

GABRIELA ALVES REIS

Claudicação em vacas prenhes – influências no desenvolvimento neonatal e na morfometria cerebral de bezerros após o nascimento

São Paulo

2024

GABRIELA ALVES REIS

Claudicação em vacas prenhes – influências no desenvolvimento neonatal e na morfometria cerebral de bezerros após o nascimento

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

São Paulo

2024

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

Catálogo na Publicação

Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo

Ficha catalográfica gerada automaticamente com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Reis, Gabriela Alves
Claudicação em vacas prenhes - influências no desenvolvimento
neonatal e na morfometria cerebral de bezerros após o nascimento /
Gabriela Alves Reis ; orientador Fábio Celidônio Fogliani .-- São
Paulo, 2024.
76 f. : il.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária
- Departamento de Clínica Médica) - Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2024.

1. Bem-estar animal. 2. Bovinos. 3. Estresse pré-natal. 4.
Afeções podais. 5. Encéfalo . I. Título.

Bibliotecária responsável pela estrutura de catalogação
na publicação: Maria Aparecida Laet - CRB 5673-8.



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Implicações da claudicação durante o período pré-natal na vitalidade pós-parto e no desenvolvimento de bezerros neonatos", protocolada sob o CEUA nº 7697170718 (ID 005491), sob a responsabilidade de **Fábio Celidonio Pogliani e equipe; Gabriela Alves Reis** - 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 "Implications of claudication during the prenatal period in postpartum vitality and in the development of neonatal calves", utilizing 80 Bovines (20 males and 60 females), protocol number CEUA 7697170718 (ID 005491), under the responsibility of **Fábio Celidonio Pogliani and team; Gabriela Alves Reis** - 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 [01/2019](#) a [09/2019](#)

Área: [Clínica Médica Veterinária](#)

Origem:	Animais de proprietários						
Espécie:	Bovinos	sexo:	Fêmeas	idade:	30 a 70 meses	N:	40
Linhagem:	Holandesa			Peso:	500 a 800 kg		
Origem:	Animais de proprietários						
Espécie:	Bovinos	sexo:	Machos	idade:	0 a 7 dias	N:	20
Linhagem:	Holandesa			Peso:	30 a 100 kg		
Origem:	Animais de proprietários						
Espécie:	Bovinos	sexo:	Fêmeas	idade:	0 a 4 semanas	N:	20
Linhagem:	Holandesa			Peso:	30 a 100 kg		

Local do experimento: O experimento será realizado na mesma propriedade leiteira, porém em locais diferentes. Uma parte será realizada no local onde as vacas prenhes se alojam, outra parte no bezerreiro da propriedade. E as análises das amostras coletadas serão realizadas nos laboratórios pertencentes a FMVZ- USP em Pirassununga (CAEP).

São Paulo, 27 de janeiro de 2019

Prof. Dra. Anneliese de Souza Traldi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: REIS, Gabriela Alves

Título: **Claudicação em vacas prenhes - influências no desenvolvimento neonatal e na morfometria cerebral de bezerros após o nascimento**

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

Aos meus pais, Silvimar e Sandra, que são meus exemplos de luta, fé, amor e perseverança, são meu alicerce e imprescindíveis na minha vida.

Aos meus irmãos e cunhados, Bárbara e Igor, Edson e Daiane por todo o apoio e alegrias que me proporcionam.

Ao meu companheiro Paulo, por todo apoio, amor, compreensão e companheirismo durante todos esses anos.

Aos animais, principalmente aos bovinos, essenciais para a realização desta pesquisa.

AGRADECIMENTOS

À minha família, por todo o apoio, paciência e companheirismo durante todos esses anos, vocês foram imprescindíveis.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fabio Celidonio Pogliani, pela orientação, paciência, amizade, pelos incentivos e todos os ensinamentos dentro e fora da sala de aula.

Ao Prof. Dr. Adroaldo José Zanella, colaborador essencial para a execução deste trabalho, por todo o apoio, ajuda, conversas e ensinamentos.

À Profa. Dra. Camila S. Dale, por toda a ajuda com o protocolo de perfusão e confecção das lâminas, por sempre ser prestativa e me ajudar na realização desta pesquisa. Estendo meus agradecimentos também a toda sua equipe que me ajudou tanto no laboratório, como em Pirassununga.

À Profa. Dra. Carla Aparecida Batista Lorigados, pela ajuda em encontrar um local para realização da Ressonância Magnética e pelo apoio nas análises das imagens. Por estar sempre disponível para conversar e tirar minhas dúvidas.

Ao Tenente Dr. Thiago Santin, responsável pela oportunidade de realizarmos os experimentos na Fazenda da Aeronáutica de Pirassununga, agradeço por todo o apoio durante este período, pela amizade e companheirismo.

Aos professores e amigos pós-graduandos do Departamento de Clínica Médica (VCM) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, minha casa por tantos anos, muito obrigada por toda a ajuda, apoio e ensinamentos.

Ao Centro de Apoio ao Ensino e Pesquisa (CAEP) por todo o apoio e estrutura para realização deste trabalho.

Ao Hospital Veterinário Veros por ceder o aparelho de Ressonância Magnética e ao Dr. Felipe Abreu por toda disponibilidade e disposição em ajudar.

A todos os funcionários do CAEP-FMVZ/USP, sempre muito prestativos e receptivos, por todo o apoio, ajuda, cafés, conversas e risadas.

Aos funcionários da Fazenda da Aeronáutica de Pirassununga, pelo apoio, por serem sempre muito prestativos, por toda a ajuda, conversas e risadas.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Romero Corrêa e seus pós-graduandos, por toda a ajuda prestada, pelo empréstimo de materiais, pelas conversas e risadas.

À Aymara Eduarda de Lima, amiga que a pós graduação me deu, por toda a ajuda, apoio nos momentos difíceis, ensinamentos, conversas e risadas.

À minha amiga e companheira de equipe, Bruna Stanigher Barbosa, pela amizade, por todos os momentos de tristeza e alegria compartilhados, por todo o apoio, companheirismo e ajuda durante todos esses anos.

Aos amigos e companheiros de equipe, Fábio Sellera, Ronaldo Gomes Gargano, Philipe Luz Pereira, por toda ajuda, ensinamentos e risadas.

Aos novos membros da equipe, Michel, Victória e Eduardo, por toda ajuda e companheirismo.

A todos os residentes do Hospital de Ruminantes da FMVZ-USP e FZEA-USP que me ajudaram na execução desse trabalho.

A toda equipe do CECSBE, por toda a ajuda na execução do experimento, pelos ensinamentos, cafés e companheirismo. Estendo meus agradecimentos também ao Sr. João Metzner, funcionário do Laboratório do VPS em Pirassununga, por todos os ensinamentos e ajuda no laboratório.

Ao Lincoln Neves, pela ajuda com a estatística.

A todos da Coordenadoria de Defesa Agropecuária Regional de Piracicaba pelo apoio nessa dupla jornada.

A todos os amigos e familiares que sempre me apoiaram.

A todos que de alguma forma me ajudaram na execução deste trabalho e a trilhar este caminho, meu muito obrigada.

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

RESUMO

REIS, G. A. **Claudicação em vacas prenhes** – influências no desenvolvimento neonatal e na morfometria cerebral de bezerros após o nascimento. 2024. 76 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2024.

A claudicação é apontada como a terceira maior causa de perdas econômicas na bovinocultura leiteira e é considerada atualmente como um dos principais indicadores de prejuízo no bem-estar dos bovinos. Portanto, quando esta condição é vivenciada durante a gestação, torna-se um dos agentes causadores de estresse pré-natal. Estudos em outras espécies observaram alterações cognitivas e comportamentais de animais oriundos de gestações estressantes, sendo estas associadas a alterações nas estruturas corticolímbicas envolvidas na regulação da emoção e na função do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, incluindo alterações na morfologia e densidade de espinhos dendríticos, neurogênese e volume dessas estruturas. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ocorrência de alterações na morfometria cerebral de bezerros após o nascimento e no desenvolvimento de bezerras, causadas pela claudicação durante a gestação. Para isso, 57 vacas Holandesas multíparas foram acompanhadas desde o dia do exame de diagnóstico de gestação até o parto, realizando-se semanalmente a avaliação do escore de locomoção (vacas com e sem claudicação intensa). No terço final da gestação foram realizadas coletas de amostras de sangue, para avaliação hematológica, e de saliva, para mensuração da concentração do cortisol. Após o nascimento, o peso corporal e a altura de cernelha foram mensurados em todos os bezerros, machos (N = 20) e fêmeas (N = 35). As fêmeas foram acompanhadas por meio de mensuração do peso vivo aos 30 e 60 dias de idade e no dia do desmame, também foram calculados a duração da gestação e o tempo até o desmame. Para a análise das estruturas cerebrais, foi realizada a eutanásia de 10 bezerros machos e coleta dos encéfalos, os quais foram perfundidos com solução de formaldeído previamente à coleta. O volume total dos encéfalos foi determinado por meio do deslocamento volumétrico de coluna de líquido e, por meio de ressonância magnética dos encéfalos, foi realizada mensuração digital dos volumes das seguintes estruturas cerebrais: hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal. Não foram encontradas diferenças significativas entre os parâmetros avaliados no presente

estudo, entretanto houve a constatação de padrões semelhantes aos descritos em literatura como menor volume das estruturas cerebrais (diminuição de até 29%), maior tempo até o desmame, menor peso vivo ao nascimento e menor duração da gestação em bezerros provenientes de vacas que apresentaram claudicação durante a gestação. Sendo assim, conclui-se que, apesar de não ter ocorrido alterações significativas nos parâmetros avaliados, são necessárias mais investigações para confirmar os achados deste estudo e avaliar as consequências do estresse pré-natal no desenvolvimento cerebral e na vida adulta dos bezerros.

Palavras-chave: Bem-estar animal. Bovinos. Estresse pré-natal. Afecções podais. Encéfalo.

ABSTRACT

REIS, G. A. **Lameness in pregnant cows** – influences on neonatal development and brain morphometry of calves after birth. 2024. 76f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2024.

Lameness is considered to be the third biggest cause of economic losses in dairy farming and is currently considered to be one of the main indicators of welfare problems in cattle. Therefore, when this condition is experienced during pregnancy, it becomes one of the agents causing prenatal stress. Studies in other species have observed cognitive and behavioral changes in animals from stressful pregnancies, which are associated with changes in corticolimbic structures involved in emotion regulation and in the function of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, including changes in the dendritic spines morphology and density, neurogenesis and volume of these structures. Therefore, the aim of this study was to evaluate the occurrence of changes in the brain morphometry of calves after birth and in the development of heifers, caused by lameness during pregnancy. To this end, 57 multiparous Holstein cows were monitored from the day of the pregnancy diagnosis test until calving, with a weekly assessment of the locomotion score (cows with and without severe lameness). In the final third of pregnancy, blood samples were taken for hematological evaluation and saliva samples for measuring cortisol concentration. After birth, body weight and height were measured in all calves, males (N = 20) and females (N = 35). The females were monitored by measuring their body weight at 30 and 60 days of age and on the day of weaning, the gestation length and the time until weaning were also calculated. To analyze the brain structures, 10 male calves were euthanized and their brains were collected, which were perfused with formaldehyde solution prior to collection. The total volume of the brains was determined using volumetric displacement of the liquid column and, using magnetic resonance imaging of the brains, the volumes of the following brain structures were digitally measured: hippocampus, amygdala and prefrontal cortex. No significant differences were found between the parameters assessed in this study, but there were patterns similar to those described in the literature, such as lower volume of brain structures (a decrease of up to 29%), longer time to weaning, lower live weight at birth and shorter gestation length in calves from cows that had lameness during pregnancy. It is

therefore concluded that, although there were no significant changes in the parameters evaluated, further research is needed to confirm the findings of this study and assess the consequences of prenatal stress on the brain development and adult life of calves.

Keywords: Animal welfare. Cattle. Prenatal stress. Claw diseases. Brain.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ressonância nuclear magnética dos encéfalos	39
Figura 2 - Mensuração da área na imagem de ressonância nuclear magnética e reconstrução em 3D do volume da região do córtex pré-frontal	40
Figura 3 - Pesagem (A) e mensuração do volume (B) do encéfalo	42
Figura 4 - Encéfalo imerso em solução de sacarose	58
Figura 5 - Dissecção da artéria carótida e veia jugular	58
Figura 6 - Corte do encéfalo na região do lobo frontal	59
Figura 7 - Secção do lobo frontal em micrótomo de deslizamento	60
Figura 8 - Confecção da lâmina com uma secção do lobo frontal do cérebro do bezerro	60
Figura 9 - Método de coloração de Nissl. (A) Lâmina com secção do encéfalo antes da coloração. (B) Bateria de cubas contendo os reagentes. (C) Lâmina após o procedimento	61
Figura 10 - Secção do encéfalo ao microscópio. (A) Observação dos neurônios com aumento de 40X. (B) Observação dos neurônios com aumento de 100X. (C) Observação dos neurônios com aumento de 400X	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média \pm erro padrão da média do Brix do colostro (%) de vacas com EL \leq 2 (G1) e de vacas com EL \geq 3 (G2)	44
Tabela 2 - Média \pm erro padrão da média da duração da gestação de vacas com EL \leq 2 (G1) e de vacas com EL \geq 3 (G2)	44
Tabela 3 - Média \pm erro padrão da média da concentração de cortisol salivar (pg/ μ L) de vacas com EL \leq 2 (G1) e de vacas com EL \geq 3 (G2) durante a gestação nos diferentes momentos de análise	45
Tabela 4 - Média \pm erro padrão da média da concentração de cortisol salivar (pg/ μ L) de vacas com EL \leq 2 (G1) e de vacas com EL \geq 3 (G2) no momento da coleta nos diferentes momentos de análise	45
Tabela 5 - Média \pm erro padrão da média dos parâmetros hematológicos de vacas com EL \leq 2 (G1) e de vacas com EL \geq 3 (G2) durante a gestação nos diferentes momentos de análise	49
Tabela 6 - Média \pm erro padrão da média dos parâmetros hematológicos de vacas com EL \leq 2 (G1) e de vacas com EL \geq 3 (G2) momento da coleta nos diferentes momentos de análise	50
Tabela 7 - Média \pm erro padrão da média do peso vivo ao nascimento (kg) de bezerros filhos de vacas com EL \leq 2 (G1) e de vacas com EL \geq 3 (G2)	53
Tabela 8 - Média \pm erro padrão da média da altura de cernelha (cm) ao nascimento de bezerros filhos de vacas com EL \leq 2 (G1) e de vacas com EL \geq 3 (G2)	53
Tabela 9 - Média \pm erro padrão da média do peso vivo de bezerras filhas de vacas com EL \leq 2 (G1) e de vacas com EL \geq 3 (G2) nos diferentes momentos de análise	53
Tabela 10 - Média \pm erro padrão da média do Brix sérico (%) no soro de bezerras filhas de vacas com EL \leq 2 (G1) e de vacas com EL \geq 3 (G2)	54
Tabela 11 - Média \pm erro padrão da média do tempo (dias) até o desmame de bezerras filhas de vacas com EL \leq 2 (G1) e de vacas com EL \geq 3 (G2)	55
Tabela 12 - Média \pm erro padrão da média do peso encefálico (g) de bezerros filhos de vacas com EL \leq 2 (G1) e de vacas com EL \geq 3 (G2)	61

