

BRUNA STANIGHER BARBOSA

**Recuperação clínica e resposta à dor em bezerros descornados
com ferro quente: influência do estresse pré-natal**

São Paulo

2022

BRUNA STANIGHER BARBOSA

**Recuperação clínica e resposta à dor em bezerros descornados
com ferro quente: influência do estresse pré-natal**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Clínica Médica

Área de concentração:

Clínica Veterinária

Orientador:

Prof. Dr. Fabio Celidonio Pogliani

Co-orientador:

Prof. Dr. Adroaldo José Zanella

São Paulo

2022

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 4149 FMVZ	Barbosa, Bruna Stanigher Recuperação clínica e resposta à dor em bezerros descornados com ferro quente: influência do estresse pré-natal / Bruna Stanigher Barbosa. – 2022. 100 f. : il. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2022. Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária. Área de concentração: Clínica Veterinária. Orientador: Prof. Dr. Fabio Celidonio Pogliani. Coorientador: Prof. Dr. Adroaldo Jose Zanella. 1. Gestação. 2. Bovinos. 3. Dor. 4. Bem-estar animal. 5. Claudicação. I. Título.
-----------------	---

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Camila Molgara Gamba, CRB 7070-8, da FMVZ/USP.



Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Recuperação Clínica e Resposta À Dor em Bezerros Descornados com Ferro Quente - Influência do Estresse Pré-Natal.", protocolada sob o CEUA nº 4744020317 (ID 005488), sob a responsabilidade de **Fábio Celidonio Pogliani** e equipe; *Bruna Stanigher Barbosa* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 19/09/2018.

We certify that the proposal "Clinical Recovery and Pain Response in Hot Iron Dehorning Calves - Influence of Prenatal Stress", utilizing 40 Bovines (males or females), protocol number CEUA 4744020317 (ID 005488), under the responsibility of **Fábio Celidonio Pogliani and team**; *Bruna Stanigher Barbosa* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 09/19/2018.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [05/2018](#) a [12/2018](#) Área: [Clínica Médica Veterinária](#)

Origem:	Animais de proprietários						
Espécie:	Bovinos	sexo:	Machos ou Fêmeas	idade:	4 a 5 semanas	N:	20
Linhagem:	Holandês			Peso:	30 a 40 kg		
<hr/>							
Origem:	Animais de proprietários						
Espécie:	Bovinos	sexo:	Fêmeas	idade:	30 a 36 meses	N:	20
Linhagem:	Holandês			Peso:	500 a 600 kg		

Local do experimento: O experimento será realizado na mesma propriedade leiteira, porém em locais diferentes. A primeira parte será realizada no local onde as vacas prenhes se alojam e a segunda e terceira parte serão realizadas no bezerreiro da propriedade.

São Paulo, 18 de novembro de 2021

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: BARBOSA, Bruna Stanigher

Título:

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a meu filho, Bernardo, razão,
inspiração e guia da minha vida.*

*Aos meus pais, Bruno e Katia, porem ser meu alicerce
sólido e exemplo durante todos esses anos
assim como pela ajuda em todos os âmbitos.*

*Aos meus avós, Maria Amélia, Catarina e Barbosa,
pelo amor, carinho e dedicação todos esses
anos.*

*Ao meu companheiro, Felipe, por nunca deixar que eu
desistisse nos momentos mais difíceis,
companheirismo e compreensão.*

*A todos os animais que de alguma forma poderão ser
beneficiados com os resultados desta
pesquisa.*

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ao Serviço Alemão de intercâmbio Acadêmico (DAAD) pela oportunidade e pela bolsa de doutorado-sanduiche, e poder aprender e vivenciar a *Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover*.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fabio Celidonio Pogliani, por acreditar na minha capacidade e potencial como por todos os ensinamentos, aulas na fazenda, conversas, conselhos, incentivos, orientações e principalmente pela amizade durante esses 9 anos de parceria e convivência.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Adroaldo José Zanella, por acreditar no projeto e dar todo apoio na execução, assim como pela ajuda no doutorado sanduiche.

A Profa. Dra. Camila S. Dale, por aceitar e abraçar este projeto, por estar sempre presente quando precisei, pelos treinamentos e pelo empréstimo dos materiais necessários para o desenvolvimento desde trabalho.

Ao Prof. Dr. Adriano B. Carregaro pelo empréstimo dos monofilamentos de von Frey, material essencial para a execução do presente trabalho.

Ao Coronel Intendente Samuel de Mattos Barroso Júnior e ao Tenente Dr. Thiago Santin, pela oportunidade de execução deste trabalho na Fazenda da Aeronáutica de Pirassununga (FAYS). Assim como aos funcionários da fazenda, em especial ao Paulo, pelo auxílio com o manejo dos animais.

A todos os Professores do Departamento de Clínica (VCM) por todos os ensinamentos e oportunidades.

Ao Prof. Jörg Hartung e ao Prof. Arpad Csaba Bajcsy por todo auxílio, oportunidades e conhecimentos durante minha estadia em Hannover - Alemanha.

Ao meu colega de equipe, Philipe Luz Pereira pelo companheirismo, aprendizado e convivência durante o período de execução deste projeto.

À minha amiga, companheira de equipe e de trabalho Carolina dos Anjos pelo companheirismo, risadas e ensinamentos. Mesmo distante nossa amizade ainda perdura!

À amiga, companheira de equipe e de trabalho Gabriela Alves Reis, por todos os momentos vivenciados dentro e fora da pós-graduação, e a quem sem a participação este trabalho não seria possível de ser realizado, pela incansável colaboração em todos os âmbitos.

Aos amigos e companheiros da equipe FAROFA, Fábio Sellera e Ronaldo Gargano, pelos ensinamentos, brincadeiras apoio e colaboração sempre que precisei e principalmente pela amizade.

A todos os amigos de pós-graduação, os residentes e estagiários (em especial Rodrigo Abbud e Letícia Micheti Italiani) pela ajuda na execução do trabalho.

Aos meus companheiros e amigos do CECSBE, em especial Leandro Sabei e Marisol Parada Sarmiento por toda ajuda nos momentos que precisei assim como por todos os ensinamentos no laboratório para mensuração do cortisol salivar.

Ao Sr. João Metzner, funcionário do Laboratório do VPS em Pirassununga, por todo conhecimento e ajuda laboratorial durante o desenvolver deste trabalho.

A todos os colegas que conheci durante a estadia em TiHo (Hannover - Alemanha), pelos ensinamentos e auxílio prestado.

A todos aqueles que de alguma forma me ajudaram durante toda esta caminhada, obrigada!

*“ DIE EXAKTE UNTERSUCHUNG IST DIE GRUNDLAGE DES TIERÄRZTLICHEN
HANDELNS “*

A investigação clínica exata é a base da ação veterinária

(R. Götze)

RESUMO

BARBOSA, B.S. **Recuperação clínica e resposta a dor em bezerros descornados com ferro quente**: influência do estresse pré-natal. [Clinical recovery and pain response in hot iron dehorning calves: influence of prenatal stress] 2022. 100 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

O período pré-natal pode modular como um indivíduo responderá ao ambiente e as diversas situações ao longo da vida. Este período, quando afetado por estímulos negativos como o estresse, pode determinar transtornos a longo prazo na vida do indivíduo. A claudicação em vacas leiteiras é considerada uma experiência desconfortável e dolorosa que afeta mais de 20% das vacas em produção, no Brasil e no mundo, e ocorre por longo período de tempo, sendo o principal indicador representativo de prejuízo no bem-estar animal em rebanhos leiteiros. A claudicação durante a gestação pode ser um importante causador de estresse pré-natal em bovinos, afetando negativamente a prole no desenvolvimento extrauterino. Dentre as possíveis alterações extrauterinas, destaca-se a resposta nociceptiva da bezerra frente à desafios dolorosos e estressantes, dos quais a descorna por ferro quente notabiliza-se por ser procedimento gerador de grave estresse e doloroso para os bezerros. Portanto, o principal objetivo deste trabalho foi de avaliar a influência da claudicação em vacas no terço final de gestação sobre as respostas nociceptivas e recuperação da lesão de queimadura da prole submetida à descorna com ferro quente aos 30 dias de vida. Foram utilizadas 34 vacas, múltíparas e primíparas, Holstein-Frisia em terço final de gestação, separadas em dois grupos de acordo com o escore de locomoção (EL): G1 – 20 vacas com $EL \leq 2$; G2 – 14 vacas com $EL \geq 3$. Após o parto as bezerras foram separadas em dois grupos de acordo com os grupos das mães: GB1 – 20 bezerras de vacas com $EL \leq 2$ e GB 2 – 14 bezerras nascidas de vacas com $EL \geq 3$. Aos 30 dias as bezerras foram descornadas com ferro quente e foram realizadas de forma cega, avaliações nociceptivas, avaliação da área de regressão da lesão de queimadura e determinação da concentração de cortisol salivar. Os resultados mostraram que não houve diferença entre os grupos GB1 e GB2 para área de regressão das lesões e para a concentração de cortisol salivar. No entanto, as bezerras filhas de vacas com $EL \geq 3$ apresentaram menor limiar nociceptivo, demonstrando a influência negativa que a claudicação em vacas prenhes

pode exercer na modulação da sensibilidade dolorosa nas bezerras após o nascimento.

Palavras-chave: Gestação. Bovinos. Dor. Bem-estar animal. Claudicação.

ABSTRACT

BARBOSA, B.S. **Clinical recovery and pain response in hot iron dehorning calves:** influence of prenatal stress. [Recuperação clínica e resposta a dor em bezerros descornados com ferro quente: influência do estresse pré-natal]. 2022. 100 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

The prenatal period is important in the modulation of biological systems to allow individuals to respond to their environment and to different situations throughout their life. However, this period, when affected by a negative stimulus such as stress, can cause long-term disturbances in the individual's ability to cope with its environment. Lameness in dairy cows is considered an uncomfortable and painful experience that occurs in more than 20% of animals, across the globe, being the main indicator of poor welfare in dairy herds., Lameness during pregnancy, can cause prenatal stress in cattle, negatively affecting offspring in extrauterine development. Among the possible extrauterine alterations, the nociceptive response of calves to painful and stressful challenges are of interest, of which dehorning by hot iron is notable for being a procedure that generates severe stress and pain for calves. Therefore, the main objective of this work was to evaluate the influence of lameness in cows in the final third of pregnancy on the nociceptive responses and recovery from burn injury in offspring submitted to dehorning with hot iron at 30 days of life. We study 34 cows, multiparous and primiparous, Holstein-Frisia in the final third of gestation, separated into two groups according to the locomotion score (LS): G1 – 20 cows with $LS \leq 2$; G2 – 14 cows with $LS \geq 3$. After calving the calves were separated into two groups according to the mothers' groups: GC1 – 20 heifers from cows with $LS \leq 2$ and GC2 – 14 calves born from cows with $LS \geq 3$. At 30 days of age the female calves were dehorned with a hot iron and nociceptive evaluations, evaluation of the area of regression of the burn injury and determination of salivary cortisol concentration were performed in a blinded manner. The results showed that there was no difference between groups GC1 and GC2 for the area of regression of the lesions and for the concentration of salivary cortisol. However, calves born from cows with $LS \geq 3$ had a lower nociceptive threshold, demonstrating the negative influence that lameness in pregnant cows can exert on the modulation of pain sensitivity in calves after birth.

Keywords: Pregnancy. Cattle. Pain. Animal welfare. Lameness.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Piquete das vacas em terço final de gestação.....	32
Figura 2 -	Contenção para coleta de amostra de saliva com roletes de algodão.....	36
Figura 3 -	Roleta de algodão sendo espremido pelo êmbolo da seringa para extração da saliva.....	36
Figura 4 -	Alojamento das bezerras (gaiolas).....	39
Figura 5 -	Procedimentos pré-descorna e descorna em bezerras.....	41
Figura 6 -	Mochador elétrico utilizado nos procedimentos de descorna das bezerras (Prata Brito®)	42
Figura 7 -	Locais das avaliações nociceptivas.....	43
Figura 8 -	Monofilamento de von Frey.....	45
Figura 9 -	Conjunto de monofilamentos de von Frey.....	46
Figura 10 -	Bezerra vendada para redução de estímulos visuais e avaliação do limiar nociceptivo.....	48
Figura 11 -	Exemplo de mensuração da área das lesões nos tempos 0, 3, 7, 14 e 21 dias após a descorna utilizando o software Image J.....	50
Figura 12 -	Linha do tempo do experimento.....	52
Figura 13 -	Concentração de leucócitos totais ($\times 10^3/\mu\text{L}$) de vacas com $\text{EL} \leq 2$ (G1) e de vacas com $\text{EL} \geq 3$ (G2), quatro semanas antes da data prevista de parto.....	54
Figura 14 -	Concentração de hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$) de vacas com $\text{EL} \leq 2$ (G1) e de vacas com $\text{EL} \geq 3$ (G2), quatro semanas antes da data prevista de parto.....	57
Figura 15 -	Concentração de hemoglobina (g/dL) de vacas com $\text{EL} \leq 2$ (G1) e de vacas com $\text{EL} \geq 3$ (G2), quatro semanas antes da data prevista de parto.....	57
Figura 16 -	Hematócrito (%) de vacas com $\text{EL} \leq 2$ (G1) e de vacas com $\text{EL} \geq 3$ (G2), quatro semanas antes da data prevista de parto.....	58

Figura 17 -	Volume Corpuscular Médio (fL) de vacas com EL ≤ 2 (G1) e de vacas com EL ≥ 3 (G2), quatro semanas antes da data prevista de parto.....	58
Figura 18 -	Hemoglobina Corpuscular Média (pg) de vacas com EL ≤ 2 (G1) e de vacas com EL ≥ 3 (G2), quatro semanas antes da data prevista de parto.....	59
Figura 19 -	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (pg) de vacas com EL ≤ 2 (G1) e de vacas com EL ≥ 3 (G2), quatro semanas antes da data prevista de parto.....	59
Figura 20 -	Concentração de cortisol salivar (pg/μL) de vacas com EL ≤ 2 (G1) e de vacas com EL ≥ 3 (G2), quatro semanas antes do parto.....	61
Figura 21 -	Peso (kg) de bezerras filhas de vacas com EL ≤ 2 (GB1) e filhas de vacas com EL ≥ 3 (GB2), 24 h após o nascimento.....	65
Figura 22 -	Peso (kg) de bezerras filhas de vacas multíparas e primíparas com EL ≤ 2 (GB1) e com EL ≥ 3 (GB2), 24 h após o nascimento.....	65
Figura 23 -	Altura de cernelha (cm) de bezerras filhas de vacas com EL ≤ 2 (GB1) e filhas de vacas com EL ≥ 3 (GB2), 24 h após o nascimento.....	66
Figura 24 -	Altura de cernelha (cm) de bezerras filhas de vacas multíparas e primíparas com EL ≤ 2 (GB1) e com EL ≥ 3 (GB2), 24 h após o nascimento.....	66
Figura 25 -	Concentração de cortisol salivar (pg/μL) de bezerras filhas de vacas com EL ≤ 2 (GB1) e filhas de vacas com EL ≥ 3 (GB2), 24 h após o nascimento.....	64
Figura 26 -	Concentração de cortisol salivar (pg/μL) de bezerras filhas de vacas com EL ≤ 2 (GB1) e filhas de vacas com EL ≥ 3 (GB2), nos diferentes momentos de análise antes e após a descorna.....	69
Figura 27 -	Área da lesão de queimadura das bezerras dos grupos GB1 e GB2 nos diferentes tempos de análise após a descorna.....	72
Figura 28 -	Regiões das avaliações nociceptivas.....	73
Figura 29 -	Média ± erro padrão da média da sensibilidade (g) avaliada por meio de filamentos de von Frey em bezerros	74

na região da pele (A) e no corno (B) nos momentos antes (basal) e após (24h e 15 dias) a descorna.....

- Figura 30 - Média \pm erro padrão da média da sensibilidade (g) avaliada por meio de analgesímetro (von Frey) digital em bezerros na região da pele (A) e no corno (B) antes (basal) e após (24h e 15 dias) a descorna..... 75
- Figura 31 - Média \pm erro padrão da média da sensibilidade (g) por meio de escore nociceptivo em bezerros na região da pele (A - lado direito) e (B - lado esquerdo) e no corno (C - lado direito) e (D - lado esquerdo) nos momentos antes (basal) e após (24h e 15 dias) a descorna..... 77
- Figura 32 - Avaliação do limiar nociceptivo por meio de filamentos de von Frey na pele das bezerras dos grupos GB1 e GB2 nos diferentes tempos de análise..... 76
- Figura 33 - Avaliação do limiar nociceptivo (g) por meio de filamentos de von Frey no corno e nas lesões das bezerras dos grupos GB1 e GB2 nos diferentes tempos de análise antes e após a descorna..... 81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Média \pm erro padrão da média dos parâmetros hematológicos avaliados de vacas com $EL \leq 2$ (G1) e vacas com $EL \geq 3$ (G2) quatro semanas antes da data prevista de parto.....	52
Tabela 2 -	Média \pm erro padrão da média da concentração de cortisol salivar de vacas com $EL \leq 2$ (G1) e de vacas com $EL \geq 3$ (G2), quatro semanas antes da data prevista de parto.....	57
Tabela 3 -	Valores individuais, média e erro padrão da média (EPM) do peso e da altura de cernelha após o nascimento das bezerras filhas de vacas com $EL \leq 2$ (GB1) e de vacas com $EL \geq 3$ (GB2).....	60
Tabela 4 -	Média \pm erro padrão da média do peso e da altura de cernelha de bezerras, 24 h após o nascimento, de acordo com as matrizes (multíparas e primíparas) e de acordo com o grupo GB1 ($EL \leq 2$) e GB2 ($EL \geq 3$).....	60
Tabela 5 -	Média \pm erro padrão da média da concentração de cortisol salivar (pg/L) de bezerras filhas de vacas com $EL \leq 2$ (GB1) e filhas de vacas com $EL \geq 3$ (GB2) nos diferentes momentos de análise.....	64
Tabela 6 -	Média \pm erro padrão da média da área da lesão (cm ²) de bezerras filhas de vacas com $EL \leq 2$ (GB1) e filhas de vacas com $EL \geq 3$ (GB2) nos diferentes momentos de análise.....	67
Tabela 7 -	Média \pm erro padrão da média da sensibilidade (g) avaliada por filamentos de von Frey na região da pele adjacente ao broto cornual, antes e após a descorna.....	69
Tabela 8 -	Média \pm erro padrão da média da sensibilidade (g) avaliada pelo analgesímetro (von Frey) digital de acordo com os momentos na região da pele adjacente ao broto cornual nos momentos antes (basal) e após (24h e 15 dias) a descorna.....	71
Tabela 9 -	Média \pm erro padrão da média do limiar nociceptivo (g) na pele das bezerras dos grupos GB1 e GB2 nos diferentes tempos de análise antes e após a descorna.....	76
Tabela 10 -	Média \pm erro padrão da média do limiar nociceptivo (g) do corno das bezerras dos grupos GB1 e GB2 nos diferentes tempos de análise antes e após a descorna.....	77

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Escore de locomoção aplicado aos bovinos leiteiros.....	34
Quadro 2 -	Momentos e avaliações realizados nas vacas e novilhas em final de gestação.....	37
Quadro 3 -	Momentos e avaliações realizados nas bezerras.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
CAEP	Centro de Apoio ao Ensino e Pesquisa
CECSBE	Laboratório do Centro de Estudos Comparativos em Saúde, Sustentabilidade e Bem-Estar
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
EL	Escore de locomoção
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
FZEA	Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
G1	Grupo de animais que não apresentaram $EL > 2$ em nenhuma avaliação semanal
G2	Grupo de animais que apresentaram ao menos uma vez $EL \geq 3$ durante as avaliações semanais
GB1	Grupo de bezerras nascidas de vacas com $EL \leq 2$ durante os últimos 60 dias de gestação;
GB2	Grupo de bezerras nascidas de vacas com $EL \geq 3$ durante os últimos 60 dias de gestação
Hb	Concentração de Hemoglobina
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
He	Concentração de Hemácias
HPA	Eixo hipófise pituitária adrenal
Ht	Hematócrito
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
IV	Intravenoso
USP	Universidade de São Paulo
VCM	Volume Corpuscular Médio
VPS	Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal
11 β -HSD2	11 β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 2

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
>	$x > y$ significa que x é maior que y
\geq	$x \geq y$ significa que x é maior ou igual a y
=	Igual
<	$x < y$ significa que x é menor que y
\leq	$x \leq y$ significa que x é menor ou igual a y
\pm	Mais ou menos
cm	Centímetros
cm ²	Centímetros quadrados
fL	Fentolitro
g	Gramas
h	Horas
kg	Quilogramas
L	Litros
μ L	Microlitro
m ²	Metros quadrados
ml	Mililitros
mm	Milímetro
pg	Picogramas
°	Grau
°C	Graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	23
3 JUSTIFICATIVA.....	29
4 OBJETIVO GERAL	30
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
5.1 ETAPA I - GRUPOS EXPERIMENTAIS E AVALIAÇÕES.....	31
5.1.1 Animais.....	31
5.1.2 Cortisol Salivar	35
5.1.3 Hemograma.....	37
5.1.4 Momentos das análises.....	37
5.2 ETAPA II - GRUPOS EXPERIMENTAIS E AVALIAÇÕES.....	38
5.2.1 Bezerras	38
5.2.2 Cortisol salivar.....	39
5.2.3 Descorna das bezerras	39
5.2.4 Avaliação do limiar nociceptivo das bezerras	42
5.2.4.1 Estudo piloto.....	42
5.2.4.1.1 Método I - Avaliação mecânica quantitativa de nocicepção.....	44
5.2.4.1.2 Método II - Avaliação do limiar nociceptivo tátil	46
5.2.5 Área das lesões.....	48
5.2.6 Momentos das análises.....	51
5.3 - ANÁLISE ESTATÍSTICA	53
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
6.1 VACAS	54
6.1.1 Hemograma.....	54
6.1.2 Cortisol Salivar	60
6.2 BEZERRAS	62
6.2.1 - Peso e altura de cernelha	62
6.2.1 Cortisol Salivar	67
6.2.3 Área das Lesões	69
6.2.4 Limiar Nociceptivo	72
6.2.4.1 Estudo Piloto	72
6.4.2.2 Estudo Principal	79

7 CONCLUSÕES	85
REFERÊNCIAS	86

1 INTRODUÇÃO

O efeito de substâncias como adrenalina e glicocorticoides liberadas em situações de estresse, quando experimentadas durante a gravidez, tem sido amplamente investigado em seres humanos e animais (GUEST et al., 2012). Sendo assim, é de grande importância o ambiente intrauterino no desenvolvimento de órgãos e tecidos fetais. Porém quando existem mudanças neste ambiente intrauterino ideal podem ocorrer alterações permanentes na função de órgãos ou estruturas sugerindo que durante o período gestacional, têm efeitos diretos na estrutura do cérebro do feto, os quais podem perdurar por toda a vida adulta (BARKER et al., 1989)

O manejo que compromete o bem-estar de animais de produção é realizado rotineiramente em fazendas leiteiras. Tal manejo associado a outros fatores estressantes, tais como o ambiente, a temperatura, enfermidades e o estresse psicossocial influenciam negativamente fêmeas gestantes e levam a distúrbios durante o desenvolvimento fetal, na imunidade e nas funções cognitivas pós-natal da prole (ARNOTT et al., 2012; GRÄBNER et al., 2009; MERLOT et al., 2008; OTTEN; KANITZ; TUCHSCHERER, 2015; BERNARDINO et al., 2016; TATEMOTO et al., 2019; TATEMOTO et al., 2020; SARMIENTO, 2021; SARMIENTO et al., 2021).

