C ($P < 0,05$), não havendo mais diferenças entre os tratamentos ($P > 0,05$) até o final das mensurações, quando foram completadas às 24 horas de colheitas.

5.3.4. Análises pós-parto: comportamento materno filial, tempo à primeira mamada e níveis de cortisol

As análises do comportamento materno filial foram realizadas considerando a interação entre tratamento e o tipo de parto (simples e duplo). Foram avaliadas as posturas e as atividades de cada mãe em relação às posturas e atividades de todos os cordeiros recém-nascidos (Tabela 2).

5.3.4.1. Postura

Comparando somente as ovelhas pela interação tratamento e tipo de parto (Tabela 5), no tratamento Gc não houve diferença para a frequência em pé em relação ao parto simples e duplo ($P > 0,05$). A postura das fêmeas no tratamento Gi, independente do tipo de parto, foi diferente dos demais tratamentos ($P < 0,05$). Já o tratamento Gf foi idêntico ao Gc quando houve parto simples, porém foi diferente dos demais tratamentos quando o parto foi duplo ($P < 0,05$).

Tabela 5. Frequência (%) de postura das ovelhas durante as observações do comportamento materno filial no parto nos tratamentos Controle (Gc), submetidas à aplicação de lipopolissacarídeo (*E. coli*) na Fase Intermediária (Gi) e na Fase Final de gestação (Gf).

	Gc		Gi		Gf		P
%	Simple	Duplo	Simple	Duplo	Simple	Duplo	
Deitada	0 d	1,5 d	13,0 b	32,0 a	0 d	7,0 c	<0,05
Em Pé	100,0 a	98,0 a	87,0 c	68,0 d	100,0 a	93,0 b	<0,05
Deslocamento	0 a	0,5 a	0 a	0 a	0 a	0 a	>0,05

Letras minúsculas diferem estatisticamente nas linhas (P<0,05).

Relacionando as posturas dos cordeiros observadas durante este mesmo momento (Tabela 6), pode-se verificar que os animais referentes ao tratamento Gc nascidos de parto simples passaram mais tempo em pé (P<0,05) do que os cordeiros nascidos de partos duplos. No tratamento Gi os cordeiros permaneceram maior tempo deitado quando o parto foi simples, não deferindo estatisticamente de Gc apenas na postura deitado quando o parto foi duplo. Já para Gi em parto duplo, a postura de maior preferência para os cordeiros foi ficar em pé. Os valores de Gf no nascimento de apenas um cordeiro foram muito semelhantes aos de Gi com o mesmo tipo de parto (P>0,05), apresentando as maiores preferências por permanecerem deitados. Quando o parto foi duplo em Gf os animais também passaram a maior parte do tempo deitados, porém com menor diferença de proporção para a postura em pé.

Tabela 6. Frequência (%) de postura dos cordeiros durante as observações do comportamento materno filial no parto nos tratamentos Controle (Gc), nascidos de mães submetidas à aplicação de lipopolissacarídeo (*E. coli*) na Fase Intermediária (Gi) e Fase Final de gestação (Gf).

	Gc		Gi		Gf		P
%	Simple	Duplo	Simple	Duplo	Simple	Duplo	
Deitado	37 c	45 b	57 a	40,8 bc	57 a	51 ab	<0,05
Em Pé	63 a	54 b	43 c	58 ab	43 c	48 bc	<0,05
Deslocamento	0 a	0 a	0 a	1,2 a	0 a	1 a	>0,05

Letras minúsculas diferem estatisticamente nas linhas (P<0,05).

Devido a baixa incidência do comportamento deslocamento, tanto para as ovelhas quanto para os cordeiros, este não foi significativo ($P>0,05$).

5.3.4.2. Atividades

Os dados que representam as atividades das ovelhas na observação do comportamento materno filial, do início do parto até a primeira mamada do cordeiro estão expressos na Tabela 7. Relacionando-os com os dados das atividades dos filhotes neste mesmo momento (Tabela 8) é possível analisar a interação entre os tratamentos e os tipos de parto, conseguindo assim verificar a influência ou não do estresse gerado pelo LPS durante a gestação, interagido com o número de filhotes nascidos, em algumas atividades.

Entre as atividades das mães, a única em que não houve nenhuma diferença significativa entre as relações de tratamento e tipo de parto foi à denominada “outras” ($P>0,05$), isso devido a abrangência de atividades contidas no etograma de trabalho para a ocasião observada. É válido lembrar que para a atividade “agride” não houve nenhuma incidência para nenhum tratamento independente do tipo de parto.

Tabela 7. Frequência de atividades das ovelhas durante as observações do comportamento materno filial no parto, nos tratamentos Controle (Gc), submetidas à aplicação de lipopolissacarídeo (*E. coli*) Fase Intermediária (Gi) e Fase Final de gestação (Gf).

	Gc		Gi		Gf		P
%	Simples	Duplo	Simples	Duplo	Simples	Duplo	
Contato	16,0 a	8,0 b	15,0 a	18,0 a	8,0 b	9,0 b	<0,05
Limpeza	46,0 c	56,0 b	69,0 a	33,0 d	60,0 ab	64,0 ab	<0,05
Ingerindo membrana	5,5 ab	1,0 c	4,0 b	4,9 b	9,0 a	0,5 c	<0,05
Facilitando mamada	24,0 a	13,0 b	8,0 b	15,0 b	13,0 b	11,0 b	<0,05
Dificultando mamada	0 b	1,0 b	0 b	4,0 a	0 b	0 b	<0,05
Afastando do cordeiro	0,5 c	4,0 b	0 c	0 c	0 c	15,0 a	<0,05
Ócio	0,5 b	2,0 b	0 b	6,0 a	0 b	0 b	<0,05
Estimulando mamada	8,0 b	13,0 ab	4,0 bc	18,0 a	10,0 b	0,5 c	<0,05
Outras	0 a	2,0 a	0 a	1,0 a	0 a	0 a	>0,05

Letras minúsculas diferem estatisticamente nas linhas ($P<0,05$).

A ação de limpar foi à atividade de maior incidência para todos os tratamentos sendo o primeiro contato entre mãe e filho após o parto.. É possível observar que o tratamento Gc com a ocorrência do parto simples foi o único que diferiu dos demais tratamentos ($P<0,05$), independente do parto ou até mesmo dentro do próprio tratamento com parto duplo, para o comportamento de facilitar a mamada. Porém o fato da ovelha não facilitar a mamada, não prediz que ela estivesse dificultando, a relação entre essas duas atividades tem pouca ou nenhuma importância. Aliás, o único tratamento que apresentou diferença significativa ($P<0,05$) para dificultando mamada foi o Gi parto duplo, sendo observados 4% do total das atividades, maior porcentagem entre todos os tratamentos, fato este que pode ser relacionado com a maior porcentagem para o comportamento de estimular a mamada, com 18%.

Observando o comportamento das ovelhas do tratamento Gf quando houve partos duplos, fica evidente que a proximidade entre mãe e cria é de extrema importância para que haja estímulo à primeira mamada. Para “afastando do cordeiro” o tratamento possui 15% dessa ocorrência, sendo a maior proporção entre todos os tratamentos ($P<0,05$). E ao mesmo tempo têm valores muito inferiores aos demais tratamentos quando levado em consideração a atividade “estimulando mamada” ($P<0,05$).

Tabela 8. Frequência de atividades dos cordeiros durante as observações do comportamento materno filial no parto, nos tratamentos Controle (Gc), e nascidos de mães submetidas à aplicação de lipopolissacarídeo (*E. coli*) na Fase Intermediária (Gi) e Fase Final de gestação (Gf).

	Gc		Gi		Gf		P
	Simples	Duplo	Simples	Duplo	Simples	Duplo	
Tentando levantar	24 b	26 b	21 b	9 c	37 a	27 b	<0,05
Levantando	10 a	10 a	10 a	4 a	8 a	7 a	>0,05
Procurando Úbere	26 b	16 c	24 bc	45 a	15 c	29 b	<0,05
Tentando mamar	15 b	23 a	5 c	6 c	19 ab	8 bc	<0,05
Ócio	21 b	18 c	32 a	28 ab	14 c	24 abc	<0,05
Outras	1 a	4 a	3 a	5 a	1 a	4 a	>0,05

Letras minúsculas diferem estatisticamente nas linhas ($P<0,05$).

Para os cordeiros foram duas as atividades com valores não significativos ($P>0,05$): ação de levantar, e também “outras atividades”. A incidência de comportamento de levantar foi baixa e não sofreu influência de nenhum dos tratamentos ou do número de cordeiros nascidos por parto. Após o nascimento, os cordeiros, em quase todos os casos, assim que conseguiam levantar pela primeira vez se mantinham em pé na maioria do tempo. Apenas em dois casos não houve a mamada em até uma hora após o parto e nestes casos a observação foi encerrada antes da mamada. Em relação à atividade “outras”, assim como para as ovelhas, a baixa incidência pode ser atribuída ao quanto abrangente estava o etograma de trabalho utilizado.

Foi observada maior porcentagem da procura do úbere no tratamento Gi quando houve parto duplo, diferindo de todos os outros tratamentos ($P<0,05$). Esse valor de 45% está diretamente ligado aos comportamentos das ovelhas em estimular a cria a mamar, resultando no aumento da dificuldade e consequentemente da procura pelos tetos. Este estímulo também pode estar relacionado com a menor incidência na tentativa do cordeiro se levantar.

Os grupos Gi e Gf, relacionado com o parto duplo, foram os tratamentos que apresentaram maior gasto de tempo para que o cordeiro conseguisse realizar a primeira mamada (Figura 12).

Figura 12. Tempo à primeira mamada de corderos nascidos de ovelhas do tratamento. Controle (Gc), submetidas à aplicação de lipopolissacarídeo (*E. coli*) na Fase Intermediária (Gi) e na Fase Final de gestação (Gf) e tipo de parto (simples e duplo).