Tabela 13 - Média \pm erro padrão da média dos volumes (cm^3) do encéfalo, do hipocampo, da amígdala e do córtex pré-frontal de bezerros filhos de vacas com $\text{EL} \leq 2$ (G1) e de vacas com $\text{EL} \geq 3$ (G2)	62
Tabela 14 - Média \pm erro padrão da média da razão entre o volume (cm^3) do hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal e o volume (cm^3) encefálico de bezerros filhos de vacas com $\text{EL} \leq 2$ (G1) e de vacas com $\text{EL} \geq 3$ (G2)	62

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Escore de locomoção (EL) utilizado nas vacas avaliadas	34
Quadro 2 -	Momentos e parâmetros avaliados nas vacas matrizes	35
Quadro 3 -	Momentos e parâmetros avaliados nos bezerros	41

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

CAEP	Centro de Apoio ao Ensino e Pesquisa
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
ECC	Escore de condição corporal
EDTA	Ethylenediamine tetra acetic acid (ácido etilenodiamino tetra-acético)
EJ	Escore de jarrete
ES	Escore de sujidade
FAYS	Fazenda da Aeronáutica de Pirassununga
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
FZEA	Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
G1	Grupo 1
GB1	Grupo de Bezerros 1
G2	Grupo 2
GB2	Grupo de Bezerros 2
Hb	Concentração de hemoglobina
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
He	Contagem de Hemácias
Ht	Hematócrito
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
Ig	Imunoglobulina
M0	Momento 0
M1	Momento 1
M2	Momento 2
M3	Momento 3

M4	Momento 4
M5	Momento 5
mRNA	Ácido Ribonucleico mensageiro
PIB	Produto Interno Bruto
RNM	Ressonância Nuclear Magnética
ROI	Região de Interesse
S	Sul
T	Tesla
UDCH	Unidade Didática Clínico-Hospitalar
UI	Unidade Internacional
USP	Universidade de São Paulo
VCM	Volume Corpuscular Médio
VPS	Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal
VR	Valor de Referência
W	Oeste
11 β -HSD-2	11 beta-hidroxiesteroide desidrogenase tipo 2

LISTA DE SÍMBOLOS

°	Grau
'	Minuto
"	Segundo
°C	Celsius
cm	Centímetro
dL	Decilitro
fL	Fentolitro
g	Grama
kg	Quilograma
L	Litro
mg	Miligramma
mL	Mililitro
mm	Milímetro
n	Número anos
pg	Picograma
μL	Microlitro
%	Por cento
T	Tesla
≥	Maior ou igual
>	Maior
≤	Menor ou igual
<	Menor
±	Mais ou menos
=	Igual
-	Menos

Sumário

1 INTRODUÇÃO	22
2 REVISÃO DE LITERATURA	25
3 JUSTIFICATIVA	31
4 OBJETIVOS	32
4.1 OBJETIVO GERAL	32
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
5 MATERIAL E MÉTODOS	33
5.1 SELEÇÃO E ACOMPANHAMENTO DOS ANIMAIS GESTANTES	33
5.2 AVALIAÇÃO DOS BEZERROS	36
5.3 AVALIAÇÃO DO MÉTODO DE COLETA E CONSERVAÇÃO DOS ENCÉFALOS	36
5.4 ANÁLISE DAS ESTRUTURAS CEREBRAIS	37
5.4.1 Ressonância Nuclear Magnética e Morfometria	37
5.5. OUTRAS AVALIAÇÕES	39
5.5.1. Avaliações hematológicas	39
5.5.2. Mensuração do cortisol salivar	40
5.5.3. Mensurações dos encéfalos	40
5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
6.1 AVALIAÇÃO DAS VACAS	43
6.2 AVALIAÇÃO DOS BEZERROS	51
6.3 AVALIAÇÃO DOS ENCÉFALOS	55
6.3.1 Sedação e transporte dos bezerros	55
6.3.2 Método de coleta e conservação	55
6.3.3 Mensurações dos encéfalos	61

7 CONCLUSÕES

67

REFERÊNCIAS

68

1 INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta atualmente o segundo maior rebanho bovino do mundo, possuindo mais de 234,3 milhões de cabeças. Destas, cerca de 15,7 milhões são de vacas ordenhadas no território nacional (IBGE, 2022).

Devido ao grande crescimento de sua produção nas últimas duas décadas, o Brasil se tornou um dos maiores fornecedores globais de *commodities*, tendo ainda mais potencial para crescimento nos próximos anos. A produção agrícola e pecuária brasileira apresenta grande importância na economia do país, tendo representado 8% do Produto Interno Bruto (PIB) no ano de 2021. A produção de produtos processados, tais como carnes frescas, refrigeradas e preparadas, laticínios, frutas e vegetais processados, cresceu 6,3% anualmente entre 2002 e 2021 (USDA, 2022).

Segundo projeções do Ministério da Agricultura e Pecuária (BRASIL, 2023), a produção de leite no Brasil apresentará uma taxa de crescimento de 1,7 a 2,7% nos próximos 10 anos.

O crescimento da oferta de leite em questão se dará principalmente em consequência da melhoria na produtividade dos animais e na gestão das propriedades produtoras de leite. Resultado de grandes mudanças pelas quais o setor está passando atualmente, apresentando um processo de tecnificação acelerado (BRASIL, 2023).

Com o rápido processo de tecnificação das propriedades produtoras de leite em busca de maior produtividade dos animais, a sanidade e o bem-estar animal são aspectos importantes que devem ser levados em consideração. Uma vez que, a ocorrência de uma enfermidade ou falha de manejo que gere estresse, por exemplo, pode acarretar grandes prejuízos ao diminuir a eficiência produtiva dos animais.

Manejos aversivos, observados frequentemente em propriedades de produção intensiva, estão correlacionados com o aumento do medo a humanos e possuem consequências indesejáveis para o bem-estar e a produtividade dos animais (RUSHEN et al., 1999).

Além disso, dentre os desafios enfrentados pelas vacas produtoras de leite, o comprometimento da saúde dos cascos, que conseqüentemente leva à claudicação, é apontado como a terceira maior causa de perdas econômicas no setor de bovinocultura (GUCCIONE et al., 2016). Esta condição é especialmente

relevante para o comprometimento do bem-estar em bovinos de leite pois, além dos resultados negativos que gera na produção animal, a prolongada experiência dolorosa determina forte estado de estresse (GALINDO; BROOM, 2002; GREEN et al., 2010; TADICH, 2011; BOND et al., 2012). Desta forma, a claudicação é considerada atualmente como um dos principais indicadores de prejuízo no bem-estar dos animais leiteiros (WHAY et al., 2003).

Bovinos com claudicação demonstram menor limiar nociceptivo, isto é, aumento da hiperalgesia, que por sua vez varia diretamente de acordo com a intensidade da claudicação (TADICH et al., 2013). Segundo estudos realizados com ovinos e bovinos (LEY et al., 1989, 1992, 1994, 1995, 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, podendo persistir por até meses, mesmo após o tratamento e a resolução macroscópica da lesão podal, envolvendo desta forma o sistema nervoso e endócrino do animal em resposta à dor crônica. Portanto, a existência de lesões podais graves determina o surgimento de intensa e prolongada sensação dolorosa (hiperalgesia), mesmo após o tratamento ser instituído e concluído.

Estudos indicam ainda que fatores estressantes presentes em criações de animais tais como manejo aversivo, ambiente ruim, temperaturas extremas, 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 (MERLOT et al., 2008; GRÄBNER et al., 2009; ARNOTT et al., 2012; TAO et al., 2012, 2013; OTTEN et al., 2015).

O período pré-natal é de suma importância e determina como um indivíduo responderá ao ambiente e as diversas situações ao longo da vida, fato comprovado em estudos realizados em diversas espécies. O encéfalo em desenvolvimento e outros sistemas fisiológicos apresentam-se especialmente sensíveis à programação pré-natal, colaborando com a hipótese de que essa plasticidade representa um mecanismo de adaptação do feto ao ambiente pós-parto. Portanto, quando o indivíduo é afetado por algum estímulo negativo no período pré-natal, poderão ocorrer transtornos a longo prazo em sua vida (WELBERG; SECKL, 2001; FOWDEN et al., 2006; MERLOT et al., 2008; OTTEN et al., 2010; ARNOTT et al., 2012).

Contudo, ainda existem poucos estudos sobre o tema em animais de produção, principalmente bovinos, e ainda menos que incluíram a claudicação como

fator de estresse e medidas anatômicas cerebrais na prole a fim de avaliar as consequências do estresse pré-natal.

Desta forma, considerando o impacto negativo a longo prazo causado pelo estresse no período pré-natal, já comprovado por pesquisas em diversas espécies, e a escassez de estudos sobre as alterações causadas por ele no desenvolvimento de bezerros, formulou-se a hipótese de que a claudicação, caracterizada como uma manifestação dolorosa intensa e prolongada, quando vivenciada durante a gestação em bovinos, irá se tornar um dos agentes causadores de estresse pré-natal, afetando negativamente o desenvolvimento, o comportamento e a adaptação de bezerros neonatos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O período pré-natal possui grande importância na definição de como um indivíduo responderá a diversos estímulos ao longo de sua vida. Já foi descrito em humanos e outras espécies animais que o estresse durante a gestação, também chamado de estresse pré-natal, causa efeitos determinantes na prole (BRAASTAD, 1998; BARKER, 2004; CHARIL et al., 2010; GLOVER, 2011). Em animais de produção, por sua vez, o estresse durante este período vem sendo estudado e ganha cada vez mais importância devido a significativas consequências produtivas causadas por ele.

Durante um evento estressante, hormônios como adrenalina e glicocorticóides são lançados na corrente sanguínea, causando uma cadeia de reações no corpo de qualquer indivíduo. Tanto em humanos como em animais, o efeito dessas substâncias liberadas durante situações de estresse vem sendo amplamente investigado. Pesquisadores constataram, ainda, que eventos estressantes, quando experimentados por fêmeas gestantes, produzem mudanças no ambiente intrauterino e, conseqüentemente, resultados negativos sobre a emotividade e os substratos neurais da prole, podendo perdurar por toda a vida adulta (BAKKER et al., 1995; CHARIL et al., 2010; GLOVER et al., 2011).

Os glicocorticóides possuem grande importância no desenvolvimento normal dos órgãos fetais durante uma gestação. Entretanto, o aumento do nível dessas substâncias no organismo de gestantes pode afetar o desenvolvimento de regiões do encéfalo, como o hipocampo, e as funções do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Para proteger o feto de níveis elevados de glicocorticóides, a enzima placentária 11 beta-hidroxiesteróide desidrogenase (11β -HSD-2) possui um papel importante, constituindo o principal sistema protetor da placenta, inativando o cortisol, convertendo-o em cortisona. Portanto, uma falha nesse sistema torna este um dos possíveis causadores de alterações negativas na programação fetal (SECKL; HOLMES, 2007; MOISIADIS; MATTHEWS, 2014; RICHETTO; RIVA, 2014).

Evidências de que a programação fetal é influenciada por situações adversas vivenciadas durante a gestação têm sido demonstradas em pesquisas realizadas em humanos, nas quais o estresse pré-natal foi associado ao desenvolvimento de transtornos na infância e idade adulta como síndrome

metabólica, baixo peso ao nascimento, alteração no crescimento, metabolismo e no sistema imunológico, além de alterações emocionais, comportamentais e cognitivas (KOENIG et al., 2002; SECKL & MEANEY, 2006; VAN DEN BERGH et al., 2007; VILTART & VANBESIEN-MAILLIOT, 2007; GUEST et al., 2012).

Estudos sobre estresse pré-natal, realizados em animais após situações como desnutrição, infecções ou experiências estressantes, também demonstraram que um ambiente adverso vivenciado pelas fêmeas durante a gestação tem efeitos na programação fetal, podendo alterar os sistemas fisiológicos e o comportamento da prole em sua vida inicial ou tardia (CHARIL et al., 2010; OTTEN et al., 2015). Comprovou-se que, semelhante ao que ocorre em humanos, existem consequências a longo prazo na sensibilidade à insulina, função cardiovascular, na atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e nos sistemas de neurotransmissores cerebrais, nas funções imunológicas e no comportamento da prole de animais (VILTART & VANBESIEN-MAILLIOT, 2007; MERLOT et al., 2008; CHARIL et al., 2010; OTTEN et al., 2015).

O estresse pré-natal afeta o desenvolvimento fetal direta e indiretamente por duas vias principais: via regulação hormonal ou via modificação da morfologia placentária. No primeiro caso, catecolaminas e glicocorticóides atuam na expressão gênica do feto pelas alterações no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, já no segundo caso, há alteração no número e tamanho dos cotilédones. Ambos os mecanismos foram observados em ovinos e caprinos comprometendo a resposta imune, a sobrevivência e o desenvolvimento fetal durante a gestação e ao longo de sua vida, além de alteração no comportamento materno em relação à prole após o parto (ROUSSEL et al., 2005, 2006; MELORT et al., 2008; COULON et al., 2011).

Como se sabe, o manejo aversivo, que pode ser observado em propriedades de produção intensiva, associado a outros fatores também estressantes tais como o ambiente ruim, temperaturas extremas, enfermidades e o estresse psicossocial influenciam negativamente fêmeas gestantes e causam distúrbios durante o desenvolvimento fetal (RUSHEN et al., 1999; MERLOT et al., 2008; GRÄBNER et al., 2009; ARNOTT et al., 2012; TAO & DAHL, 2013; OTTEN et al., 2015).

Coulon e colaboradores (2011), por meio do teste de aproximação humana e teste do objeto novo com susto, demonstraram que cordeiros oriundos de ovelhas manejadas de forma aversiva apresentaram mais medo do que aqueles nascidos de

ovelhas manejadas de forma gentil. Participando da mesma linha de pesquisa, Hild e colaboradores (2011) observaram que ovelhas que faziam parte do grupo de manejo aversivo passaram mais tempo cuidando de sua prole durante as duas horas após o nascimento.