O período pré-natal é de suma importância para determinar como um indivíduo responderá ao ambiente e as diversas situações ao longo da vida. Porém, este período quando afetado por estímulo negativo como o estresse, determinam transtornos a longo prazo na vida do indivíduo (ARNOTT et al., 2012; MERLOT et al., 2008). Segundo estudos recentes realizados em animais, além dos fatores genéticos, eventos ambientais como o manejo e práticas pecuárias rotineiras atuam sobre a programação e desenvolvimento do feto e predispondo a doenças tardias (BAKKER et al., 1995; BAKKER et al., 1998; MADER et al., 2014; MERLOT et al., 2008).

O estresse pré-natal tem demonstrado efeitos negativos sobre a ontogênese do feto em suínos, ovinos e em humanos, devido a sua atuação em neurotransmissores cerebrais como a serotonina bem como em habilidades cognitivas da prole, aumentando o risco de doenças cardiovasculares, hipertensão, resistência à insulina e síndrome metabólica (GLOVER, 2011; GRÄBNER et al., 2009). Este estresse pré-natal vivenciado pelas fêmeas prenhes afeta o desenvolvimento fetal diretamente e indiretamente por duas vias principais: via regulação hormonal, na qual

catecolaminas e glicocorticoides atuam na expressão gênica do feto pelas alterações no eixo hipotálamo-hipofisário-adrenal, ou via modificação da morfologia placentária. Ambos os mecanismos foram observados em ovinos e caprinos e comprometem a resposta imune, a sobrevivência e o desenvolvimento do feto intra-útero e ao longo da vida, bem como influencia no comportamento materno pós-parto (MELORT et al., 2008).

Pesquisas atuais desenvolvidas com ovinos, caprinos, suínos e bovinos apontam que o manejo estressante por meio de agressões às fêmeas prenhes, tem efeito prejudicial a esta e ao feto, acarretando, na vida adulta da prole, menores índices produtivos e reprodutivos e comprometimento de funções imunes, metabólicas e cognitivas (BAXTER et al., 2016; COULON et al., 2011; HILD et al., 2011; TAO et al., 2012; TAO; DAHL, 2013). Além do descrito, Coulon et al. (2013), demonstraram haver alterações morfológicas e funcionais em neurônios corticolímbicos em ovinos nascidos de mães submetidas a este tipo de manejo.

Segundo estudos recentes, em razão da experiência desconfortável e dolorosa que ocorre por longo período de tempo, o principal indicador representativo de prejuízo no bem-estar animal em rebanhos leiteiros, é o comprometimento da saúde dos cascos, determinando, assim, o surgimento da claudicação. Além disto, esta manifestação clínica, de origem multifatorial, é apontada como a terceira maior causa de perdas econômicas no setor (GUCCIONE et al., 2016; VAN AMSTEL; SHEARER, 2006; WHAY et al., 2003) e, quando vivenciada durante a gestação, torna-se um dos agentes causadores de estresse pré-natal em bovinos, afetando negativamente a prole no desenvolvimento intra e extra útero (WHAY et al., 1998; TAO et al., 2012; TAO; DAHL., 2013).

Ainda considerando-se estímulos estressantes e conforme o manejo tradicional empregado na pecuária leiteira, a descorna de bezerros é um procedimento inserido no manejo rotineiro, considerado necessário e aceitável, com finalidade de reduzir o risco de ferimentos causados pelos cornos aos manipuladores e outros animais. O método mais empregados para tal prática é a cauterização pelo calor com ferro quente (GRONDAHL-NIELSON et al., 1999; VICKERS et al., 2005; GOTTARDO et al., 2011) além do procedimento ser acompanhado por dor e estresse (GRAF; SENN, 1999; GRONDAHL-NIELSON et al., 1999; HEIRICH et al., 2010).

Desta forma, frente as pesquisas que demonstram o impacto negativo do estresse no período pré e pós-natal, formulou-se a hipótese de que a claudicação,

caracterizada como um episódio doloroso e crônico, quando vivenciada durante a gestação de bovinos, sendo, portanto, um agente causador de estresse pré-natal, irá afetar negativamente a prole no desenvolvimento extra uterino, alterando a resposta nociceptiva do mesmo frente à desafios dolorosos e estressantes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A seguir será realizada breve revisão de literatura acerca das três principais problemáticas atinentes a este projeto: estresse pré-natal, claudicação em bovinos e descorna em bezerros.

2.1 - Estresse pré-natal e seus impactos na prole

Em 1990, o epidemiologista britânico David Barker publicou o artigo "*The Fetal and Infant Origins of Adult Disease*", no qual expunha ao mundo pela primeira vez a teoria da programação fetal, também conhecida como "A Hipótese de Barker" (BARKER, 1990). Baseado em estudos anteriores Barker afirma que o novo modelo para o entendimento de doenças em adultos deve incluir a programação modulada pelo ambiente na vida fetal e infantil, enfatizando significativamente a relação entre o ambiente intrauterino e seu efeito na doença do adulto.

Deste então, o ambiente intrauterino tem sido estudado pois além de afetar o desenvolvimento fetal, impacta diretamente no aparecimento de doenças nos adultos.

Pesquisas atuais mostram que o principal fator que altera o ambiente uterino é o estresse vivenciado pela mãe durante a gestação. E esse estresse gestacional, que pode ser de origem física ou psicológica, é capaz de modular o desenvolvimento fetal e estar associado a um risco aumentado de problemas emocionais, comportamentais e cognitivos na prole (SANDERCOCK et al., 2011; SARMIENTO, 2021).

Durante um evento estressante, catecolaminas e glicocorticoides são lançados na corrente sanguínea, para que uma série de repostas ocorram. Porém, o efeito dessas substâncias liberadas em situações de estresse durante a gestação pode modular uma o desenvolvimento e a ontogênese do feto.

Segundo a literatura, durante uma gestação saudável, o feto não é exposto a altos níveis de glicocorticóides maternos porque a placenta contém uma enzima, a 11 β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 2 (11 β -HSD2), que catalisa uma reação convertendo o cortisol ativo em cortisona inerte, minimizando assim a exposição do feto aos glicocorticoides (JANHKE et al., 2021; KNAEPEN et al., 2014). Porém em

mães que sofreram estresse durante a gestação, principalmente estresse psicossocial como ansiedade e depressão, possuem níveis elevados de cortisol, apresentando assim a quantidade de mRNA da placenta para 11 β -HSD2 diminuído (O'DONNELL et al., 2009; O'DONNELL et al., 2012). Desta forma, o feto é exposto a níveis elevados de corticoide, alterando assim o desenvolvimento do eixo hipófise-pituitária-adrenal (HPA) fetal. Essa exposição do feto ao corticoide materno pode levar a alterações na ontogênese do feto, dependendo da fase gestacional em que o feto foi exposto aos glicocorticoides.

Segundo Grégoire e colaboradores (2020), o estresse pré-natal tem impacto sobre a sensibilidade à dor crônica na idade adulta e sugerem que essas alterações de longo prazo podem ser mediadas, em parte, pela desregulação dos processos epigenéticos, uma vez que esses processos podem ser potencialmente modulados por agentes que têm como alvo as enzimas epigenéticas.

Muitos estudos usam modelos animais, utilizando vários tipos de estresses para melhor entendimento de como o estresse pré-natal pode afetar a prole.

Em um estudo utilizando porcas mancas durante a gestação como modelo de estresse pré-natal, Sarmiento e colaboradores (2017), demonstrou que a claudicação modificou o limiar nociceptivo da prole, sugerindo um aumento na tolerância à dor de leitões nascidos de porcas mancas. Sarmiento e colaboradores (2021), também estudando suínos fêmeas que apresentavam claudicação durante o período gestacional observou alterações o ganho de peso da prole, no número de lesões cutâneas e vocalizações, mostrando evidências de que a claudicação em porcas afeta o desempenho e o comportamento da prole.

Vários manejos que comprometem o bem-estar de vacas leiteiras são realizados rotineiramente, como mudanças em grupos sociais, alojamento com pisos inadequados, entre outros. Tais práticas de manejo são associados a outros fatores estressantes, tais como o ambiente, a temperatura, enfermidades e o estresse psicossocial influenciam negativamente fêmeas gestantes e levam a distúrbios durante o desenvolvimento fetal, na imunidade e nas funções cognitivas pós-natal da prole (ARNOTT et al., 2012; GRÄBNER et al., 2009; MERLOT et al., 2008; OTTEN; KANITZ; TUCHSCHERER, 2015).

O período pré-natal é de suma importância para determinar como um indivíduo responderá ao ambiente e as diversas situações ao longo da vida. Porém, este período quando afetado por estímulo negativo como o estresse, determinam

transtornos a longo prazo na vida do indivíduo (ARNOTT et al., 2012; MERLOT et al., 2008).

Segundo estudos recentes realizados em animais, além dos fatores genéticos, eventos ambientais como o manejo e práticas pecuárias rotineiras atuam sobre a programação e desenvolvimento do feto e predispondo a doenças tardias (BAKKER et al., 1995; BAKKER et al., 1998; MADER et al., 2014; MERLOT et al., 2008).

2.2 - Claudicação em bovinos leiteiros

A claudicação, comumente chamada de “manqueira”, é um sintoma clínico que se manifesta como distúrbio de locomoção em vacas devido, principalmente, ao comprometimento da saúde dos cascos (O'CALLAGHAN, 2002), e atualmente é considerado o principal indicador representativo de prejuízo no bem-estar animal dos rebanhos leiteiros. Assim, os indicadores visuais comumente usados para identificar um indivíduo afetado com claudicação incluem movimento assimétrico, ritmo e velocidade da marcha, redução da sustentação do peso nos cascos e posturas anormais (FLOWER E WEARY, 2009).

Atualmente é uma das principais preocupações com a saúde do setor pecuário, particularmente na indústria de gado leiteiro (AFONSO et al., 2020). Dados nacionais apontam que no Brasil a claudicação afeta mais de 20% das vacas leiteiras (BRAN et al., 2018; COSTA et al., 2018), e dados internacionais e mais antigos demonstram que o custo estimado em dólares americanos da claudicação clínica em gado leiteiro aproxima-se de US\$ 500 por caso (GUARD, 2006; WHAY, SHEARER, 2017).

Segundo Bran e colaboradores (2018), a etiologia da claudicação é multifatorial e complexa, mas, em geral, a interação entre dois fatores principais que podem influenciar diretamente a dinâmica da claudicação relacionado a lesões de ruptura de estojo córneo. O primeiro grupo de fatores estão associados com a questões de alojamento e manejo que podem aumentar o estresse mecânico nos membros, como tamanho inadequado das instalações, superfícies de caminhada inadequadas e características da superfície de repouso. Os outros fatores estão relacionados com as mudanças fisiológicas durante o período de transição e o manejo nutricional do

rebanho, incluindo alta produção de leite, perda excessiva e rápida de peso corporal e manejo alimentar inadequado das vacas durante o parto.

A claudicação em vacas leiteiras é uma condição extremamente dolorosa que afeta diretamente o bem-estar dos animais e impacta economicamente a indústria de laticínios em todo o mundo (WHAY, SHEARER, 2017)

Segundo estudos realizados em ovinos e bovinos (LEY et al., 1989; LEY et al., 1992; LEY et al., 1994; LEY et al., 1995; LEY et al., 1996; WHAY et al., 1998), parâmetros como o limiar nociceptivo mecânico, cortisol, adrenalina e noradrenalina se alteram durante a exposição a dor crônica ocasionada por lesões podais, e estas mudanças podem persistir por até três meses, mesmo após o tratamento e a resolução macroscópica, envolvendo assim o sistema nervoso e endócrino do animal em resposta a dor crônica. Portanto, a existência de lesões podais graves determina o surgimento de intensa e prolongada sensibilidade nociceptiva (hiperalgesia), mesmo após o tratamento ser instituído e concluído. Pesquisas posteriores reforçaram estes resultados demonstrando que bovinos com claudicação demonstraram menor limiar nociceptivo, isto é, o aumento da hiperalgesia variou diretamente de acordo com a intensidade da claudicação (TADICH et al., 2013).

Em suínos, dados apontam que leitões provenientes de porcas claudicantes possuem menor ganho de peso a maior taxa de agressividade nas primeiras semanas de vida (Sarmiento et al., 2017), e mudança na nocicepção (Sarmiento et al., 2019).

2.3 - Descorna em bezerras

A descorna em bezerros é uma prática rotineira empregada em fazendas leiteiras, realizada com a justificativa de garantir a segurança aos tratadores e reduzir a agressividade entre os animais, facilitando assim o manejo dos animais (KNIERIM et al., 2015, CARDOSO et al., 2016).

Tal prática tem o objetivo de destruir o broto córneo que dará origem aos cornos em animais adultos. Segundo Stafford e Mellor (2005), a idade recomendada para este procedimento é por volta de até oito semanas de idade, quando o botão córneo ainda não está aderido ao osso frontal, ou seja, quando o broto cornual mede aproximadamente 5 a 10 mm. Porém, em um trabalho realizado por Caray et al.

(2015), os quais compararam a resposta ao estresse de bezerros descornados por ferro quente com idade entre uma e quatro semanas de vida, mostrou que a hipótese de que bezerros com uma semana de vida seriam menos sensíveis a descorna quando comparados com bezerros de quatro semanas não é verdadeira.

Vários métodos podem ser utilizados para destruição das células do broto cornual, como a cauterização por calor utilizando-se ferro quente ou elétrico, (GRONDAHL-NIELSON et al., 1999; KLING-EVEILLARD et al., 2009 ; VICKERS et al., 2005; VASSEUR et al., 2010; GOTTARDO et al., 2011; STOCK et al., 2013; BARBOSA, 2016), pasta cáustica (VICKERS et al., 2005; STILWELL; LIMA; BROOM, 2008; STILWELL et al., 2009; EDE et al., 2020; WINDER et al., 2017; RREDMAN et al., 2020) e cauterização pelo frio - crio cirurgia (BENGTSSON et al., 1996).

Dentre todas estas técnicas a que mais se destacada por estar inserida no manejo rotineiro das propriedades leiteiras é cauterização pelo calor utilizando o ferro quente, tornando-se, portanto, um dos principais fatores da ocorrência de queimaduras em bezerros (GRONDAHL-NIELSON et al., 1999; GOTTARDO et al., 2011; VICKERS et al., 2005; COZZI et al., 2015; HÖTZEL E SNEDDON, 2013), sendo estas caracterizadas em terceiro grau (botão córneo) e nos tecidos adjacentes de segundo grau (BARBOSA, 2016; TASCHKE, FOLSCH, 1997).

A literatura reporta que a descorna em bezerros é um procedimento extremamente doloroso e causa estresse aos animais (STAFFORD E MELLOR, 2005). Dados comportamentais e parâmetros fisiológicos têm demonstrado que a dor pós-descorna persiste até 24 h após o procedimento (STOCK et al., 2016), exibindo níveis de cortisol e frequência cardíaca elevados por até várias horas após o procedimento (GRONDAHL-NIELSEN, 1999), bem como alterações de comportamento, com maior frequência de movimentos de cabeça, sacudir de orelhas e esfregar de cabeças (FAULKNER; WEARY, 2000; STAFFORD e MELLOR, 2005).

Tais estudos apontam a necessidade da utilização de medicamentos sedativos, anestésicos, analgésicos e anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) durante e após o procedimento (FAULKNER; WEARY, 2000; VICKERS et al., 2005; DOHERTY et al., 2007; STILWELL et al., 2010; FIERHELLER et al., 2012; ESPINOZA et al., 2013; FRACCARO et al., 2013; BATES et al., 2015; CARAY et al., 2015) visando mitigar a dor causada pelo procedimento. Também foi demonstrado que sensibilização periférica ocorre e dura de 75 até 96 h após a descorna por ferro quente em bezerros,

mesmo com a administração de analgesia multimodal (MINTLINE et al., 2013; STOCK et al., 2016).

Segundo Casoni e colaboradores (2019), as sequelas da descorna podem se estender muito além da fase aguda da dor e os animais podem ser afetados pela sensibilização crônica do nervo trigêmeo, independentemente da idade na descorna.

Segundo Neave e colaboradores (2013), Lecorps e colaboradores (2019), os bezerros experimentam após a descorna, mudança negativa no estado emocional, ou seja, um viés cognitivo pessimista e depressivo mesmo com a utilização de anestésicos e anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), destacando assim a importância de proporcionar alívio da dor durante e após o procedimento.

Outras alterações decorrentes da descorna por ferro quente em bezerros foram relatadas por Mir e colaboradores (2019), que avaliaram os possíveis efeitos do estresse de descorna e castração sobre a microbiota do trato gastrointestinal de bezerros leiteiros, demonstraram que o estresse da descorna por ferro quente reduz a diversidade microbiana da microbiota do trato gastrointestinal, mas apenas em bezerros leves.

Embora vários destes estudos tenham sido capazes de documentar as alterações comportamentais, fisiológicas e neuroendócrinas que indiquem dor aguda e provável dor crônica no processo de descorna, muito pouco se sabe sobre as consequências a longo prazo do procedimento, ou seja, as reais consequências deste procedimento para vida adulta do animal.

Nos últimos anos, alguns estudos tentam quantificar a nocicepção dos bezerros pós descorna, porém, cada estudo utiliza um método diferente, tornando a comparação dos dados algo variável e não fidedigno.

3 JUSTIFICATIVA

Por meio de resultados promissores obtidos em estudos realizados em caprinos (BAXTER et al., 2016), ovinos (COULON et al., 2011; COULON et al., 2013; HILD et al., 2011) e suínos (OTTEN; KANITZ; TUCHSCHERER et al., 2015; SABEI, 2020; SARMIENTO et al., 2019; BERNARDINO et al., 2016; SARMIENTO et al., 2021; SARMIENTO, 2021) associados à existência de poucas informações na literatura nacional e internacional veterinária abordando o tema em bovinos e, tendo em vista a relevância da cadeia produtiva da bovinocultura leiteira no agronegócio nacional, a atual intensificação do sistema de produção de leite no Brasil, a ocorrência de lesões podais em bovinos de leite e a importância do estresse causado por estas lesões durante o período gestacional à saúde e a produtividade futura da prole, torna-se fundamental o constante desenvolvimento de pesquisas científicas que assegurem e garantam melhorias nos cuidados com animais de produção de modo a assegurar a saúde, o bem estar animal e, conseqüentemente, a produtividade e a sustentabilidade.

4 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a influência da claudicação em vacas no terço final de gestação, como modelo clínico de estresse pré-natal, sobre as respostas nociceptivas e recuperação da lesão de queimadura da prole submetida à descorna com ferro quente aos 30 dias de vida.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a influência da claudicação no hemograma de vacas, quatro semanas antes do parto;
- Avaliar a influência da claudicação no cortisol salivar de vacas, quatro semanas antes do parto;
- Avaliar a concentração de cortisol salivar de bezerras, provenientes de vacas com e sem claudicação no terço final da gestação, ao nascimento, após a descorna com ferro quente e durante a recuperação da lesão de queimadura.

5 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado seguindo os princípios éticos da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA-FMVZ/USP) sob o protocolo de número 4744020317.

Por se tratar de um estudo com observações transgeracionais e para melhor entendimento, os materiais e métodos utilizados foram divididos em etapa I e etapa II e encontram-se descritas abaixo.

5.1 ETAPA I - GRUPOS EXPERIMENTAIS E AVALIAÇÕES

5.1.1 Animais

Foram selecionados 40 bovinos, fêmeas, da raça Holstein-Frísia, primíparas e multíparas, em terço final de gestação, em período seco, pertencentes ao rebanho da Fazenda da Aeronáutica de Pirassununga (FAYS), localizada no Estado de São Paulo, município de Pirassununga (-21.92971348764433, -47.351538716198476).

Os animais eram mantidos em sistema semi-intensivo de criação, em piquetes com acesso ao pasto (Figura 1).

Figura 1 - Piquete das vacas em terço final de gestação



Fonte: Stanigher (2021)

Após a secagem os animais foram acompanhados semanalmente até a data prevista de parto, para determinação do escore de locomoção (EL), de acordo com Sprecher et al. (1997), por meio de inspeção direta realizada por avaliador treinado (Quadro 1). Após a identificação do EL, os animais acometidos eram contidos e recebiam os cuidados necessários.

Na data do parto, de acordo com o EL, os animais foram separados em dois grupos:

- **G1:** $EL \leq 2$ (N = 20; 09 vacas e 11 novilhas) - animais que não apresentaram $EL > 2$ em nenhuma avaliação semanal;
- **G2:** $EL \geq 3$ (N = 14; 11 vacas e 03 novilhas) - animais que apresentaram ao menos uma vez $EL \geq 3$ durante as avaliações semanais.

Inicialmente haviam sido selecionados 40 animais, isto é, 20 animais por grupo, no entanto seis animais foram excluídos do G2 devido à comorbidades e/ou alterações comportamentais que inviabilizaram as coletas de amostras para o experimento (Tabela 1).

Inicialmente os animais foram submetidos ao exame físico segundo Rosenberger (1983), e, quatro semanas antes da data de parto prevista, foram contidos para coleta de amostras de saliva para determinação do cortisol salivar e de amostras de sangue para determinação do hemograma. Até a data do parto, foram também avaliados semanalmente por meio de exame físico. Os momentos das análises estão discriminados no Quadro 2.

Quadro 1 - Escore de locomoção aplicado aos bovinos leiteiros

Escore de Locomoção (EL)	Classificação	Critérios de avaliação	
		Animal imóvel e em estação	Animal em movimento
1	Normal	Dorso plano	Dorso plano; a marcha está normal.
2	Claudicação leve	Dorso plano	Dorso arqueado; a marcha está normal.
3	Claudicação moderada	Dorso arqueado	Dorso arqueado; a marcha está afetada, pode apresentar encurtamento do movimento de um ou mais membros.
4	Claudicação evidente	Dorso arqueado	Dorso arqueado; a marcha é descrita como um passo de cada vez e favorece um ou mais membros.
5	Claudicação grave	Dorso arqueado; reluta em apoiar um ou mais membros	Dorso arqueado; grande dificuldade em se locomover e evita o apoio de um ou mais membros quando em movimento.