A relação entre as atividades de ovelhas e cordeiros do parto até a primeira mamada foi avaliada utilizando as interações positivas e negativas entre eles, sendo observadas diferenças entre os tratamentos e os tipos de parto ($P < 0,05$; Tabela 9). É possível observar que há a existência dos maiores valores de interações positivas independente do tratamento ou o número de nascidos por parto, porém quando analisadas as interações negativas é nítida a influência do tipo de parto nesses comportamentos sendo de grande relevância o valor da combinação do estresse durante o terço final da gestação e o parto duplo ($P < 0,05$) quando comparados com os outros tratamentos.

Tabela 9. Relação entre as atividades das ovelhas e dos cordeiros comparadas entre as interações entre tratamento e tipo de parto.

	Gc		Gi		Gf		P
	Simple	Duplo	Simple	Duplo	Simple	Duplo	
¹Interações positivas	28 a	17 b	9 c	27 a	20 ab	10 c	<0,05
²Interações negativas	0 c	4 b	0 c	3 b	0 c	14 a	<0,05

Letras minúsculas diferem estatisticamente nas linhas ($P < 0,05$). ¹Estimula a mamada e facilita a mamada (ovelha); Tentando levantar, levantando, procurando úbere e tentando mamar (cordeiro). ²Dificultando a mamada, afastando do cordeiro e agredindo o cordeiro (ovelha); Tentando levantar, levantando, procurando úbere e tentando mamar (cordeiro).

Quanto aos níveis de cortisol dos cordeiros momentos após o parto, não houve efeito dos níveis de cortisol gerados pelo LPS e da temperatura retal durante a gestação, dos níveis de cortisol das ovelhas momentos após o parto e nem efeito da fase da gestação em que ocorreu o estresse. Porém, foi observada diferença estatística ($P < 0,05$) quando relacionados ao sexo dos animais, com as fêmeas apresentando maiores níveis de cortisol momentos após o parto, com média de $11,12 \pm 0,283 \mu\text{g.dL}^{-1}$ comparados aos machos, que tiveram média de $8,96 \pm 0,340 \mu\text{g.dL}^{-1}$.

O sexo também influenciou no peso ao nascimento, porém agora tendo interação com o tratamento ($P < 0,05$; Figura 13). Os machos obtiveram maiores médias de peso quando comparados às fêmeas para os tratamentos Gc e Gi ($P < 0,05$). Já para Gf essas médias não diferiram entre si ($P > 0,05$). Quando comparados entre os tratamentos os maiores valores foram constatados para os machos dos tratamentos Gc e Gi, sem diferença entre os dois ($P > 0,05$). Os

menores pesos foram mensurados no tratamento Gf independente do sexo ($P < 0,05$).

Figura 13. Peso ao nascer de cordeiros fêmeas e machos nascidos de ovelhas do tratamento Controle (Gc), submetidas à aplicação de lipopolissacarídeo (*E. coli*) na Fase Intermediária (Gi) e na Fase Final de gestação (Gf).

A perda de animais mortos ou natimortos nas primeiras semanas pós-parto apresentou um valor de 23% dos nascimentos, ou um total de 14 animais, sendo 3 cordeiros do grupo de animais do tratamento Gc, 1 animal pertencia ao tratamento Gi e 10 animais eram provenientes ao tratamento Gf.

5.4. Discussão

A ativação do sistema imunológico pelo LPS durante a gestação vem sendo estudada há algum tempo em algumas espécies de mamíferos. Foi possível notar, analisando os resultados apresentados, que houve alteração do ritmo circadiano do cortisol e da temperatura retal das ovelhas após a administração do LPS, configurando uma situação de estresse. Além disso, a fase da gestação em que este evento ocorre pode influenciar nas interações positivas e negativas nos primeiros contatos entre mãe e filho, assim como no desenvolvimento dos filhotes considerando o peso ao nascer. A fase final da gestação torna-se o período mais vulnerável para ambos (DWYER, 2008), quando ambos ovelha e cordeiro são desafiados.

Alguns desses efeitos negativos, causados pela aplicação de LPS, podem ser atribuídos as citocinas pró-inflamatórias liberadas pela ativação do sistema imunológico. Herman et al. (2012) investigaram a aplicação do LPS e os efeitos por ela gerado, pela expressão gênica da IL-1 β . Alguns trabalhos também apontam a expressão de outras citocinas além da IL-1 β , averiguando também a presença da IL-6 e do TNF- α , devido a aplicação de LPS durante a gestação de ratas. (GAYLE et al., 2004; LASANA; ZHOU, 2007).

No presente estudo houve uma incompatibilidade entre as curvas de temperatura retal e de cortisol na fase intermediária e final da gestação, pode-se notar que mesmo o tratamento Gi e Gf estando com valores de temperatura acima em praticamente todos os horários de colheitas, nas respectivas datas em que foram desafiados com o LPS, as temperaturas retais mais acentuadas podem ser relacionadas ao acúmulo de calor adquirido durante o período do dia e não diretamente ao estresse gerado pelo LPS, uma vez que a época do ano em que foram realizadas as colheitas concentravam-se dias com maiores quantidade de horas de luz. Laburn et al. (1988) trabalhando com análises de temperatura retal em ovinos, também observaram um aumento de temperatura, a partir de duas horas após a aplicação do LPS. Porém suas observações duraram apenas quatro horas e trinta minutos, não sendo possível comparar os horários em que foram observadas as maiores temperaturas retais neste estudo.

Ovelhas desafiadas na fase final da gestação com 1 μ g.kg⁻¹ de LPS (*Salmonella typhimurium*) também apresentaram alterações significativas de cortisol após a primeira hora de aplicação, porém nos fetos observou-se aumento do cortisol basal apenas 12 horas após a aplicação do LPS na mãe (SCHLAFFER et al., 1994). McClure et al. (2005) desafiaram ovelhas prenhes, não prenhes e cordeiros recém-nascidos com LPS (*E. coli*, 0,3 μ g.kg⁻¹), e verificaram aumento de temperatura para as três categorias. Entretanto, observaram apenas diferença entre o recém-nascido e a não prenhe, ultrapassando os 41°C para ambos.

Com a imposição de tratamentos aversivos durante a fase final da gestação de ovelhas também foi observado aumento nos níveis de cortisol, porém sem interferência no comportamento materno filial. Apenas constataram

que ovelhas mais reativas dificultavam a mamada e ovelhas menos reativas passaram mais tempo realizando *grooming* em sua cria (COULON et al., 2014).

É possível afirmar por observações realizadas neste estudo que para a ovelha estimular o cordeiro a mamar é necessário que haja movimentação por parte dela e a interação entre mãe e cordeiro através de outros contatos e vocalizações até que o filhote aprenda achar os tetos, promovendo assim certa dificuldade até a aprendizagem. Foi possível notar também que houve influência direta com o tipo de parto no aumento de interações negativas entre mãe e cordeiro e também no tempo à primeira mamada, para os cordeiros nascidos de parto duplo. Hild et. al (2011) trabalharam com comportamento materno filial analisando o nível de atenção dada pela mãe à cordeiros gêmeos (um foi estressado e outro controle) que foram desafiados no 3º e 4º dia de vida. Os animais passaram pela aplicação do LPS (estresse imunológico) ou a separação social (estresse psicológico) no 3º dia e/ou sofreu dor (corte de cauda ou castração) no 4º dia. Na avaliação constatou-se que a ovelha expressa atenção semelhante aos cordeiros que passaram pelo estresse imunológico ou psicológico, porém a atenção maior foi dada aos cordeiros que passaram pela dor quando comparados com o controle.

Os dados apresentados no presente estudo demonstram que em praticamente todos os tratamentos, cordeiros que gastaram mais tempo procurando o úbere, apresentaram menor incidência em tentar mamar, tendo essa associação interferência direta no tempo da primeira mamada, havendo maior influência do estresse gerado durante a gestação e do tipo de parto. Retardando a ingestão do colostro o que pode ser uma situação não muito favorável. (McGLONE; STOBART, 1986).

O rápido acesso ao colostro também é fundamental para o aumento da capacidade imunológica do cordeiro, como também influencia na quantidade de reservas energéticas tendo como consequência um maior potencial de sobrevivência (NOWAK; POIDRON, 2006). O sucesso do vínculo entre mãe e cordeiro está diretamente ligado com as primeiras horas de amamentação (VAL-LAILLET; SIMON; NOWAK, 2004).

A taxa de mortalidade de cordeiros apresenta-se maior nos primeiros dias de vida (HIGHT; JURY, 1970) possuindo uma relação curvilínea com o peso ao nascer (NOWAK; POIDRON, 2006). Este fato foi constatado pelos dados apresentados, havendo uma correlação positiva associando o peso ao nascer e o tratamento com LPS imposto na fase final da gestação. Com os valores apresentados neste estudo é nítida a maior taxa de mortalidade no tratamento que sofreu estresse durante a gestação (Gf) do que para os demais grupos de animais. Raineri (2008), em situação em que não houve nenhum tipo de estresse durante a gestação apresentou um média de peso ao nascer de 3,55 kg valor menores que os observados neste trabalho para os machos também sem estresse (Gc) e para animais que foram submetidos ao estresse na fase intermediária da gestação (Gi). Porém foram consideravelmente maiores do que os pesos observados para animais nascidos de fêmeas que passaram pelo estresse na fase final de gestação (Gf). Havendo também influencia do sexo para o peso ao nascer com os valores mostrando que machos, quando submetidos ao estresse gestacional na final da gestação se tornam mais suscetíveis do que os que sofreram na fase intermediária ou os que não sofreram, apresentando maiores perdas do que as fêmeas do mesmo tratamento.

5.5. Conclusão

A administração de LPS altera os níveis de cortisol durante a gestação e ocasiona no terço final maior influencia no comportamento materno filial, retarda a primeira mamada e menor peso ao nascer.