Estudos realizados em ovinos, caprinos, bovinos e suínos mostraram efeitos do estresse pré-natal sobre a realidade emocional da prole (LAY et al., 1997a; ROUSSEL et al., 2005, 2006; JARVIS et al., 2006), usando como fatores de estresse o isolamento, transporte repetitivo ou eventos semanais de interrupção social. Outras pesquisas desenvolvidas com essas mesmas espécies constataram que o manejo estressante de fêmeas prenhes, tem efeito prejudicial a esta e ao feto, acarretando menores índices produtivos e reprodutivos, além de comprometimento das funções imunes, metabólicas e cognitivas na vida adulta da prole (HILD et al., 2011; ARNOTT et al., 2012; TAO et al., 2012; COULON et al., 2013; BAXTER et al., 2016).

Otten e colaboradores (2015) destacam que os resultados encontrados nas pesquisas analisadas em seu artigo de revisão indicam como o estresse pré-natal pode prejudicar o crescimento, a adaptabilidade fisiológica, a saúde e o comportamento na vida tardia de suínos, tendo implicações econômicas e também no bem estar animal.

Em vacas, eventos estressantes possuem um papel importante na implantação embrionária, no desenvolvimento da placenta e no crescimento fetal. De acordo com o momento em que um evento adverso ocorre, este impacta diretamente no equilíbrio de citocinas do trato reprodutivo e no ambiente intra uterino, interferindo na programação, plasticidade e adaptação embrionária (ROBERTSON et al., 2015, 2018).

Diminuição de peso e tamanho da prole já foram relatados em diversas espécies como sendo consequência de falha da enzima 11β -HSD-2 ou devido a altas concentrações de glicocorticóides circulantes durante a gestação. Em estudos nos quais fêmeas gestantes recebiam doses de glicocorticóides, constatou-se que estes e as citocinas intervêm no processo de crescimento da prole, apresentando menor peso ao nascer (LINDSAY et al., 1996; SECKL, 2004; KRANENDONK et al., 2006).

Observou-se que o estresse durante a gestação possui efeitos negativos sobre a ontogênese do feto de suínos, ovinos e humanos devido a sua atuação em

neurotransmissores cerebrais, bem como em habilidades cognitivas da prole, além de aumentar o risco de doenças cardiovasculares, hipertensão, resistência à insulina e síndrome metabólica (GRÄBNER et al., 2009; GLOVER, 2011).

As alterações cognitivas e comportamentais observadas em ratos oriundos de gestações estressantes foram associadas a alterações nas estruturas corticolímbicas envolvidas na regulação da emoção (córtex pré-frontal e hipocampo) e na função do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, incluindo alterações na morfologia e densidade dos espinhos dendríticos no hipocampo e córtex pré-frontal (MURMU et al., 2006; MYCHASIUK et al., 2012).

A exposição fetal a altos níveis de cortisol altera o desenvolvimento de neurônios no cérebro e resulta em tamanhos menores de hipocampo (SZURAN et al., 1994; HAYASHI et al., 1998; AVISHAI-ELINER et al., 2002; SCHMITZ et al., 2002; COE et al., 2003). Em estudos utilizando ressonância magnética em encéfalos de macacos Rhesus, Coe et al. (2002; 2003) e Uno et al. (1994) encontraram, respectivamente, alteração no volume do corpo caloso (diminuição em machos e aumento em fêmeas) e diminuição em aproximadamente 30% do volume do hipocampo na prole de fêmeas estressadas.

O estresse pré-natal causa uma cascata de respostas fisiológicas e moleculares na fêmea gestante capaz de reprogramar epigeneticamente genes envolvidos no desenvolvimento de neurocircuitos de estresse na prole. Produzindo modificações como aumento dos níveis basais de glicocorticóides, alterações na reatividade ao estresse (maiores aumentos na concentração de cortisol após um estressor), além de recuperação mais lenta após o estresse (secreção prolongada induzida pelo evento estressante), diminuição da expressão de receptores de glicocorticóides e diminuição do número de neurônios no hipocampo, alteração de aprendizagem espacial e na memória (UNO et al., 1990, 1994; BALE, 2015).

Estudos em diversas espécies demonstram que o estresse pré-natal pode causar efeitos estruturais e funcionais no sistema límbico e no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal da prole. Observou-se que eventos estressantes ocorridos no meio e final da gestação causam ativação neuronal no encéfalo da prole, demonstrada pela expressão aumentada do mRNA do gene c-fos (SCHWERIN et al., 2005; OTTEN et al., 2010, 2015).

O estresse social em porcas gestantes mostrou ser determinante no aumento da expressão do mRNA do hormônio liberador de corticotropina e na

alteração da proporção de receptores deste hormônio na amígdala, região envolvida nas respostas comportamentais ao estresse, incluindo ansiedade e medo (JARVIS et al. 2006; RUTHERFORD et al. 2014).

Segundo Otten e colaboradores (2015), o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e o sistema límbico, principalmente hipocampo e amígdala, são especialmente sensíveis à concentração alterada de cortisol. Animais provenientes de gestações com eventos adversos, que causam estresse pré-natal, apresentam em geral maior atividade e alteração na regulação do feedback do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, maior ativação do sistema nervoso simpático e alterações no sistema límbico, tornando-se uma prole mais ansiosa e com aumento da reatividade emocional.

Em ruminantes, Coulon et al. (2013) e Petit et al. (2015) demonstraram haver alterações morfológicas e funcionais em neurônios corticolímbicos de ovinos submetidos a estresse pré-natal. Verificou-se nestes estudos que cordeiros provenientes de ovelhas estressadas no último trimestre de gestação apresentaram alteração na expressão de genes envolvidos na morfologia dendrítica neuronal e transmissão sináptica, além de aumento da densidade dos espinhos dendríticos e alteração de sua morfologia. Sendo assim, o ambiente uterino é extremamente importante no desenvolvimento dos órgãos e tecidos fetais.

Já em suínos, Sarmiento e colaboradores (2021a, 2021b) demonstraram que a claudicação durante a gestação afeta o ganho de peso, o limiar nociceptivo e o comportamento da prole. Leitões provenientes de fêmeas que vivenciam a dor como estresse pré-natal, são mais agressivos, aumentando o número de lesões cutâneas no grupo em que estão inseridos, demonstram reatividade alterada durante os testes de medo e menor vocalização.

Com grande importância também na bovinocultura, o comprometimento da saúde dos cascos, que conseqüentemente leva à claudicação, é apontado como a terceira maior causa de perdas econômicas neste setor. Possuindo origem multifatorial, a claudicação é considerada atualmente como um dos principais indicadores de prejuízo no bem estar dos animais leiteiros, pois além de resultados negativos na produtividade, a prolongada experiência dolorosa determina forte estado de estresse (GREENOUGH, 1996; WHAY et al., 1998, 2003; GALINDO; BROOM, 2002; GREEN et al., 2010; TADICH, 2011; BOND et al., 2012; GUCCIONE et al., 2016).

Portanto, a experiência dolorosa causada por lesões de casco sendo vivenciada durante a gestação, pioram ainda mais o bem estar desses animais, se tornando um dos agentes causadores de estresse pré-natal. Tal estado pode resultar em respostas fisiológicas e moleculares que causam por sua vez alterações epigenéticas que afetam o desenvolvimento da prole.

Barbosa (2022), pesquisando a influência do estresse pré-natal na resposta a dor em bezerras descornadas com ferro quente, demonstrou que houve redução do limiar nociceptivo da pele de bezerras descornadas provenientes de vacas com claudicação durante a gestação, constatando a influência negativa que a dor em vacas prenhes pode exercer sobre a modulação da sensibilidade dolorosa na vida destes animais.

Estudos demonstram que o estresse e as respostas do organismo frente a essa condição enfrentada durante a gestação alteram o desenvolvimento de estruturas cerebrais da prole, principalmente as responsáveis pelas emoções, memória e comportamento social (CHARIL et al., 2010). Entretanto, há uma escassez de estudos principalmente em animais como os bovinos, que demonstrem quais seriam as alterações causadas pelo estresse pré-natal no desenvolvimento do encéfalo dos bezerras e conseqüentemente em seu comportamento (ARNOTT et al., 2012).

Com estas evidências pode-se afirmar, portanto, que, além de fatores genéticos, diversos eventos ambientais, o manejo e alterações de saúde dos animais durante a gestação podem causar estresse. Este por sua vez atua sobre a programação e desenvolvimento fetal, predispondo a prole a doenças ao longo da vida (BAKKER et al., 1995, 1998; MERLOT, et al., 2008; MADER et al., 2014).

3 JUSTIFICATIVA

Frente à atual intensificação do sistema de produção de leite no Brasil, torna-se fundamental a constante busca de melhorias nos cuidados com animais de produção de modo a assegurar a saúde e o bem-estar animal. Pesquisas já demonstraram o impacto negativo do estresse no período pré-natal em outras espécies, porém estudos sobre as alterações causadas por este no encéfalo e no desenvolvimento pós-parto de ruminantes são escassos, especialmente em bovinos, o que justifica a realização deste trabalho.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar as alterações que a claudicação durante a gestação, considerada um estresse pré-natal, de vacas da raça Holandesa pode causar no encéfalo de bezerros e no desenvolvimento de bezerras.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar e comparar o tempo de duração da gestação, concentração de cortisol salivar, hemograma e a concentração indireta de imunoglobulinas no colostro de vacas da raça Holandesa com e sem claudicação durante a gestação.
- Avaliar e comparar o peso, a altura de cernelha, a concentração indireta de imunoglobulinas séricas e o tempo decorrido até o desmame, de bezerros oriundos de vacas da raça Holandesa com e sem claudicação no período pré-natal.
- Avaliar e comparar alterações do volume encefálico e do volume do hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal do cérebro de bezerros oriundos de vacas da raça Holandesa com ou sem claudicação no período pré-natal.

5 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), sob o protocolo nº 7697170718.

5.1 SELEÇÃO E ACOMPANHAMENTO DOS ANIMAIS GESTANTES






Foram selecionadas 57 vacas multíparas, da raça Holandesa, pertencentes à granja leiteira da Academia da Força Aérea (FAYS), localizada no município de Pirassununga, Estado de São Paulo (21°55'50.20"S, 47°21'14.71"W). Estes animais foram acompanhados desde o diagnóstico de gestação, com aproximadamente 45 dias de prenhez, até o final da mesma. As vacas foram avaliadas semanalmente por meio da determinação do escore de locomoção (EL), proposto por Sprecher et al. (1997) (Quadro 1).

Os animais foram separados em dois grupos de acordo com o escore de locomoção (EL) conforme as condições a seguir:

- G1: 21 vacas com $EL \leq 2$ – vacas que não apresentaram $EL > 2$ em nenhuma avaliação semanal;
- G2: 36 vacas com $EL \geq 3$ – vacas que apresentaram ao menos uma vez $EL \geq 3$ durante as avaliações semanais.

Durante o período observado, na ocorrência de um episódio de $EL \geq 3$, o animal era classificado como G2. Após a identificação da claudicação, os animais acometidos recebiam os cuidados necessários realizados por funcionários treinados da propriedade.

Quadro 1 - Escore de Locomoção (EL) utilizado nas vacas avaliadas

Escore	Classificação	Postura	Características
1	Normal		Dorso plano quando parada e em movimento; Marcha normal
2	Claudicação Leve		Dorso plano quando parada e leve arqueamento quando em movimento; Marcha normal
3	Claudicação Moderada		Dorso arqueado quando parada e em movimento; Marcha afetada, com encurtamento do movimento de um ou mais membros
4	Claudicação Evidente		Dorso evidentemente arqueado; Marcha afetada, realiza um passo de cada vez e favorece um ou mais membros
5	Claudicação Grave		Dorso evidentemente arqueado; Demonstra muita dificuldade em se locomover e evita o apoio em um ou mais membros

Fonte: Reis (2024). Adaptado de SPRECHER et al. (1997) e Zinpro Locomotion Scoring and Treatment of Dairy Cattle

https://www.zinpro.com/wp-content/uploads/2023/06/Dairy_Cattle_Locomotion_Scoring_Treatment-1.pdf

Após serem transferidas para o piquete pré-parto, aproximadamente 60 dias antes da data prevista de parto, o EL foi avaliado semanalmente e foram coletadas amostras de sangue para realização do hemograma e amostras de saliva para determinação da concentração de cortisol.

Após o parto, foi realizada a mensuração da quantidade indireta de imunoglobulinas existentes no colostro produzido pelas vacas acompanhadas por meio do refratômetro de Brix, conforme descrito por Quigley e colaboradores (2013), e a duração da gestação foi calculada conforme intervalo de dias entre a data da inseminação artificial e a data do parto.

Quadro 2 – Momentos e parâmetros avaliados nas vacas matrizes

VACAS (N=57)			
Grupos	Momento	Período	Avaliações
G1 - EL \leq 2 (21 vacas) e G2 - EL \geq 3 (36 vacas)	M5	A partir do diagnóstico de gestação	EL
	M4	4 semanas antes do parto	EL, hemograma e cortisol salivar
	M3	3 semanas antes do parto	
	M2	2 semanas antes do parto	
	M1	1 semana antes do parto	
	M0	Parto	Brix do colostro

Fonte: Reis (2023).

5.2 AVALIAÇÃO DOS BEZERROS

Após o parto das 57 vacas, houve o óbito de dois bezerros e, portanto, os bezerros remanescentes, sendo 20 machos e 35 fêmeas, foram separados em dois grupos conforme a classificação dos grupos das vacas matrizes:

- GB1: 19 bezerros (12 fêmeas e sete machos);
- GB2: 36 bezerros (23 fêmeas e 13 machos).

Logo após o nascimento, os bezerros machos (N = 20) e fêmeas (N = 35) foram pesados (kg) e a altura da cernelha (cm) foi mensurada.

As bezerras foram pesadas novamente aos 30 e 60 dias de vida e no momento do desmame. A mensuração da concentração indireta de imunoglobulinas séricas foi realizada em até 24 horas após o nascimento, utilizando-se o refratômetro de Brix, conforme Deelen e colaboradores (2014), e o “tempo até o desmame” foi calculado conforme intervalo entre a data de nascimento e a data em que foi realizado o desmame do animal.

5.3 AVALIAÇÃO DO MÉTODO DE COLETA E CONSERVAÇÃO DOS ENCÉFALOS

Com o objetivo de se realizar a preservação das estruturas anatômicas do encéfalo para posterior análise destas, optou-se pela perfusão dos tecidos dos bezerros com solução de formaldeído. Por meio desta técnica seria possível a obtenção de amostras sem a presença de sangue, que poderia atrapalhar a realização de exames de imagem e microscopia.