Fonte: Stanigher (2021). Adaptado de Spreacher, Hostetler e Kaneene (1997) 5.1.2 Cortisol salivar

5.1.2 Cortisol Salivar

As amostras de saliva foram coletas sempre durante o período da manhã, preferencialmente até as 9h para minimizar as influências circadianas. A concentração foi determinada de acordo com o método descrito por Siegford e colaboradores (2008).

Para a coleta de saliva foram utilizados dois roletes de algodão amarrados por fio dental de aproximadamente 60 cm de comprimento. Os roletes de algodão foram fornecidos os animais de forma que eles mastigassem e o umedecessem com saliva. O primeiro rolete era descartado e o procedimento repetido para garantir que a saliva coletada fosse recém produzida, diferente da saliva acumulada na cavidade bucal. Em seguida, os roletes de algodão eram colocados dentro de uma seringa de 20 mL para então serem espremidos pelo êmbolo e assim extrair a saliva acumulada (Figura 2 e 3).

A saliva extraída era então armazenada em microtubos de 1,5 mL e mantidos em caixas de isopor com gelo para transporte até o Centro de Apoio ao Ensino e Pesquisa – CAEP FMVZ/USP, Campus Fernando Costa, Pirassununga/SP, e, em seguida, congelamento a -20°C em freezer no local até a realização das análises laboratoriais. As amostras foram processadas de forma a obter os valores da concentração de cortisol (pg) utilizando-se Ensaio Imunoenzimático (EIA), segundo Palme e Möstl (1997), no Laboratório do Centro de Estudos Comparativos em Saúde, Sustentabilidade e Bem-Estar (CECSBE), sob responsabilidade do Prof. Dr. Adroaldo José Zanella, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS), no campus Fernando Costa, Pirassununga/SP.

Figura 2 – Contenção para coleta de amostra de saliva com roletes de algodão



Fonte: Stanigher (2021)

Legenda: (A) - coleta de saliva com rolete de algodão em vaca gestante; (B) coleta de saliva com rolete de algodão em bezerra

Figura 3 - Rolete de algodão sendo espremido pelo êmbolo da seringa para extração da saliva



Fonte: Stanigher (2021)

5.1.3 Hemograma

Amostras de sangue das vacas foram coletadas quatro semanas antes do parto previsto por meio de punção da veia coccígea usando-se sistema Vacutainer® em tubos siliconizados com EDTA tripotássico, destinados à determinação do hemograma. O eritrograma e o número total de leucócitos foram determinados por meio de analisador hematológico automático (Mindray BC-2800Vet®) no Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias do Departamento de Medicina Veterinária da FZEA/USP, Campus Pirassununga, sob responsabilidade do Prof. Dr. Eduardo Harry Birgel Junior.

5.1.4 Momentos das análises

Quadro 2 - Momentos e avaliações realizados nas vacas em final de gestação

VACAS		
Momentos	Período	Avaliações
M4	4 semanas antes do parto	<ul style="list-style-type: none"> • Exame físico • Hemograma • Cortisol salivar
M3	3 semanas antes do parto	<ul style="list-style-type: none"> • Exame físico
M2	2 semanas antes do parto	
M1	1 semana antes do parto	

Fonte: Stanigher (2021)

5.2 ETAPA II - GRUPOS EXPERIMENTAIS E AVALIAÇÕES

5.2.1 Bezerras

Logo após o nascimento, as bezerras foram classificadas em dois grupos experimentais de acordo com o grupo que a mãe pertencia:

- **GB1:** bezerras nascidas de vacas com EL ≤ 2 durante os últimos 60 dias de gestação (N = 20; 09 bezerras nascidas de multíparas e 11 bezerras nascidas de primíparas);
- **GB 2:** bezerras nascidas de vacas com EL ≥ 3 durante os últimos 60 dias de gestação (N = 14; 11 bezerras nascidas de multíparas e 03 bezerras nascidas de primíparas)

Após o parto, foram fornecidos 6 L de colostro fresco de primeira ordenha, proveniente de suas respectivas mães, através de mamadeira (correspondente a 10-15% do peso vivo ao nascimento). O volume total era dividido em duas alimentações de 3 L cada, com intervalo de 6 h, sendo os primeiros 3 L até 4 h após o nascimento, como recomendado por Lora et al. (2017). O peso vivo (kg) e a altura de cernelha (cm) foram mensurados 24h após o parto.

Diariamente, os animais eram aleitados por meio de baldes, duas vezes ao dia, em volume totalizando aproximadamente 6 L de leite, correspondendo a 20 % do peso vivo, e o volume total era dividido em duas alimentações. Adicionalmente recebiam ração peletizada para bezerros e água *ad libitum*.

Desde o nascimento até o final do experimento, as bezerras permaneceram alojadas em sistema de criação individual em gaiolas suspensas, nas quais não tinham contato físico umas com as outras, apenas contato visual, orfativo e sonoro (Figura 4).

As bezerras foram avaliadas semanalmente através de exame físico segundo Rosenberger (1983), até o momento da descorna, aos 30 dias de vida. Os momentos das análises e exames realizados estão discriminados no Quadro 3.

Figura 4 - Alojamento das bezerras (gaiolas)



Fonte: Stanigher (2021)

5.2.2 Cortisol salivar

Para mensuração do cortisol salivar as amostras foram coletadas, armazenadas e processadas de forma similar ao realizado com as matrizes e descrito no item 5.1.2. As coletas foram realizadas nos momentos: 24h após o parto, imediatamente antes da descorna aos 30 dias de vida, 24 h após a descorna, três, sete, 14 e 21 dias após a descorna (Quadro 3).

5.2.3 Descorna das bezerras

Aos 30 dias de vida as bezerras foram descornadas com ferro quente. Para o procedimento, os animais receberam previamente sedativo e anestesia local de acordo com Edwards (2001), e Stock e colaboradores (2013). A descorna foi realizada

de acordo com técnica descrita por Barbosa (2016), empregando-se mochador elétrico para bovinos (Prata Brito®) (Figura 5 e 6). Após a descorna foi utilizado unguento à base de óxido de zinco sobre as lesões até a cicatrização e para analgesia no pós-cirúrgico administrou-se dipirona sódica (D-500® - Zoetis; 25 mg/kg, IV, BID) durante três dias após a descorna.

Figura 5 - Procedimentos pré-descorna e descorna em bezerras



Fonte: Stanigher (2021)

Legenda: (A) - Anestesia local ao redor do botão cornual de bezerra; (B) - Excisão do broto cornual após anestesia local e antes da cauterização térmica; (C) - Cauterização térmica do broto cornual utilizando-se mochador elétrico.

Figura 6 - Mochador elétrico utilizado nos procedimentos de descorna das bezerras (Prata Brito®)



Fonte: Stanigher (2021)

5.2.4 Avaliação do limiar nociceptivo das bezerras

Para avaliação do limiar nociceptivo, foi realizado treinamento da técnica com a equipe do Laboratório de Neuromodulação da Dor do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP), sob a supervisão da Prof^{fa}. Dr^a. Camila Squarzoni Dale, e estudo piloto para padronização da técnica.

5.2.4.1 Estudo piloto

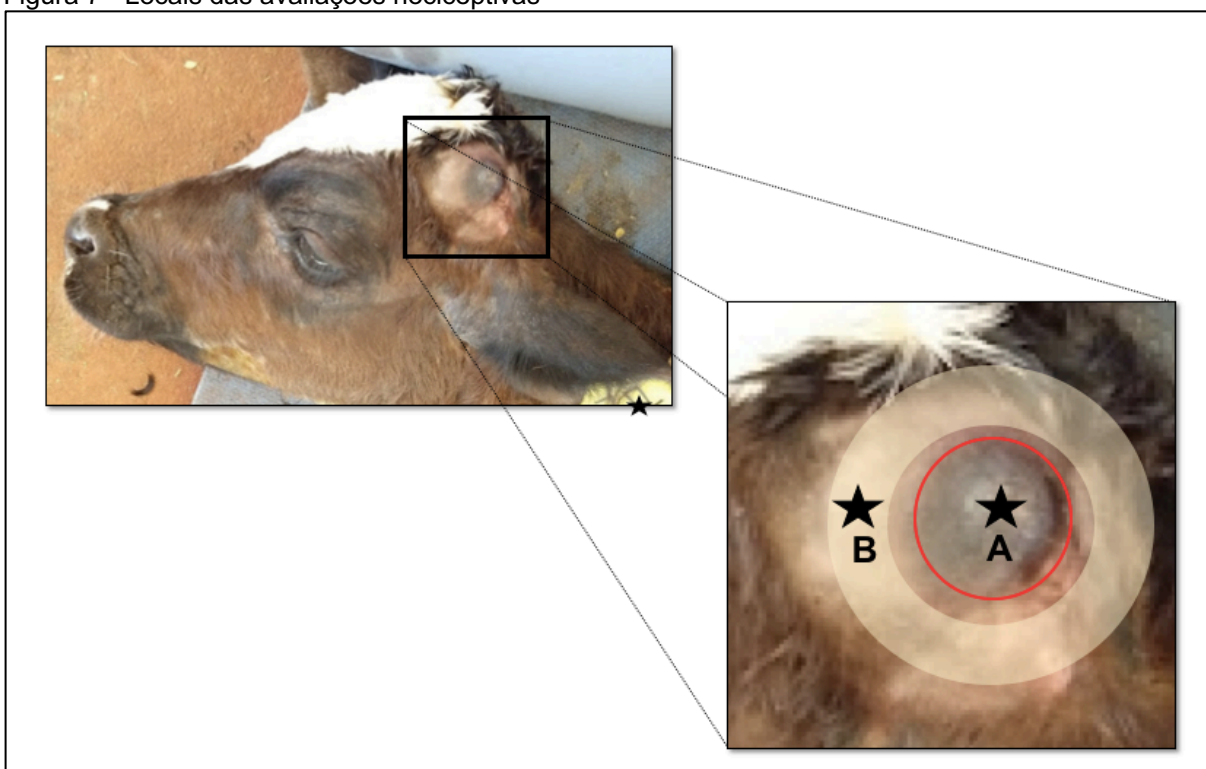
Pesquisas demonstram a importância, a necessidade e a dificuldade de se avaliar e quantificar a dor em animais de produção, principalmente em bovinos leiteiros, e quando somado à falta de padronização de avaliações nociceptivas nestes animais na literatura, propôs-se a realização deste estudo que visou a padronização por meio da comparação de três diferentes métodos de avaliação da sensibilidade dolorosa, descrito em literatura, para, desta forma, identificar a melhor avaliação de

sensibilidade dolorosa em bezerros, antes e após a lesão de queimadura causada pela descorna por ferro quente.

Este estudo foi realizado em uma propriedade leiteira localizada na cidade de Pirassununga/SP. Foram utilizados 25 bezerros, machos e fêmeas, da raça Holstein-Frísia, com idade entre quatro e cinco semanas de vida, alojados em bezerreiro modelo argentino. Os animais eram aleitados por meio de mamadeiras, duas vezes ao dia, em volume totalizando aproximadamente 6 L de leite dia/animal. Adicionalmente, recebiam ração peletizada para bezerros, água e feno *ad libitum*.

Previamente ao processo de descorna por ferro quente bem como a todos os momentos das avaliações nociceptivas, os animais foram submetidos ao exame físico segundo Rosenberger (1983). As avaliações nociceptivas foram realizadas em duas regiões distintas: sobre o broto cornual e na região adjacente, em ambos os lados da cabeça (direito e esquerdo) (Figura 7), nos momentos: imediatamente antes do procedimento de descorna, 24 h e 15 dias após o procedimento.

Figura 7 - Locais das avaliações nociceptivas



Fonte: Stanigher (2021)

Legenda: (A) Local de avaliação do limiar nociceptivo sobre o broto cornual; (B) Local de avaliação do limiar nociceptivo na região adjacente ao broto cornual. Os mesmos locais foram avaliados após a descorna.

Para a avaliação nociceptiva foram utilizados três modelos de testes citados na literatura e descritos a seguir.

5.2.4.1.1 Método I - Avaliação mecânica quantitativa de nocicepção

Esta avaliação baseou-se no estudo de Chaplan e colaboradores (1994), no qual utilizam-se filamentos von Frey, isto é, filamentos de nylon de diferentes diâmetros e resistências responsáveis por empregar diferentes intensidades de força sobre a lesão ou tecido alvo (Figura 8). Tal teste consistiu em um conjunto de nove filamentos que eram aplicados diretamente sobre a região do broto cornual e da pele adjacente, antes e após a lesão de queimadura, em ambos os cornos de cada animal (Figura 9A). O conjunto de monofilamentos de von Frey foi cedido pelo Prof. Dr. Adriano Bonfim Carregaro, do Núcleo de Anestesiologia Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da FZEA/USP, Campus Fernando Costa, Pirassununga/SP.

Os filamentos utilizados foram: 0,07 g, 0,16 g, 0,4 g, 0,6 g, 1,0 g, 1,4 g, 2,0 g, 4,0 g e 6,0 g (Figura 9B). Sendo que o limiar de retirada da cabeça foi determinado pelo aumento ou diminuição sequencial da força. O teste foi iniciado sempre com o filamento de 1,0 g e a contagem de respostas é iniciada quando a primeira resposta for negativa e a segunda positiva.

A resposta foi considerada positiva quando o animal retirava a cabeça ao estímulo mecânico, e negativa quando o animal não apresentava reação alguma. A partir desta resposta negativa/positiva, foram registradas mais quatro respostas, respeitando-se sempre o princípio de que uma resposta positiva é sempre seguida por um estímulo (filamento) inferior ao anterior, enquanto uma resposta negativa é sempre seguida por um estímulo (filamento) superior ao anterior.

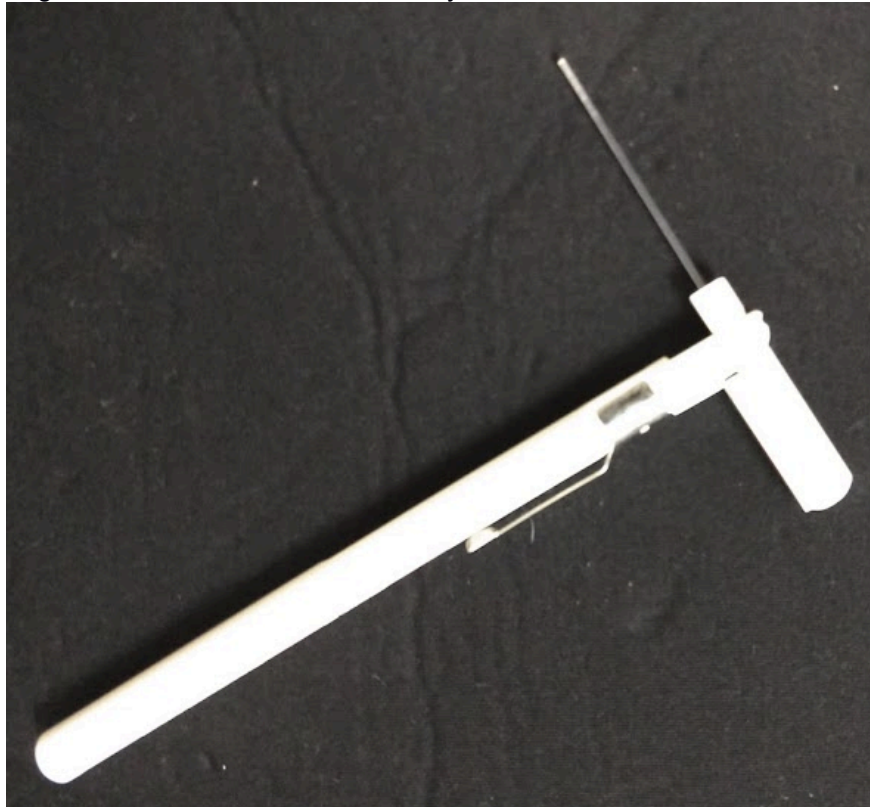
O limiar de retirada da cabeça do animal foi analisado observando os padrões de respostas, onde estes padrões foram inseridos no cálculo a seguir:

$$50\% g = 10 [X_f + (K \times Y)]$$

Sendo:

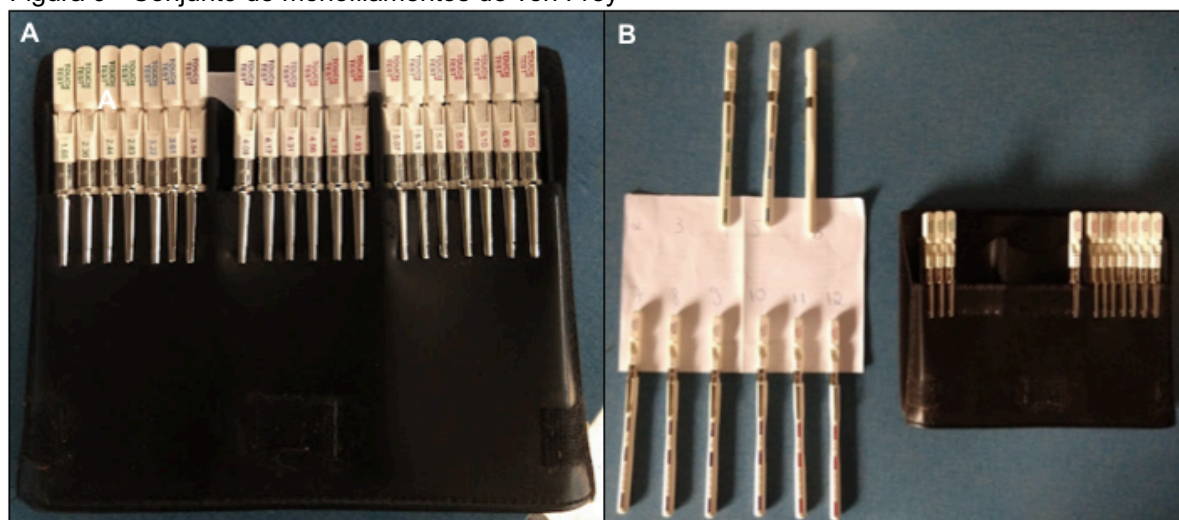
- X_f : valor do último filamento em gramas que é convertido em log de base 10;
- K : valor da sequência de seis respostas as quais os dados foram retirados da tabela (CHAPLAN, 1994);
- Y : é a média da diferença (em log) entre os filamentos apresentados.

Figura 8 - Monofilamento de von Frey



Fonte: Stanigher (2021)

Figura 9 - Conjunto de monofilamentos de von Frey



Fonte: Stanigher (2021)

Legenda: A - conjunto completo de monofilamentos de von Frey; B - monofilamentos utilizados para avaliação do limiar nociceptivo segundo Chaplan e colaboradores (1994)

5.2.4.1.2 Método II - Avaliação do limiar nociceptivo tátil

O método de avaliação de sensibilidade dolorosa mecânica foi adotado conforme o modelo descrito por Denadai-Souza et al. (2009). O mesmo se baseia na utilização de aparelho denominado analgesímetro digital (von Frey), sendo empregado o analgesímetro modelo EFF 301, Insight (Ribeirão Preto/SP, Brasil).

O método consiste em um transdutor de pressão eletrônico ligado a um contador digital com precisão de 0,1 g através de um cabo. Assim, a ponteira do transdutor foi aplicada nas regiões do broto cornual e pele adjacente como demonstrado na figura 6, com força e velocidade uniformes e progressivas de modo a obter a menor variação possível. A sensibilidade mecânica da região foi definida medindo-se o limiar de intensidade da força (em g) necessário para que ocorresse uma resposta de retirada da cabeça do animal. As avaliações de sensibilidade dolorosa e as medidas dos limiares de força, foram realizadas em triplicatas seguidas, para depois realizar a média das três medidas obtidas.

5.2.4.1.3 Método III - Avaliação sensorial quantitativa da sensibilidade

O método emprega como instrumento para análise da resposta ao estímulo nociceptivo o Teste Sensorial Quantitativo (QST – *Quantitative Sensorial Test*) utilizando monofilamentos calibrados de von Frey para avaliar a sensibilidade da lesão de queimadura e o tecido adjacente. Estes monofilamentos calibrados de von Frey são instrumentos que, dependendo do comprimento e do diâmetro, aplica-se força específica sobre a superfície da pele. Foram utilizados monofilamentos que exercem 60g e 300g de força para simular toque leve e estímulo nociceptivo intenso segundo McCarthy et al. (2016).

A sensibilidade foi avaliada pontuando-se as respostas comportamentais dos bezerros à estimulação mecânica em uma escala numérica de 0 a 3 adaptada de Espinoza et al. (2007), e McCarthy et al. (2016), em que: 0 = sem resposta; 1 = resposta leve incluindo pequeno reflexo de retirada, como um leve movimento da cabeça ou um movimento da orelha; 2 = resposta moderada incluindo reflexo de retirada parcial, como rotação parcial da cabeça; e 3 = resposta intensa, incluindo reflexo de retirada completo, como puxão/empurrão brusco ou rotação completa da cabeça associado ao movimento de retirada do corpo.

Durante todas as avaliações (método I, II e III), os animais foram vendados com objetivo de eliminar estímulos visuais e reduzir o estresse, além de serem contidos por uma pessoa deixando a cabeça livre para poder expressar o comportamento de retirada, segundo recomendam McCarthy e colaboradores (2016) (Figura 10).

Figura 10 - Bezerra vendada para redução de estímulos visuais e avaliação do limiar nociceptivo



Fonte: Stanigher (2021)

Após a padronização da técnica no estudo piloto e em função dos resultados obtidos, decidiu-se pelo emprego do método I na avaliação nociceptiva de bezerras filhas de vacas com e sem claudicação submetidas à descorna com ferro quente.