6. Experimento II: Relação entre o estresse durante a gestação e o estresse da desmama sobre o desempenho de cordeiros

RESUMO

O objetivo neste experimento foi avaliar a eficiência da desmama controlada ou abrupta em reduzir o impacto do estresse durante a gestação em relação ao desempenho de cordeiros. O experimento foi realizado no anexo do Laboratório de Biometeorologia e Etologia localizado no setor de caprino e ovinocultura da Prefeitura do Campus Administrativo da Universidade de São Paulo em Pirassununga-SP. Foram utilizados 47 cordeiros, 22 machos e 25 fêmeas, provenientes da inseminação artificial de 34 ovelhas mestiças Santa Inês com sêmen de macho White Dorper. Os tratamentos foram constituídos pelo sistema fatorial 3 x 2 e delineado de maneira aleatória, com o esquema de distribuição sendo composto por três grupos submetidos ou não à aplicação de LPS durante a gestação (Gc: controle; Gi: fase intermediária; Gf: fase final) e duas formas de desmama (Dc: desmama controlada; Da: desmama abrupta). Foram analisados os níveis de cortisol sanguíneo e a TR da desmama controlada e na comparação entre os dois tipos de desmama, peso a desmama (PD) e os dados de desempenho em confinamento pela ingestão de matéria seca (IMS), conversão alimentar (CA), eficiência alimentar (EA), ganho médio diário (GMD) e medidas pós-abate. As médias foram comparadas pelo teste F e teste t de Student (PDIFF) com um nível de significância de 5%. Houve efeito fixo do estresse durante a gestação e dos dias para os níveis de cortisol durante a Dc ($P < 0,05$), para a temperatura retal foi observado efeito fixo de sexo, dia e tempo ($P < 0,05$). No dia de entrada dos animais no confinamento houve efeito fixo de tempo (colheitas durante o dia) e tipo de desmama, com maiores valores de cortisol para a primeira colheita do dia ($P < 0,05$) e para a desmama abrupta quando comparada com a controlada ($P < 0,05$), neste mesmo dia para a TR foi observado efeito fixo de tempo, sendo a primeira colheita menor que as demais ($P < 0,05$). Nas colheitas de 24 e 48 horas após a entrada dos animais no confinamento Da apresentou maior nível de cortisol do que Dc ($P < 0,05$), efeito contrario foi observado para TR. Dc apresentou maior

peso a desmama que Da ($P < 0,05$). Houve interação entre estresse na gestação e sexo para IMS e GMD, com menores valores para machos de Gf ($P < 0,05$), não havendo diferenças significativas para CA e EA em nenhum tratamento. Nas análises pós – abate, os menores valores foram observados para Gf e Da. A desmama controlada pode reduzir os efeitos do estresse durante a gestação, melhorando o desempenho de cordeiros, assim como cordeiros machos quando desafiados na fase final da gestação são mais suscetíveis que fêmeas.

Palavras chave: Cortisol; Lipopolissacarídeo; Ovinos, Pós-abate; Rendimento.

6.1. Introdução

O ato da desmama é causador de estresse para o cordeiro. Segundo Orgeur et al. (1998) esta fase se faz crítica, devido à separação da mãe, em primeiro lugar, e em segundo pela mudança no hábito alimentar do filhote. A liberação do cortisol, causada pelo estresse da desmama, pode ter relação com a diminuição do hormônio do crescimento (GH) influenciando no crescimento do cordeiro (KUHN et al., 1990; ORGEUR et al. 1998). A prática da desmama usualmente é realizada quando o cordeiro atinge a idade entre 45 e 50 dias dependendo do objetivo do sistema produtivo (NAPOLITANO; DE ROSA; SEVI, 2008).

Entretanto, a forma com que ocorre essa desmama pode ter grande influência sobre o estresse do cordeiro (SCHICHOWSKI; MOORS; GAULY, 2008).

Há formas distintas de se realizar o desaleitamento dos cordeiros, sendo uma delas a desmama abrupta, variando a idade do filhote e o objetivo do sistema produtivo, havendo casos que o cordeiro não chega a ter contato social algum com a ovelha (ORIHUELA et al., 2004). A forma abrupta é considerada por Grubb e Jewell (1966) como sendo o método que causa menores impactos sociais nos grupos de ovelhas e cordeiros, quando não realizada de maneira precoce.

A outra maneira de se realizar a desmama é a denominada controlada ou artificial, que pode induzir a um maior estresse, devido as constantes separações (ORGEUR et al., 1998) notando-se por comportamentos como um aumento na atividade locomotora e no balido, como forma de comunicação para não perderem contato (ALEXANDER, 1977; TORRES-HERNANDEZ; HOHENBOKEN, 1979). Entretanto, esse tipo de desmama antecipa a substituição do leite por alimentos sólidos, que normalmente possuem em torno de 25% de proteína bruta em base de matéria seca, antes da separação definitiva da ovelha e possibilita que mãe e filhote se acostumem com a separação de maneira gradativa (NAPOLITANO et al. 1995; ORGEUR et al., 1998).

Os atributos que classificam a forma da desmama empregada são de extrema influência no peso que os cordeiros atingem no final do desaleitamento. Na fase final da gestação e após o nascimento, a taxa de crescimento do cordeiro é influenciada por diversos fatores que diretamente estão ligados a desmama, como o desencadeamento ou inibição hormonal, fatores ambientais e nutricionais (WIDDOWSON, 1980; GLUCKMAN, 1986). Owens, Dubeski e Hanson (1993) afirmam que o desempenho e desenvolvimento corporal desses animais podem ficar abaixo do determinado geneticamente, devido à inibição da divisão celular gerada pelos fatores citados.

Esse desempenho normalmente é mensurado através de medidas de alimento ingerido em valores de matéria seca, ganho de peso durante a vida do cordeiro, aproveitamento do alimento pela conversão e eficiência alimentar e por fim o rendimento de carcaça.

O objetivo neste experimento foi avaliar a eficiência da desmama controlada ou abrupta em reduzir o impacto do estresse durante a gestação em relação ao desempenho de cordeiros.

6.2. Material e Métodos

6.2.1. Local e animais

O experimento foi realizado no anexo do Laboratório de Biometeorologia e Etologia localizado no setor de caprino e ovinocultura da Prefeitura do Campus Administrativo da Universidade de São Paulo em Pirassununga-SP, em área sob as coordenadas 21° 59' de latitude sul e 47° 26' de longitude oeste (W.Gr) e altitude média de 635 metros. O clima da região é classificado, segundo Koppen, como Cwa, mesotérmico com chuvas predominantemente no verão, apresentando inverno seco e verões quentes, com temperatura média anual de 22°C e pluviosidade média anual próxima a 1363 mm.

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FZEA/USP, nº protocolo 13.1.2109.74.8.

Foram utilizados 46 cordeiros, 21 machos e 25 fêmeas, provenientes da inseminação artificial de 34 ovelhas mestiças Santa Inês com sêmen de macho White Dorper.

Os cordeiros tiveram seus partos concentrados em quinze dias do mês de março de 2014, sendo mantidos no piquete maternidade até os sete dias de vida, e posteriormente deslocados junto das mães, para os piquetes explorados de forma rotacionada, formados de pastagem de *Coast-cross* (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.). Todos os animais tiveram acesso ao concentrado no *creep-feeding* a partir de 7 dias de vida (Tabela 1), composto por milho moído (63,1%), farelo de soja (31,1%), calcário calcítico (0,8%) e núcleo mineral (5%).

6.2.2. Tratamentos

Os tratamentos foram constituídos pelo sistema fatorial 3 x 2 e delineado de maneira aleatória, com o esquema de distribuição sendo composto por três grupos submetidos ou não à aplicação de LPS durante a gestação e duas formas de desmama.

Estresse na gestação:

Trinta e quatro ovelhas foram desafiadas durante a gestação com lipopolissacarídeo (LPS; $0,8 \mu\text{g.kg}^{-1}$ PV; *E.coli* 0127:B8, Sigma Aldrich, EUA) em diferentes fases, sendo divididas em três grupos: controle:Gc (n=14); aplicação de LPS aos 70 dias de gestação: Gi (n=12); aplicação de LPS aos 120 dias de gestação: Gf (n=8).

Desmama:

O manejo da desmama foi conduzido em quarenta e seis cordeiros de duas maneiras durante o período experimental, a desmama controlada (Dc) e desmama abrupta (Da).

Ambos os tipos de desmamas foram realizados aos 45 dias de vida dos cordeiros (machos e fêmeas). Os animais foram distribuídos de maneira aleatória para a escolha do tipo de desmama que iram ser submetidos. Tendo em vista alcançar a proporcionalidade equivalente de cordeiros foi considerado os grupos que eram pertencentes durante a gestação (Gc, Gi e Gf), para que

houvesse a maior similaridade do número de animais entre todos os tratamentos (3 grupos na gestação x 2 tipos de desmama).

Na desmama controlada (Dc), durante seis dias, as ovelhas eram retiradas do piquete às 7h00min, e os cordeiros eram mantidos separados de suas mães até às 17h00min. Durante este período foram realizadas colheitas de sangue pelo sistema a vácuo através da punção venosa intrajugular para a avaliação dos níveis de cortisol e também foi medida a temperatura retal (TR) momentos após as colheitas sanguíneas. Do 39º ao 44º dias de vida dos cordeiros foram realizadas três colheitas por dia, sendo a primeira após a separação, porém ainda com a possibilidade de contato sonoro com a mãe, a segunda 60 minutos após a separação diária da mãe e a terceira 180 minutos após a separação diária da mãe. No 45º dia os animais foram introduzidos no confinamento e as colheitas de sangue ocorreram em três momentos, sendo a primeira durante o último contato com a mãe, a segunda 60 minutos após a entrada no confinamento e a terceira 180 minutos após a entrada no confinamento. No 46º e 47º dias as colheitas foram realizadas apenas uma vez por dia, 24 horas e 48 horas após a entrada no confinamento, respectivamente.

Já na desmama abrupta (Da) as colheitas de sangue e temperatura retal foram realizadas no 45º, 46º e 47º dias de vida, semelhantes às ocorridas na Dc.

Para as colheitas de sangue e medidas de TR, os animais foram selecionados aleatoriamente no primeiro horário do primeiro dia de avaliação. Seguindo a mesma ordem de animais nos demais horários e dias em todas as colheitas dos tipos de desmama (colheitas ordenadas).

A combinação entre estresse na gestação e desmama resultou na divisão de seis tratamentos (Tabela 10).

Tabela 10. Distribuição dos cordeiros em tratamentos entre os grupos da gestação e os tipos de desmama.

Tratamentos			
	Gc	Gi	Gf
Dc	GcDc (n=9)	GiDc (n=8)	GfDc (n=5)
Da	GcDa (n=11)	GiDa (n=8)	GfDa (n=5)

Gc (controle), Gi (estresse na fase intermediária da gestação) e Gf (estresse na fase final de gestação); Dc (desmama controlada) e Da (desmama abrupta).