Em conjunto com a equipe do Laboratório de Neuromodulação da Dor (ICB III/USP), sob responsabilidade da Profa Dra Camila Squarzoni Dale, discutiu-se a melhor maneira de se realizar a perfusão do encéfalo dos bezerros utilizando-se solução de formaldeído, para isso adaptou-se a metodologia já utilizada na perfusão do sistema nervoso de ratos. Frente à falta de descrição da técnica para bezerros na literatura, além da dificuldade do procedimento de fixação do encéfalo de maiores proporções e da coleta do mesmo, foi necessário realizar experimento para padronização da técnica antes de se realizar o estudo principal.

Para isso foram utilizados três bezerros machos da raça Holandesa, para se treinar e padronizar a melhor forma de perfundir o encéfalo dos mesmos. Foram avaliados o protocolo de anestesia para transporte do animal ao Centro de Apoio ao Ensino e Pesquisa (CAEP) da FMVZ/USP, no campus Fernando Costa, em Pirassununga/SP e o procedimento de perfusão, coleta e fixação dos encéfalos.

Para verificação do sucesso do experimento e padronização da técnica, o encéfalo fixado foi transportado ao Laboratório de Neuromodulação da Dor (ICB III/USP) para processamento no local, por meio de corte no micrótomo e posterior confecção de lâminas para histologia.

5.4 ANÁLISE DAS ESTRUTURAS CEREBRAIS

Para o estudo anatômico macroscópico de estruturas cerebrais foi realizada a eutanásia de 10 bezerros, oriundos das vacas selecionadas, em até um dia após o nascimento, conforme anexo da Resolução Normativa nº 37 que dispõe sobre a diretriz da prática de eutanásia do CONCEA, utilizando-se o seguinte protocolo: acepromazina (0,2 mg/kg); xilazina (0,3 mg/kg); tiopental sódico (4 a 5 mg/kg) e cloreto de potássio 19,1% (75 a 150 mg/kg), aplicados estritamente nessa ordem e pela via intravenosa.

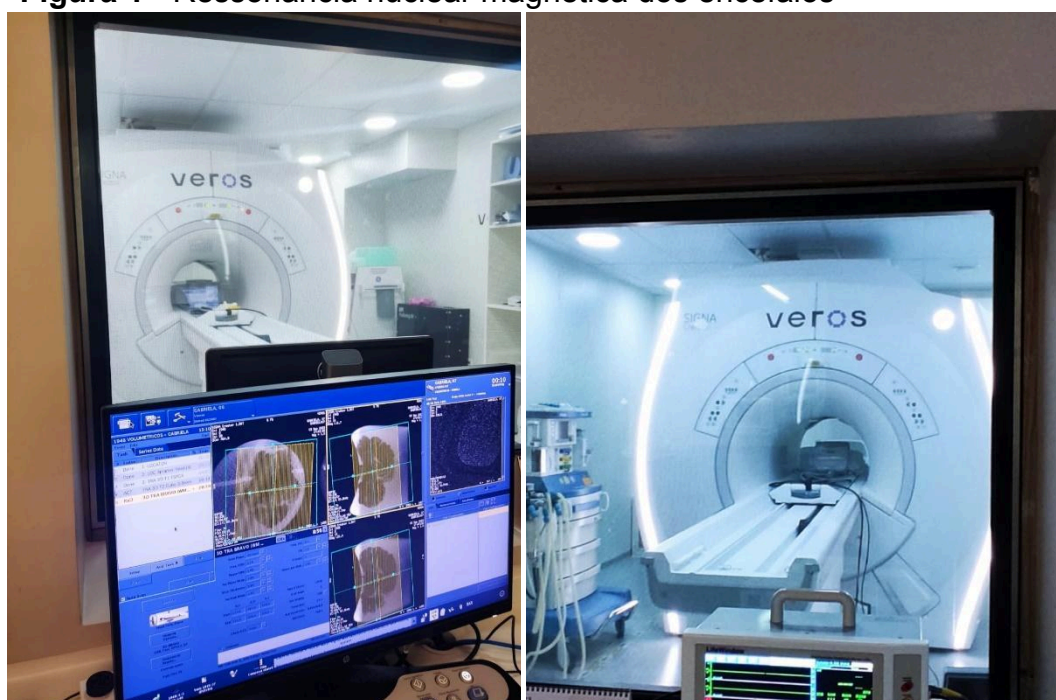
Após a eutanásia, foi realizado o procedimento de perfusão com solução de formaldeído 12,5%, de acordo com os resultados encontrados através do experimento para a padronização da técnica de preservação do encéfalo, citado anteriormente e descrito na seção 6.3.2 dos RESULTADOS E DISCUSSÃO desta Tese.

5.4.1 Ressonância Nuclear Magnética e Morfometria

O exame de ressonância nuclear magnética (RNM) foi realizado em parceria com o Hospital Veterinário Veros, localizado em São Paulo/SP. As imagens foram adquiridas em aparelho GE Sigma Creator de 1,5 T (Figura 1) no plano transversal, sendo aquisições volumétricas em T1 de 0.8 mm e em T2 de 2.0 mm.

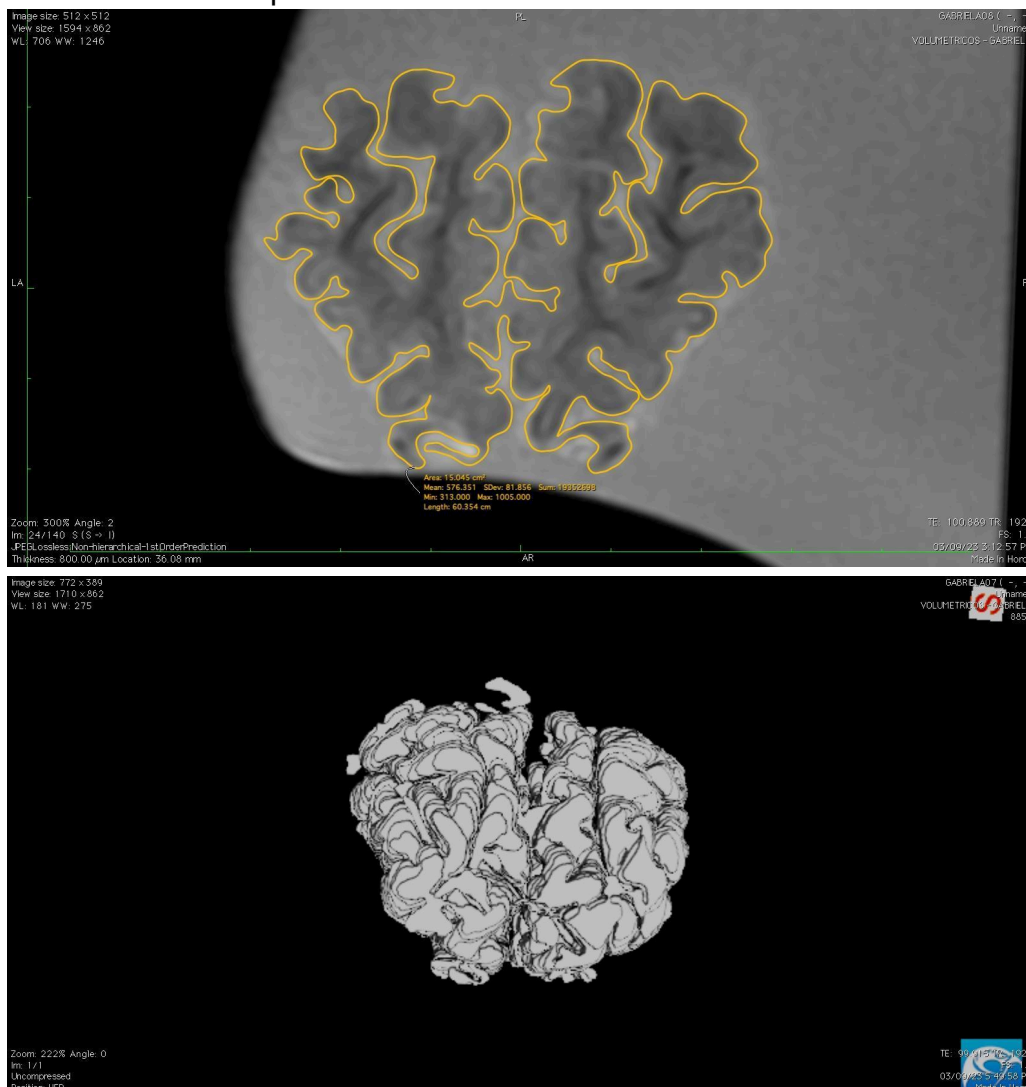
As imagens foram analisadas utilizando-se o Software Horos, no qual regiões cerebrais como o hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal foram localizadas conforme descritos por Schmidt et al. (2009), DeLahunta; Glass (2009) e Prada (2014). A área de cada região foi demarcada manualmente em cada imagem, sendo denominadas como região de interesse (ROI) para posterior reconstrução do volume (cm^3) das estruturas através do software (Figura 2).

Figura 1 - Ressonância nuclear magnética dos encéfalos



Fonte: Reis (2023).

Figura 2 - Mensuração da área na imagem de ressonância nuclear magnética e reconstrução em 3D do volume da região do córtex pré-frontal



Fonte: Reis (2023).

5.5. OUTRAS AVALIAÇÕES

5.5.1. Avaliações hematológicas

Amostras de sangue das vacas matrizes foram coletadas por meio de punção da veia coccígea utilizando-se sistema Vacutainer® em tubos com EDTA tripotássico, destinados à determinação do hemograma.

O eritrograma e o número total de leucócitos foram determinados por meio de analisador automático (Mindray BC-2800 Vet) do laboratório da Unidade Didática Clínico-Hospitalar (UDCH) da FZEA/USP. Esfregaços sanguíneos foram confeccionados para as contagens diferenciais de leucócitos e avaliação de características das hemácias, utilizando-se o corante de Rosenfeld (Birgel, 1982).

5.5.2. Mensuração do cortisol salivar

Todas as amostras de saliva das vacas matrizes foram coletadas durante o período da manhã, procurando minimizar as influências circadianas. A metodologia utilizada foi baseada em Siegford e colaboradores (2008), utilizando-se algodão hidrofílico, em formato de rolete, amarrados em um fio dental com pontas longas, sendo confeccionadas duas unidades. Os roletes de algodão foram apresentados individualmente a cada animal a fim de que mastigassem até o mesmo ficar saturado com saliva e então retirados da boca das vacas.

A primeira amostra foi descartada, com a finalidade de se coletar somente saliva recentemente produzida. Após a coleta da segunda amostra, esta foi introduzida em uma seringa de 20 mL e espremida com o êmbolo para extração da saliva contida no algodão, conforme procedimento descrito por Barbosa (2022).

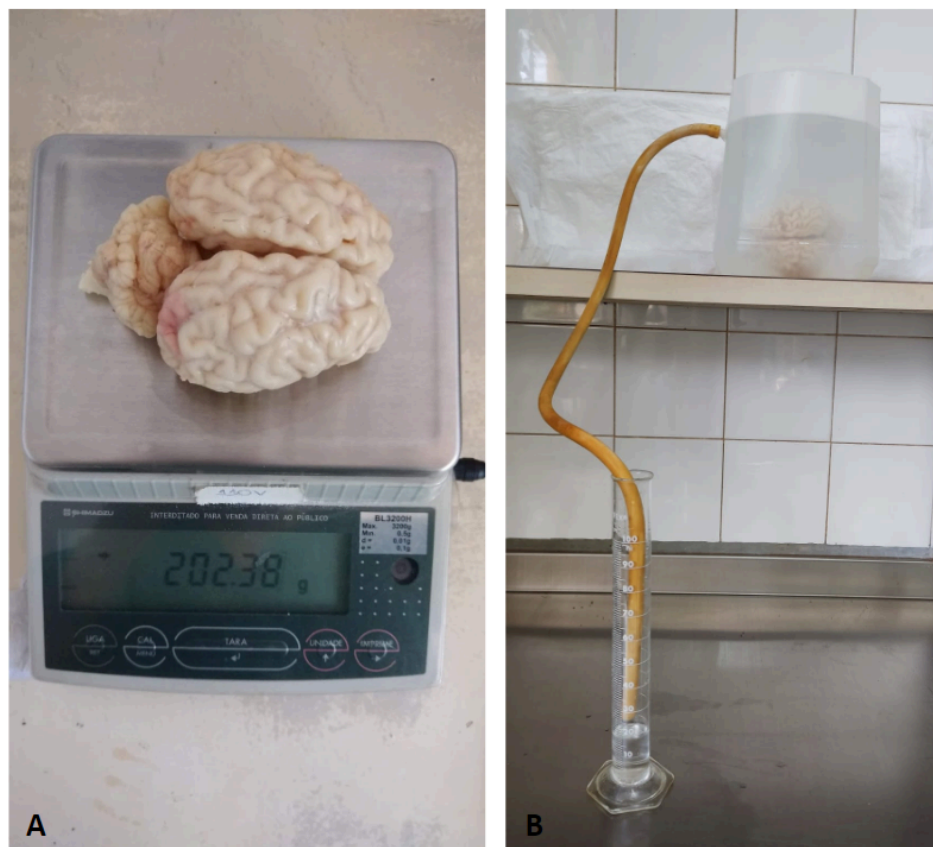
Posteriormente, o tubo foi acondicionado em uma caixa de isopor com gelo até o término da coleta, destinado ao laboratório e então mantido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o processamento. Foi utilizado protocolo de ensaio imunoenzimático de acordo com o descrito por Palme e Möstil (1997), para se obter os valores de concentração do cortisol ($\text{pg}/\mu\text{L}$) na saliva. Este exame foi realizado no laboratório do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS/FMVZ-USP), localizado em Pirassununga e sob responsabilidade do Prof. Dr. Adroaldo José Zanella.

5.5.3. Mensurações dos encéfalos

Foi realizada a mensuração do peso (g) dos encéfalos dos bezerros utilizando-se uma balança digital (Figura 3a) do laboratório do CAEP FMVZ/USP.

O volume (cm^3) dos encéfalos foi realizado por deslocamento volumétrico de coluna de água, adaptando-se o procedimento descrito por Scott e colaboradores (1999) (Figura 3b).

Figura 3 - Pesagem (A) e mensuração do volume (B) do encéfalo



Fonte: Reis (2023)

Quadro 3 - Momentos e parâmetros avaliados nos bezerros

BEZERROS (N = 20 machos e 35 fêmeas)		
Momentos	Período	Avaliações
M0	Nascimento	<ul style="list-style-type: none"> • Peso vivo e altura de cernelha de machos e fêmeas; • Brix do soro das fêmeas; • Eutanásia, coleta dos encéfalos de 10 machos.
M1	30 dias	<ul style="list-style-type: none"> • Peso vivo das fêmeas
M2	60 dias	
M3	Desmama	

Fonte: Reis (2023).