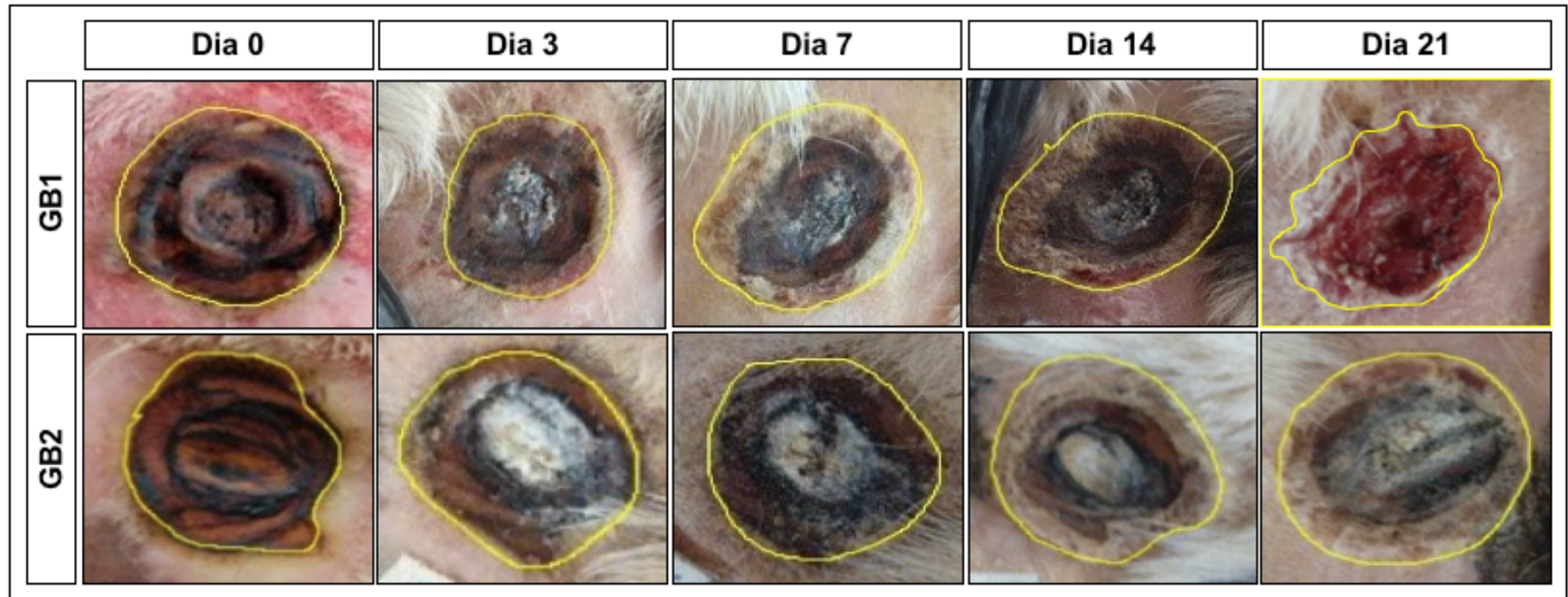
Para este estudo, as bezerras foram avaliadas nos momentos: 24 h antes da descorna, 24 h após a descorna, três, sete, 14 e 21 dias após a descorna (Quadro 3).

5.2.5 Área das lesões

Para a análise da área das lesões (cm^2), foram utilizadas fotografias digitais capturadas por meio de câmera digital disposta a 20 cm aproximadamente da lesão de queimadura de ambos os lados dos cornos (direto e esquerdo), nos momentos: logo após a descorna (dia 0), três, sete, 14 e 21 dias após o procedimento de descorna.

A área da lesão foi determinada por meio da análise das fotografias utilizando-se o software Image J (versão 1.46), de acordo com o preconizado por Barbosa (2016) (Figura 11).

Figura 11 - Exemplo de mensuração da área das lesões de queimadura nos tempos 0, 3, 7, 14 e 21 dias após a descorna utilizando o software Image J



Fonte: Stanigher (2021)

5.2.6 Momentos das análises

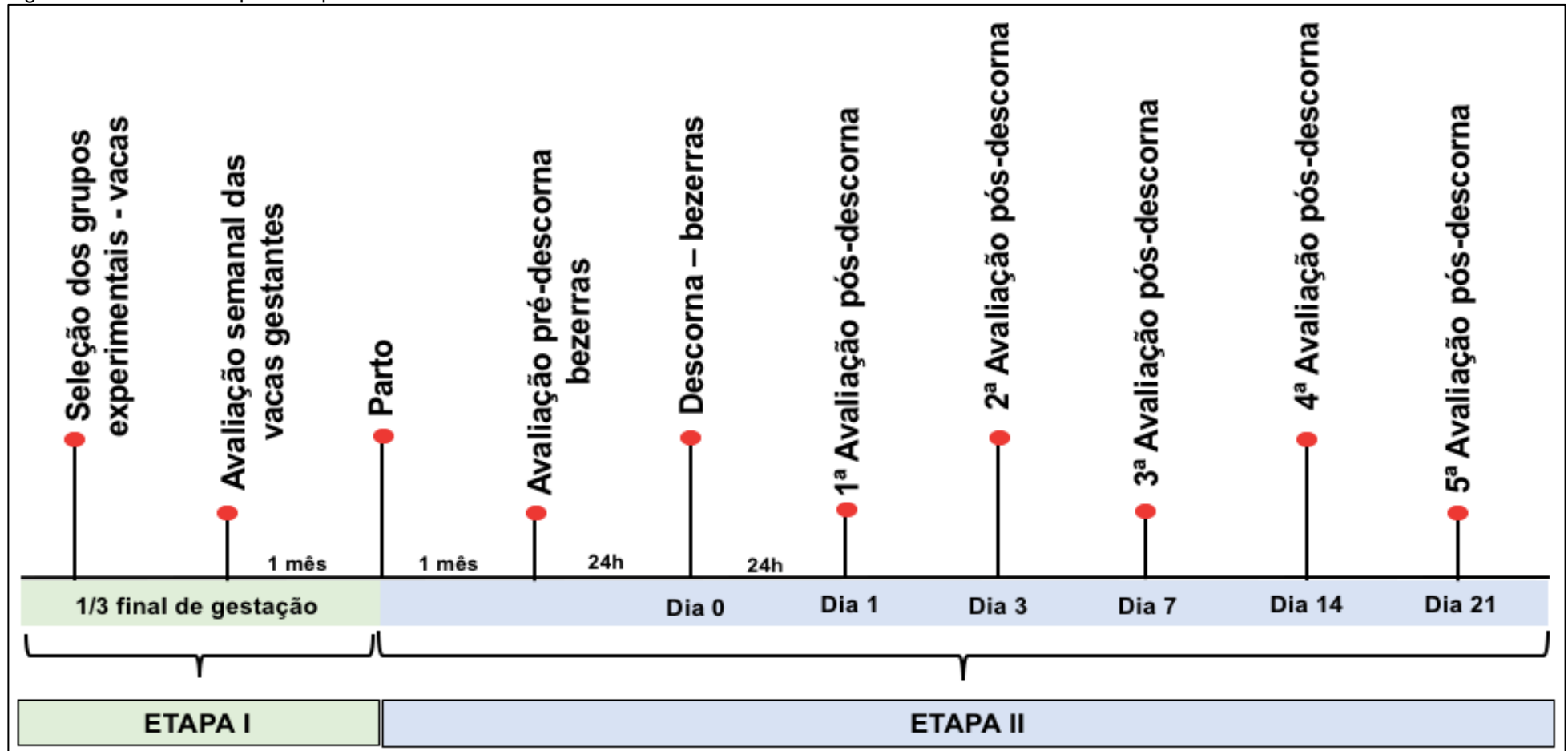
Quadro 3 - Momentos e avaliações realizados nas bezerras

BEZERRAS		
Momentos	Período	Avaliações
M0	24h após o parto	<ul style="list-style-type: none"> • Exame físico • Peso vivo • Altura de cernelha • Cortisol salivar
M1	1 semana de vida	<ul style="list-style-type: none"> • Exame físico
M2	2 semanas de vida	
M3	3 semanas de vida	
M4	4 semanas de vida	
M5	24h antes da descorna	<ul style="list-style-type: none"> • Avaliação do limiar nociceptivo (monofilamentos de von Frey)
M6	30 dias de vida / Imediatamente antes da descorna	<ul style="list-style-type: none"> • Exame físico • Cortisol salivar • Fotografia dos cornos
M7	Logo após a descorna	<ul style="list-style-type: none"> • Fotografia das lesões
M8	24h após a descorna (dia 0)	<ul style="list-style-type: none"> • Exame físico • Cortisol salivar • Avaliação do limiar nociceptivo (monofilamentos de von Frey)
M10	3 dias após a descorna	<ul style="list-style-type: none"> • Exame físico • Cortisol salivar • Avaliação do limiar nociceptivo (monofilamentos de von Frey) • Fotografia das lesões
M11	7 dias após a descorna	
M12	14 dias após a descorna	
M13	21 dias após a descorna	

Fonte: Stanigher (2021)

Para melhor entendimento e visualização de todas as etapas e avaliações realizadas neste trabalho, segue uma linha de tempo explicativa (Figura 12).

Figura 12 - Linha do tempo do experimento



Fonte: Stanigher (2021)

5.3 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para o estudo piloto de padronização da técnica de avaliação do limiar nociceptivo, utilizou-se o software GraphPad Prism (versão 5.0, GraphPad Software, Inc., CA, USA). Os resultados foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguida de pós-teste de Bonferroni para detecção das diferenças das médias. O índice de significância considerado foi de $p < 0,05$.

Para o estudo principal, os resultados foram comparados por meio do programa *Statistical Analyses Systems* (SAS version 9.4; SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA). Inicialmente os dados foram previamente verificados quanto à normalidade dos resíduos através do teste de Shapiro-Wilk. Os dados que não respeitaram a normalidade foram transformados e/ou feita a retirada de *outliers*. Os dados que mesmo após transformação e/ou retirada dos *outliers* não respeitaram as premissas, foram analisados por estatística não paramétrica de ordem, sendo feita a análise através do teste de Kruskal-Wallis (PROC NPAR1WAY). Os dados normais ou transformados foram submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA), seguido da observação de diferenças entre os grupos, quando significativa, pelo teste de Tukey-Kramer (PROC GLIMMIX). Os tratamentos (G1 – vacas com EL ≤ 2 ; G2 – vacas com EL ≥ 3 ; GB1 - bezerras nascidas de mães com EL ≤ 2 ; GB2 - bezerras nascidas de mães com EL ≥ 3) foram comparados em relação ao momento de análise em formato de medidas repetidas no tempo, sendo analisados primeiramente a interação tratamento X momento e, quando a mesma não foi encontrada, foram analisados os efeitos isolados de tratamento e/ou momento. Os dados foram apresentados em forma de média e erro padrão da média. Para todas as comparações foi utilizado o nível de significância estatística de 5% ($p \leq 0,05$), e o nível de tendência estatística de 10% ($0,05 < p < 0,1$).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir serão apresentados os resultados e a discussão. Os dados obtidos neste estudo serão divididos em seções para melhor aproveitamento e entendimento.

6.1 VACAS

6.1.1 Hemograma

Após análise estatística dos hemogramas das vacas em terço final de gestação verificou-se não haver efeito significativo entre os grupos G1 e G2 ($p \geq 0,1$, Tabela 1). Porém mesmo sem ter apresentado diferença foi possível constatar alteração na contagem total de leucócitos do grupo G1 ($16,12 \times 10^3/\mu\text{L}$) e do grupo G2 ($16,04 \times 10^3/\mu\text{L}$) (Figura 13), estando acima do valor de referência empregado ($4,9 - 12,0 \times 10^3/\mu\text{L}$).

Em relação ao eritograma, houve redução dos valores da concentração de hemoglobina em ambos os grupos, 8,17 e 8,09 g/dL para G1 e G2, respectivamente, porém ainda próximos ao valor de referência adotado (8,5 - 12,2 g/dL). Simultaneamente, houve aumento do índice hematimétrico volume corpuscular médio (VCM) para os grupos G1 (53,73 fL) e G2 (54,79 fL) (Figura 17), quando comparados com o valor de referência (38,0 - 50,0 fL), e diminuição do índice hematimétrico concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) do grupo G1 (26,36 %) e do grupo G2 (26,04 %) (Figura 19), quando comparados com o valor de referência (36,0 - 39,0 %). Desta forma, foi possível caracterizar para ambos os grupos, a ocorrência de anemia macrocítica hipocrômica.

Durante a gestação há a ocorrência de anemia fisiológica, sendo este quadro clínico devido ao aumento do volume plasmático circulante que, simultaneamente, não é acompanhado proporcionalmente por aumento das células, reduzindo, portanto, a concentração de hemoglobina, o hematócrito e a concentração de hemácias e, comumente, não há alterações no índice hematimétrico CHCM.

Paiano (2018), caracteriza a anemia fisiológica da gestação como normocítica normocrômica e regenerativa, sendo, portanto, um quadro hematológico diferente do encontrado no presente estudo. O autor avaliou animais durante período entre 20 dias pré-parto até 60 dias pós-parto e constatou ocorrência de anemia em 44% dos animais. No entanto, a maior prevalência de anemia ocorreu no período 60 dias após o parto (18,3%), enquanto no período pré-parto houve maior prevalência (4,8%) com aproximadamente cinco dias pré-parto, não ocorrendo anemia observada no período entre 20 e 5 dias pré-parto. O atual estudo avaliou as vacas aproximadamente quatro semanas antes do parto previsto, portanto, não era esperado anemia com o quadro hematológico descrito para este momento.

O quadro hematológico encontrado nos animais deveria ser investigado prospectivamente, sendo sugestivo, caso ocorresse a evolução com agravamento da anemia, com a ocorrência de tristeza parasitária bovina, um importante diferencial no diagnóstico e uma das principais enfermidades causadoras de lise de hemácias em ruminantes (THRALL, 2004).

Outro ponto a ser considerado é o aumento da contagem total de leucócitos em ambos os grupos. Este achado pode estar relacionado com a infecção pelo vírus da leucose bovina, agente etiológico da Leucose Enzoótica Bovina (LEB), no rebanho estudado uma vez que, como descrito por Bartlett e colaboradores (2020), países como Estados Unidos, Japão, Canadá e Brasil relatam aumento contínuo na prevalência da LEB.

Para se reforçar a suspeita clínica, recomenda-se realizar contagem diferencial de leucócitos para comprovar ocorrência de linfocitose, uma vez que a LEB cursa com quadro clínico hematológico caracterizado por leucocitose por linfocitose, e exame sorológico através de ELISA ou imunodifusão em gel de ágar para o diagnóstico etiológico.

Tabela 1 - Média \pm erro padrão da média dos parâmetros hematológicos avaliados de vacas com $EL \leq 2$ (G1) e vacas com $EL \geq 3$ (G2) quatro semanas antes da data prevista de parto

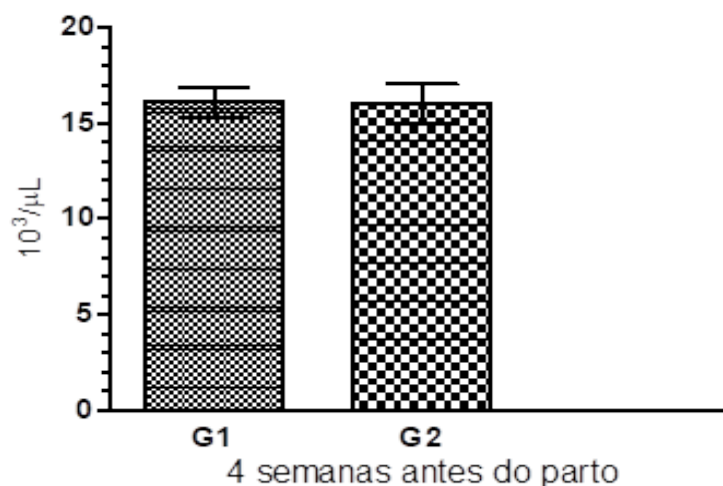
Parâmetros	Grupos		p Valor	V.R.*
	G1	G2		
Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	16,12 \pm 0,77	16,04 \pm 1,05	0,5	4,9 - 12,0
He ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	5,95 \pm 0,14	5,71 \pm 0,1	0,3	5,1 - 7,6
Hb (g/dL)	8,17 \pm 0,1	8,09 \pm 0,11	0,4	8,5 - 12,2
Ht (%)	31,11 \pm 0,34	31,05 \pm 0,42	0,7	22,0 - 33,0
VCM (fL)	53,73 \pm 0,44	54,79 \pm 0,44	0,4	38,0 - 50,0
HCM (pg)	14,11 \pm 0,13	14,2 \pm 0,11	0,6	14,0 - 18,0
CHCM (%)	26,36 \pm 0,12	26,04 \pm 0,1	0,2	36,0 - 39,0

Fonte: Stanigher (2022)

Legenda: He: contagem de hemácias; Hb: concentração de hemoglobina; Ht: hematócrito; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média.

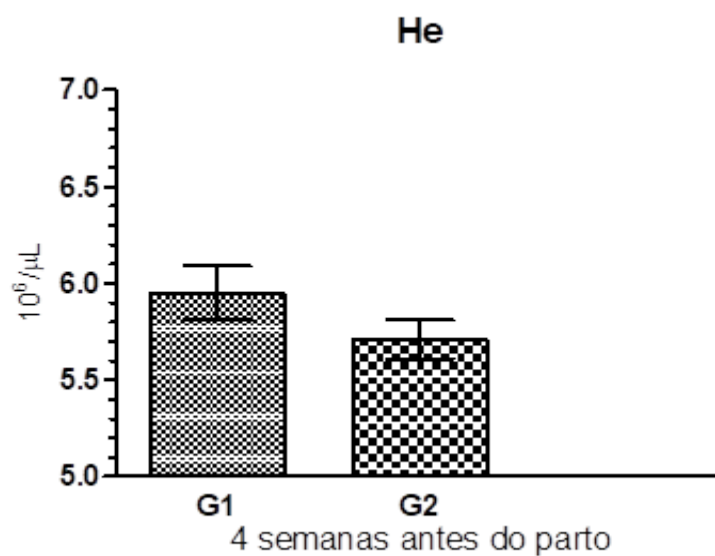
* Valores de referência: CONSTABLE, P.D.; HINCHCLIFF, K.W.; DONE, S.H.; GRÜNBERG, W. (eds.) Veterinary medicine. A textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pig and Goats. 11th ed. Saunders Ltd., 2017.

Figura 13 – Concentração de leucócitos totais ($\times 10^3/\mu\text{L}$) de vacas com $EL \leq 2$ (G1) e de vacas com $EL \geq 3$ (G2), quatro semanas antes da data prevista de parto



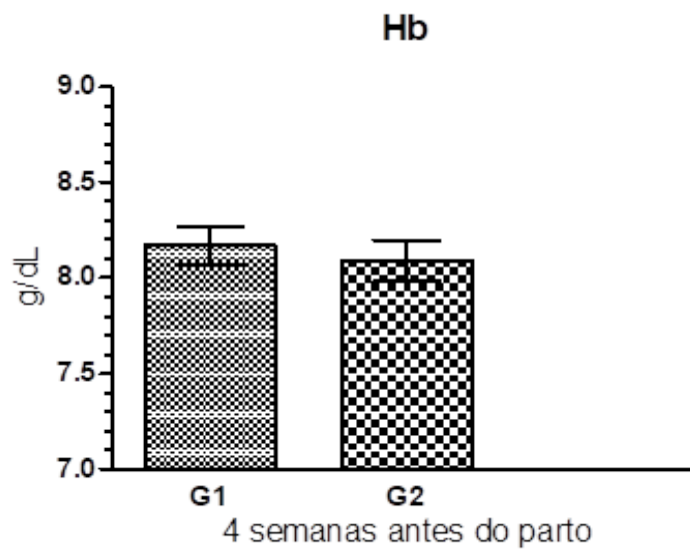
Fonte: Stanigher (2021)

Figura 14 – Concentração de hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$) de vacas com $\text{EL} \leq 2$ (G1) e de vacas com $\text{EL} \geq 3$ (G2), quatro semanas antes da data prevista de parto



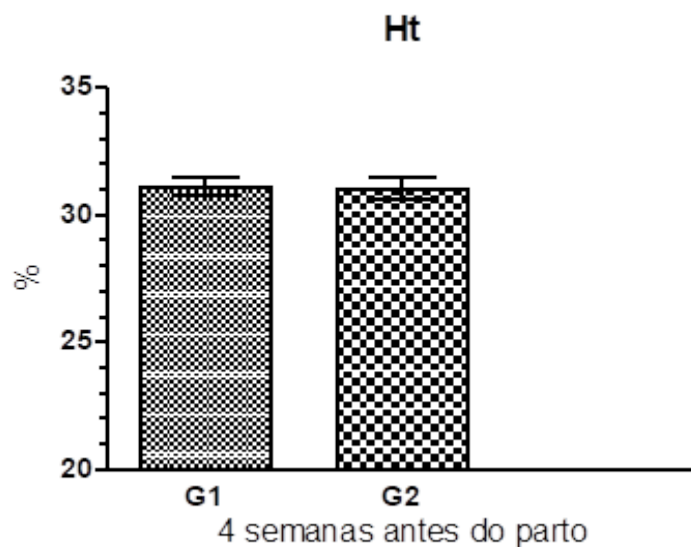
Fonte: Stanigher (2021)

Figura 15 – Concentração de hemoglobina (g/dL) de vacas com $\text{EL} \leq 2$ (G1) e de vacas com $\text{EL} \geq 3$ (G2), quatro semanas antes da data prevista de parto



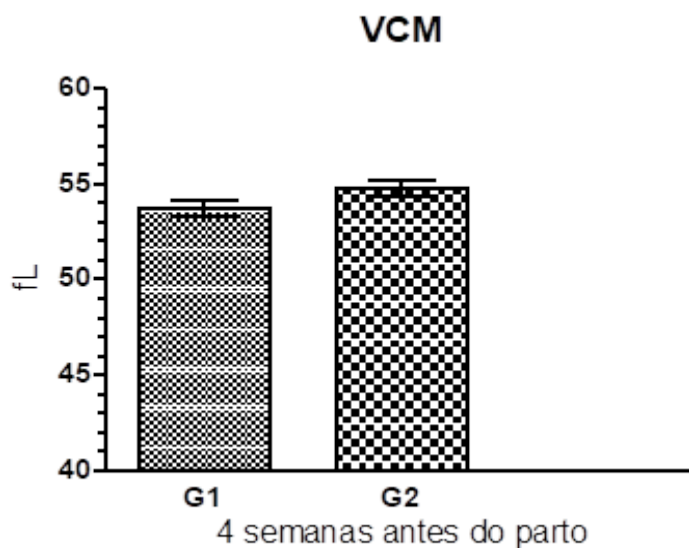
Fonte: Stanigher (2021)

Figura 16 - Hematócrito (%) de vacas com $EL \leq 2$ (G1) e de vacas com $EL \geq 3$ (G2), quatro semanas antes da data prevista de parto



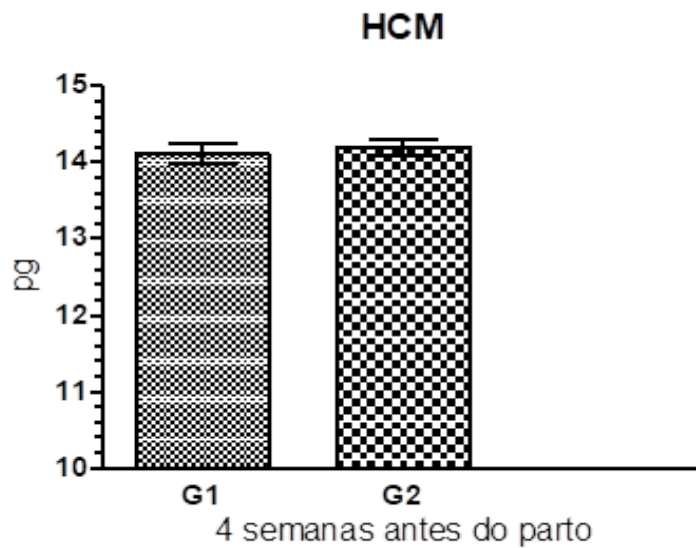
Fonte: Stanigher (2021)

Figura 17 - Volume Corpuscular Médio (fL) de vacas com $EL \leq 2$ (G1) e de vacas com $EL \geq 3$ (G2), quatro semanas antes da data prevista de parto



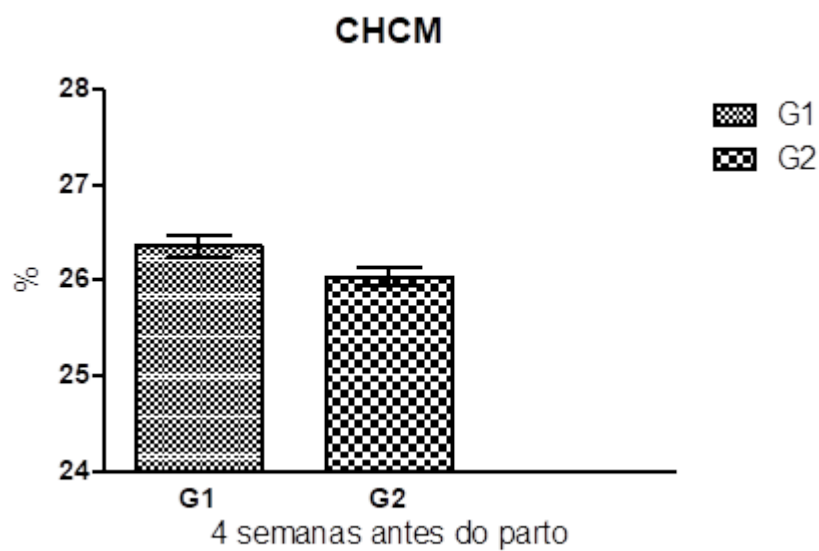
Fonte: Stanigher (2021)

Figura 18 - Hemoglobina Corpuscular Média (pg) de vacas com $EL \leq 2$ (G1) e de vacas com $EL \geq 3$ (G2), quatro semanas antes da data prevista de parto



Fonte: Stanigher (2021)

Figura 19 - Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (pg) de vacas com $EL \leq 2$ (G1) e de vacas com $EL \geq 3$ (G2), quatro semanas antes da data prevista de parto



Fonte: Stanigher (2021)

6.1.2 Cortisol Salivar

Não foram encontradas diferenças entre a concentração de cortisol salivar dos animais do G1 e G2, quatro semanas antes do parto, como demonstrado na Tabela 2. Portanto, através dos resultados encontrados, não se pode considerar o cortisol salivar, no momento e nas condições experimentais propostas, um marcador de estresse crônico nas matrizes e que possivelmente possa influenciar a prole e, portanto, dar suporte e justificar a hipótese proposta neste trabalho.