Desempenho em confinamento:

Aos 45 dias os cordeiros foram alojados em baias individuais com visão externa de 1,30m de comprimento por 1,20m de largura, onde permaneceram 73 dias em regime de confinamento, precedidos de sete dias de adaptação (Figura 8). A dieta ofertada (Tabela 3) foi uniforme para todos os tratamentos, tendo a silagem de milho como alimento volumoso, na proporção de 30% em base de matéria seca (MS) e o concentrado foi composto por milho moído (49,6%), farelo de soja (17,7%), sal mineral (1,8%) e calcário calcítico (0,9%), na proporção de 70% em base de matéria seca (MS). O fornecimento foi realizado duas vezes ao dia, às 07h00min e às 16h00min (Figura 4 b).

Cada animal recebeu sua alimentação de forma individual, e a quantidade ofertada diariamente foi resultado do consumo verificado no dia anterior (as sobras foram pesadas diariamente) com um acréscimo de 20%, para permitir a seleção dos alimentos. Diariamente os bebedouros individuais foram limpos e abastecidos, mantendo sempre água de boa qualidade à disposição dos animais. Semanalmente amostras das sobras foram colhidas e congeladas para posterior determinação da matéria seca (MS), conforme procedimento descrito pela AOAC (1990). Assim, foi possível avaliar o desempenho do cordeiro no confinamento de acordo com a ingestão de matéria seca (IMS): calculada pela soma das quantidades de MS de concentrado e volumoso ofertadas para o animal por dia, subtraído pela MS da sobra. A conversão alimentar (CA): calculada pela divisão entre a ingestão de matéria seca e o ganho de peso, sendo ambos ao longo de todo o período do confinamento. Eficiência alimentar (EA): calculada pela divisão do ganho médio diário pela média diária da ingestão de matéria seca. Os animais também foram pesados em uma balança de até 150 kg com variação de 1g, para a obtenção dos valores do ganho médio diário (GMD), valor atribuído ao peso vivo dos cordeiros de saída do confinamento menos o peso vivo de entrada, dividido pelo número de dias experimentais que os animais permaneceram confinados.

Pós abate:

Ao término da fase de confinamento os 21 cordeiros machos foram abatidos (Tabela 11).

Tabela 11. Distribuição dos machos abatidos em tratamentos entre os grupos da gestação e os tipos de desmama.

Tratamentos			
	Gc	Gi	Gf
Dc	GcDc (n=6)	GiDc (n=3)	GfDc (n=3)
Da	GcDa (n=4)	GiDa (n=2)	GfDa (n=3)

Gc (controle), Gi (estresse na fase intermediária da gestação) e Gf (estresse na fase final de gestação); Dc (desmama controlada) e Da (desmama abrupta).

Para a avaliação após o abate foram considerados o peso da carcaça limpa (kg), rendimento da carcaça (%), rendimento da margem bruta em valores monetários (calculado pela subtração do valor (R\$) atribuído à carcaça menos o custo da dieta consumida durante toda a fase de confinamento (kg)) e para os testículos foram medidos do peso testicular (kg) e circunferência escrotal (cm).

6.2.3. Análises de dados

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) tendo um fatorial 3 x 2 como o esquema de distribuição dos tratamentos composto por 3 grupos durante a gestação (controle (Gc), aplicação de LPS aos 70 dias de gestação (Gi) e o aos 120 dias de gestação (Gf)) combinado com 2 tipos de desmama (desmama controlada (Dc) e desmama abrupta (Da)).

A desmama foi dividida em três análises distintas. Na primeira análise da desmama controlada para cortisol e temperatura retal foram incluídos os seis primeiros dias de separação do cordeiro de sua mãe, com efeito fixo de sexo, dia de separação (39º a 44º dias de vida - 1 a 6), tempo de colheita (0h; 1 hora depois, 3 horas depois da separação), desafio de estresse via LPS na gestação (controle, intermediária e final) e suas interações. A segunda análise foi realizada no dia da separação final para a desmama controlada e abrupta (45º dia de vida), com efeitos fixos de sexo, tempo de colheita (0h; 1 hora depois, 3 horas depois da separação), desafio de estresse via LPS na gestação (controle, intermediária e final) e tipo de desmama, bem como suas interações.

A terceira análise foi realizada para os três dias subsequentes à separação final do par, com efeitos fixos de sexo, dia de separação (45º, 46º e 47º dias de vida – 1, 2 e 3), desafio de estresse via LPS na gestação (controle, intermediária e final), tipo de desmama e suas interações. As médias foram comparadas pelo teste F e teste t de Student (PDIFF).

Para as variáveis de desempenho foram realizadas análise de variância com efeitos fixos de desafio de estresse via LPS na gestação (controle, intermediária e final), sexo, tipo de desmama e suas interações. Foi incluído como efeito aleatório o peso ao nascer e peso à desmama. As médias foram comparadas pelo teste F e teste t de Student (PDIFF).

6.3. Resultados

Os níveis de cortisol durante os dias experimentais de Dc que antecederam a entrada dos cordeiros no confinamento tiveram efeito dos dias e do estresse na gestação não havendo nenhuma interação entre eles e nem efeito significativo para o tempo (colheitas durante cada dia).

Os maiores valores de cortisol foram observados no primeiro dia de colheita, atingindo o nível de $1,03 \pm 0,077 \mu\text{g.dL}^{-1}$ (Figura 14) data que aconteceu a primeira separação entre ovelhas e cordeiros, sendo diferente quando comparado com os outros quatro dias seguintes ($P < 0,05$) que respectivamente foram de $0,62 \pm 0,077 \mu\text{g.dL}^{-1}$, $0,61 \pm 0,077 \mu\text{g.dL}^{-1}$, $0,54 \pm 0,077 \mu\text{g.dL}^{-1}$ e $0,70 \pm 0,077 \mu\text{g.dL}^{-1}$ ($P > 0,05$), havendo um aumento do nível de cortisol para $0,90 \pm 0,078 \mu\text{g.dL}^{-1}$ no dia anterior à entrada dos animais no confinamento (dia 44), se igualando estatisticamente ($P > 0,05$) ao primeiro dia de colheita, não sendo diferente ao dia que o antecedeu ($P > 0,05$).

Figura 14. Níveis de cortisol de cordeiros durante os dias experimentais da desmama controlada antes da entrada no confinamento.

Avaliando a TR, diferente do que aconteceu com os valores de cortisol, não houve efeito do estresse na gestação ($P>0,05$), mas sim influência do sexo, dia e tempo de separação ($P<0,05$).

O primeiro dia de separação também foi o que apresentou a maior medida de temperatura retal ($40,1\pm0,06^{\circ}\text{C}$), sendo diferente dos demais dias ($P<0,05$). Além do primeiro dia, o terceiro dia de separação também foi diferente dos demais, porém com valor inferior ($P<0,05$) (Figura 15).

Figura 15. Temperatura Retal (°C) dos cordeiros durante os dias experimentais da desmama controlada antes da entrada no confinamento.

Comparando as médias devido ao efeito fixo do tempo de separação (três colheitas) realizadas em cada dia, foi possível observar que o menor valor de temperatura retal apareceu na primeira medida do dia, antes da separação

dos cordeiros de suas mães. A média de $39,38 \pm 0,04$ °C foi menor ($P < 0,05$) do que as outras duas médias seguintes, a segunda de $39,64 \pm 0,04$ °C, que aconteceu uma hora após a separação e a terceira de $39,74 \pm 0,04$ °C que era medida três horas após a separação. Já para sexo as fêmeas com média de $39,81 \pm 0,04$ °C apresentaram maior valor que os machos ($P < 0,05$), que tiveram média de $39,36 \pm 0,03$ °C nos seis dias de colheitas durante a realização da desmama controlada.

6.3.1. Análise comparativa entre a desmama controlada e a desmama abrupta

No dia da entrada no confinamento (45 dias de idade) foi constatado efeito de tempo de separação (colheitas durante o dia) e para o tipo de desmama ($P < 0,05$), não sendo observado efeito de sexo, estresse durante a gestação e algum tipo de interação entre eles.

Considerando o efeito do tempo, a média dos valores de cortisol foi mais elevada ($P > 0,05$) na colheita que antecedeu a entrada dos cordeiros no confinamento, antes da separação de suas mães, quando comparado com as amostras colhidas 60 e 180 minutos após o alojamento nas baias individuais (Tabela 12).

Tabela 12. Médias e erro padrão médio de cortisol sanguíneo em cordeiros submetidos à desmama controlada (Dc) ou abrupta (Da) em relação ao tempo de colheita na data de entrada no confinamento (45 dias de idade).

	<i>Tempo</i>			Média
	1	2	3	
Dc	1,57 ($\pm 0,131$)	0,67 ($\pm 0,131$)	0,55 ($\pm 0,131$)	0,93 B
Da	2,12 ($\pm 0,132$)	1,55 ($\pm 0,132$)	1,55 ($\pm 0,132$)	1,74 A
Média	1,85 a	1,11 b	1,05 b	

Letras minúsculas na linha e maiúsculas na coluna diferem entre si pelo Teste F e t de Student a 5%. Dc (desmama controlada) e Da (desmama abrupta).

Foram observados valores inversos para as médias de TR considerando o efeito do tempo, sendo que o menor valor foi apresentado na colheita antes da entrada dos cordeiros no confinamento comparado com as outras duas posteriores ($P < 0,05$), que não foram diferentes quando comparadas entre si

($P>0,05$). Na ordem de colheita as médias de TR foram respectivamente $39,1 \pm 0,08$ °C, $39,43 \pm 0,08$ °C e $39,43 \pm 0,08$ °C.

Quando comparadas as médias de cortisol nos dias 45, 46 e 47 o único efeito encontrado foi o tipo de desmama ($P<0,05$), não havendo efeito para sexo, dia, tratamento e não existindo também nenhum tipo de interação. Como nos dias 46 e 47 houve apenas uma colheita por dia (24 e 48 horas após a entrada dos cordeiros no confinamento) não foi considerado neste modelo o tempo.