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística foi utilizado o Software Estatístico R. Os dados obtidos no presente estudo foram previamente verificados quanto à normalidade dos resíduos por meio do teste de Shapiro-Wilk. Os dados que não respeitaram a normalidade e cujo número de amostras não era suficiente para realização de testes paramétricos foram analisados por estatística não paramétrica de ordem, sendo feita a análise através do teste Wilcoxon-Mann-Whitney (função `wilcox.test`), sendo considerados um conjunto de dados independentes. Os resultados 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

6.1 AVALIAÇÃO DAS VACAS

Nas vacas gestantes acompanhadas durante o estudo foram realizados o hemograma e as seguintes mensurações: Brix do colostro, indicando a concentração indireta de imunoglobulinas, tempo de gestação e concentração do cortisol salivar.

O Brix do colostro foi em média 29% para o colostro de vacas do G1 e 27% para o colostro de vacas do G2 e o tempo de gestação foi 279,29 dias para as vacas do G1 e 272,65 dias para as vacas do G2.

Não houve diferença entre os grupos para os resultados do Brix do colostro, indicando não haver diferença na concentração de imunoglobulinas do colostro entre os grupos (Tabela 1) e não houve diferença entre o tempo de gestação (Tabela 2) entre os grupos. Entretanto, ao se comparar as médias de duração da gestação entre os grupos, é possível constatar que a gestação do G2 tem 6,65 dias a menos que a gestação do G1. O grupo das vacas que manifestaram claudicação durante a gestação apresenta, portanto, tempo de gestação 2,44% menor do que as vacas que não apresentaram claudicação, corroborando com o descrito por Sarmiento (2021b) em seu estudo sobre as influências da claudicação na prole de suínos.

Tao e colaboradores (2012), pesquisando sobre os efeitos do estresse térmico materno sobre o crescimento e função imunológica dos bezerros, observaram que vacas que passaram por esse estresse durante a gestação tiveram duração da gestação 4 dias menor em comparação com as vacas do grupo controle. Ainda que o modelo de estresse tenha sido diferente, os dados se assemelham quando há redução dos dias de gestação dos animais provenientes dos grupos com estresse.

Autores relataram níveis mais baixos de imunoglobulinas no colostro de vacas e porcas que enfrentaram estresse durante o final da gestação (MACHADO-NETO et al., 1987; NARDONE et al., 1997). No presente estudo, o resultado do exame brix do colostro do G2 foi 7,4% menor que o do G1, apesar de não haver diferença entre os dados obtidos.

Os valores do Brix não diferiram no presente estudo, indicando não haver diferença na concentração de imunoglobulinas do colostro entre os grupos, provavelmente em razão do G2 ser composto por vacas que apresentaram claudicação também em outras fases da gestação, não somente no final dela. Portanto, devido à duração da gestação ser extensa nesses animais e o colostro ser formado apenas no final deste período, somente a ocorrência de claudicação durante o final da gestação provavelmente acarretaria alterações significativas na concentração de imunoglobulinas transmitidas ao colostro, conforme demonstram os estudos citados.

O estudo realizado por Nardone e colaboradores (1997), utilizou vacas primíparas e o estresse térmico como sendo a fonte do estresse pré-natal. Segundo o autor, os resultados encontrados (menores concentrações de imunoglobulinas no colostro de vacas com estresse pré-natal) podem ter ocorrido devido ao fato de o estresse térmico poder ser potencialmente mais prejudicial por causar uma suposta redução no fluxo sanguíneo mamário e conseqüentemente menor passagem de imunoglobulinas para o colostro.

Tabela 1 - Média \pm erro padrão da média do Brix do colostro (%) de vacas com EL \leq 2 (G1) e de vacas com EL \geq 3 (G2)

	G1	G2	p Valor
Brix Colostro (%)	29 \pm 2,57	27 \pm 7,71	0,83

Fonte: Reis (2024)

Tabela 2 - Média \pm erro padrão da média da duração da gestação de vacas com EL \leq 2 (G1) e de vacas com EL \geq 3 (G2)

	G1	G2	p Valor
Duração da gestação (dias)	279,29 \pm 16,5	272,65 \pm 6,52	0,45

Fonte: Reis (2024)

Os dados de cortisol salivar foram analisados de duas formas diferentes: classificando-os conforme o EL das vacas observado durante toda a gestação e classificando a amostra conforme o EL que o animal apresentava no momento da

coleta da saliva. Desta forma, objetivou-se avaliar se vacas que manifestam claudicação durante a gestação apresentam concentrações de cortisol salivar diferentes daquelas que não exibem tal condição e também verificar se naquele momento que a claudicação estava sendo apresentada havia alteração pontual no parâmetro em questão.

Não foi verificada diferença entre a concentração de cortisol salivar entre os dois grupos analisados (Tabelas 3 e 4). Mesmo o animal apresentando claudicação no momento da coleta, essa condição parece não ter sido suficiente para induzir o aumento do hormônio no organismo dos animais amostrados.

Tabela 3 - Média \pm erro padrão da média da concentração de cortisol salivar (pg/ μ L) de vacas com EL \leq 2 (G1) e de vacas com EL \geq 3 (G2), durante a gestação nos diferentes momentos de análise

Grupos Momentos	G1 (pg/ μ L)	G2 (pg/ μ L)	p Valor
1 semana antes do parto	2,80 \pm 3,18	0,68 \pm 0,7	0,09
2 semanas antes do parto	4,39 \pm 8,23	1,54 \pm 1,61	0,95
3 semanas antes do parto	0,16 \pm 0,05	0,31 \pm 0,13	0,18

Fonte: Reis (2024)

Tabela 4 - Média \pm erro padrão da média da concentração de cortisol salivar (pg/ μ L) de vacas com EL \leq 2 (G1) e de vacas com EL \geq 3 (G2) no momento da coleta, durante os diferentes momentos de análise

Grupos Momentos	G1 (pg/ μ L)	G2 (pg/ μ L)	p Valor
1 semana antes do parto	1,63 \pm 1,58	33,05 \pm 72	0,84
2 semanas antes do parto	2,4 \pm 3,08	2,25 \pm 3,01	0,67
3 semanas antes do parto	-	-	-

Fonte: Reis (2024)

Ley e colaboradores (1994), ao estudarem o efeito da dor crônica associada à claudicação em ovelhas, descreveram que há aumento significativo do cortisol plasmático em todos os grupos de animais que apresentavam claudicação, independente do escore observado. Entretanto, esse mesmo primeiro autor e outros colaboradores (LEY et al., 1996), não encontraram diferença entre resultados de concentração de cortisol plasmático em vacas com ou sem claudicação, deduzindo que a dor crônica não determina, necessariamente, mudanças na concentração plasmática de cortisol em bovinos, corroborando, portanto, os resultados encontrados.

Estudando o estresse térmico, condição comumente encontrada na bovinocultura de leite, Tao e colaboradores (2012), observaram que essa condição decorrida durante o final da gestação em vacas também não afeta a concentração de cortisol sanguíneo durante o período em que a vaca não está em lactação e aguardando o parto e conseqüente início da lactação seguinte, isto é, o período seco.

Em um outro estudo, Almeida e colaboradores (2008), não encontraram diferença entre o cortisol sérico de vacas com e sem claudicação, porém os valores de cortisol em vacas que apresentavam claudicação foram aproximadamente 49% maiores que os valores do cortisol de vacas que não manifestaram a condição.

Barbosa (2022), também não observou aumento na concentração de cortisol salivar em vacas com claudicação no último terço da gestação. Segundo a autora, os resultados podem ter sido afetados devido à coleta de amostras em tempos diferentes e avançados da gestação não ter sido possível e pelo grupo de animais sem claudicação e estudados ser composto também por novilhas, menos acostumadas com o manejo. Da mesma forma, Sarmiento e colaboradores (2021a), não encontraram diferença entre os resultados da análise da concentração de cortisol salivar entre os dois grupos de suínos estudados, com e sem claudicação durante a gestação.

É importante ressaltar que, devido às coletas terem sido realizadas de forma única durante o dia, mesmo ocorrendo apenas no período da manhã, as concentrações de cortisol salivar podem ter sido influenciadas pelas mudanças do ritmo circadiano dos animais coletados. Apesar de estarem acostumadas, o manejo para realização da coleta (deslocamento do piquete pré-parto para o curral) e a

contenção também podem ter influenciado os resultados do cortisol salivar, reduzindo a validade desse indicador de estresse em bovinos.

Conforme descrito por Almeida e colaboradores (2007), a etiologia multifatorial da claudicação e a detecção subjetiva aumenta ainda mais a necessidade da padronização de biomarcadores capazes de auxiliar no diagnóstico e acompanhamento dessa condição, porém a concentração de cortisol salivar parece não ser apropriada para tal finalidade.

Seguindo a mesma linha de análise da concentração do cortisol salivar, o hemograma também foi analisado de duas formas: classificando as vacas conforme o EL observado durante toda a gestação e classificando a amostra conforme o EL que o animal apresentava no momento da coleta. Objetivando-se avaliar se há alterações no hemograma de vacas com claudicação durante a gestação comparada com vacas sadias e também verificar se houve alteração pontual nos componentes hematológicos no momento em que o animal estava apresentando escore de claudicação alterado.

Após análise estatística dos hemogramas das vacas acompanhadas durante as últimas três semanas de gestação, verificou-se que não houve diferença entre os grupos analisados (Tabela 5 e 6).

Alves (2007), ao realizar uma análise comparativa da laminite em fêmeas bovinas adultas de diferentes raças, pesquisou dados hematológicos relacionados com a pododermatite, uma das afecções podais causadoras de claudicação. O autor encontrou valores menores do que os fisiológicos no eritrograma (concentração de hemácias e de hemoglobina, hematócrito, VCM, HCM e CHCM) das vacas Holandesas estudadas. Já o leucograma das vacas Holandesas com pododermatite, apresentou baixa reação leucocitária, porém acima dos valores médios fisiológicos, demonstrando cronicidade da enfermidade, segundo o autor. Os valores encontrados por Alves (2007), estão apresentados como valor de referência (VR**) nas tabelas 5 e 6.

Barbosa (2022), comparando o hemograma de vacas com e sem claudicação quatro semanas antes da data prevista do parto, não encontrou diferença entre os grupos, porém constatou a ocorrência de anemia macrocítica hipocrômica e leucocitose em ambos os grupos avaliados.

Ao se analisar os dados contidos na Tabela 5 e 6, observa-se que em geral os valores médios dos parâmetros dos hemogramas apresentaram-se dentro do

intervalo de referência na maioria dos parâmetros. Entretanto, ao se comparar os valores obtidos com o VR*, os leucócitos e o VCM apresentam-se acima e o CHCM abaixo dos valores de referência. Porém, adotando-se como referência o VR**, os valores do hematócrito e do VCM encontrados no presente estudo apresentam-se acima e o CHCM abaixo dos valores encontrados por Alves (2017), em vacas com afecções podais.

Os valores de leucócitos encontrados no presente trabalho podem indicar ocorrência de leucose enzoótica bovina no rebanho acompanhado, porém, para se confirmar essa suspeita clínica, se faz necessária a realização de contagem de leucócitos e diferencial, a fim de se comprovar a existência de linfocitose e de atipias linfocitárias, respectivamente, quadro típico desta enfermidade, ou exames sorológicos para o diagnóstico etiológico.

Tabela 5 - Média \pm erro padrão da média dos parâmetros hematológicos de vacas com EL \leq 2 (G1) e de vacas com EL \geq 3 (G2) durante a gestação e nos diferentes momentos de análise

		Grupos		p Valor	VR*	VR**
		G1	G2			
Parâmetros						
1º Semana	Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	16,17 \pm 4,20	14,96 \pm 3,88	0,39	4,9 - 12,0	10 - 16
	He ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	5,72 \pm 0,57	5,67 \pm 0,65	0,83	5,1 - 7,6	4,5 - 6,0
	Hb (g/dL)	9,36 \pm 0,70	9,63 \pm 0,81	0,32	8,5 - 12,2	7,6 - 9,8
	Ht (%)	30,71 \pm 2,72	31,92 \pm 2,74	0,17	22,0 - 33,0	23 - 27
	VCM (fL)	53,99 \pm 5,32	56,68 \pm 4,99	0,23	38,0 - 50,0	45 - 51,1
	HCM (pg)	16,38 \pm 1,20	17,04 \pm 1,45	0,13	14,0 - 18,0	15 - 19,1
	CHCM (%)	30,50 \pm 1,61	30,13 \pm 0,60	0,68	36,0 - 39,0	32,6 - 37,3
2º Semana	Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	16,47 \pm 5,48	14,28 \pm 5,71	0,28	4,9 - 12,0	10 - 16
	He ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	5,61 \pm 0,55	5,79 \pm 0,44	0,35	5,1 - 7,6	4,5 - 6,0
	Hb (g/dL)	9,33 \pm 0,87	9,75 \pm 0,73	0,25	8,5 - 12,2	7,6 - 9,8
	Ht (%)	30,63 \pm 3,55	32,07 \pm 2,94	0,56	22,0 - 33,0	23 - 27
	VCM (fL)	54,71 \pm 5,68	55,65 \pm 5,69	0,79	38,0 - 50,0	45 - 51,1
	HCM (pg)	16,60 \pm 1,33	16,86 \pm 1,31	0,68	14,0 - 18,0	15 - 19,1
	CHCM (%)	30,56 \pm 2,16	30,43 \pm 1,42	0,24	36,0 - 39,0	32,6 - 37,3
3º Semana	Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	15,81 \pm 6,21	14,39 \pm 5,13	0,60	4,9 - 12,0	10 - 16
	He ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	5,72 \pm 0,47	5,77 \pm 0,65	0,82	5,1 - 7,6	4,5 - 6,0
	Hb (g/dL)	9,52 \pm 0,79	9,7 \pm 0,87	0,79	8,5 - 12,2	7,6 - 9,8
	Ht (%)	31,27 \pm 3,07	31,85 \pm 2,39	0,72	22,0 - 33,0	23 - 27
	VCM (fL)	54,99 \pm 6,90	55,59 \pm 4,56	0,89	38,0 - 50,0	45 - 51,1
	HCM (pg)	16,67 \pm 1,86	16,84 \pm 1,01	0,92	14,0 - 18,0	15 - 19,1
	CHCM (%)	30,47 \pm 1,30	30,40 \pm 1,17	0,62	36,0 - 39,0	32,6 - 37,3

Fonte: Reis (2024)

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. Veterinary Medicine. A textbook of the Disease of Cattle, Horses, Sheep, Pig and Goats, 11th ed., Saunders Ltd., 2017.