A coleta de amostras em momentos diferentes e avançados da gestação não foi possível em função do manejo dos animais, que estavam alojados em piquetes, sendo, portanto, necessário a contenção dos mesmos em curral e brete apropriado (Figura 3), bem como pela composição dos grupos com novilhas, animais menos acostumados com o ambiente, manejo e gestação. Portanto, as influências alheias à claudicação seriam potencialmente danosas à acurácia do cortisol salivar ao se coletar as amostras nas condições encontradas.

Os resultados encontrados por Almeida e colaboradores (2008), também não demonstraram diferença nos níveis de cortisol comparando-se vacas com e sem claudicação. Adicionalmente, em estudo realizado com suínos com e sem claudicação, a concentração de cortisol também não foi diferente entre as fêmeas estudadas na pesquisa de Sarmiento et al. (2021).

Estes achados, em conjunto com o atual, demonstram que o cortisol não apresenta ser um biomarcador fidedigno para quantificar a influência da claudicação durante o período gestacional. Além disto, segundo Fischer-Tenhagen e colaboradores (2018), o cortisol não é um bom marcador para estresse causado por claudicação crônica, como a apresentada no presente estudo. Outros estudos demonstram que talvez outros biomarcadores possam ser mais úteis em casos de claudicação em vacas, tais como a desidroepiandrosterona (ALMEIDA et al., 2008), a esterase salivar (CONTRERAS-AGUILAR et al., 2020), citocinas (fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1alfa (IL-1 α), interleucina 13 (IL-13), quimiocina-10 (CXCL10 / IP-10), quimiocina-9 (CXCL9 / MIG), interferon-alfa (IFN- α), interferon-gama (IFN- γ), interleucina-21 (IL-21), interleucina-36ra (IL-36ra), proteína-1 beta

inflamatória de macrófagos (MIP-1 β) (HERZBERG et al., 2020) e haptoglobina (SMITH et al., 2010).

Os mecanismos pelos quais o impacto da dor e inflamação no período pré-natal podem influenciar a prole ainda precisam ser elucidados bem como a metodologia empregada uma vez que a coleta de uma única amostra de saliva, durante o dia, pode reduzir a validade do indicador em função das mudanças circadianas que ocorrem com cortisol no corpo do animal.

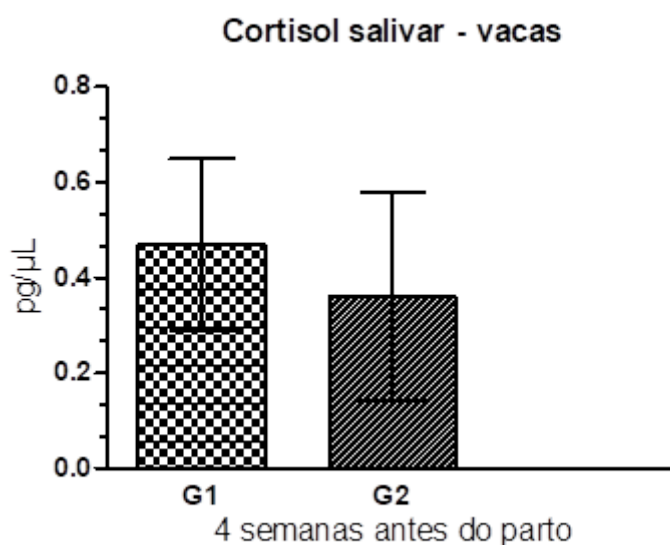
Ressalta-se que o presente estudo buscou averiguar o efeito da claudicação sobre a nocicepção das bezerras frente a um desafio adverso e não a elucidação de mecanismos patogênicos envolvidos, desta forma a mensuração do cortisol salivar das vacas em apenas um momento não contribuiu para estabelecer inter-relações com os possíveis resultados, sendo esta metodologia insatisfatória devido às limitações encontradas nas coletas das amostras.

Tabela 2 - Média \pm erro padrão da média da concentração de cortisol salivar de vacas com EL \leq 2 (G1) e de vacas com EL \geq 3 (G2), quatro semanas antes da data prevista de parto

Grupos	G1	G2	Média	p Valor
Cortisol salivar (pg/ μ L)	0,47 \pm 0,18	0,36 \pm 0,22	0,43 \pm 0,14	0,2

Fonte: Stanigher (2021)

Figura 20 - Concentração de cortisol salivar (pg/ μ L) de vacas com EL \leq 2 (G1) e de vacas com EL \geq 3 (G2), quatro semanas antes do parto



Fonte: Stanigher (2021)

6.2 BEZERRAS

É de suma importância ressaltar que todos os dados apresentados a seguir foram coletados e analisados às cegas, ou seja, de forma que o pesquisador não sabia a qual grupo experimental cada bezerra pertencia.

6.2.1 - Peso e altura de cernelha

Os resultados obtidos através da mensuração do peso das bezerras demonstram que em média, os animais do grupo GB2 ao nascimento (47,14 kg) são 3,49 kg mais pesados quando comparados com os animais do GB1 (43,65 kg), ou seja, 7,99% mais pesados (Tabela 3 e Figura 21). Em relação à altura da cernelha, em média, as bezerras do GB2 ao nascimento (77,71 cm) são 1,46 cm mais altas quando comparadas com as bezerras do GB1 (76,25 cm), ou seja, 1,91% mais altas (Tabela 3 e Figura 23).

Ao analisarmos os dados por categoria de fêmeas (matrizes multíparas X matrizes primíparas) podemos observar que as bezerras nascidas de vacas multíparas do grupo GB2 (47,18 kg) são 4,4 kg mais pesadas quando comparadas com as bezerras do GB1 (42,78 kg), ou seja, 10,28% mais pesadas (Tabela 4 e Figura 22, além das bezerras do grupo GB2 (77,64 cm) serem 1,2 cm mais altas quando comparadas as do GB1 ao nascimento (76,44 cm), ou seja, 1,56% mais altas (Tabela 4 e Figura 24).

E ao analisarmos os dados das bezerras nascidas de vacas primíparas, podemos observar que bezerras nascidas de vacas primíparas do grupo GB2 (47 kg) são 2,64 kg mais pesadas quando comparadas as bezerras do GB1 (44,36 kg), ou seja, 5,95 % de diferença de peso entre as bezerras. Em relação à altura de cernelha, as bezerras do grupo GB2 (78 cm) são 1,91 cm mais altas quando comparadas com as bezerras do grupo GB1 (76,09), ou seja, 2,51 % mais altas (Tabela 4 e Figuras 22 e 24).

Comparando-se nos mesmos grupos o peso entre bezerras filhas de vacas multíparas (42,78 kg, GB1; 47,12 kg, GB2) e primíparas (44,36 kg GB1; 47 kg, GB2),

e a altura de cernelha de multíparas (76,44, GB1; 77,64 GB2) e primíparas (76,09, GB1; 78,0 GB2), temos que bezerras filhas de primíparas no GB1 são mais pesadas, em média (1,58 kg, 3,69%) porém mais baixas (-0,35 cm, 0,45%). Para o GB2, a ocorrência inverte-se para o peso, com bezerras filhas de multíparas mais pesadas (0,18 kg, 0,38%) porém também são mais altas (0,36 cm, 0,46%) (Tabela 4).

A ocorrência de diferentes pesos e tamanhos poderia refletir na ocorrência de distocias durante o parto de animais maiores e mais pesados, no entanto, somente dois animais ($2/34 = 5,88\%$) e ambas filhas de primíparas ($EL \leq 2$; G1), portanto pertencentes ao GB1, necessitaram de rápido auxílio obstétrico durante o parto, porém não demandando intervenção grave ou gerando quadros clínicos adversos nas bezerras após o parto.

Considerando-se efeitos adversos sobre as dimensões das proles, Tao et al. (2012), estudando o peso ao nascimento e a altura de cernelha de bezerras nascidas de mães que passaram por estresse térmico gestacional, observou que as bezerras nascidas de mães estressadas apresentaram peso e altura de cernelha ao nascimento reduzidos em comparação com animais sem o mesmo estresse, ou seja, eram mais leves e menores.

De uma forma geral, a claudicação apresentada pelas vacas durante a gestação não interferiu negativamente no desenvolvimento corporal das bezerras, uma vez que os animais do grupo GB2 apresentaram-se mais pesados e mais altos ao nascimento quando comparados com o grupo GB1 e que esta diferença não determinou complicações obstétricas significativas. No entanto não se pode atribuir, unicamente, efeito isolado das maiores dimensões dos animais do GB2 devido à presença de claudicação nas matrizes uma vez que efeitos, principalmente, do touro e das vacas também precisariam ser considerados nesta análise.

Tabela 3 – Valores individuais, média e erro padrão da média (EPM) do peso e da altura de cernelha após o nascimento das bezerras filhas de vacas com EL ≤ 2 (GB1) e de vacas com EL ≥ 3 (GB2)

N	GB1		N	GB2	
	Peso (kg)	Altura de cernelha (cm)		Peso (kg)	Altura de cernelha (cm)
1	38	76	1	37	78
2	48	79	2	40	76
3	40	77	3	50	79
4	52	79	4	50	80
5	39	76	5	52	80
6	37	73	6	42	76
7	39	78	7	40	78
8	40	78	8	57	79
9	52	72	9	53	81
10	40	77	10	45	69
11	50	80	11	53	78
12	43	78	12	50	77
13	47	78	13	52	80
14	42	77	14	39	77
15	42	72	-	-	-
16	40	72	-	-	-
17	47	80	-	-	-
18	40	76	-	-	-
19	48	77	-	-	-
20	49	70	-	-	-
Média	43,65	76,25	Média	47,14	77,71
EPM	1,10	0,65	EPM	1,72	0,79

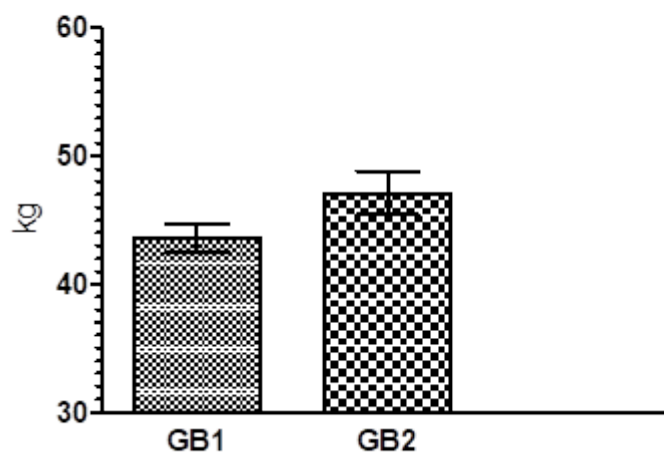
Fonte: Stanigher (2021)

Tabela 4 – Média ± erro padrão da média do peso e da altura de cernelha de bezerras, 24 h após o nascimento, de acordo com as vacas matrizes (multíparas e primíparas) e de acordo com o grupo GB1 (EL ≤ 2) e GB2 (EL ≥ 3)

Parâmetros (24 h após o nascimento)	Peso (kg)		Altura de cernelha (cm)	
	GB1 (N=20)	GB2 (N=14)	GB1 (N=20)	GB2 (N=14)
Grupos				
Vacas				
Multíparas	42,78 ± 2,03 (N=9)	47,18 ± 2,0 (N=11)	76,44 ± 0,84 (N=9)	77,64 ± 0,98 (N=11)
Primíparas	44,36 ± 1,17 (N=11)	47,0 ± 4,04 (N=3)	76,09 ± 1,0 (N=11)	78,0 ± 1,0 (N=3)
Total	43,65 ± 1,10	47,14 ± 1,72	76,25 ± 0,65	77,91 ± 0,79

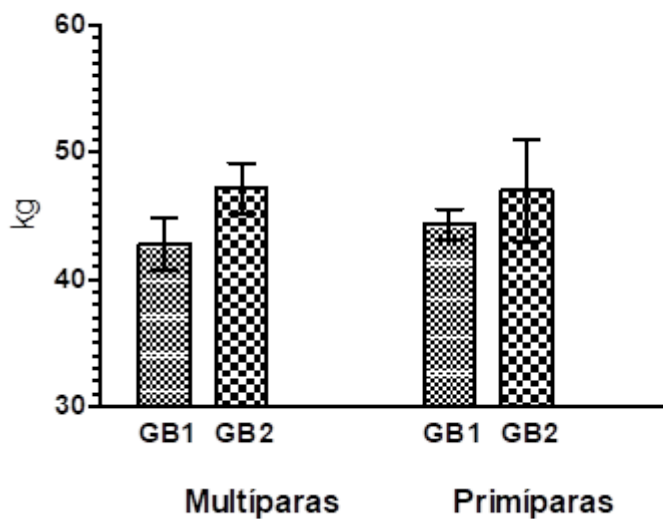
Fonte: Stanigher (2022)

Figura 21 – Peso (kg) de bezerras filhas de vacas com $EL \leq 2$ (GB1) e filhas de vacas com $EL \geq 3$ (GB2), 24 h após o nascimento



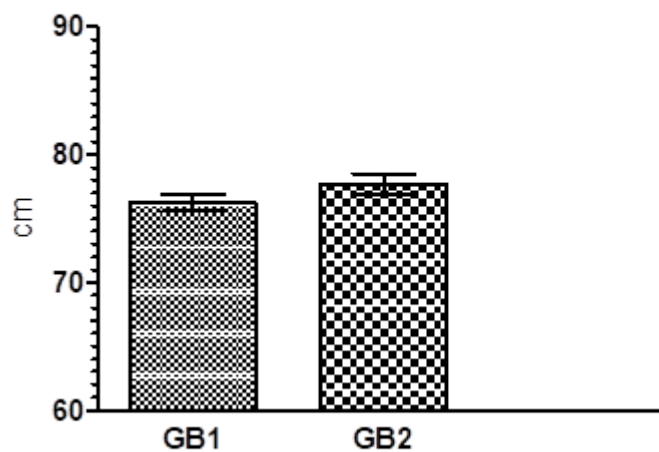
Fonte: Stanigher (2021)

Figura 22 – Peso (kg) de bezerras filhas de vacas múltiparas e primíparas com $EL \leq 2$ (GB1) e com $EL \geq 3$ (GB2), 24 h após o nascimento



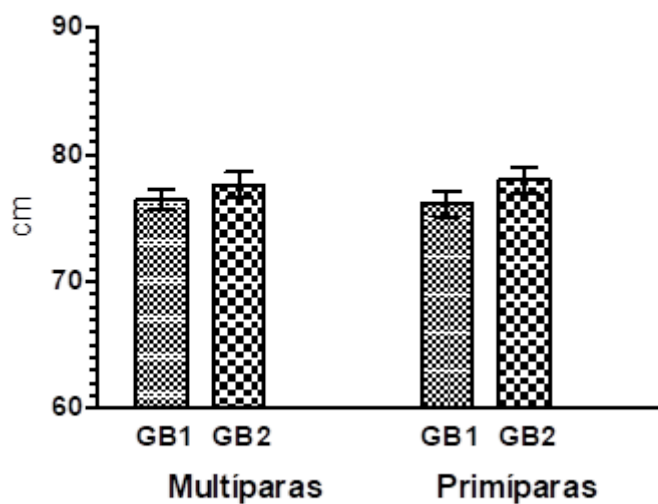
Fonte: Stanigher (2021)

Figura 23 – Altura de cernelha (cm) de bezerras filhas de vacas com $EL \leq 2$ (GB1) e filhas de vacas com $EL \geq 3$ (GB2), 24 h após o nascimento



Fonte: Stanigher (2021)

Figura 24 – Altura de cernelha (cm) de bezerras filhas de vacas múltiparas e primíparas com $EL \leq 2$ (GB1) e com $EL \geq 3$ (GB2), 24 h após o nascimento



Fonte: Stanigher (2021)

6.2.1 Cortisol Salivar

Os resultados de cortisol salivar obtidos demonstram que houve diferença ($p = 0,03$) entre os grupos GB1 e GB2 apenas no momento basal de coleta, ou seja, antes do processo de descorna. Porém, mesmo sem diferença estatística, para analisarmos se houve diferença entre os momentos basal e 24 horas após a descorna, podemos calcular a razão entre esses momentos para ambos os grupos.

Temos que para o GB1 a razão é de 0,67 e para o GB2 a razão é de 0,25, demonstrando assim que o cortisol depois da descorna foi maior para o grupo GB2. Este dado é interessante uma vez que demonstra que após o desafio da descorna, o grupo GB2 apresentou resposta mais exacerbada, ou seja, numericamente os níveis de cortisol salivar foram maiores quando comparados com o GB1.

Isto pode ser associado ao fato de que o eixo HPA das bezerras do GB2 possa ter sido influenciado durante a gestação pelo estresse da claudicação sofrido pelas mães e esteja modulando as respostas destas bezerras frente a um desafio doloroso como é a descorna.

Em um estudo realizado por Neave e colaboradores (2013), os quais estudaram o viés cognitivo associado a dor do processo de descorna em bezerros, afirmam que a dor sentida pelas bezerras após um procedimento de descorna por ferro quente causa viés cognitivo negativo, o qual resulta em mudanças negativas no estado emocional.

Desta forma, as bezerras pertencentes ao grupo GB2 deste experimento podem ter passado por este viés cognitivo pessimista pós descorna e, somado a este fato, por terem nascido de mães que sofreram estresse durante a gestação, portanto, seria, provavelmente, este conjunto a causa pela qual os valores de cortisol do GB2 estarem maiores que os valores do GB1 no mesmo momento pós descorna.

Tabela 5 - Média \pm erro padrão da média da concentração de cortisol salivar (pg/L) de bezerras filhas de vacas com $EL \leq 2$ (GB1) e filhas de vacas com $EL \geq 3$ (GB2) nos diferentes momentos de análise

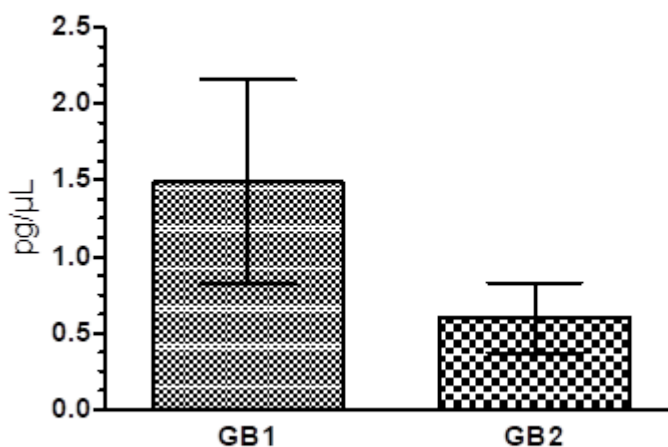
Grupos		GB1	GB2	<i>p</i> Valor
Momentos		(pg/ μ L)	(pg/ μ L)	
Nascimento		1,49 \pm 0,67 ^a	0,6 \pm 0,23 ^a	0,5
Descorna	Basal	0,7 \pm 0,18 ^{Aab}	0,15 \pm 0,04 ^{Bb}	0,03
	24 h	1,11 \pm 0,39 ^a	0,6 \pm 0,17 ^{ab}	0,7
	3 d	0,48 \pm 0,12 ^{ab}	1,26 \pm 0,84 ^{abc}	0,5
	7 d	0,45 \pm 0,25 ^{bc}	0,34 \pm 0,11 ^{abc}	0,8
	14 d	0,15 \pm 0,03 ^c	0,22 \pm 0,06 ^{bc}	0,3
	21 d	0,2 \pm 0,08 ^c	0,19 \pm 0,08 ^c	0,8
Média		0,64 \pm 0,12	0,49 \pm 0,13	-
<i>p</i> Valor		0,0004	0,05	-

Fonte: Stanigher (2021)

Legenda: ^{A, B} Letras sobrescritas maiúsculas indicam diferença estatística na linha pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$).