Os animais que passaram pela desmama controlada apresentaram média de cortisol inferior aos da desmama abrupta, com valores de $1,38 \pm 0,187$ $\mu\text{g.dL}^{-1}$ e $2,22 \pm 0,189$ $\mu\text{g.dL}^{-1}$ respectivamente ($P<0,05$). Para a TR além do efeito da desmama ocorreu também efeito do sexo, onde as fêmeas tiveram maior média de temperatura do que os machos, $39,1 \pm 0,07$ °C e $38,9 \pm 0,07$ °C respectivamente ($P<0,05$). Valores idênticos das médias de TR foram observados para o efeito da desmama, porém diferente dos níveis de cortisol o maior valor foi apresentado pela desmama controlada com $39,1 \pm 0,07$ °C quando comparada com a desmama abrupta, que foi de $38,9 \pm 0,07$ °C ($P<0,05$).

6.3.2. Análise do desempenho dos cordeiros confinados em baias individuais

Analisando o peso a desmama (PD) entre todos os cordeiros na Tabela 13, houve diferença ($P<0,05$) para as médias dos tipos de desmama como efeito fixo, não havendo efeito de tratamento, sexo ou alguma interação entre eles ($P>0,05$), podendo ser observado maior média de peso para os animais na desmama controlada.

Tabela 13. Médias seguidas de erro padrão médio do peso à desmama (kg) dos cordeiros nascidos de fêmeas estressadas durante a gestação e submetidos à desmama controlada (Dc) ou abrupta (Da).

	Gc	Gi	Gf	Média
Dc	12,4 ($\pm 1,02$)	12,5 ($\pm 1,13$)	10,6 ($\pm 1,40$)	11,8 ($\pm 0,70$) a
Da	9,9 ($\pm 0,97$)	9,8 ($\pm 1,20$)	10 ($\pm 1,40$)	9,9 ($\pm 0,70$) b
Média	11,1 ($\pm 0,71$)	11,1 ($\pm 0,85$)	10,3 ($\pm 1,00$)	

Letras minúsculas diferem nas linhas ($P<0,05$). Gc (controle), Gi (estresse na fase intermediária da gestação) e Gf (estresse na fase final de gestação).

Para a ingestão de matéria seca (IMS) houve interação entre a fase do estresse na gestação e o sexo dos animais (Tabela 14), entretanto não foram observadas diferenças significativas dentro de nenhum grupo do desafio com LPS ($P>0,05$), mas sim entre estes grupos dentro de cada sexo ($P<0,05$). Os maiores valores foram encontrados para o grupo Gc para os machos quando comparado com o grupo Gf ($P<0,05$), e o grupo Gi por sua vez não apresentou diferença entre nenhum dos outros grupos de estresse na gestação ($P>0,05$). Em relação às fêmeas, nenhuma diferença foi observada para o efeito do estresse na gestação de suas mães ($P>0,05$).

Tabela 14. Médias seguidas de erro padrão médio para ingestão de matéria seca (kg/dia) de cordeiros nascidos de fêmeas que passaram por estresse durante a gestação.

	Gc	Gi	Gf
Macho	1,195 ($\pm 0,0856$) a	1,167 ($\pm 0,1222$) ab	0,855 ($\pm 0,1084$) b
Fêmea	0,970 ($\pm 0,0934$)	0,905 ($\pm 0,0800$)	1,146 ($\pm 0,1322$)

Letras minúsculas diferem nas linhas ($P<0,05$). Gc (controle), Gi (estresse na fase intermediária da gestação) e Gf (estresse na fase final de gestação).

É possível observar na Figura 16 a diferença entre o ganho médio diário dos cordeiros (GMD) avaliado pela interação entre o estresse na gestação e o sexo dos animais. O grupo Gc apresentou média numericamente superior quando a comparação é realizada entre os cordeiros machos, porém não se diferencia estatisticamente quando comparada com o valor observado no grupo Gi ($P>0,05$), entretanto, ambos os grupos citados possuem valores de GMD superiores quando confrontados com a média apresentada pelo grupo Gf ($P<0,05$). Houve também diferenças significativas entre o sexo para os grupos Gc e Gi, com maiores valores de GMD atribuídos aos machos foram comparados com as fêmeas dentro de cada grupo ($P<0,05$), entretanto, não foi observada essa mesma diferença para Gf ($P>0,05$). As fêmeas não apresentaram diferenças em seus valores de GMD entre os três grupos, desafiados ou não na gestação ($P>0,05$).

Figura 16. Ganho médio diário (GMD) de cordeiros nascidos de ovelhas desafiadas com Lipopolissacarídeo (*E. coli*) durante a gestação. Letras diferem as médias entre os tratamentos Gc (controle), Gi (estresse na fase intermediária da gestação) e Gf (estresse na fase final de gestação) ($P < 0,05$). * Diferem as médias entre os sexos em cada tratamento ($P < 0,05$).

Tanto para conversão alimentar (CA) quanto para a eficiência alimentar (EA) não foi constatada a existência de nenhum tipo de interação ou efeitos de estresse na gestação, sexo e desmama ($P > 0,05$). Porém, para ambas as medidas de desempenho dos cordeiros houve um efeito aleatório do peso ao nascer ($P < 0,05$; Tabela 15).

Tabela 15. Médias seguidas de erro padrão médio de conversão alimentar (CA) e eficiência alimentar (EA) entre os tipos de estresse na gestação e os tipos de desmama em cordeiros.

	Gc	Gi	Gf
CA			
Dc	4,7 ($\pm 0,38$)	5,0 ($\pm 0,39$)	4,7 ($\pm 0,49$)
Da	4,8 ($\pm 0,33$)	4,4 ($\pm 0,44$)	4,8 ($\pm 0,49$)
EA (%)			
Dc	22,0 ($\pm 1,63$)	20,4 ($\pm 1,66$)	22,3 ($\pm 2,06$)
Da	21,6 ($\pm 1,42$)	24,1 ($\pm 1,85$)	21,4 ($\pm 2,06$)

Gc (controle), Gi (estresse na fase intermediária da gestação) e Gf (estresse na fase final de gestação). Dc (desmama controlada) e Da (desmama abrupta).

6.3.3. Medidas pós-abate dos cordeiros machos

Houve efeito fixo do estresse durante a gestação e tipo de desmama para a avaliação das médias dos pesos das carcaças (Tabela 16) e efeito aleatório do peso a desmama no modelo ($P<0,05$). É possível observar avaliando o estresse na gestação que Gf apresentou a menor média em comparação com os grupos Gc e Gi ($P<0,05$) e que os animais da desmama controlada obtiveram maior peso de carcaça em relação aos da desmama abrupta ($P<0,05$).

Tabela 16. Médias seguidas de erro padrão médio dos pesos de carcaça (kg) de cordeiros em relação ao estresse na gestação e tipos de desmama.

	Gc	Gi	Gf	Média
Dc	14,2 ($\pm 0,55$)	14,8 ($\pm 0,71$)	12,8 ($\pm 0,73$)	13,9 ($\pm 0,37$) a
Da	13,8 ($\pm 0,61$)	12,4 ($\pm 0,87$)	10,8 ($\pm 0,79$)	12,3 ($\pm 0,44$) b
Média	14,0 ($\pm 0,40$) A	13,6 ($\pm 0,56$) A	11,8 ($\pm 0,57$) B	

Letras maiúsculas diferem nas colunas e letras minúsculas diferem nas linhas ($P<0,05$).

Gc (controle), Gi (estresse na fase intermediária da gestação) e Gf (estresse na fase final de gestação). Dc (desmama controlada) e Da (desmama abrupta).

Na avaliação do rendimento de carcaça houve interação entre o estresse na gestação e o tipo de desmama (Figura 17) além dos efeitos aleatórios do peso ao nascer e do peso à desmama, com diferenças significativas sendo apresentadas entre as desmamas nos grupos Gi e Gf ($P<0,05$), mas não para os animais em Gc ($P>0,05$). Não foram observadas diferenças entre os grupos do estresse na gestação para nenhum tipo de desmama ($P>0,05$).

Figura 17. Rendimento de carcaça dos cordeiros (%) pela interação entre as diferentes fases de estresse na gestação e os tipos de desmama. *Diferem as médias entre os tipos de desmama em cada tratamento. Dc=Desmama controlada; Da=Desmama abrupta. Gc= controle; Gi= estresse na fase intermediária da gestação; Gf= estresse na fase final de gestação.

Calculada para avaliar o rendimento das carcaças em reais (R\$) a margem bruta sofreu efeito fixo tanto do estresse na gestação quanto do tipo de desmama, não havendo nenhum tipo de interação entre eles. Na análise dos grupos durante a gestação os maiores rendimentos da margem bruta foram observados para o grupo Gc e os menores para o grupo Gf ($P < 0,05$), não havendo diferença significativa para o grupo Gi quando comparado aos demais ($P > 0,05$). É possível notar essas diferenças na Tabela 17.

Tabela 17. Rendimento da margem bruta em reais (R\$) seguido de erro padrão médio, das carcaças dos cordeiros nascidos de fêmeas estressadas durante a gestação e submetidos à dois tipos de desmama.

	Gc	Gi	Gf	Média
Dc	87,2 ($\pm 4,07$)	81,0 ($\pm 5,2$)	82,2 ($\pm 5,39$)	83,5 ($\pm 2,75$) a
Da	84,2 ($\pm 4,50$)	77,6 ($\pm 6,38$)	57,6 ($\pm 5,76$)	73,15 ($\pm 3,21$) b
Média	85,7 ($\pm 3,00$) A	79,34 ($\pm 4,14$) AB	69,9 ($\pm 4,16$) B	

Letras maiúsculas diferem nas colunas e minúsculas nas linhas ($P < 0,05$). Gc (controle), Gi (estresse na fase intermediária da gestação) e Gf (estresse na fase final de gestação). Dc (desmama controlada) e Da (desmama abrupta).

Na avaliação das medidas testicular dos cordeiros foram observadas diferenças significativas para o peso testicular quando comparados pelo efeito fixo do estresse durante a gestação e do tipo de desmama (Tabela 18), contando também com o efeito aleatório do peso à desmama. A diferença dos

pesos testiculares entre os grupos Gc e Gf foi mais uma vez significativa, com o valor médio de Gc superior ao apresentado por Gf ($P < 0,05$). Comparando os tipos de desmama, maior valor do peso testicular foi observado para a desmama controlada.