**Valores de Referência: ALVES, 2007.

Tabela 6 - Média \pm erro padrão da média dos parâmetros hematológicos de vacas com EL \leq 2 (G1) e de vacas com EL \geq 3 (G2) no momento da coleta nos diferentes momentos de análise

		Grupos		p Valor	VR*	VR**
		G1	G2			
Parâmetros						
		1º Semana	Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	16,83 \pm 5,59	13,58 \pm 4,97	0,30
He ($\times 10^9/\mu\text{L}$)	5,66 \pm 0,62		5,27 \pm 0,69	0,42	5,1 - 7,6	4,5 - 6,0
Hb (g/dL)	9,02 \pm 0,85		8,72 \pm 1,31	0,46	8,5 - 12,2	7,6 - 9,8
Ht (%)	29,66 \pm 2,67		27,92 \pm 4,79	0,30	22,0 - 33,0	23 - 27
VCM (fL)	52,68 \pm 5,05		55,04 \pm 6,56	0,84	38,0 - 50,0	45 - 51,1
HCM (pg)	15,91 \pm 0,81		17,13 \pm 1,34	0,17	14,0 - 18,0	15 - 19,1
CHCM (%)	30,40 \pm 1,94		31,28 \pm 1,40	0,34	36,0 - 39,0	32,6 - 37,3
2º Semana	Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	18,66 \pm 6,53	17,36 \pm 6,94	1	4,9 - 12,0	10 - 16
	He ($\times 10^9/\mu\text{L}$)	5,7 \pm 0,47	5,66 \pm 0,55	0,69	5,1 - 7,6	4,5 - 6,0
	Hb (g/dL)	9,44 \pm 0,89	9,2 \pm 1,25	0,40	8,5 - 12,2	7,6 - 9,8
	Ht (%)	30,88 \pm 3,05	30,02 \pm 3,86	0,46	22,0 - 33,0	23 - 27
	VCM (fL)	54,34 \pm 4,66	53,08 \pm 4,11	1	38,0 - 50,0	45 - 51,1
	HCM (pg)	16,54 \pm 1,36	16,16 \pm 1,24	0,84	14,0 - 18,0	15 - 19,1
	CHCM (%)	30,56 \pm 0,84	86,5 \pm 125,5	0,75	36,0 - 39,0	32,6 - 37,3
3º Semana	Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	14 \pm 1,55	15,3 \pm 4,66	1	4,9 - 12,0	10 - 16
	He ($\times 10^9/\mu\text{L}$)	6,10 \pm 0,21	5,34 \pm 0,41	0,34	5,1 - 7,6	4,5 - 6,0
	Hb (g/dL)	9,8 \pm 1,41	8,5 \pm 1,13	0,67	8,5 - 12,2	7,6 - 9,8
	Ht (%)	32 \pm 5,37	27,65 \pm 4,17	0,67	22,0 - 33,0	23 - 27
	VCM (fL)	52,3 \pm 6,92	51,8 \pm 3,81	1	38,0 - 50,0	45 - 51,1
	HCM (pg)	15,95 \pm 1,76	15,85 \pm 0,91	1	14,0 - 18,0	15 - 19,1
	CHCM (%)	30,65 \pm 0,77	30,7 \pm 0,56	1	36,0 - 39,0	32,6 - 37,3

Fonte: Reis (2024)

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. Veterinary Medicine. A textbook of the Disease of Cattle, Horses, Sheep, Pig and Goats, 11th ed., Saunders Ltd., 2017.

**Valores de Referência: ALVES, 2007.

6.2 AVALIAÇÃO DOS BEZERROS

Nos bezerros estudados no presente trabalho, nascidos das vacas acompanhadas durante a gestação, foram realizadas as seguintes mensurações: altura de cernelha e peso vivo ao nascimento tanto em machos quanto em fêmeas; peso vivo aos 30, 60 dias de vida e no dia do desmame, exame Brix do soro para avaliação indireta da concentração sérica de imunoglobulinas e cálculo do tempo decorrido entre o nascimento até o desmame nas fêmeas. A avaliação do peso e volume dos encéfalos, assim como a análise da morfometria do hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal dos machos serão descritas na próxima seção.

Ao se analisar os dados obtidos, constatou-se não haver diferença para peso vivo (Tabela 7) e altura dos bezerros (Tabela 8) ao nascimento e peso das bezerras até o desmame (Tabela 9). Entretanto, é possível observar que o peso ao nascimento de bezerras do GB2 é 7,06% menor que as do GB1, fato que curiosamente ocorreu de forma inversa em machos, isto é, os animais do GB2 são 5,06% mais pesados que os machos do GB1. Situação que também ocorreu com a altura de cernelha ao nascimento, machos do GB2 são 0,75% maiores que os do GB1, já fêmeas do GB2 são 4,12% menores que as do GB1.

Wassink e colaboradores (2010), estudando sobre a influência do tratamento de enfermidades de casco em ovelhas, demonstraram que a claudicação sem tratamento durante a gestação causou diminuição de produtividade, menor número de cordeiros nascidos e maior tempo para atingir o peso ideal de abate pelos cordeiros. Comprovando que o tratamento levou à melhora da saúde, bem estar e produtividade das ovelhas.

Estudos revelam haver uma participação importante do aumento dos níveis de glicocorticóides no organismo materno intervindo no processo de crescimento fetal, causando como consequência diminuição do peso e tamanho da prole ao nascimento (LINDSAY et al., 1996; SECKL, 2004; KRANENDONK et al., 2006).

Tao e colaboradores (2012), pesquisando sobre os efeitos do estresse térmico materno sobre o crescimento e função imunológica dos bezerros, observaram que bezerras nascidas de vacas que passaram por estresse térmico durante a gestação tiveram menor peso corporal ao nascer e ao desmame, porém, entre três a sete meses de idade, não houve diferença entre os grupos ao se

analisar o peso corporal e altura de cernelha. Fato também observado no presente estudo, apesar de não haver diferença entre os grupos.

Sarmiento e colaboradores (2021a), por sua vez, não encontraram diferença estatística referente ao peso vivo ao nascimento entre os grupos de leitões estudados, entretanto observaram menor peso ao desmame nos animais nascidos de porcas com claudicação. Segundo os autores, tal achado se deu provavelmente devido um menor consumo alimentar das porcas com claudicação e conseqüentemente menor produção de leite. Em primatas não humanos, Coe e colaboradores (2002), também não encontraram diferença do peso ao nascer e do crescimento pós-natal.

Já Barbosa (2022), comparando peso vivo e altura de cernelha de bezerras oriundas de vacas com e sem estresse pré-natal, observou que bezerras nascidas de vacas que apresentaram claudicação durante os últimos meses de gestação foram 7,99% mais pesadas e 1,91% mais altas do que as bezerras de vacas que não apresentaram claudicação nesse mesmo período, fato diferente do observado.

Lay e colaboradores (1997b), estudando quais são os efeitos na prole produzidos pelo transporte repetitivo de vacas prenhes, observaram peso vivo ao nascimento maior em bezerros nascidos de vacas que passaram pelo estresse pré-natal causado pelo transporte. Para tal resultado, sugeriram causa hormonal uma vez que nesse mesmo grupo, observaram também glândulas pituitárias maiores, que poderiam secretar mais hormônio de crescimento, explicando o maior peso.

Os resultados obtidos, mesmo não apresentando diferença, podem ser explicados através do possível efeito sexo-dependente do estresse pré-natal, fato descrito em uma série de estudos realizados em outras espécies (MERLOT et al. 2008; CHARIL et al., 2010; RICETTO; RIVA, 2014), porém o efeito do touro no tamanho dos bezerros oriundos de inseminação artificial também deve ser levado em consideração. Aumento do número de animais estudados se faz necessário nesse caso para se confirmar essa hipótese.

Tabela 7 - Média \pm erro padrão da média do peso vivo ao nascimento (kg) de bezerros filhos de vacas com EL \leq 2 (GB1) e de vacas com EL \geq 3 (GB2)

	GB1	GB2	p Valor
Peso Vivo (Kg)	42,28 \pm 3,81	44,42 \pm 5,22	0,43

Fonte: Reis (2024)

Tabela 8 - Média \pm erro padrão da média da altura de cernelha (cm) ao nascimento de bezerros filhos de vacas com EL \leq 2 (GB1) e de vacas com EL \geq 3 (GB2)

	GB1	GB2	p Valor
Machos (cm)	76,42 \pm 3,55	77 \pm 5,19	1,0
Fêmeas (cm)	77,41 \pm 4,99	74,34 \pm 4,77	0,12

Fonte: Reis (2024)

Tabela 9 - Média \pm erro padrão da média do peso vivo de bezerras filhas de vacas com EL \leq 2 (GB1) e de vacas com EL \geq 3 (GB2) nos diferentes momentos de análise

Grupos / Momentos	GB1 (Kg)	GB2 (Kg)	p Valor
Nascimento	41,66 \pm 6,93	38,91 \pm 8,52	0,45
30 dias	58,25 \pm 4,93	53,91 \pm 8,46	0,17
60 dias	89,91 \pm 8,92	81,41 \pm 16,84	0,18
Desmama	106,33 \pm 10,31	102,83 \pm 8,74	0,27

Fonte: Reis (2024).

Os valores do Brix sérico dos bezerros, indicando de forma indireta a concentração de imunoglobulinas no soro dos animais deste estudo não apresentou diferença (Tabela 10), provavelmente pelo fato de que os bezerros, logo após o nascimento, são separados da mãe e seu aleitamento é realizado por meio de mamadeira, com colostro de boa qualidade principalmente quando o produzido pela mãe não alcança boa qualidade. É possível observar que os valores do refratômetro de Brix são bem próximos e acima do valor de corte (8,4%), conforme descrito por

Deelen e colaboradores (2014), indicando adequada transferência de imunidade passiva.

Em porcos, estudos demonstraram que o estresse térmico e psicológico durante o final da gestação diminuíram (MACHADO-NETO et al., 1987; TUCHSCHERER et al., 2002), enquanto o estresse pelo frio aumentou (BATE; HACKER, 1985) os níveis de imunoglobulinas circulantes nos neonatos. Entretanto, esses resultados foram relacionados com a menor concentração de imunoglobulinas no colostro ingerido.

Tao e colaboradores (2012), também encontraram diferenças na imunoglobulina sérica total de bezerros nascidos de vacas que passaram por estresse térmico durante a gestação, sendo esses resultados menores que aqueles apresentados pela prole de vacas sem estresse térmico.

Tabela 10 - Média \pm erro padrão da média do Brix sérico (%) de bezerras filhas de vacas com EL \leq 2 (GB1) e de vacas com EL \geq 3 (GB2)

Brix sérico (%)	GB1	GB2	<i>p</i> Valor
	10,1 \pm 1,37	10,3 \pm 1,25	0,87

Fonte: Reis (2024)

Referente ao tempo decorrido entre o nascimento e a desmama, não houve diferença entre os dois grupos estudados (Tabela 11), porém é possível constatar que as bezerras do GB2 demoraram em média 7,43 dias a mais para serem desmamadas, portanto o tempo de desmama das bezerras do GB2 foi 10,05% maior que o do GB1.

Wassink e colaboradores (2010), observaram que cordeiros nascidos de ovelhas que apresentavam claudicação durante a gestação demoravam mais tempo para atingir o peso ideal de abate, corroborando o observado no presente estudo.

Já Nickles e colaboradores (2023), pesquisando o efeito do estresse ambiental na prole de vacas, não encontraram diferença no peso vivo ao nascimento, ao desmame e no ganho de peso na fase de crescimento entre bezerros nascidos de vacas que foram alojadas em ambiente com lama e ambiente seco durante o último terço da gestação.

Tabela 11 - Média \pm erro padrão da média do tempo (dias) até o desmame de bezerras filhas de vacas com $EL \leq 2$ (GB1) e de vacas com $EL \geq 3$ (GB2)

Tempo para desmama (dias)	GB1	GB2	p Valor
	73,91 \pm 8,11	81,34 \pm 14,24	0,14

Fonte: Reis (2024)

6.3 AVALIAÇÃO DOS ENCÉFALOS

6.3.1 Sedação e transporte dos bezerros

Inicialmente o primeiro bezerro foi sedado e transportado às dependências do CAEP FMVZ/USP com a administração de acepromazina 1% (0,2 mg/kg, IV) e cetamina (2 mg/kg, IV). No entanto esta técnica de sedação não se mostrou satisfatória e a mesma precisou ser modificada para acepromazina 1% (0,2 mg/kg, IV) e xilazina 2% (0,3 mg/kg, IV), a qual permitiu o transporte e contenção dos outros dois bezerros com mais conforto.

6.3.2 Método de coleta e conservação

Após a chegada do animal nas dependências do CAEP/FMVZ-USP, foi realizada tricotomia bilateral na região da veia jugular e se iniciou o protocolo de eutanásia. Após a administração da solução de tiopental sódico (4 a 5 mg/kg), com o animal em plano anestésico, procedeu-se à dissecação da veia jugular e da artéria carótida de ambos os lados com o objetivo de agilizar o início da perfusão com a solução de formaldeído 12,5% após a eutanásia. Logo em seguida à dissecação, foi realizada a administração de solução de cloreto de potássio 19,1% (75 a 150 mg/kg), e, após a confirmação do óbito do animal, iniciou-se o protocolo de perfusão descrito a seguir.

No início, procedeu-se a ligadura distal das carótidas e punção das mesmas através de catéteres para administração das soluções de perfusão e observação da circulação de retorno através das jugulares que foram seccionadas transversalmente.

Em uma das carótidas houve administração de bolus de heparina (50.000 UI), para, em seguida, ser aplicada solução fisiológica heparinizada (2%) gelada em volume suficiente até que o líquido proveniente das jugulares se tornasse límpido.

Após esta etapa, iniciou-se o procedimento para fixação do encéfalo com solução de formaldeído 12,5% (diluição de 1:7 de formaldeído 37% em água destilada gelada), sendo utilizadas também as carótidas como a via de administração desta solução. Este procedimento foi realizado até algumas regiões da cabeça do animal (língua e masseter) começarem a apresentar sinais de enrijecimento por causa da solução de formol. Para este resultado foram utilizados 4 L de solução fisiológica e 4 L de solução de formaldeído 12,5% para a realização do procedimento.