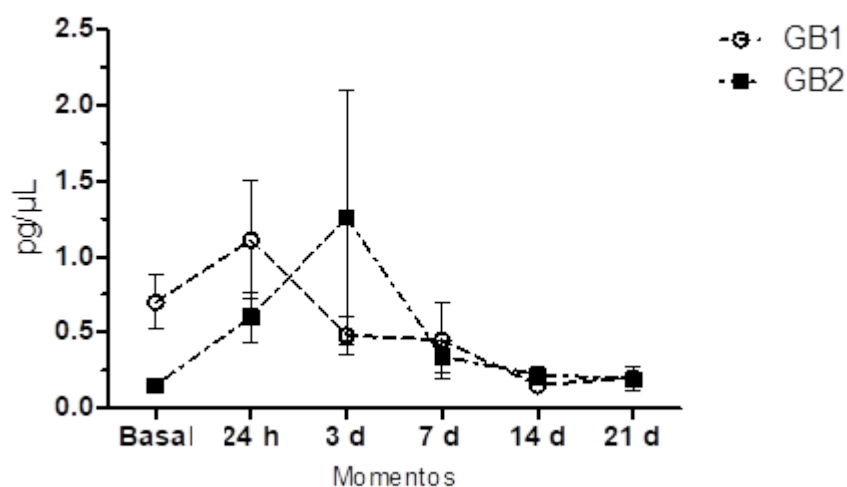
^{a, b, c} Letras sobrescritas minúsculas indicam diferença estatística na coluna pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$).

Figura 25 - Concentração de cortisol salivar (pg/ μ L) de bezerras filhas de vacas com $EL \leq 2$ (GB1) e filhas de vacas com $EL \geq 3$ (GB2), 24 h após o nascimento



Fonte: Stanigher (2021)

Figura 26 - Concentração de cortisol salivar (pg/ μ L) de bezerras filhas de vacas com EL \leq 2 (GB1) e filhas de vacas com EL \geq 3 (GB2), nos diferentes momentos de análise antes e após a descorna



Fonte: Stanigher (2021)

6.2.3 Área das Lesões

Ao analisar os dados da área das lesões de queimadura, pode-se observar que não houve efeito significativo de interação entre os grupos GB1 e GB2, e nem momentos ($p = 0,22$), assim como não houve efeito de tratamento ($p = 0,21$), entretanto houve efeito de momento ($p < 0,0001$) como mostra a Tabela 6.

A cicatrização de lesões é um processo complexo, no qual várias respostas locais e sistêmicas são envolvidas e é regulada por diferentes fatores celulares. O processo de reparação tecidual é composto por três principais fases sobrepostas: fase inflamatória (duração aproximada: 4 a 6 dias), fase de formação do tecido de granulação (duração aproximada: 7 a 20 dias) e fase de remodelamento (duração aproximada: 21 dias a 2 anos).

Desta forma, observa-se que mesmo não tendo apresentado diferença estatística, numericamente houve uma diminuição do tamanho da lesão do sétimo dia para o 21º dia após a descorna por ferro quente nas bezerras do grupo GB2 mais acentuada quando comparada com a área das bezerras do GB1, ou seja, foi possível observar uma melhor evolução da cicatrização da ferida a partir da fase de granulação.

No entanto no 14º dia é possível observar nos dois grupos, valores da área da lesão discrepantes dos outros momentos (Figura 28), justificado pela formação de

uma crosta necrótica aderida ao centro da lesão, a qual impede a real mensuração do tamanho da área da lesão, assim como encontrado também por Barbosa (2016).

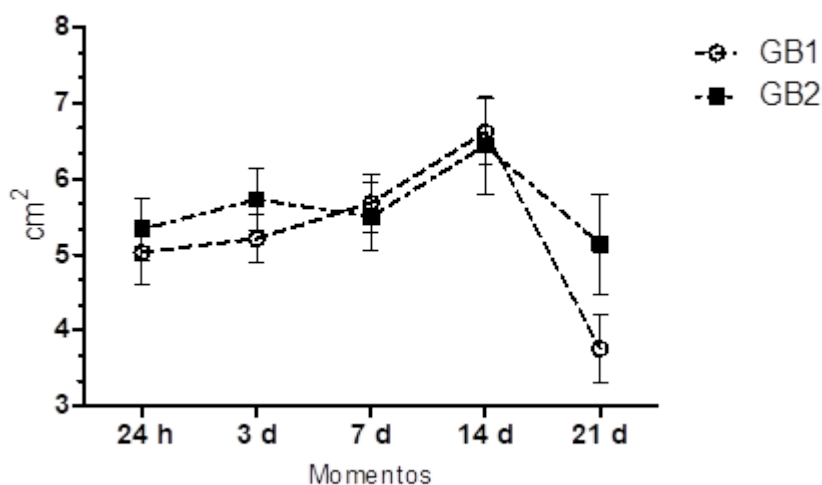
Tabela 6 - Média \pm erro padrão da média da área da lesão (cm²) de bezerras filhas de vacas com EL \leq 2 (GB1) e filhas de vacas com EL \geq 3 (GB2) nos diferentes momentos de análise

Momentos	Grupos		Efeitos		
	GB1 (cm ²)	GB2 (cm ²)	Grupos	Momentos	Grupos*Momentos
24h	5,03 \pm 0,41	5,33 \pm 0,32			
3 d	5,21 \pm 0,32	5,73 \pm 0,42			
7 d	5,68 \pm 0,38	5,5 \pm 0,45			
14 d	6,62 \pm 0,44	6,44 \pm 0,64	0,21	<0,0001	0,22
21 d	3,76 \pm 0,46	5,14 \pm 0,66			
Média	5,28 \pm 0,2	5,62 \pm 0,23			

Fonte: Stanigher (2021)

Legenda: ^{A, B, C} letras maiúsculas sobrescritas indicam diferença estatística na coluna segundo o teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

Figura 27 - Área da lesão de queimadura das bezerras dos grupos GB1 e GB2 nos diferentes tempos de análise após a descorna



Fonte: Stanigher (2021)

6.2.4 Limiar Nociceptivo

6.2.4.1 Estudo Piloto

Por meio da realização das avaliações nociceptivas, foi possível observar que na região 2 (Figura 27) os animais apresentavam sensibilidade diminuída quando comparada com a região 1, em todos os momentos avaliados. Desta forma, todas as avaliações foram padronizadas para serem realizadas na região 1.

Os resultados obtidos demonstraram diminuição do limiar nociceptivo dos animais em todos os tempos avaliados por meio dos monofilamentos de von Frey no momento após a descorna (Tabela 7 e Figura 28). A alteração da sensibilidade dolorosa foi significativa na região da pele (Figura 28A) após 24h em ambos os lados e manteve-se mesmo após 15 dias da descorna quando comparados à média basal, realizada antes da descorna. Por outro lado, não houve alteração da sensibilidade na região do corno (Figura 28B) em nenhum dos tempos avaliados. Ainda, observa-se que a alteração da sensibilidade ocorreu em ambos os lados (direito e esquerdo).

Figura 28 – Regiões das avaliações nociceptivas



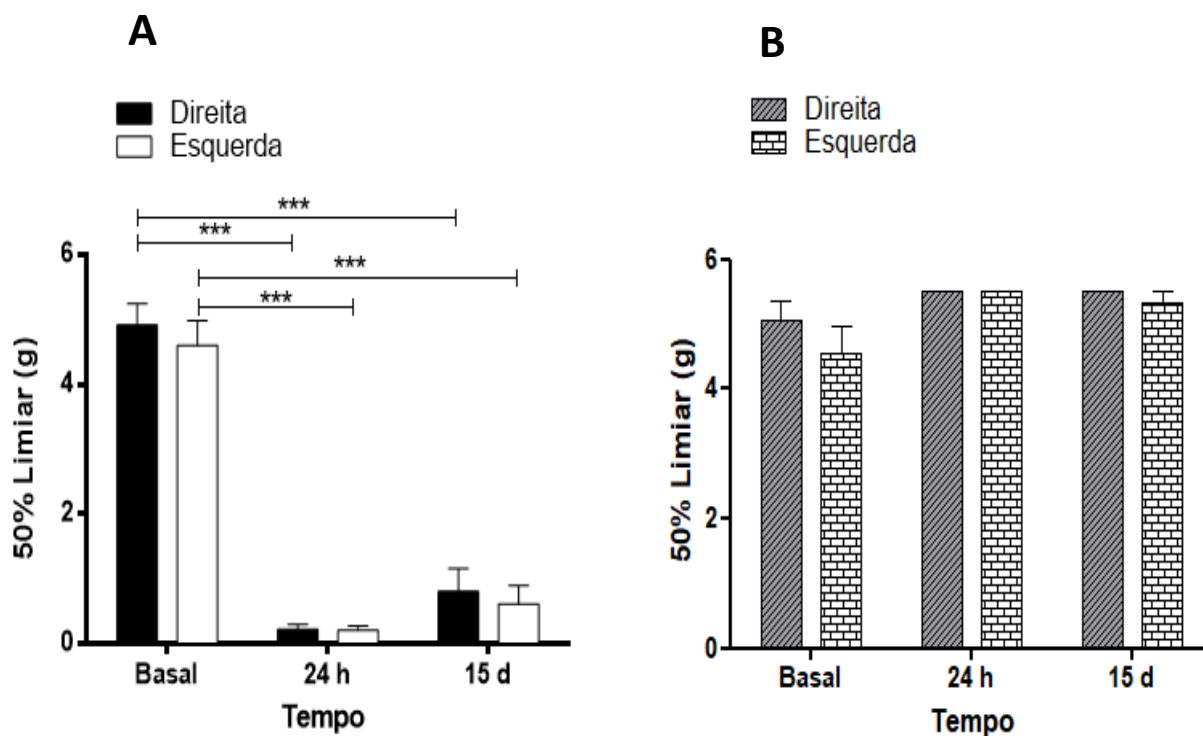
Fonte: Stanigher (2021)

Tabela 7 – Média \pm erro padrão da média da sensibilidade (g) avaliada por filamentos de von Frey na região da pele adjacente ao broto cornual, antes e após a descorna

Antes (N=25) (g)	24 h (N=25)		15 d (N=21)	
	Direito (g)	Esquerdo (g)	Direito (g)	Esquerdo (g)
4,91 \pm 0,32 (p < 0,17)	0,21 \pm 0,07 (p < 0,001)	0,20 \pm 0,06 (p < 0,001)	0,80 \pm 0,35 (p < 0,001)	0,61 \pm 0,28 (p < 0,001)

Fonte: Stanigher (2022)

Figura 29 – Média \pm erro padrão da média da sensibilidade (g) avaliada por meio de filamentos de von Frey em bezerras na região da pele (A) e no corno (B) nos momentos antes (basal) e após (24h e 15 dias) a descorna



Fonte: Stanigher (2022)

Legenda: média \pm epm dos animais por grupo. *** $p < 0,001$ em comparação com a medida basal (ANOVA de duas vias, seguido de pós teste de Bonferroni).

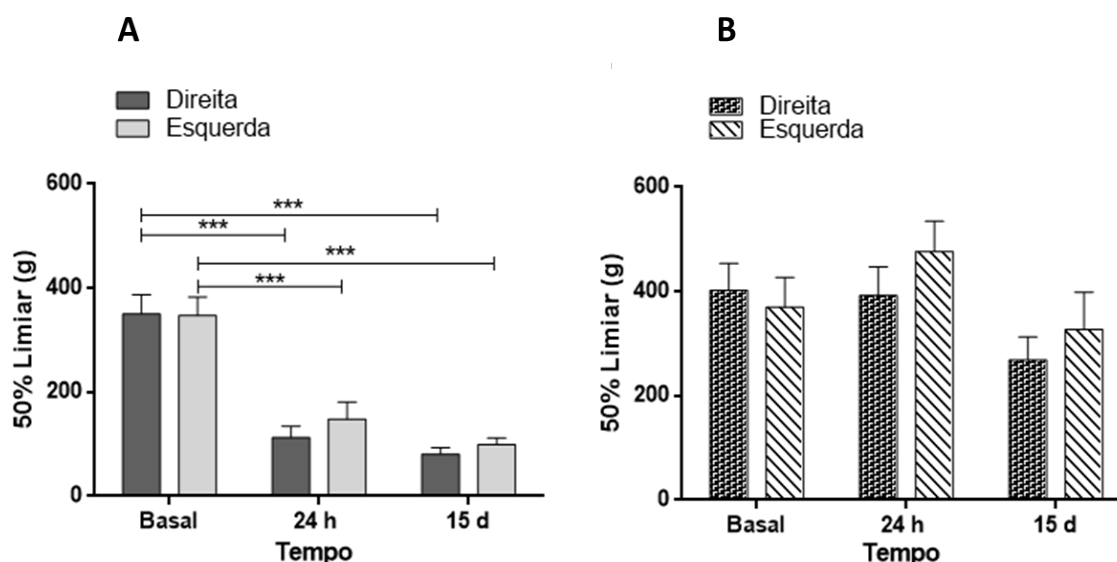
Resultado semelhante pode ser observado na figura 29 e tabela 8, onde a sensibilidade dos animais submetidos ao mesmo processo de descorna foi avaliada através da pressão com técnica utilizando-se o analgesímetro (von Frey) digital. Observou-se alteração nociceptiva também na região da pele (Figura 30A) após 24h da descorna, a qual também se manteve após 15 dias em comparação à medida basal, mas não na região do corno (Figura 30B).

Tabela 8 – Média \pm erro padrão da média da sensibilidade (g) avaliada pelo analgesímetro (von Frey) digital de acordo com os momentos na região da pele adjacente ao broto cornual nos momentos antes (basal) e após (24h e 15 dias) a descorna

Antes (g) (N=25) (g)	24 h (N=25)		15 d (N=21)	
	Direito (g)	Esquerdo (g)	Direito (g)	Esquerdo (g)
350,21 \pm 37,08	112,92 \pm 22,01	148,06 \pm 32,94	80,62 \pm 12,67	99,05 \pm 12,69
(p > 0,99)	(p < 0,001)		(p < 0,001)	

Fonte: Stanigher (2022)

Figura 30 – Média \pm erro padrão da média da sensibilidade (g) avaliada por meio de analgesímetro (von Frey) digital em bezerras na região da pele (A) e no corno (B) antes (basal) e após (24h e 15 dias) a descorna



Fonte: Stanigher (2022)

Legenda: média \pm e.p.m dos animais por grupo. ***p<0,001 em comparação com a medida basal (ANOVA de duas vias, seguido de pós teste de Bonferroni).

No terceiro método, utilizado para a avaliação da sensibilidade baseada no escore de 0 a 3 (Figura 30), foi possível observar que o filamento de 300 g (p= 0,0027, n=25) provocou um efeito nociceptivo superior ao de 60g (p= 0,0808, n=25).

Na região da pele (Figura 30A e B), 24h após a descorna prevalece o escore 3, retirada da cabeça do animal em ambos os lados.

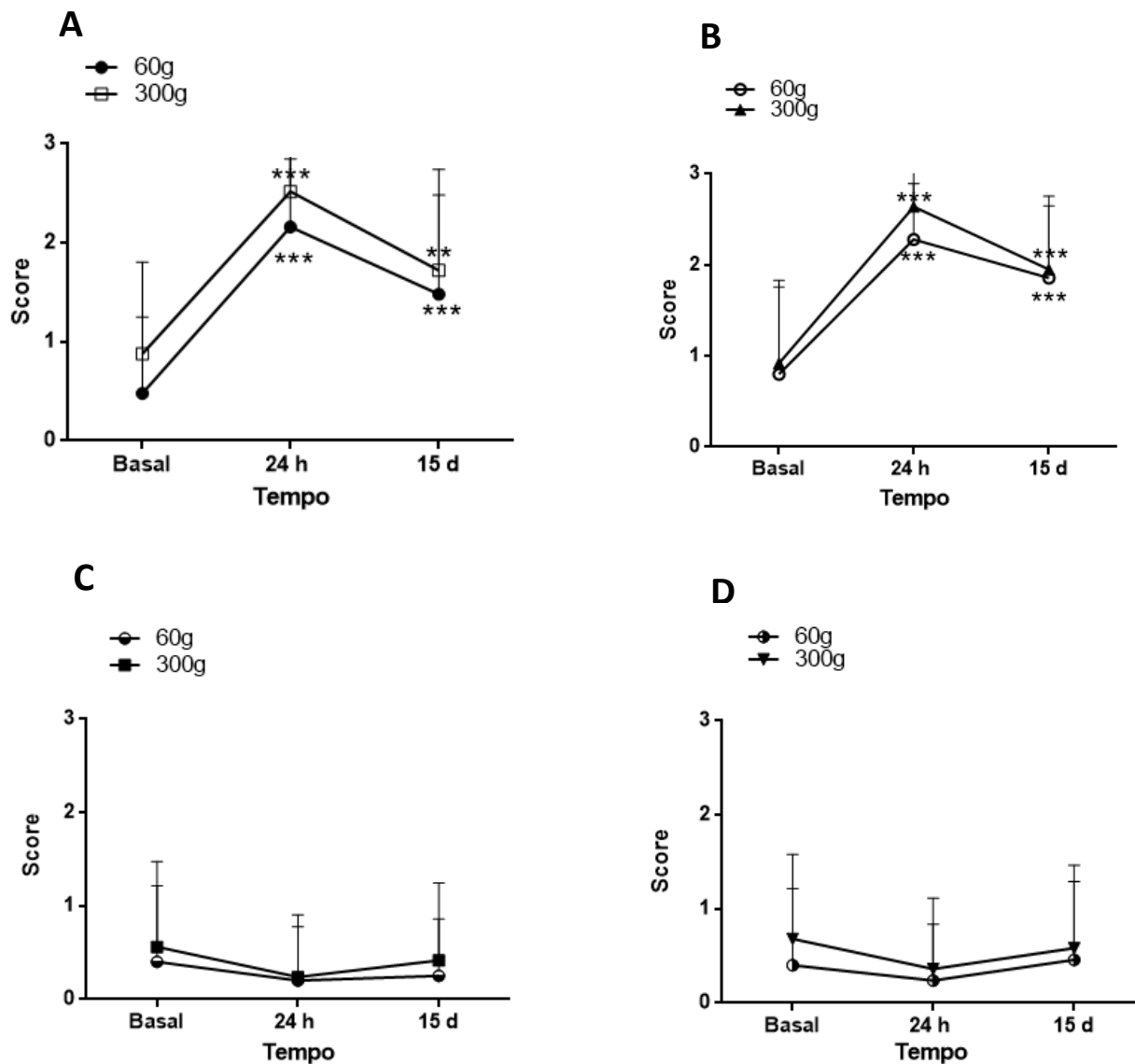
Quando analisados os experimentos e comparando suas respectivas porcentagens, foi possível a obtenção dos seguintes resultados, após 24 h da

descorna houve aumento de 450% e 286% - lado direito e 285% e 286% - lado esquerdo, respectivamente, frente aos monofilamentos de von Frey de 60g e 300g na pele quando comparados às medidas basais. Enquanto após 15 dias do procedimento o escore nociceptivo é reduzido para 2, significando que houve melhora da lesão de acordo com a metodologia empregada.

Houve uma redução de 68% e 82% - lado direito e 68% e 74% - lado esquerdo, respectivamente, frente aos estímulos produzidos pelos monofilamentos de von Frey com gramatura de 60g e 300g aplicados na região da pele, comparando as respostas de 24h com 15 dias após a descorna.

Quando aplicado o estímulo na região do corno em ambos os lados, os animais apresentaram escore 0 e não houve alteração significativa após a descorna em nenhum dos tempos avaliados (Figura 30 C e D). Em todos os pontos avaliados a medida basal, isto é, antes da descorna, apresentou escore 1.

Figura 31 - Média \pm erro padrão da média da sensibilidade (g) por meio de escore nociceptivo em bezerros na região da pele (A - lado direito) e (B - lado esquerdo) e no corno (C - lado direito) e (D - lado esquerdo) nos momentos antes (basal) e após (24h e 15 dias) a descorna



Fonte: Stanigher (2022)

Legenda: média \pm e.p.m dos animais por grupo. *** $p < 0,001$ em comparação com a medida basal (ANOVA de duas vias, seguido de pós teste de Bonferroni).

O principal objetivo do estudo piloto foi a padronização por meio da validação de técnicas de avaliação de limiar nociceptivo em bezerros buscando o método que seja mais preciso e fidedigno, porém de fácil aplicação em situações de pesquisas a campo.

Os resultados obtidos demonstram que, independentemente da metodologia utilizada, todos os testes foram eficazes e apontaram que a descorna em bezerros é um procedimento doloroso, causando aumento de sensibilidade por até 15 dias após a descorna. Porém a aplicabilidade e praticidade em situação de pesquisa em campo destes testes não foi o mesmo.

Na avaliação do limiar de dor por pressão utilizando o analgesímetro digital, os limiares mensurados nos bezerros não apresentaram valores estáveis ao longo do tempo fazendo-se necessário a realização de três mensurações consecutivas para obter-se uma média. Desta forma poder-se-ia questionar a confiabilidade e repetibilidade dos valores apresentados (CASONI et al., 2019).

A avaliação sensorial quantitativa da dor, na qual foram dadas pontuações às respostas comportamentais dos bezerros após a estimulação mecânica com monofilamentos de von Frey, mostrou-se ser de pouca aplicabilidade e repetibilidade em situações de pesquisas a campo, pois é baseada em comportamentos que nem sempre os bezerros expressam da mesma maneira e o avaliador pode não interpretar de tal forma, assim sendo subjetivo e questionável o seu uso.

Entretanto, a avaliação mecânica quantitativa de alodinia, na qual o limiar de retirada da cabeça do bezerro foi determinado pelo aumento ou diminuição sequencial da força empregada, demonstrou aplicabilidade e repetibilidade adequada para pesquisas a campo pois baseia-se em um comportamento dicotômico de retirada de cabeça, sem necessidade de pontuar a intensidade de tal comportamento, reduzindo, desta forma, a subjetividade do teste.

Como demonstrado em todos os métodos realizados, os animais demonstraram ter pouca ou nenhuma sensibilidade nociceptiva antes e após o procedimento de descorna no local correspondente ao broto cornual. Isto deve-se ao fato desta região ser formada em grande parte por queratina e de o ferro quente utilizado para realizar o procedimento de descorna causar queimadura de terceiro grau no local, danificando as pequenas terminações nervosas locais e dessensibilizando a região (BARBOSA, 2016; CASONI et al., 2019).

Através dos resultados foi possível concluir que, apesar de todos os métodos terem sido eficazes para avaliar a sensibilidade após o procedimento de descorna nos bezerras, houve melhor empregabilidade e repetibilidade ao se utilizar a metodologia descrita por Chaplan et al., (1994) com os monofilamentos de von Frey. Portanto, este método foi considerado o mais eficiente para avaliação da dor aguda em bezerras descornadas e, portanto, empregado no estudo principal.