Tabela 18. Médias seguidas de erro padrão médio do peso testicular (kg) dos cordeiros nascidos de fêmeas estressadas durante a gestação e submetidos à dois tipos de desmama.

	Gc	Gi	Gf	Média
Dc	0,242 ($\pm 0,0169$)	0,254 ($\pm 0,0217$)	0,194 ($\pm 0,0225$)	0,230 ($\pm 0,0114$) a
Da	0,217 ($\pm 0,0188$)	0,181 ($\pm 0,0266$)	0,153 ($\pm 0,0240$)	0,183 ($\pm 0,0134$) b
Média	0,230 ($\pm 0,0124$) A	0,217 ($\pm 0,0172$) AB	0,173 ($\pm 0,0173$) B	

Letras maiúsculas diferem nas colunas e minúsculas nas linhas ($P < 0,05$). Gc (controle), Gi (estresse na fase intermediária da gestação) e Gf (estresse na fase final de gestação). Dc (desmama controlada) e Da (desmama abrupta).

Já a circunferência escrotal não apresentou efeito fixo e nenhuma interação, apenas houve um efeito aleatório para o peso a desmama. As médias, que não possuem diferenças estatísticas ($P > 0,05$) estão apresentadas na Tabela 19.

Tabela 19. Médias seguidas de erro padrão médio da circunferência escrotal (cm) dos cordeiros nascidos de fêmeas estressadas durante a gestação e submetidos à dois tipos de desmama.

	Gc	Gi	Gf	Média
Dc	20,8 ($\pm 1,43$)	21,4 ($\pm 1,84$)	20,8 ($\pm 1,90$)	21,0 ($\pm 0,97$)
Da	21,7 ($\pm 1,59$)	18,9 ($\pm 2,25$)	15,24 ($\pm 2,03$)	18,62 ($\pm 1,13$)
Média	21,3 ($\pm 1,05$)	20,1 ($\pm 1,46$)	18,0 ($\pm 1,47$)	

Gc (controle), Gi (estresse na fase intermediária da gestação) e Gf (estresse na fase final de gestação). Dc (desmama controlada) e Da (desmama abrupta).

6.4. Discussão

O aumento do nível de cortisol nos últimos dias da desmama controlada pode ter sido causado pela mudança de comportamento por antecipação dos cordeiros ou também denominado comportamento antecipatório, atribuído à consciência dos filhotes, que após alguns dias de separação durante esse período de desmama se condicionaram à rotina e sabiam que em algum período do dia voltariam a encontrar suas mães, ou seja, enfrentavam uma

fase de ansiedade. Forkman et al. (2007) relatam diversos testes que comprovam que o medo e a ansiedade, alteram o comportamento e que infringem o bem-estar-animal em diversas espécies, entre elas os ovinos, mediante à mudanças ambientais, contato com novos objetos e diversificações no convívio social. Os dados de temperatura retal durante os dias de colheita também seguiram essa tendência de aumento após atingir seu menor valor depois de alguns dias, porém essa guinada não se igualou à primeira colheita.

A comparação entre a desmama contralada e a desmama abrupta no dia da entrada dos cordeiros no confinamento (45 dias de vida) em relação ao tempo de colheita demonstrou que a separação parcial entre ovelha e cordeiro no primeiro momento proporcionou um aumento de cortisol aos filhotes, que pode ser atribuído à combinação entre a possibilidade de ouvir o chamado da mãe com a incapacidade de aproximação entre mãe e filho, causado pela contenção do cordeiro para a realização da colheita de sangue. Haja vista que os níveis de cortisol baixaram quando não havia esse contato prévio nas colheitas posteriores. Este efeito pode não ter aparecido durante a desmama controlada, quando avaliada isoladamente, visto que os valores de cortisol da primeira colheita de cada dia foram transformados em médias em proporção à quantidade de dias avaliados (6 dias). Entretanto, o contato visual mostrou-se mais eficiente para o reconhecimento entre mãe e cria do que o sonoro, fato influenciado também pela idade do cordeiro, ou seja, cordeiros mais velhos possuem maior potencial de reconhecimento de sua mãe pela visão e audição, do que cordeiros mais novos (SHILLITO; ALEXANDER, 1975; ALEXANDER; SHILLITO, 1977; ALEXANDER, 1977). Mediante a essa separação, pode-se verificar níveis mais baixos de glicocorticoides, desde que haja contato não apenas sonoro, mas principalmente de visão (LEVINE; JOHNSON; GONZALEZ, 1985; HENNESSY; MOORMAN, 1989; LEFCOURT; ELSASSER, 1995). Ainda considerando o efeito do tempo, o menor valor de temperatura retal na primeira colheita, apesar de estatisticamente diferentes das outras duas, apresentou pouca inferência fisiológica, já que os valores estavam dentro do considerado normal para a espécie (ANDERSSON; JÓNASSON, 1996).

O maior valor de cortisol no dia da entrada no confinamento já era esperado que fosse observado na desmama abrupta, por ter sido a primeira

experiência daqueles animais na situação de separação. Quando comparado com essa mesma primeira experiência dos animais da desmama controlada, o valor dos animais da desmama abrupta são pelo menos numericamente superiores, fato este que pode ser explicado, além da separação materna, pela acomodação dos animais neste mesmo dia em baias individuais, influenciando nas atribuições sociais dos animais (SYME; ELPHICK, 1983). Os valores de cortisol da desmama abrupta continuaram superior aos da desmama controlada quando comparados nas primeiras colheitas do dia da entrada dos animais no confinamento, 24 e 48 horas depois. O pensamento em termos de produtividade possui a tendência em preferir a desmama controlada, devido o encurtamento do ciclo produtivo, não apenas pela antecipação do consumo de sólidos pelos cordeiros, mas também pela liberação da fêmea para a entrada em outra estação de monta. Por outro lado há quem prefira a desmama para buscar este ganho produtivo, retardando a idade da desmama e consequentemente o consumo integro de alimentos sólidos pelos cordeiros e a entrada dos animais no confinamento. Atribuições tidas a essa comparação entre o tipo de desmama, são em sua maioria, direcionadas ao convívio social dos cordeiros, apontando fatores prejudiciais referentes ao comportamento quando a desmama é realizada de maneira controlada ou artificial e quando a desmama abrupta não acontece de maneira precoce nas primeiras semanas de vida dos cordeiros (GRUBB; JEWELL 1966; NAPOLITANO; DE ROSA; SEVI, 2008). Em outros casos, a desmama controlada apresenta atributos positivos tanto para a interação social quanto para o desempenho dos cordeiros (SCHICHOWSKI; MOOR; GAULY, 2008).

No presente trabalho comparações entre os tipos de desmama também foram observadas pelo desempenho dos animais. O maior valor do peso a desmama, observado na desmama controlada por exemplo, pode ser atribuído à antecipação do consumo de alimentos sólidos por esses animais (ORGEUR et al., 1998; NAPOLITANO et al., 1995), contribuindo para um animal mais pesado na entrada do confinamento.

A ingestão de matéria seca além de ter apresentado efeito da interação entre o grupo na gestação e sexo, também sofreu efeito aleatório do peso ao nascer, algo que não foi observado no ganho médio diário que foi influenciado

pela interação entre o grupo na gestação e sexo. É possível relacionar a ingestão de matéria seca e o ganho médio diário pela teoria aplicada na nutrição entre consumo e produtividade animal (MERTENS, 1994), que prediz que o ganho está, em sua maior parte, relacionado diretamente ao consumo. Os valores de ingestão de matéria seca são semelhantes aos encontrados na literatura independente do tratamento durante a gestação, porém os ganhos médios diários corroboram apenas com os valores para os machos do tratamento controle e do tratamento intermediário, considerando que para esses trabalhos citados não houve avaliação do desempenho entre os sexos (RODRIGUES, 2005; URANO et al. 2006). A influência do sexo nessas avaliações pode ser atribuída como consequência normal das exigências nutricionais e tamanho corporal de cada gênero, para a ingestão de matéria seca e conseqüentemente para o ganho médio diário (NRC, 1996) e ao menos é claro que haja um fator aversivo a essas situações normais, como é caso da influência do estresse gestacional no terço final da gestação, mostrando bem claro a maior submissão dos cordeiros machos à esse tipo de desafio quando comparados com as fêmeas do mesmo tratamento pelos dados de desempenho em questão, apesar das diferenças terem sido apresentadas apenas de forma numérica e não estatística. Resultados relatados apontam os níveis de cortisol promovidos pelo estresse gestacional como modificador da atuação de outros hormônios, em diversas espécies, havendo assim maior influência no desenvolvimento do sexo masculino, promovendo inclusive alterações em órgãos atuantes no sistema reprodutivo (WARD; WEISZ, 1984; von HOLST, 1998; MACK et al., 2014).

Tanto os dados de conversão alimentar quando os dados de eficiência alimentar sofreram apenas efeito aleatório do peso ao nascer, não sendo influenciado por nenhuma interação ou efeito fixo. Foram muito semelhantes quando observados entre tratamentos e entre as desmamas.

O peso de carcaça teve relação direta com os dados de peso à desmama, uma vez que os maiores e menores valores foram atribuídos aos mesmos efeitos, do grupo na gestação e desmama, nas duas medidas de desempenho. Já os dados de rendimento de carcaça foram apresentados com algumas diferenças do peso de carcaça, havendo interação do tratamento e do

tipo de desmama, com diferenças estatísticas para os tipos de desmama dentro dos tratamentos que passaram pelo estresse, apesar de ter havido efeito aleatório do peso ao nascer e do peso a desmama para as comparações do rendimento de carcaça. São vários os fatores que alteram a taxa de crescimento e desenvolvimento dos ruminantes (OWES; DUBESKI; HANSON, 1993), sendo o tipo de desmama diretamente influente, devido a antecipação da oferta de sólidos (ORGEUR et al., 1998; NAPOLITANO et al., 1995), nas médias de carcaça apresentadas nesse trabalho, se mostrando numericamente menor quando comparadas com dados da literatura (URANO et al., 2006). O valor da margem bruta em reais nitidamente foi influenciado pelo peso da carcaça uma vez que o seu valor total foi calculado pelo valor médio do preço da carcaça em reais multiplicado pelo peso da carcaça limpa. Portanto, quanto maior o estresse durante a gestação e na desmama, menor a rentabilidade em reais.