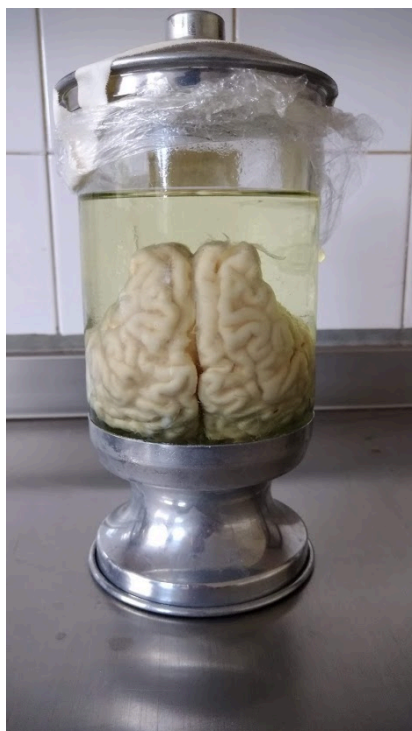
Em seguida, o encéfalo foi exposto com a secção da calota craniana por meio de serra com arco de serra para, a seguir, ser removido e acondicionado em frasco de vidro transparente com aproximadamente 2,5 L de solução de formaldeído (1:7) durante o período de sete dias e mantido resfriado em geladeira.

Após esta fase, o encéfalo foi transferido para novo recipiente de vidro transparente com 1,5 L de solução de sacarose (30%) e mantido resfriado em geladeira. Quando o encéfalo apresentasse aumento de densidade e submersão na solução de sacarose, estaria em condições para processamento e avaliação histológica.

Nesta última fase, o encéfalo inicialmente apresentava flutuação na solução de sacarose e, após 30 dias, em média, o mesmo apresentou alteração de densidade em função do efeito osmótico, aumentando a densidade e submergindo completamente ao fundo do frasco de vidro (Figura 4), indicando que estava pronto para o processamento histológico, que foi realizado no Laboratório de Neuromodulação da Dor.

Após realizar o procedimento no primeiro animal, verificou-se as dificuldades e melhorias que poderiam ser implementadas. Observou-se o aperfeiçoamento do procedimento com a utilização de sondas uretrais n.6 posicionadas nas carótidas ao invés de cateteres (Figura 5).

Figura 4 - Encéfalo imerso em solução de sacarose



Fonte: Reis, 2020.

Figura 5 - Dissecção da artéria carótida e veia jugular



Fonte: Reis (2021)

Nota: 1 - artéria carótida com a sonda uretral; 2 - veia jugular seccionada; Vista lateral esquerda

Além disso, foram empregados outros materiais para abertura da cabeça como serra óssea elétrica oscilante, osteótomo e martelo, que facilitaram a remoção do encéfalo da calota craniana, diminuindo os riscos de danos que podem ocorrer no órgão ao se utilizar a serra com o arco de serra.

Para verificar microscopicamente se os procedimentos de perfusão, retirada e fixação obtiveram sucesso, foi escolhido, utilizando-se critério visual subjetivo, o encéfalo proveniente da metodologia que ofereceu a melhor fixação foi escolhido.

Primeiramente foi realizada a divisão dos hemisférios cerebrais e o corte em três partes: lobo frontal, parietal e occipital, com o objetivo de melhor acomodação do órgão no micrótomo em função das dimensões do mesmo (Figura 6).

Figura 6 - Corte do encéfalo na região do lobo frontal

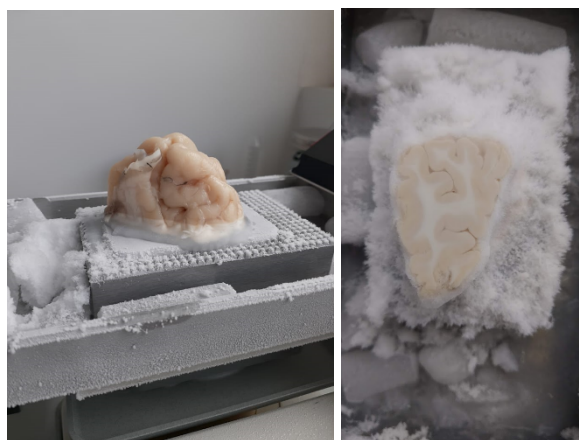


Fonte: Reis, 2020.

Em seguida, a porção escolhida (lobo frontal) foi apoiada na base do micrótomo de deslizamento Leica SM 2010R, e congelada por gelo seco disposto na plataforma e ao redor da mesma (Figura 7). Após o congelamento do tecido, iniciou-se a secção com espessura de 30 micrômetros. Os fragmentos foram acondicionados em recipiente com poços contendo solução anticongelante, obedecendo uma ordem de deposição para cada corte.

Para a confecção das lâminas com o fragmento, foi utilizada lâmina gelatinizada medindo 7,5 x 5,0 cm e placa de Petri com solução salina tamponada com fosfato em quantidade suficiente para a lâmina ficar parcialmente imersa, sendo o conjunto posicionado em fundo escuro. Cuidadosamente o fragmento foi colocado na placa de Petri e, com ajuda de um pincel, foi posicionado e disposto da melhor maneira para possibilitar a visualização ao microscópio (Figura 8).

Figura 7 - Secção do lobo frontal em micrótomo de deslizamento



Fonte: Reis, 2020

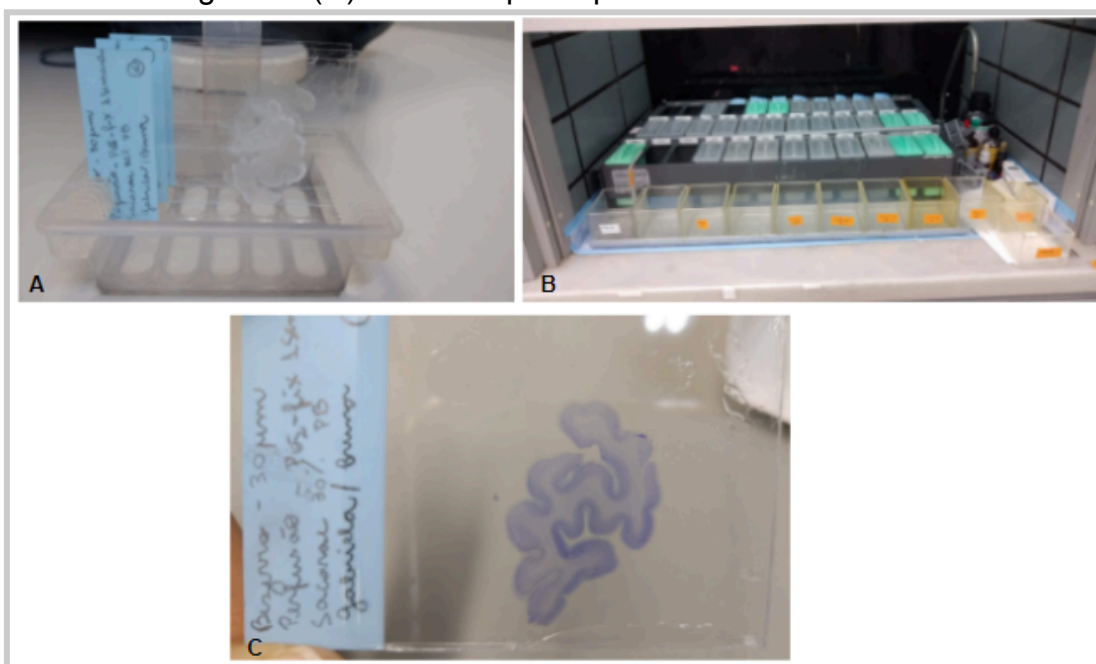
Figura 8 - Confeção da lâmina com uma secção do lobo frontal do cérebro do bezerro.



Fonte: Reis, 2020.

Com o objetivo de verificar se o protocolo de perfusão criado foi satisfatório, realizou-se a coloração de Nissl. Este método consiste na imersão da lâmina em uma sequência de cubas contendo diferentes soluções de álcool (50%, 70%, 100%), xilol e tionina (Figura 9). O procedimento visa identificar os chamados corpúsculos ou grânulos de Nissl, os quais representam o retículo endoplasmático rugoso, responsável pela síntese de proteínas. Estas substâncias cromófilas são acumulações basófilas que se encontram no citoplasma de células nervosas, sendo um ótimo método para verificar se a arquitetura cerebral está preservada (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

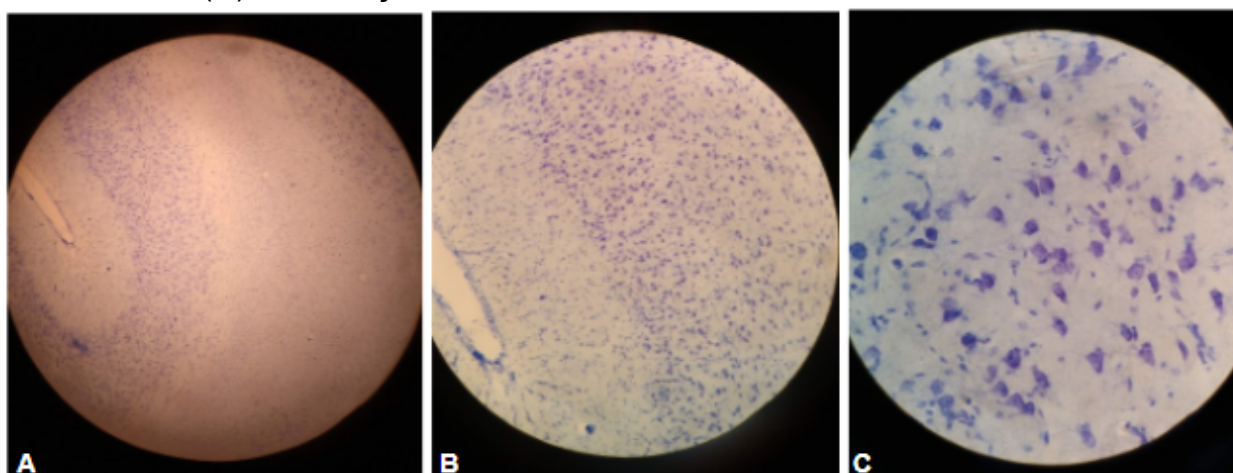
Figura 9 - Método de coloração de Nissl. (A) Lâmina com secção do encéfalo antes da coloração. (B) Bateria de cubas contendo os reagentes. (C) Lâmina após o procedimento



Fonte: Reis, 2020.

Após o procedimento descrito, a lâmina foi analisada por microscopia e verificou-se a preservação da arquitetura cerebral na porção estudada. Foram observados os corpos dos neurônios íntegros e bem estruturados (Figura 10), concluindo-se então que a metodologia empregada para a perfusão do encéfalo dos bezerros foi satisfatória, sendo capaz de atender os objetivos propostos.

Figura 10 - Secção do encéfalo ao microscópio. (A) Observação dos neurônios com aumento de 40X. (B) Observação dos neurônios com aumento de 100X. (C) Observação dos neurônios com aumento de 400X.



Fonte: Reis, 2020.

6.3.3 Mensurações dos encéfalos

Logo após a retirada do encéfalo da calota craniana este foi pesado e acondicionado em frasco de plástico transparente com solução de formaldeído. Além da pesagem, foi realizada também a mensuração do volume e exame de RNM para morfometria de regiões cerebrais específicas.

Não foram encontradas diferenças em relação ao peso (Tabela 12) e volume dos encéfalos (Tabela 13) entre os dois grupos estudados. Observou-se, porém, que, em média, o peso dos encéfalos dos bezerros do grupo GB2 foi 1,73% maior que aqueles do GB1 e o volume encefálico dos bezerros do GB2 apresentou-se 1,99% menor que os do GB1. Mesmo sendo valores muito parecidos, o peso vivo ao nascimento pode ter interferido nos resultados encontrados.

Ao se comparar o volume das regiões do cérebro como hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal também não foram encontradas diferenças tanto nos dados de volume absoluto (Tabela 13) como também quando se procurou retirar o efeito do tamanho do bezerro ao se realizar a razão entre o volume da região estudada e o volume encefálico (Tabela 14).

Tabela 12 - Média \pm erro padrão da média do peso encefálico (g) de bezerros filhos de vacas com EL \leq 2 (GB1) e de vacas com EL \geq 3 (GB2)

Peso Encefálico (g)	GB1	GB2	p Valor
	217,86 \pm 7,49	221,64 \pm 15,47	1

Fonte: Reis (2024).

Tabela 13 - Média \pm erro padrão da média dos volumes (cm^3) do encéfalo, do hipocampo, da amígdala e do córtex pré-frontal de bezerros filhos de vacas com $\text{EL} \leq 2$ (GB1) e de vacas com $\text{EL} \geq 3$ (GB2)

Grupos Estrutura	GB1 (cm^3)	GB2 (cm^3)	p Valor
Encéfalo	205 \pm 16,09	201 \pm 22,06	1
Hipocampo	3,01 \pm 1,05	2,33 \pm 0,44	0,7
Amígdala	0,34 \pm 0,05	0,32 \pm 0,17	0,7
Córtex pré-frontal	25,36 \pm 1,26	24,47 \pm 1,56	0,7

Fonte: Reis (2024).

Tabela 14 - Média \pm erro padrão da média da razão entre o volume (cm^3) do hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal e o volume (cm^3) encefálico de bezerros filhos de vacas com $\text{EL} \leq 2$ (GB1) e de vacas com $\text{EL} \geq 3$ (GB2)

Grupos Razão	GB1	GB2	p Valor
Hipocampo / Encéfalo	0,0146 \pm 0,0041	0,0115 \pm 0,0009	0,4
Amígdala / Encéfalo	0,0016 \pm 0,0002	0,0016 \pm 0,0008	0,7
Córtex pré-frontal / Encéfalo	0,1241 \pm 0,008	0,1231 \pm 0,020	0,7

Fonte: Reis (2024).

Analisando-se os dados de volume absoluto, é possível constatar que o volume do hipocampo do GB2 apresentou-se 29,18% menor que o do GB1. O mesmo também foi observado para as outras estruturas analisadas, sendo o volume das amígdalas e do córtex pré-frontal dos bezerros do GB2, 6,25% e 3,63% menores que do GB1, respectivamente.

Quando se realiza a análise das razões entre os volumes das estruturas e o volume do encéfalo correspondente, os volumes relativos do GB2 continuam apresentando-se menores do que os volumes relativos do GB1. Sendo os volumes do hipocampo 26,95% e do córtex pré-frontal 0,81% menores que os volumes dessas estruturas nos bezerros pertencentes ao GB1.

Mesmo não havendo diferença, observa-se que os volumes de hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal encontrados nos bezerros nascidos de vacas que apresentaram claudicação durante a gestação foram menores que os volumes apresentados pelos bezerros de vacas sem claudicação, corroborando o encontrado na literatura (CHARIL et al., 2010).