6.4.2.2 Estudo Principal

No atinente à resposta nociceptiva das bezerras após a descorna, os resultados obtidos por meio da análise do limiar nociceptivo da pele, comparando-se as médias dos grupos, demonstraram ocorrer diferença entre os grupos GB1 (bezerras nascidas de vacas com $EL \leq 2$) e GB2 (bezerras nascidas de vacas com $EL \geq 3$) (Tabela 9 e Figura 32) com redução do limiar nociceptivo da pele de bezerras pertencentes ao GB2, demonstrando uma influência negativa que a claudicação pode exercer na vida extra-uterina da prole.

Observa-se que nos momentos basal, 24 h, e três dias, mesmo não apresentando diferença estatística, os valores numéricos do limiar nociceptivo do grupo GB2 são superiores quando comparados ao GB1. Porém, a partir do sétimo dia após o procedimento de descorna, assim como no 21º dia, as bezerras do grupo GB1 apresentaram diferença, com valores maiores do limiar nociceptivo quando comparadas com as bezerras do GB2. Observa-se também que no 14º dia após a descorna, o grupo GB1 apresentou tendência estatística ($0,05 < p < 0,1$) a maior valor do limiar nociceptivo quando comparado com o valor do GB2.

Com estes achados podemos constatar que a partir do sétimo dia houve inversão do limiar nociceptivo, isto é, os limiares nociceptivos do grupo GB2 se tornaram significativamente menores quando comparados aos limiares do GB1, indicando que as bezerras apresentam maior sensibilidade ao estímulo mecânico aplicado. Este fato realça o sétimo dia após o estímulo nociceptivo principal como um momento importante para melhor entendimento futuro de como se comporta a sensibilidade da prole oriunda de mães estressadas durante a gestação, sugerindo, deste modo, existir potencialmente associação entre a inversão de limiares

nociceptivos e a transição da fase inflamatória para fase proliferativa de recuperação da lesão, representada no modelo por meio do sétimo dia da cicatrização da lesão.

Tabela 9 - Média \pm erro padrão da média do limiar nociceptivo (g) na pele das bezerras dos grupos GB1 e GB2 nos diferentes tempos de análise antes e após a descorna

Momentos	Grupos		p Valor
	GB1	GB2	
Basal	4,25 \pm 0,42 ^{ab}	4,45 \pm 0,49 ^a	0,7
24 h	0,81 \pm 0,35 ^d	1,12 \pm 0,56 ^b	0,5
3 d	0,34 \pm 0,16 ^d	0,89 \pm 0,52 ^b	0,8
7 d	2,35 \pm 0,52 ^{Ac}	0,97 \pm 0,56 ^{Bb}	0,02
14 d	3,65 \pm 0,42 ^{b*}	2,31 \pm 0,73 ^{ab*}	0,08
21 d	5,19 \pm 0,25 ^{Aa}	3,24 \pm 0,8 ^{Ba}	0,04
Média	2,88 \pm 0,22	2,15 \pm 0,28	-
p Valor	< 0,0001	0,0003	-

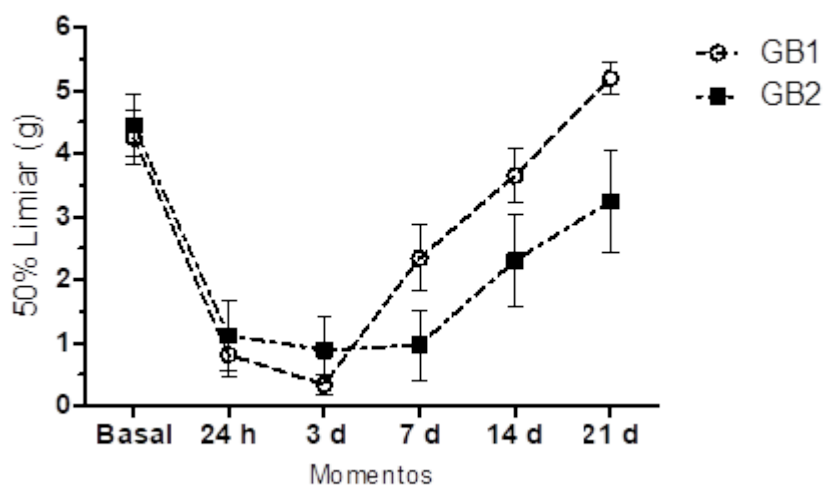
Fonte: Stanigher (2021)

Legendas: ^{A,B} Letras sobrescritas maiúsculas indicam diferença estatística na linha pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$).

^{a,b,c,d} Letras sobrescritas minúsculas indicam diferença estatística na coluna pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$).

* asterisco na linha indica tendência estatística pelo teste de Kruskal-Wallis ($0,05 > p \leq 0,1$).

Figura 32 - Avaliação do limiar nociceptivo por meio de filamentos de von Frey na pele das bezerras dos grupos GB1 e GB2 nos diferentes tempos de análise



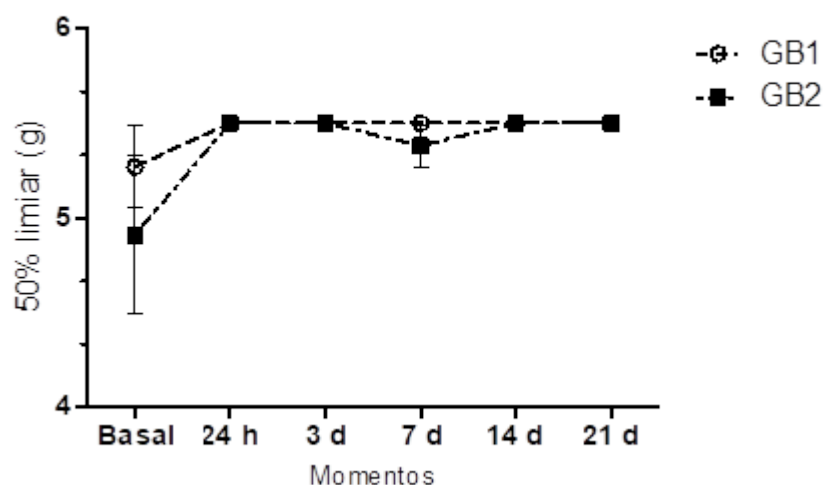
Fonte: Stanigher (2021)

Tabela 10 - Média \pm erro padrão da média do limiar nociceptivo (g) do corno das bezerras dos grupos GB1 e GB2 nos diferentes tempos de análise antes e após a descorna

Momentos	Grupos		p Valor
	GB1	GB2	
Basal	5,27 \pm 0,22	4,91 \pm 0,42	0,3
24 horas	5,5 \pm 0	5,5 \pm 0	1
3 dias	5,5 \pm 0	5,5 \pm 0	1
7 dias	5,5 \pm 0	5,38 \pm 0,11	0,2
14 dias	5,5 \pm 0	5,5 \pm 0	0,4
21 dias	5,5 \pm 0	5,5 \pm 0	0,5
Média	5,46 \pm 0,04	5,38 \pm 0,08	-
p Valor	0,6		-

Fonte: Stanigher (2021)

Figura 33 - Avaliação do limiar nociceptivo (g) por meio de filamentos de von Frey no corno e nas lesões das bezerras dos grupos GB1 e GB2 nos diferentes tempos de análise antes e após a descorna



Fonte: Stanigher (2021)

Em pesquisa realizada por Sarmiento (2021), foi possível observar que em leitões machos, nascidos de porcas que claudicavam durante a gestação, e que foram castrados após o nascimento, houve diminuição do limiar nociceptivo quando comparado ao grupo de leitões nascidos de mães que não claudicaram durante a gestação, corroborando assim com os achados deste estudo. Desta forma seria possível conceber hipótese de que tecidos lesionados de animais de diferentes

espécies, mas provenientes de mães claudicantes, apresentariam alterações de limiar, sendo menos tolerantes aos estímulos nociceptivos.

Segundo a literatura, mães que sofreram estresse durante a gestação, possuem níveis elevados de cortisol, expondo o feto a níveis elevados de corticoide, alterando assim o desenvolvimento do eixo HPA. Estas alterações induzidas pelo estresse materno perinatal no desenvolvimento do sistema HPA da prole, segundo Knaepen e colaboradores (2013), está diretamente relacionada com sensibilidade à dor na prole.

Ainda que não suportado pelos resultados do cortisol salivar das vacas, as suspeitas de alterações no desenvolvimento do eixo HPA são reforçadas pelos resultados encontrados neste trabalho, ou seja, as bezerras nascidas de mães que passaram pelo estresse da claudicação durante o período gestacional apresentaram o limiar nociceptivo menor, assim respondendo com maior sensibilidade ao estímulo nociceptivo após o sétimo, 14º e 21º dia da descorna.

Segundo Davys e colaboradores (2011), isso provavelmente ocorre por meio das ações do cortisol no sistema nervoso central em desenvolvimento do feto. O cortisol é importante para a maturação normal na maioria das regiões do sistema nervoso central em desenvolvimento pois tem ação de remodelar axônios e dendritos, mielinização e sobrevivência celular e, por este motivo, a enzima 11 β -HSD2 inativa, fisiologicamente, apenas 80% do cortisol produzido pela mãe. Além disso, os receptores para cortisol são altamente expressos no cérebro em desenvolvimento, e a exposição ao cortisol durante a gestação tem efeitos generalizados sobre os neurônios e na formação de sinapses. Assim a exposição do feto à elevadas concentrações de cortisol materno durante o período gestacional está diretamente relacionada ao período de exposição ao cortisol.

Estudos em humanos demonstram que a exposição ao cortisol materno elevado no início da gestação afeta o comportamento do bebê devido a influência do cortisol no desenvolvimento da conectividade entre as regiões cerebrais do tronco encefálico, sistema límbico e regiões corticais do cérebro, responsáveis pela regulação do comportamento humano (GEVA E FELDMAN, 2008). Já descobertas em modelos animais sugerem que a exposição a elevados níveis de cortisol materno durante as fases finais da gestação altera a densidade dos receptores de glicocorticóides no hipocampo e na amígdala com consequências para a sensibilidade de feedback do eixo HPA (KAPOOR et al., 2006).

Adicionalmente, Thompson e Neugebauer (2017), e Ong e colaboradores (2019), afirmam que estas estruturas cerebrais, amígdala e hipocampo, atuam diretamente na modulação e processamento da dor. Correlacionando as informações, podemos, hipoteticamente, assumir que as alterações encontradas neste trabalho, ou seja, as bezerras nascidas de vacas que apresentaram claudicação em terço final de gestação, caracterizando assim um evento estressante, podem ter apresentado o limiar nociceptivo diminuído possivelmente por alterações na amígdala e hipocampo, apresentando hiperalgesia quando comparadas às bezerras nascidas das mães que não claudicaram durante a gestação.

Segundo o gráfico representado na Figura 31, pode-se observar que o GB1 apresentou diferença quando comparado ao GB2 a partir da fase proliferativa da cicatrização das lesões, ou seja, a partir do sétimo dia pós descorna. Porém, Sarmiento e colaboradores (2019), demonstraram que leitões nascidos de porcas que claudicaram durante a gestação apresentaram limiar nociceptivo maior em pele íntegra, quando comparados a leitões oriundos de porcas que não claudicaram durante a gestação, demonstrando assim que leitões nascidos de mães estressadas apresentam hipoalgesia em pele não lesionada, não corroborando com os dados encontrados no presente trabalho uma vez que no tempo basal (pele íntegra) não houve diferença entre os limiares, enquanto que na pele lesionada após a descorna houve maior sensibilidade a partir do sétimo dia na prole proveniente de mães com claudicação.

Em estudo desenvolvido por Sandercock e colaboradores (2011), cujo objetivo principal foi de relacionar o corte de cauda em leitões e a hiperalgesia inflamatória induzida pelo estresse gestacional, os resultados indicaram que o corte da cauda nos leitões não induzem alterações de longo prazo nos níveis de respostas nociceptivas, portanto, não há evidência de hiperalgesia crônica e de que o estresse pré-natal intra útero reduz as respostas aos estímulos de dor aguda e nocicepção induzida por inflamação aguda na vida adulta.

Desta forma, podemos observar que há inconsistências na literatura sobre o mecanismo dos efeitos do estresse materno pré-natal na sensibilidade à dor. Essas inconsistências podem ser parcialmente explicadas pelos diferentes tipos de modelos experimentais usados, o sexo dos animais, a idade da prole em teste, estresse materno perinatal usado e a espécie animal em questão.

Segundo Taschke e Fölsch (1997), que estudaram a histologia e a morfologia do broto cornual em bezerras, observaram que esta região é desprovida de aporte nervoso robusto, ou seja, a identificação de fibras nervosas nesta região foi algo raro de se encontrar nas lâminas histológicas. Relatam, também, que nesta região a epiderme e as papilas dérmicas vão se espessando com o passar da idade do animal.

Além disto, o processo de desenvolvimento córneo é resultado da diferenciação e remodelação de vários tecidos presentes no local, que mais tarde irá culminar na queratinização da epiderme e na ossificação do tecido hipodérmico, que irá se fundir com o osso frontal do crânio, dando origem, assim, no animal adulto, a uma bainha permanente e externa de queratina e um núcleo ósseo pneumatizado (DOVE, 1935; WIENER et al., 2015).

Desta forma, como a região sobre o broto cornual de bezerras é fisiologicamente uma área com pouca inervação, os dados encontrados neste trabalho (Tabela 10 e Figura 32) corroboram com a literatura, uma vez que a variação do limiar nociceptivo sobre o corno apresentado pelos grupos GB1 e GB2, antes e após a descorna, não diferiram estatisticamente entre os momentos de avaliação, ou seja, a sensibilidade sobre o botão córneo é menor quando comparada com a sensibilidade expressa pelos mesmos grupos na região da pele adjacente ao broto cornual.

Sabe-se que a de descorna por ferro quente em bezerras, além de ser um procedimento rotineiro em fazendas leiteiras, é uma experiência estressante e dolorosa para o animal, uma vez que irá provocar intencionalmente uma lesão de queimadura no botão córneo e na pele ao redor do mesmo. Segundo Barbosa (2016), por meio de achados histológicos, demonstrou que as lesões de queimadura induzidas pela descorna por ferro quente na pele adjacente ao broto cornual correspondem a queimadura de segundo grau, as quais caracterizam-se por não acometer vasos e terminações nervosas. Já as lesões de queimadura sobre o broto cornual corresponderam a uma queimadura de terceiro grau, caracterizando-se por acometer vasos e terminações nervosas (GROSS et al., 2005; SINCLAIR et al., 2007). Assim, o acometimento dos nervos pós descorna determina hiposensibilidade local, como demonstrado no presente trabalho (Figura 33).

7 CONCLUSÕES

Por meio dos resultados obtidos no presente trabalho e nas condições propostas, foi possível concluir que a presença de claudicação em vacas ($EL \geq 3$) em até 60 dias antes do parto, adotado como modelo clínico de estresse pré-natal:

1) Não influenciou a recuperação das lesões de queimadura causadas pela descorna por ferro quente.

2) Alterou a resposta nociceptiva das bezerras, determinando redução do limiar nociceptivo na região da pele após descorna por ferro quente, quando comparado com o limiar de bezerras nascidas de vacas com $EL \leq 2$.

3) Não alterou o hemograma das vacas quatro semanas antes do parto.

4) Não alterou a concentração de cortisol salivar das vacas quatro semanas antes do parto.

5) Não alterou a concentração de cortisol salivar das bezerras ao nascimento.

6) Não alterou a concentração de cortisol salivar de bezerras durante o processo de cicatrização das lesões de queimadura após da descorna com ferro quente.

REFERÊNCIAS

AFONSO, J.S.; BRUCE, M.; KEATING, P.; RABOISSON, D.; CLOUGH, H.; OIKONOMOU, G.; RUSHTON, J. Profiling Detection and Classification of Lameness Methods in British Dairy Cattle Research: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Frontiers in veterinary science**, v. 7, p. 542, 2020.

ALMEIDA, P.E.; WEBER, P.S.D.; BURTON, J.L.; ZANELLA, A.J. Depressed DHEA and increased sickness response behaviors in lame dairy cows with inflammatory foot lesions. **Domestic Animals Endocrinology**, v. 34, p. 89-99, 2008.

ARNOTT, G.; ROBERTS, D.; ROOKE, J. A.; TURNER, S. P.; FAWRENCE, A. B.; RUTHERFOR, K. M. D. BOARD INVITED REVIEW: The importance of the gestation period for welfare of calves: Maternal stressors and difficult births. **Journal of Animal Science**, v. 90, n. 3, p. 5021-5034, 2012.

BAKKER, J. M.; SCHMIDT, E. D.; KROES, H.; KAVELAARS, A.; HEIJNEN, C. J.; TILDER, F. J. H.; VAN REES, E. P. Effects of short-term dexamethasone treatment during pregnancy on the development of the immune system and the hypothalamo – pituitary adrenal axis in the rat. **Journal of Neuroimmunology**, v.63, p.183–191,1995.

BAKKER, J. M.; VAN DEN DOBBOBELSTEEN, G. P. J. M.; KROES, H.; KAVELAARS, A.; HEIJNEN, C. J.; TILDERS, F. J. H., VAN REES, E. P. Long-term genderspecific effects of manipulation during pregnancy on immune and endocrine responsiveness in rat offspring. **Journal of Neuroimmunology**, v. 82, p. 56–63, 1998.

BARBOSA, B. S. **Efeitos da fototerapia no processo de cicatrização de queimadura em bezerros**. 2016. 73 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

BARKER, D. J.; WINTER, P. D.; OSMOND, C.; MARGETTS, B.; SIMMONDS, S. J. The Fetal and Infant Origins of Adult Disease. **Lancet**, v. 2, p. 577-580, 1990.

BARTLETT, P.C.; RUGGIERO, V.J.; HUTCHINSON, H.C.; DROSCHA, C.J.; NORBY, B.; SPORER, K.R.B.; TAXIS, T.M. Current developments in the epidemiology and control of enzootic bovine leukosis as caused by bovine leukemia virus. **Pathogens**, v. 9, n. 12, p. 1058-1071, 2020.

BATES, A. J.; EDER, P.; LAVEN, R. A. Effect of analgesia and anti-inflammatory treatment on weight gain and milk intake of dairy calves after disbudding. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 63, n. 3, p. 153-157, 2015.

BAXTER, E. M.; MULLIGAN, J., HALLS, S. A., DONBAVAND, J. E., PALME, R., ALDUJAILI, E., ZENELLA, A. J. DWVER, C. M. Positive and negative gestational handling influences placental traits and mother-offspring behavior in dairy goats. **Physiology & Behavior**, v.157, p. 29-138, 2016.

BELLINGER, D. L.; LUBAHN, C.; LORTON, D. Maternal and early life stress effects on immune function: relevance to immunotoxicology. **Journal of Immunotoxicology**, v.5, n.4, p. 419-444, 2008.

BERNARDINO, T.; TATEMOTO, P.; MORRONE, B.; RODRIGUES, P.H.M.; ZANELLA, A.J. Piglets born from sows fed high fibre diets during pregnancy are less aggressive prior to weaning. **Plos One**, v.11, p.12, 2016.

BIRGEL, E.H. Hematologia clínica veterinária. In: BIRGEL, E.H.; BENESI, F.J. Patologia clínica veterinária. São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, p. 2-34, 1982.

BORGES, A.S. Avaliação da eficácia da administração de plasma, por via intravenosa, como tratamento da falência de transferência de imunidade passiva em bezerros da raça Holandesa. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, 1997. 84p. (Dissertação, Mestrado).

BORGES, J.R.J.; CAMARA, A.C.L.; MOSCARDINI, A.R.C.; RODRIGUES, C.A.; PITOMBO, C.A.; GRACA, F.A.S.; SILVA, L.A.F.; SILVA, P.C.A.R.; CUNHA, P H.J.; VIANA, R.B.; RABELO, R.E.; OLLHOFF, R.D. Doenças dos dígitos dos bovinos:

nomenclatura padronizada para o Brasil. *REVISTA CFMV (BRASÍLIA)*, v. 23, p. 45-52, 2017.

BRAASTAD, B. O. Effects of prenatal stress on behavior of offspring of laboratory and farmed mammals. *Applied Animal Behavior Science*, v. 61, p. 159-180, 1998.

BRAN, J.A.; DAROS, R.R.; VON KEYSERLINGK, M.A.G.; LEBLANC, S.J.; HÖTZEL, M.J. Cow- and herd-level factors associated with lameness in small-scale grazing dairy herds in Brazil. *Preventive Veterinary Medicine*, v.155, p.79-86, 2018.

CARAY, D.; BOYER DES ROCHES, A.; FROUJA, S.; ANDANSON, S.; VEISSIER, I. Hot-iron disbudding: stress responses and behavior of 1- and 4-week-old calves receiving anti-inflammatory analgesia without or with sedation using xylazine. *Livestock Science*, n. 179, p. 22-28, 2015.

CARDOSO, C.S.; VON KEYSERLINGK, M.A.G.; HÖTZEL, M.J. Trading off animal welfare and production goals: Brazilian dairy farmers' perspectives on calf dehorning. *Livestock Science*, v. 187, p. 102-108, 2016.

CARPINELLO, O. J.; DECHERNEY, A.H.; HILL, M.J. Developmental origins of health and disease: The History of the Barker Hypothesis and assisted reproductive technology. *Seminars in reproductive medicine*, v. 36, n. 3-4, p. 177-182, 2018.

CASONI, D.; MIRRA, A.; SUTER, M. R., GUTZWILLER, A.; SPADAVECCHIA C. Can disbudding of calves (one versus four weeks of age) induce chronic pain? *Physiology and Behavior*, v. 199, p. 47-55, 2019.

CHAPLAN, S. R.; BACH, F. W.; POGREL, J. W.; CHUNG, J. M.; YAKSH, T. L. Quantitative assessment of tactile allodynia in rat paw. *J Neurosci Methods*, n. 1, v. 53, p. 55-63, 1994.

CONTRERAS-AGUILAR, M.D.; VALLEJO-MATEO, P.J.; ZELVYTE, R.; TECLES, F.; RUBIO, C.P. Changes in saliva analytes associated with lameness in cows: a pilot study. *Animals*, v. 10, p. 2078-2088, 2020.

COSTA, J.H.C.; BURNETT, T.A.; KEYSERLINGKT, M.A.G.; HÖTZEL, M.J. Prevalence of lameness and leg lesions of lactating dairy cows housed in southern Brazil: Effects of housing systems. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 3, p.2395-2405, 2018.

COULON, M.; HILD, S.; SCHROEER, A.; JANCZAK, A. M.; ZANELLA, A. J. Gentle vs. aversive handling of pregnant ewes: II. Physiology and behavior of the lambs. **Physiology and Behavior**, v. 103, p. 575-584, 2011.

COULON, M.; WELLMAN, C. L.; MARJARA, I. S.; JANCZAK, A. M.; ZANELLA, A. J. Early adverse experience alters dendritic spine density and gene expression in prefrontal cortex and hippocampus in lambs. **Psychoneuroendocrinology**, n. 38, p. 1112-1121, 2013.