A influência do estresse gestacional no desenvolvimento testicular já foi comprovado em vários trabalhos principalmente em estudos com ratos, havendo inclusive alteração na atuação de hormônios como o LH e a testosterona e involução de células como as de Sertoli e Leydig, prejudicando também a espermatogênese (MAIRESSE et al., 2007; CHANG et al., 2011, WANG et al., 2014). Apesar de não haver medidas hormonais e histológicas no presente estudo, os dados morfológicos apresentados trazem diferenças significativas no peso testicular com efeito do tratamento imposto durante a gestação e do tipo de desmama, sendo observados maior peso para os animais que não sofreram a aplicação do LPS durante a gestação e menor para os animais que foram desafiados no terço final. Os dados referentes ao tipo de desmama apresentam maior valor à desmama controlada e menor para o grupo de animais da desmama abrupta. Variações numéricas também são evidentes considerando a circunferência escrotal seguindo a mesma linha de raciocínio do peso testicular, caracterizando uma alteração no desenvolvimento morfológico testicular (ANDRADE et al., 2014).

6.5. Conclusão

A desmama controlada é mais eficiente do que a desmama abrupta para cordeiros estressados durante a gestação. Para cordeiros machos o estresse no terço final acarreta menores ganhos.

7. Referências Bibliográficas

- ADCOCK, I. M.; CARAMORI, G. Cross-talk between pro-inflammatory transcription factors and glucocorticoids. **Immunology and Cell Biology**, v. 79 p. 376–384, 2001.
- ALEXANDER, G. Role of auditory cues in mutual recognition between ewes and lambs in Merino sheep. **Applied Animal Ethology**, v.3, p. 65–81, 1977.
- ALEXANDER, G.; PETERSON, J. E. Neonatal mortality in lambs. **Australian Veterinary Journal**, v.37, p. 371-381, 1961.
- ALEXANDER, G.; SHILLITO, E. Importance of visual clues from various body regions in maternal recognition of the young in merino sheep (*ovis aries*). **Applied Animal Ethology**, v. 3, p.137-143, 1977.
- ASSOCIATION OF ANALITICAL CHEMIST-AOAC. 1990. **Official methods of analysis**. 15. ed. Arlington: Virginia. 117 p.
- ANDERSSON, B. E.; JÓNASSON, H. Temperatura e Fisiologia Ambiental. In: SWENSON, M. J.; REECE, W. O. *Dukes fisiologia dos animais domésticos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996, p. 805-813.
- ANDRADE, A. K. G. et al. Testicular and epididymal ultrasonography in Santa Inês lambs raised in Brazil. **Animal Reproduction**, v.11, n.2, p.110-118, 2014
- AXELROD, J.; REISINE, T. D. Stress hormones: their interaction and regulation. **Science**, v. 224, n.4, p. 452-459, 1984.
- BELL, A. W., McBRIDE, B. W., SLEPETIS, R. et al. Chronic heat stress and prenatal development in sheep: I. Conceptus growth and maternal plasma hormones and metabolites. **Journal Animal Science**, v. 67, n. 12, p. 3289-3299, 1989.
- BLASS E. M. et al. Mother as shield — differential-effects of contact and nursing on pain responsivity in infant rats —evidence for nonopioid mediation. **Behavior Neuroscience**, v.109 (2) p.342–53, 1995.
- BROOM, D. M. Animal-welfare: concepts and measurements. **Journal Animal Science**, v. 69, n. 10, p. 4167-4175, 1991.
- BROOM, D. M. A usable definition of animal welfare. **Journal of Agriculture and Environmental Ethics**, Guelph, v.6, p.15-25, 1993.
- BROOM, D. M.; MOLENTO, C. F. M. Bem-estar animal: conceito e questões relacionadas – Revisão. **Archives of Veterinary Science** v. 9, n. 2, p. 1-11, 2004.
- BROWN, R. E. Steroid and thyroid hormone receptors. In: BROWN, R. E. (Ed.). **An introduction to neuroendocrinology**. London: Routledge & Kegan Paul, p. 1-102, 1994.
- BRUCKMAIER, R. M.; SCHAMS, K.; BLUM, J. W. Milk removal in familiar and unfamiliar surroundings: concentrations of oxytocin; prolactin; cortisol and β – endorphin. **Journal of Dairy Research**, v. 60, n. 4, p. 449-456, 1993.
- CHANG, Y. et al. Isolation of Sertoli, Leydig, and spermatogenic cells from the mouse testis. **BioTechniques**, v. 51 p. 341-344, 2011.

CHROUSOS, G. P. The hypothalamic–pituitary–adrenal axis and immune-mediated inflammation. **New England Journal Medicine**, v. 332, p. 1351-1363, 1995.

COLLIER, R. J.; BEEDE, D. K.; THATCHER, W. W. et al. Influence of environment and its modification on dairy animal health and production. **Journal of Dairy Science**, v.65, p.2213-2227, 1982.

COSTE, J. Reliability of hormone levels for assessing the hypothalamic – pituitary – adrenal system in clinical pharmacology. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 38, n.5, p. 474 – 479, 1994.

COULON, M. et al. Early adverse experience alters dendritic spine density and gene expression in prefrontal cortex and hippocampus in lambs. **Psychoneuroendocrinology**, v. 38, p.1112-1121, 2012.

COULON, M. et al. Mild effects of gestational stress and social reactivity on the onset of mother–young interactions and bonding in sheep. **Stress**, v.17, p.460–470, 2014.

CROWDER, M.J.; HAND, P.J. **Analysis of repeated measures**. London: Chapman & Holl, 1990.

CRUZ-MACHADO, S. S. Lipopolissacarídeo (LPS): ativador e regulador da transcrição gênica via fator de transcrição NFkB. **Revista da Biologia**, v.4, p. 40-43, 2010.

DONN R. P.; RAY D. Macrophage migration inhibitory factor: molecular, cellular and genetic aspects of a key neuroendocrine molecule. **Journal Endocrinology**, v.182, p. 1-9, 2004.

DUPRÉ, A. S. A. **Avaliação da idade gestacional através da fetometria pelo método de ultrassonografia em ovelhas da raça Hampshire Down (Ovis aries, Linnaeus – 1758)**. 2009. 53f. :il. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

DWYER, C. M. Behaviour desenvolvimento in the neonatal lamb: effect of maternal and birth-related factors. **Theriogenology**, v. 59, p. 1027-1050, 2003.

DWYER, C. M. The welfare of the neonatal lamb. **Small Ruminant Research**, v.76, p.31–41, 2008.

ELLIOTT, J.; JOHNSTONE, J. A. SOCS: role in inflammation, allergy and homeostasis. **Trends Immunology**, v. 25, p. 434-440, 2004.

ELMQUIST, J.K.; SCAMMELL, T.E.; SAPER, C.B. Mechanisms of CNS response to systemic immune challenge: the febrile response. **Trends Neuroscience**, v. 20, p. 565–570, 1997.

ELOY, A. M. X. **Estresse na produção animal**. Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2007. 7 p. (Embrapa Caprinos e Ovinos. Circular Técnica, 87).

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

ENCARNAÇÃO, E. O. **Estresse e produção animal**. 3.ed. Campo Grande: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – CNPQC, 1997, 32p.

FORMKMAN, B. et al. A critical review of fear tests used on cattle, pigs, sheep, poultry and horses. **Physiology & Behavior**, v.92, p. 340–374, 2007.

GAYLE, et al. Maternal LPS induces cytokines in the amniotic fluid and corticotropin releasing hormone in the fetal rat brain. **American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 286, p. R1024–R1029, 2004.

GLUCKMAN, P. D. The regulation of fetal growth. In: P. J. Buttery, N. B. Haynes, and D. B. Lindsay (Ed.) **Control and Manipulation of Animal Growth**. Butterworths, London, p. 85-104, 1986.

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

GRUBB, P., JEWELL, P. Social grouping and home range in feral Soay sheep. **Symposia of the Zoological Society**, London v.18, p.179–210, 1966.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. In: JAINUDEEN, M.R.; HAFEZ, E.S.E. Ovinos e caprinos. São Paulo: Manole, 2004 p. 173-182.

HENNESSY, M. B.; MOORMAN L. Factors influencing cortisol and behavioural response to maternal separation in Guinea pigs. **Behavioral Neuroscience**, v.103, p.378–385, 1989.

HERD, R. M. Serum cortisol and “stress” in cattle. **Australian Veterinary Journal**, v.v66, n. 10, p. 341-342, 1989.

HERMAN, A. P. et al. Inhibition of acetylcholinesterase activity by rivastigmine decreases lipopolysaccharide-induced IL-1b expression in the hypothalamus of ewes. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 44, p. 109-114, 2013.

HIGHT, G. K.; Jury, K. E. Hill country sheep production. II. Lamb mortality and birth weights in Romney and Border Leicester x Romney flocks. **New Zealand Journal Agriculture Research**, v. 13, p. 735–752, 1970.

HILD S., ANDERSEN I. L., ZANELLA A. J. The relationship between thermal nociceptive threshold in lambs and ewe–lamb interactions. **Small Ruminant Research**, v. 90 (1–3) p.142–5, 2010.

HILD, S. et al. Ewes are more attentive to their offspring experiencing pain but not stress. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 132, p. 114-120, 2011.

HOOD, K. E.; DRESCHER, N. A.; GRANGER, D. A. Maternal behavior changes after immune challenge of neonates with developmental effects on adult social behavior. **Developmental Psychobiology**; v. 42(1) p. 17-34, 2003.

IWASA T. et al. Neonatal immune challenge affects the regulation of estrus cyclicity and feeding behavior in female rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 27, n.1, p. 111-114, 2009.

KABAROFF, L. et al. Assessment of the ovine acute phase response and hepatic gene expression in response to *Escherichia coli* endotoxin. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.113, p.113–124, 2006.