COZZI, G.; GOTTARDO, F.; BRSCIC, M.; CONTIERO, B.; IRRGANG, N.; KNIERIM, U.; PENTELESCU, O.; WINDING. J. J; MIRABITO, L.; KLING EVEILLARD, F.; DOCKES, A. C.; VEISSIER, I., VELARDE, A.; FUENTES, C., DALMAU, A.; WINCKLER, C. Dehorning of cattle in the EU Member Estates: A quantitative survey of the current practices. **Livestock Science**, v. 179, p. 4-11, 2015.

DENADAI-SOUZA, A. C.; CAMARGO LDE, L.; RIBELA, M. T.; KEEBLE, J. E.; COSTA, S. K.; MUSCARÁ, M. N. Participation of peripheral tachykinin NK1 receptor in the carrageenan-induced inflammation of the rat temporomandibular joint. **European Journal of Pain**, v. 13, n. 8, p. 812-819, 2009.

DOHERTY, T. J.; KATTESH, H. G.; ADCOCK, R. J.; WELBORN, M. G.; SAXTON, A. M. Effects of a concentrated lidocaine solution on the acute phase stress response to dehorning in dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 9, p.4232-4239, 2007.

DOVE, W.F. The physiology of horn growth: a study of the morphogenesis, the interaction of tissues and the evolutionary processes of a mendelian recessive character by means of transplantation of tissues. **Journal of Experimental Zoology**, 1935.

EDMONSON, A. J.; LEAN, I. J.; WEAVER, L. D.; FARVER, T.; WEBSTER, G. A body condition score chart for Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 1, p. 68-78, 1984.

EDWARDS, B. Regional anaesthesia techniques in cattle. **In Practice**, v. 13, n. 1, p. 142-149, 2001.

ESPINOZA, C.; LOMAX, S.; WINDSOR, P. The effect of a topical anesthetic on the sensitivity of calf dehorning wounds. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 5, p. 2894-2902, 2013.

FAULKNER, P.M.; WEARY, D.M. Reducing pain after dehorning in dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 9, p. 2037-2041, 2000.

FIERHELLER, E. E.; CAULKETT, N. A.; HALEY, D. B.; FLORENCE, D.; DOEPEL, L. Onset, duration and efficacy of four methods of local anesthesia of the horn bud in calves. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v. 39, n. 4, p. 431-435, 2012.

FLOWER, F.C.; WEARY, D.M. Gait assessment in dairy cattle. **Animals**, v.3, n.1, p.87-95, 2009

FRACCARO, E.; COETZEE, J.F.; ODORE, R.; EDWARDS-CALLAWAY, L.N.; KUKANICH, B.; BADINO, P.; BERTOLOTTI, L.; GLYNN, H.; DOCKWEILER, J.; ALLEN, K.; BERGAMASCO, L. A study to compare circulating flunixin, meloxicam and gabapentin concentrations with prostaglandin E₂ levels in calves undergoing dehorning. **Research in Veterinary Science**, v. 95, n. 1, p. 204-211, 2013.

GEVA, R.; FELDMAN, R. A neurobiological model for the effects of early brainstem functioning on the development of behavior and emotion regulation in infants: implications for prenatal and perinatal risk. **Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines**, v. 49, n. 10, p. 1031-1041, 2008.

GIBBONS, J., E. VASSEUR, J. RUSHEN, AND A. M. DE PASSILLÉ. A training programme to ensure high repeatability of injury scoring of dairy cows. **Animal Welfare**, v. 21, p. 379–388, 2012.

GLOVER, V. The effect of prenatal stress on child behavior and cognitive outcomes start at the beginning. **Encyclopedia on Early Childhood Development**, Institute of Reproductive and Developmental Biology, Imperial College London, United Kingdom, 2011.

GOTTARDO, F.; NALON, E.; CONTIERO, B.; NORMANDO, S.; DALVIT, P.; COZZI, G. The dehorning of dairy calves: Practices and opinions of 639 farmers. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 11, p. 5724–5734, 2011.

GRÄBNER, M.; KANITZ, E.; OTTEN, W. Prenatal stress in farm animals: a survey. **Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift**, v.122, n. 3-4, p. 73-81, 2009.

GRAFF B. AND SENN M. Behavioral and physiological responses of calves to dehorning by heat cauterization with or without local anesthesia. **Applied Animal Behaviors Science**, 62:153–171, 1999.

GRONDAHL-NIELSON C.; SIMONSEN, H. B.; DAMKJER LUND, J.; HESSELHOLT, H. Behavioral, endocrine and cardiac responses in young calves undergoing dehorning without and with the use of sedation and analgesia. **The Veterinary Journal**, v. 158, n. 1, p. 14-20, 1999.

GUCCIONE, J.; CARCASOLE, C.; ALSAAODS, M.; D'ADREA, L.; DI LORIA, A.; DE ROSA, CIARAMELLA, P.; STEINER, A. Assessment of foot health and animal welfare: clinical findings in 229 dairy Mediterranean Buffaloes (*Bubalus bubalis*) affected by foot disorders. **Veterinary Research**, v.12, p. 107, 2016.

GUEST, F.L.; MARTINS-DE-SOUZA, D.; RAHMOUNE, H.; BAHN, S.; GUEST, P.C. The effects of stress on hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis function in subjects with schizophrenia. **Archives of Clinical Psychiatry**, v.40, p. 20-27, 2012.

HEIRICH, A.; DUFFIELD, T. F.; LISSEMOR, K. D.; MILLMAN, S. T. The effect of meloxicam on behavior and pain sensitivity of dairy calves following cautery dehorning with a local anesthetic. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 6, p. 2450-2457, 2010.

HERZBERG, D. STROBEL, P.; RAMIREZ-REVECO, A.; WERNER, M.; BUSTAMANTE, H. Chronic inflammatory lameness increases cytokine concentration in the spinal cord of dairy cows. **Frontiers in veterinary science**, v. 7, p. 125, 2020.

HILD, S.; COULON, M.; SCHROEER, A.; ANDERSON, I. L.; ZANELLA, A. J. Gentle vs. aversive handling of pregnant ewes: I. Maternal cortisol and behavior. **Physiology and Behavior**, v. 104, p. 384-391, 2011.

HÖTZEL, M.J.; SNEDDON, J.N. The role of extensionists in Santa Catarina, Brazil, in the adoption and rejection of providing pain relief to calves for dehorning. **Journal of Dairy Science**, v.96, n. 3, p. 1535-1548, 2013.

JAHNKE, J.R.; TERÁN, E.; MURGUEITIO, F.; CABRERA, H.; THOMPSON, A.L. Maternal stress, placenta 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2, and infant HPA axis development in humans: Psychosocial and physiological pathways. **Placenta**, v.104, p. 179-187, 2021.

KAPOOR, A.; DUNN, E.; KOSTAKI, A.; ANDREWS, M.H.; MATTHEWS, S.G. Fetal programming of hypothalamo-pituitary-adrenal function: prenatal stress and glucocorticoids. **The Journal of physiology**, v.572, n. 1, p. 31-44, 2006.

KNAEPEN, L.; PAWLUSKI, J.L.; PRATJIN, J.; VAN KLEEF, M.; TIBBOEL, D.; JOOSTEN, E.A. Perinatal maternal stress and serotonin signaling effects on pain sensitivity in offspring. **Developmental psychobiology**, v.56, n.5, p. 885-96, 2014.

KNIERIM, U.; IRRGANG, N.; ROTH, B.A. To be or not to be horned - Consequences in cattle. **Livestock Science**, v.179, p. 29-37, 2005.

LAUTARESCU, A.; CRAIG, M.C.; GLOVER, V. Prenatal stress: effects of fetal and child brains development. **International review of neurobiology**, v. 150, p. 17- 40, 2020.

LAY, D. C. Jr.; RANDEL, R.D.; FRIEND, T.H.; CARROL, J.A.; WELSH, T. H. Jr.; JENKINS, O.C.; NEUENDORFF, D.A.; BUSHONG, D.M.; KAPP, G.M. Effects of prenatal stress on the fetal calf. **Domestic Animal Endocrinology**, v.14, p.73-80, 1997.

LECORPS, B.; LUDWIG, B.R.; VON KEYSERLINGK, M.A.G.; WEARY, D.M. Pain-Induce pessimism and anhedonia: evidence from a novel probability-based judgment bias test. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v.13, p.54, 2019.

LEY, S. J.; LIVINGSTON, A.; WATERMAN, A. E. The effect PF chronic clinical pain on thermal and mechanical thresholds in sheep. **Pain**, v. 39, p. 353-357, 1989.

LEY, S. J.; WATERMAN, A. E.; LIVINGSTON, A. A field study of the effect of lameness on mechanical nociceptive thresholds in sheep. **Veterinary Records**, v.22, p. 85-87, 1995.

LEY, S. J.; WATERMAN, A. E.; LIVINGSTON, A. Measurement of mechanical thresholds, plasma cortisol and catecholamines in control and lame cattle: A preliminary study. **Veterinary Science**, v. 61, p. 172-173, 1996.

LEY, S. J.; WATERMAN, A. E.; LIVINGSTON, A.; PARKINSON, T. J. Effect os chronic pain associated with lameness on plasma cortisol concentrations in sheep: a field study. **Veterinary Science**, v. 57, p. 3320335, 1994.

LEY, S.J.; LIVINGSTON, A.; WATERMAN, A. E. Effects of clinically occurring chronic lameness in sheep on the concentrations of plasma noradrenaline and adrenaline. **Veterinary Science**, v.53, p.122-125, 1992.

LORA, I.; BARBERIO, A.; CONTIERO, B.; PAPARELLA, P.; BONFANTIL, L.; BRSCIC, M.; STEFANI, A.L.; GOTTARDO, F. Factors associated with passive immunity transfer

in dairy calves: combined effect of delivery time, amount and quality of the first colostrum meal. **Animal**, v. 17, p. 1-9, 2017.

MADER, T.L.; DAVIS, M.S.; BROWN-BRANDL, T. Environmental factors influencing heat stress in feedlot cattle. *Journal of Animal Science*, v.84, p.712-719, 2014.

MAGALHÃES, M.N.; LIMA, A.C.P. **Noções de Probabilidade e Estatística**. São Paulo: IME-USP, 2000, p.392.

MCCARTHY, D.; WINDSOR P. A.; HARRIS, C.; LOMAX, S.; WHITE, P. W. Effect of Topically Applied Anaesthetic Formulation on the Sensitivity of Scoop Dehorning Wounds in Calves. **Plos One**, v. 11, n.9, p. 163-181, 2016.

MEE, J. F. Managing the dairy cow at calving time. **The Veterinary Clinics of North America – Food Animal Practice**, v. 20, p. 521-546, 2004.

MEE, J. F. Prevalence and risk factors for dystocia in dairy cattle: A review. **The Veterinary Journal**, v. 176, p. 93-101, 2008.

MERLOT, E.; COURET, D.; OTTEN, W. Prenatal stress, fetal imprinting and immunity. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 22, p. 42 - 51, 2008.

MINTLINE, E. M.; STEWART, M.; ROGERS, A. R.; COX, N. R.; VERKERK, G. A.; STOOKEY, J. M.; WEBSTER, J. R.; TUCKER, C. B. Play behavior as an indicator of animal welfare: disbudding in dairy calves, **Applied Animal Behavior**, v. 144, n. 1-2, p. 22-30, 2013.

MIR, R.A.; KLEINHENZ, M.D.; COETZEE, J.F.; ALLEN, H.K.; KUDVA, I.T. Fecal microbiota changes associated with dehorning abs castration stress primarily affects light-wight dairy calves. **Plos One**, v. 14, n. 1, p. 210203, 2019.

MIRRA, A.; SPADAVECCHIA, C.; BRUCKMAIER, R.; GUTZWILLER, A. Acute pain and peripheral sensitization following cautery disbudding in 1- and 4-week-old calves. *Physiology and Behavior*, v. 184, p. 248-260, 2018.

MONTEIRO, S.T.; THOMPSON, I.M.; HAYEN, M.J.; DAHL, G.E. Effect of late-gestation maternal heat stress on growth and immune function of dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 12, p. 7128-7136, 2012.

MURRAY, C. F.; LESLIE, K.E. Newborn calf vitality: Risk factors, characteristics, assessment, resulting outcomes and strategies for improvement. **The Veterinary Journal**, v. 198, n. 2, p. 322-328, 2013.

NEAVE, H. W. Cognitive bias as a method of pain assessment following hot-iron dehorning of dairy calves. 2012. 80 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - The Faculty of Graduate and Postdoctoral Studies - Applied Animal Biology, University of British Columbia, Vancouver, 2012.

NEAVE, H.W. **Cognitive bias as a method of pain assessment following hot-iron dehorning of dairy calves**. Tese (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Biologia Animal Aplicada, Universidade de British Columbia, Vancouver, 2013.

NEAVE, H.W.; DAROS, R.R.; COSTA, J.H.; von KEYSERLINGK, M.A.G.; WEARY, D.M. Pain and pessimism: dairy calves exhibit negative judgement bias following hot-iron disbudding. **Plos One**, v.5, n.9, p. 96135, 2014.

NEGRÃO, J. A.; PORCIONATO, M. A.; PASSILE, A. M.; RUSHEN, J. Cortisol in saliva and Plasma of Cattle After ACTH Administration and Milking. **Journal of Dairy Science**, v.87, n. 6, p. 1713-1718, 2004.

NIELSEN, B. H.; PETER T. T.; JAN TIND S. Identifying risk factors for poor hind limb cleanliness in Danish loose-housed dairy cows. **Animals**, v. 5, n. 10, p.1613-1619, 2011.

O'CALLAGHAN, K. Lameness and association pain in cattle - challenging traditional perceptions. **In Practice**, v. 24, n. 4, p. 212-219, 2002.

O'DONNELL, K.J.; O'CONNOR, T.G.; GLOVER, V. Prenatal stress and neurodevelopment of the child: focus on the HPA axis and role of the placenta. **Developmental neuroscience**, v. 31, n. 4, p. 285-92, 2009.

O'DONNELL, K.J.; JENSEN, A.B.; FREEMAN, L.; KHALIFE, N.; O'CONNOR, T.G.; GLOVER, V. Maternal prenatal anxiety and downregulation of placental 11 β -HSD2. **Psychoneuroendocrinology**, v.37, n. 6, p. 818-826, 2012.

ONG, W.; STOHLER, C.S.; HERR, D.R. Role of the prefrontal cortex in pain processing. **Molecular neurobiology**, n. 56, v. 2, p. 1137-1166, 2019.

OTTEN, W.; KANITZ, E.; TUCHSCHERER, M. The impact of pre-natal stress on offspring development in pigs. **Journal of Agricultural Science**, v. 153, p. 907-919, 2015.

PAIANO, R.B. **Effects of anemia on periparturient cows**. 79f. Dissertação (Mestrado em Anatomia de Animais domésticos e Silvestres) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

PALME, R. & MÖSTL, E. Measurement of cortisol metabolites in faeces of sheep as a parameter of cortisol concentration in blood. *Int. j. mammal. biol.* 62(suppl. 2), 192–197 (1997).

PFEIFFER, N. E.; MCGUIRE, T. C.; BENDEL, R. B.; WEIKEL, J. M. Quantitation of bovine immunoglobulins: comparison of single radial immunodiffusion, zinc sulfate turbidity, serum electrophoresis, and refractometer methods. **American Journal of Veterinary Research**, v. 38, n. 5, p. 693-698, 1977.

REA, D. E.; TYLER, J. W.; HANCOCK, D. D.; BESSER, T. E.; WILSON, L.; KRYTENBERG, D. S.; SANDERS, S.G. Prediction of calf mortality by use of tests for passive transfer of colostral immunoglobulin. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 208, n. 12, p. 2047-2049, 1996.

ROSEBOOM, T.J.; VAN DER MEULEN, J.H.; RAVELLI, A.C.; OSMOND, C.; BARKER, D.J.; BLEKER, O.P. Effects of prenatal exposure to the Dutch famine on adult disease in later life: an overview. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 85, n. 1-2, p. 93-98, 2001.

ROSENBERGER, G. **Exame clínico dos bovinos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983. 429 p.

SANDERCOCK, D.A.; GIBSON, I.F.; ROTHERFORD, K.M.D.; DONALD, R.D.; LAWRENCE, A.B.; BRASH, H.M.; SCOTT, E.M.; NOLAN, A.M. The impact of prenatal stress on basal nociception and evoked responses to tail-docking and inflammatory challenge in juvenile pigs. **Physiology and behavior**, v. 5, p. 728-727, 2011.

SARMIENTO, M.P. Lameness in sows and the emotional consequences in the offspring. 91p. Dissertação (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2021.

SARMIENTO, M.P.; BERNARDINO, T.; TATEMOTO, P.; POLO, G.; ZANELLA, A.J. The in-utero experience of piglets born from sows with lameness shapes their life trajectory. **Plos One**, v. 11, p. 13052, 2021.

SARMIENTO, M.P.; SABEI, L.; BABROSA, B.S.; ZANELLA, A.J. Lameness in sows during pregnancy impacts welfare outcomes in the offspring. In: 53rd Congress of the ISAE, 2019, Bergen, Norway. **Proceedings ... 2019**.

SIEGFORD, J.M.; RUCKER, G.; ZANELLA, A.J. effects of pre-weaning exposure to a maze on stress responses in pigs at weaning and on subsequent performance in spatial and fear-related tests. **Applied Animal Behavior Science**, v. 110, n. 1-2, p. 189-202, 2008.

SMITH, B.L.; KAUFFOLD, J.; SHERMAN, L. Serum haptoglobin concentration in dairy cattle with lameness due to claw disorders. **The Veterinary Journal**, v. 186, n. 2, p. 162-165, 2010.

SPRECHER, D. J.; HOSTETLER, D. E.; KANEENE, J. B. A lameness scoring system that uses posture and gait to predict dairy cattle reproductive performance. *Theriogenology*, v.47, n.6, p. 1179-1187, 1997.

STAFFORD, K. J.; MELLOR, D. J. Dehorning and Disbudding distress and its alleviation in calves. **The Veterinary Journal**, v. 169, n. 6, p.337-349, 2005.

STAFFORD, K.J.; MELLOR, D.J. Dehorning and disbudding distress and its alleviation in calves. **Veterinary Journal**, v. 169, n. 3, p. 337-49, 2005.

STILWELL, G.; CARVALHO, R.C.; LIMA, M.S.; BROOM, D.M. Effect of caustic paste disbudding, using local anaesthesia with and without analgesia, on behavior and cortisol of calves. **Applied Animal Behaviour Science**, v.116, n. 1, p.35-44, 2009.

STILWELL. G.; CARVALHO, R. C.; CAROLINO, N.; LIMA, M. S.; BROOM, D.M. Effect of hot-iron disbudding on behavior and plasma cortisol of calves sedated with xylazine. **Research in Veterinary Science**, v. 88, n. 1, p. 188-193, 2010.

STOCK, M. L.; BARTH, N. K.; VAN ENGEN, N. K.; MILLMAN, S. T.; GEHRING, R.; VORIS, E. A.; WULF, L. W.; LABEUR, L.; HSU, W. H.; COETZEE, J. F. Impact of carprofen administration on stress and nociception responses of calves to cauterly dehorning. **Journal of Animal Science**, v. 94, n.2, p. 542-555, 2016.

STOCK, M.; BALDRIDGE, S.; GRIFFIN D.; COETZEE J. Bovine dehorning: assessing pain and providing analgesic management. **Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice**, v. 29, p.103–133, 2013.

SZASZ, G. A kinetic photometric method for serum gamma glutamyltranspeptidase. **Clinical Chemistry**, v. 15, n. 2, p. 124-135, 1969.

TADICH, N.; TEJEDA, C.; BASTIAS, S.; ROSENFELD, C.; GREEN, L. E. Nociceptive threshold, blood constituents and physiological values in 213 cows with locomotion scores ranging from normal to severely lame. **The Veterinary Journal**, v. 197, p. 401-405, 2013.

TAO, S.; DAHL, G. E. Heat stress effects during late gestation on dry cows and their calves. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 1-15, 2013.

TAO, S.; MONTEIRO, A. P. A.; THOMPSON, I. M.; HAYEN, M. J.; DAHL, G. E. Effect of late-gestation maternal heat stress on growth and immune function of dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 7128-7136, 2012.

TASCHKE, A. C.; FOLSCH, D. W. Ethological, physiological and histological aspects of pain and stress in cattle when being dehorned, **Tierarztl. Prax**, v. 25, p. 19 – 27, 1997.

TATEMOTO, P.; BERNARDINO, T.; MORRONE, B.; QUEIROZ, M. R.; ZANELLA, A.J. Stereotypic behavior in sows is related to emotionality changes in the offspring. **Frontier of Veterinary Science**, v. 7, p.79, 2020.

THOMPSON, J.M.; NEUGEBAUER, V. Amygdala plasticity and pain. **Pain research & management**, 2017.

TENNANT, B.; BALDWIN, B. H.; BRAUN, R. K.; NARCROSS, N. L.; SANDHOLM, M. Use of the glutraldehyde coagulation test for detection of hypogammaglobulinemia in neonatal calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 174, n. 8, p. 848-853, 1979.

UETAKE, K. Newborn calf welfare: A review focusing on mortality rates. **Animal Science Journal**, v. 84, p. 101-105, 2013.

VAN AMSTEL, S.; SHEARER, J. **Manual for treatment and control of lameness in cattle**. Iowa: Blackwell Publishing, 2006, 212p.

VICKERS, K. J.; NIEL, L.; KIEHLBAUCH, L. M.; WEARY, D. M. Calf response to caustic paste and hot-iron dehorning using sedation with and without local anesthetic. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 4, p. 1454-1459, 2005.

VIDONDO, B.; STETTLER, S.; STOJILJKOVIC, A.; MOGEL, H.; GASCHEN, V.; SPADAVECCHIA, C.; CASONI, D.; STOFFEL, M.H. Assessment of potential neuropathic changes in cattle after cautory disbudding. **Research in veterinary science**, v. 126, p. 9-16, 2019.

WHAY, H. R.; MAIN, D. C.; GREEN, L. E.; WEBSTER, A. J. Assessment of the welfare of dairy cattle using animal-based measurements: direct observations and investigation of farm records. **Veterinary Record**, v.153, p. 197-202, 2003.

WHAY, H.R; WATERMAN, A. E.; WEBSTER, J. F.; O'BRIEN, J. K. The influence of lesion type on the duration of hyperalgesia associated with hindlimb lameness in dairy cattle. **The Veterinary Journal**, v.153, p. 23-29, 1998.

WHAY, H.R.; SHEARER, J.K. The Impact of Lameness on Welfare of the Dairy Cow. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 33, n. 2, p.153-164, 2017.

WIENER, D.J.; WIEDEMAR, N.; WELLE, M.M.; DRÖGEMÜLLER, C. Novel features of the prenatal horn bud development in cattle (*Bos Taurus*). **Plos One**, v.5, p.10, 2015.