KUHN, C. M.; PAUK J.; SCHANBERG, S. M... Endocrine responses to mother-infant separation in developing rats. **Developmental Psychobiology**, v. 23 p.395–410, 1990.

LABURN H. P. et al. Effects of tracheostomy breathing on brain and body temperatures in hyperthermic sheep. **Journal of Physiology** v. 406, p. 331-344, 1988.

LASANA, N.; ZHOU, H. Effects of maternal exposure to LPS on the inflammatory response in the offspring. **Journal of Neuroimmunology**, v. 189, p. 95–101, 2007.

LEFCOURT, A. M.; AKERS, R.M. Teat stimulation-induced oxytocin and catecholamine release in pregnant and lacting Holstein heifers. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 8, n. 2, p. 235-243, 1991.

LEFCOURT, A. M.; ELSASSER, T. H. Adrenal responses of Angus x Hereford cattle to the stress of weaning. **Journal Animal Science**, v. 73, p.2669–2676, 1995.

LEME, T. M. C. **Métodos de transporte e períodos de descanso pré-abate sobre nível de estresse e qualidade da carne de ovinos**. 2009. 95f.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2009.

LEVINE, S.; JOHNSON D. F.; GONZALEZ, C. A. Behavioural and hormonal responses to separation in infant Rhesus monkeys and mother. **Behavioral Neuroscience**, v. 99, p.399–410, 1985.

LEVINE, S. Primary social relationships influence the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. **Physiology & Behavior**, v. 73, p. 255-260, 2001.

LEVINE, S. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the neonatal rat: the role of maternal behavior. **Neurotoxicity Research**, v. 4, p. 557-564, 2002.

MACK, L. A. et al. Growth and reproductive development of male piglets are more vulnerable to midgestation maternal stress than that of female piglets. **Journal Animal Science**, v.92, p. 530-548, 2014.

MARIZ, T. M. A. et al. Relação materno-filial da raça morada nova recebendo dietas com três níveis de energia, ao final da gestação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.6, p. 1889-1893, 2007.

MAIRESSE, J. et al. Maternal stress alters endocrine function of the feto-placental unit in rats. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, v.292, p. E1526–E1533, 2007.

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

McGLONE, J. J., STROBART, R. H. A quantitative athogram of behavior of yearling ewes during two hours post-parturition. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 16, p. 157-164, 1986.

McCLURE, L. et al. Effects of age and pregnancy on the circulatory activin response of sheep to acute inflammatory challenge by lipopolysaccharide. **Journal of Endocrinology**, v.185, p. 139–149, 2005.

MEXIA, A. A. et al. Desempenho e características das fibras musculares esqueléticas de cordeiros nascidos de ovelhas que receberam suplementação alimentar em diferentes períodos da gestação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.4, p.1780-1787, 2006.

MERTENS, D.R. Regulation of forage intake. In: Forage quality, evaluation, and utilization, 1994, Wisconsin. **Proceedings...** Wisconsin: 1994. p.450-493.

MORBERG, G. P. A model for assessing the impact of behavioral stress on domestic animal. **Journal of Animal Science**, v.65, n.5, p. 1228-1235, 1987.

MOBERG, G. P. Biological response to stress: Implications for Animal Welfare In: MOBERG, G.; MENCH, J.A. **The Biology of Animal Stress: Basic Principles and Implications for Animal Welfare**. Davis, University of California, p. 1-22, 2000.

MOBINI et al. Teriogenologia de ovinos e caprinos. In: PUGH, D. G. **Clínica de ovinos e caprinos**. São Paulo: Roca, p.145-208, 2005

MÖST, E.; PALME, R. Hormones as indicators of stress. **Domestic Animal Endocrinology**, v.23, p.67-74, 2002.

NAPOLITANO, F.; DE ROSA G.; SEVI, A. Welfare implications of artificial rearing and early weaning in sheep. **Applied Animal Behaviour Science**, v.110, p.58-72, 2008.

NAPOLITANO, F. et al. Influence of artificial rearing on behavioural and immune response of lambs. **Applied Animal Behaviour Science**, v.45, p. 245–253, 1995.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrients requeriments of beef cattle**. 7.ed. Washington, D.C.: 1996. 244p.

NELDER, J.A.; WEDDERBURN, R. W. M. Generalized Linear Models, **Journal of the Royal Statistical Society**. Series A (General), v. 135, n. 3, p.370-384, 1972.

NOWAK, R. Neonatal survival: contributions from behavioural studies in sheep. **Applied Animal Behaviour Science** 49, 61-72, 1996.

NOWAK, R. et al., Role of mother–young interactions in the survival of offspring in domestic mammals. **Journals of Reproduction and Fertility**, v.5, p. 153-163, 2000.

NOWAK, R.; LINDSAY, D. R. Effects of breed and litter size on mother discrimination by 12 h old lambs. **Behaviour**, v. 115, p. 1-3, 1990.

NOWAK, R. POIDRON, P. From birth to colostrum: early steps leading to lamb survival. **Reproduction Nutrition Development**, v.46, p.431-446, 2006.

ORGEUR, P. et al. Artificial weaning in sheep: consequences on behavioural, hormonal and immuno-pathological indicators of welfare. **Applied Animal Behaviour Sciencen**, v.58, p.87-103, 1998.

ORIHUELA, A; SUÁREZ E.; VÁZQUEZ, R. Effect of restricting suckling on the social bond between ewes and their 10-week-old lambs. **Livestock Production Science**, v. 87, p.259-264, 2004.

OWENS, F. N.; DUBESKI, P.; HANSON, C. F. Factors that alter the growth and development of ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 71, p.3138-3150, q 1993.

PARANHOS DA COSTA, M. J. R., CROMBERG, V. U. Relações materno-filiais em bovinos de corte nas primeiras horas após o parto. In: PARANHOS DA COSTA, M. J. R., CROMBERG, V. U. **Comportamento materno em**

- mamíferos:** bases teóricas e aplicações aos ruminantes domésticos. São Paulo: Sociedade Brasileira de Etologia, p. 215-235, 1998.
- POIDRON, P. et al. Influence of the blood concentration of prolactin on the length of the sensitive period for establishing maternal behavior in sheep at parturition. **Hormonal Behavior**, v.14, n.3, p.173-177, 1980.
- RAETZ, C. R., WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins. **Annual Review of Biochemistry**, v.71, p.635-700, 2002.
- RAINERI, C. **Perfil do comportamento materno-filial de ovinos da raça Santa Inês e sua influência no desempenho dos cordeiros ao desmame**. 2008. 72f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.
- RODA, D.S.; SANTOS, L.; OLIVERIA, A.A.D. Performance of lambs with different periods of suckling and feed supplementation. **Boletim de Industria Animal**, v.41, p.85-101, 1984.
- RODRIGUES, G. H. Polpa citric na ração de cordeiros confinados: desempenho, digestibilidade de rações, característica de carcaça e qualidade de carne. 2005. 77f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.
- RUSHEN, J. et al. Human contact and effects of acute stress on cows at milking. **Applied Animal Behaviour Science**, v.73, p. 1-14, 2001.
- SASSI N. et al. Lipid A-induced responses in vivo. **Adv Exp Med Biol.**, v. 667, p.69-80, 2009.
- SCHLAFER, D. H. Effect of Salmonella Endotoxin Administered to the Pregnant Sheep at 133-142 Days Gestation on Fetal Oxygenation, Maternal and Fetal Adrenocorticotrophic Hormone and Cortisol, and Maternal Plasma Tumor Necrosis Factor α Concentrations. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 1297-1302, 1994.
- SCHICHOWSKI C.; MOORS, E.; GAULY, M. Effects of weaning lambs in two stages or by abrupt separation on their behavior and growth rate. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. 220-225, 2008.
- SHILLITO, E.; ALEXANDER G. Mutual recognition amongst ewes and lambs of four breeds of sheep (*ovis aries*). **Applied Animal Ethology**, v.1, 151-165, 1975.
- SYME, L.A.; ELPHICK, G.R. Heart rate and the behaviour of sheep in yards. **Applied Animal Etology**, v.9, p.31-35, 1983.
- TAKEDA K.; KAISHO T.; AKIRA S. Toll-like receptors **Annual Review Immunology**, v. 21, p. 335–376, 2003.
- TIZARD, I. R. Imunologia veterinária: uma introdução/Ian R. Tizard; tradução para o português Lúcia Jamli Abel. 6 ed. São Paulo:Roca, 2002.
- TOLEDO, L. M. et al. Impactos de variáveis climáticas na agilidade de bezerros nelore neonatos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 5, p. 1399-1404, 2007.
- TORRES-HERNANDEZ, G. HOHENBOKEN, W. An attempt to assess traits of emotionality in crossbred ewes. **Applied Animal Ethology**, 5, 71–83, 1979.
- TUIN, A. et al. On the role and fate of LPS-dephosphorylating activity in the rat liver. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 290, p.377-385, 2006.

- URANO, F. S. et al. Desempenho e características da carcaça de cordeiros confinados alimentados com grãos de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.10, p.1525-1530, 2006.
- VAL-LAILLET, D.; SIOMN, M.; NOWAK, R. A full belly and colostrum: two major determinants of filial love. **Developmental Psychobiology**, v.45, p. 163-173, 2004.
- von HOLST, D.. The concept of stress and its relevance for animal behavior. **Advances in the Study Behavior**, v. 27, p.1–131, 1998.
- WALKER C. D. et al. Repeated neonatal pain influences maternal behavior, but not stress responsiveness in rat offspring. **Developmental Brain Research**, v.140 (2) p.253–61, 2003.
- WANG, H. et al. Maternal LPS exposure during pregnancy impairs testicular development, steroidogenesis and spermatogenesis in male offspring. **Plos One**, v. 9, n.9, e.106786, 2014.
- WARD, I. L.; WEISZ J. Differential effects of maternal stress on circulating levels of corticosterone, progesterone, and testosterone in male and female rat fetuses and their mothers. **Endocrinology** 114:1635–1644, 1984.
- WIDDOWSON, E. M. Definitions of growth. In: **T.L.J. Lawrence (Ed.) Growth in Animals**. Butterworths, London, p. 1-9, 1980.