Embora os glicocorticóides sejam necessários para o desenvolvimento normal dos órgãos fetais, seu excesso causa efeitos deletérios principalmente no desenvolvimento do hipocampo e sobre o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. O estresse pré-natal resulta na redução dos locais de ligação da 5-hidroxitriptamina, neurotransmissor que desempenha um papel importante no desenvolvimento inicial do cérebro facilitando a formação e manutenção das sinapses, causando por sua vez redução nos receptores de glicocorticóides no hipocampo (AVISHAI-ELINER et al., 2002).

Autores relatam que o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e o sistema límbico, principalmente hipocampo e amígdala, parecem ser particularmente sensíveis a altas concentrações de cortisol durante o seu desenvolvimento, levando a alterações das respostas comportamentais ao estresse, como ansiedade e medo (SCHWERIN et al., 2005; OTTEN et al., 2010; OTTEN et al., 2015).

Conforme Charil e colaboradores (2010), a escolha das regiões cerebrais estudadas até os dias atuais está relacionada em sua maioria a funções comportamentais e cognitivas observadas como sendo afetadas pelo estresse pré-natal.

A escolha das regiões estudadas no presente trabalho foi realizada também pretendendo buscar respostas aos resultados obtidos por Barbosa (2022), que objetivou pesquisar os efeitos causados pela claudicação, considerada um estresse pré-natal, na resposta à dor em bezerros descornados com ferro quente. A autora conclui em seu trabalho que há redução do limiar nociceptivo após descorna por ferro quente em bezerras nascidas de vacas que apresentaram claudicação no terço final da gestação.

Segundo Yang e Chang (2019), estruturas como a região pré-frontal e o sistema límbico estão associados à percepção e aos aspectos afetivos da dor, regulando as respostas emocionais e motivacionais. Portanto, a escolha das regiões cerebrais estudadas (hipocampo, córtex pré-frontal e amígdala) estão ligadas a regiões responsáveis pelo processamento da dor, emoção, medo entre outros.

Uno e colaboradores (1994), pesquisando os efeitos neurotóxicos dos glicocorticóides no cérebro de primatas não humanos, revelaram que a área média e o volume dos segmentos do hipocampo que foram analisados nos animais tratados com doses de glicocorticóides durante a gestação, foram 20 a 30% menores que os animais do grupo controle. Além disso, os volumes cerebrais totais dos dois grupos não apresentaram diferença significativa. Tais achados corroboram os dados do presente trabalho, apesar de não haver diferença estatística, o volume do hipocampo foi aproximadamente 29% menor em animais que sofreram estresse pré-natal, que numericamente surpreende e funcionalmente ainda necessita de mais estudos para se avaliar o potencial impacto dessa redução.

Tendo em vista este fato, um número maior de animais estudados seria necessário para potencialmente se comprovar este padrão ou a tentativa de replicação do experimento realizado pelos pesquisadores em questão poderia oferecer novos resultados. Já que, para a obtenção do volume do hipocampo no estudo de Uno e colaboradores (1994), foram selecionadas quatro imagens consecutivas de formações hipocâmpais, sendo segmentos coronais posteriores a região anatômica conhecida como unco (ou uncus), procedimento diferente do adotado para análise das imagens dos bezerros. As áreas médias das secções esquerda e direita do hipocampo e seus respectivos volumes também foram mensurados por software de análise de imagens. Tal área foi escolhida pelos pesquisadores, pois, em outro estudo, Uno e colaboradores (1990), demonstraram que o excesso de glicocorticóides induz danos irreversíveis aos neurônios, principalmente os piramidais, nas regiões CA do hipocampo.

Outros estudos como o de Coe e colaboradores (2003), também relatam volumes reduzidos do hipocampo em macacos Rhesus que sofreram estresse pré-natal. Utilizando protocolo de estresse induzido, os autores encontraram reduções de 10 a 12% do volume do hipocampo na prole estressada e uma inibição de 32% da neurogênese pós-natal no giro denteado.

Em animais de laboratório, Szuram e colegas (1994), relataram redução do peso úmido do hipocampo de filhotes de três meses de idade, após submeter as mães gestantes a um estresse de contenção. Foram encontradas reduções de 15,4% nos machos estressados e 8,2% nas fêmeas. Schmitz e colaboradores (2002), também encontraram diminuição dos volumes do hipocampo na prole de

ratas estressadas, relacionando-se o achado ao número reduzido de células granulares no hipocampo.

Considerando que as alterações de volume do hipocampo representam manifestações macroscópicas provavelmente relacionadas com alterações microscópicas causadas pelo estresse pré-natal, condição já demonstrada em algumas espécies, os encéfalos coletados no presente estudo podem ser utilizados em um futuro próximo para a elucidação dessa ocorrência também em bovinos.

Estudos relatam também haver reduções nos volumes dos núcleos da amígdala, acompanhado de diminuições nos neurônios e número de células gliais em ratos que sofreram estresse pré-natal. Kraszpulski e colaboradores (2006), observaram diminuição em 20 a 25% do volume de núcleos da amígdala na prole de ratas estressadas por meio de manuseio, exposição a um ambiente novo e administração de solução fisiológica uma vez ao dia durante o final da gestação. Foram encontrados também diminuição em 25 a 30% do número de neurônios e células gliais, achado também relatado por Kawamura e colaboradores (2006), que relatam diminuição de 30% na neurogênese total da amígdala de ratos com estresse pré-natal.

Já no córtex cerebral, há muitas descrições de redução na arborização dendrítica (46%) e perda sináptica (52%) em ratos estressados durante a gestação, bem como redução da densidade de espinhos dendríticos nos dendritos de neurônios piramidais em ratos (BARROS et al., 2006; MURMU et al. 2006).

Tais alterações também foram descritas por Coulon et al. (2013), e Petit et al. (2015), que comprovaram haver alterações morfológicas e funcionais em neurônios corticolímbicos de cordeiros nascidos de ovelhas estressadas no último trimestre de gestação. Os referidos autores observaram expressão diminuída de genes envolvidos no desenvolvimento cerebral, na morfogênese dos espinhos dendríticos dos neurônios e na transmissão sináptica no córtex pré-frontal e hipocampo, expressão aumentada do gene ligado a morfologia dos espinhos dendríticos dos neurônios na região da amígdala e maior densidade de espinhos dendríticos nos neurônios piramidais do córtex pré-frontal e hipocampo, além de maior concentração de espinhos dendríticos do tipo curto e largo e menor proporção de espinhos em formato de cogumelo no hipocampo.

Há também outras regiões cerebrais que foram estudadas, porém com menor frequência como o corpo caloso (COE et al., 2002), cerebelo (ULUPINAR; YUCEL,

2005; ULUPINAR et al., 2006) e hipotálamo (ANDERSON et al., 1985). Sendo encontradas alterações causadas pelo estresse pré-natal em todas elas.

As alterações causadas pelo estresse pré-natal no encéfalo da prole são melhor descritas em espécies como animais de laboratório e primatas não humanos. Até o momento em ruminantes há poucos estudos sobre o assunto e, ao que se sabe, este é o primeiro estudo clínico em bovinos que objetivou pesquisar a influência da claudicação durante a gestação, problema recorrente na produção leiteira, no encéfalo da prole.

Apesar de as análises não apresentarem diferenças estatísticas, observa-se diminuição das estruturas cerebrais estudadas nos bezerros provenientes de vacas que apresentaram claudicação durante a gestação, corroborando os dados obtidos na literatura, como o menor volume de estruturas como o hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal em animais que experimentaram o estresse pré-natal, por exemplo.

Este é apenas o primeiro passo na pesquisa sobre as influências que o estresse pré-natal causa no desenvolvimento cerebral de bezerros e as consequências em sua vida futura. Sabendo que o tipo de estressor e o momento em que ele ocorre podem estar relacionados com a intensidade da alteração observada e que há diferentes graus de resiliência ao estresse entre animais da mesma espécie e de espécies diferentes (MURMU et al., 2006), se faz necessário realizar mais investigações sobre o estresse pré-natal no desenvolvimento encefálico de bovinos, abordando tanto as manifestações macroscópicas como microscópicas e as potenciais consequências em bezerros e vacas na vida adulta.

7 CONCLUSÕES

Com a análise dos resultados obtidos na presente pesquisa, pode-se afirmar que a claudicação ($EL \geq 3$) em vacas da raça Holandesa durante a gestação:

- Não alterou o volume do encéfalo, hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal dos bezerros, apesar de os animais nascidos de vacas com claudicação apresentarem volumes menores destas estruturas;
- Não alterou a concentração de imunoglobulinas no colostro, determinada indiretamente através do Brix, a duração da gestação em dias, a concentração de cortisol salivar e o hemograma das vacas;
- Não alterou peso vivo ao nascimento, a altura de cernelha, a concentração de imunoglobulina sérica, determinada indiretamente através do Brix, e o peso até o desmame dos bezerros;
- Não alterou o tempo decorrido entre o nascimento até o desmame das bezerras, apesar deste ser maior nas bezerras nascidas de vacas com claudicação.

REFERÊNCIAS

- 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.
- ALVES, C. G. T. **Análise Comparativa da Laminite em fêmeas bovinas adultas das raças holandesa, parda alpina e girolanda, no agreste setentrional de Pernambuco**. 2007, 89 f. Dissertação de Mestrado, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2007.
- ANDERSON, D. K.; RHEES, R. W.; FLEMING, D. E. Effects of prenatal stress on differentiation of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area (SDN-POA) of the rat brain. **Brain Res.**, v. 332, p. 113–118, 1985.
- 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.
- AVISHAI-ELINER, S.; BRUNSON, K. L.; SANDMAN, C. A.; BARAM, T. Z. Stressed-out or in (utero)? **Trends Neurosci.** v. 25, p. 518–524., 2002.
- BALE, T. L. Epigenetic and transgenerational reprogramming of brain development. **Nat. Rev. Neurosci.** v. 16, p. 332–344, 2015.
- 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. **Recuperação clínica e resposta a dor em bezerros descornados com ferro quente**: influência do estresse pré-natal. 2022. 102 f. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.
- BARKER, D. J. P. The developmental origins of chronic adult disease. **Acta Paediatr Suppl.**, n. 446, p. 26-33, 2004.

BARROS, V. G.; DUHALDE-VEGA, M.; CALTANA, L.; BRUSCO, A.; ANTONELLI, M. C. Astrocyte-neuron vulnerability to prenatal stress in the adult rat brain. **J. Neurosci. Res.**, v. 83, p. 787–800, 2006.

BATE, L. A.; HACKER, R. R. The influence of environmental temperature during late gestation and soon after birth on IgG absorption by newborn piglet. **Can. J. Anim. Sci.**, v. 65, p. 87–93, 1985.

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.

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.

BOND, G. B.; ALMEIDA, R.; OSTRENSKY, A.; MOLENTO, C. F. M. Métodos de diagnóstico e pontos críticos de bem-estar de bovinos leiteiros. **Ciência Rural**, v. 42, n. 7, p. 1286-1293, 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. **Projeções do Agronegócio: BRASIL 2022-2023 a 2032-2033**. Secretaria de Política Agrícola. Brasília, 2023, 108 p. (<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/politica-agricola/todas-publicacoes-de-politica-agricola/projecoes-do-agronegocio/projecoes-do-agronegocio-2022-2023-a-2032-2033.pdf/>). Acesso em 30 de setembro de 2023.

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

CHARIL, A.; LAPLANTE, D. P.; VAILLANCOURT, C.; KING, S. Prenatal stress and brain development. **Brain Research Reviews**, v. 65, p. 56-79, 2010.

COOK, N. B. The influence of barn design on dairy cow hygiene, lameness, and udder health. In: 35° Annual Conference. American Association of Bovine Practitioners, **Proceedings**, Madison, p. 97–103, 2002.

COE, C. L.; LULBACH, G. R.; SCHNEIDER, M. L. Prenatal disturbance alters the size of the corpus callosum in young monkeys. **Dev. Psychobiol.** v. 41, p. 178–185, 2002.

COE, C. L.; KRAMER, M.; CZÉH, B.; GOULD, E.; REEVES, A. J.; KIRSCHBAUM, C.; FUCHS, E. Prenatal stress diminishes neurogenesis in the dentate gyrus of juvenile rhesus monkeys. **Biol. Psychiatry**. v. 54, p. 1025–1034, 2003.

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.

DEELEN, S.M., OLLIVETT, T.L., HAINES, D.M., LESLIE, K.E. Evaluation of a Brix refractometer to estimate sérum immunoglobulin G concentration in neonatal dairy calves. *Journal of Dairy Science*, v. 97, p. 3838–3844, 2014.

DELAHUNTA, A.; GLASS, E. **Veterinary neuroanatomy and clinical neurology**. 3 ed., Elsevier Inc., 2009, 515 p.

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

FOWDEN, A. L.; GIUSSANI, D. A.; FORHEAD A. J. Intrauterine programming of physiological systems: Causes and Consequences. **Physiology**, n. 21, p. 29–37, 2006.

GALINDO, F.; BROOM, D. Effects of lameness of dairy cows. **J. Appl. Anim. Welf. Sci.**, v. 5, p. 193-201, 2002.

GIBBONS, J.; VASSEUR, E.; RUSHEN, J.; DE PASSILLÉ, A. M. 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.

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.

GREEN, L. E.; BORKERT, J.; MONTI, G.; TADICH, N. Associations between lesion-specific lameness and the milk yield of 1635 dairy cows from seven herds in the Xth region of Chile and implications for management of lame cows world wide. **Anim. Welfare**, v.19, p. 419-427, 2010.

GREENOUGH, P.R., 1996. Controlling lameness in dairy cattle. In: RUSHEN, J.; TAYLOR, A. A.; DE PASSILLE´, A. M. Domestic animals' fear of humans and its effect on their welfare. **Appl. Anim. Behav. Sci.** v. 65, p. 285-303, 1999.

GUCCIONE, J.; CARCASOLE, C.; ALSAOD, 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.

HAYASHI, A.; NAGAOKA, M.; YAMADA, K.; ICHITANI, Y.; MIAKE, Y.; OKADO, N. Maternal stress induces synaptic loss and developmental disabilities of offspring. **Int. J. Dev. Neurosci.** v. 16, p. 209–219, 1998.

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.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa da Pecuária Municipal (PPM)**, 2022. (<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/ppm/quadros/brasil/2022>). Acesso em 30 de setembro de 2023.

JARVIS, S.; MOINARD, C.; ROBSON, S. K.; BAXTER, E.; ORMANDY, E.; DOUGLAS, A. J.; SECKL, J. R.; RUSSELL, J. A.; LAWRENCE, A. B. Programming the offspring of the pig by prenatal social stress: neuroendocrine activity and behaviour. **Horm. Behav.** v. 49, p. 68-80, 2006.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 13 ed. Rio de Janeiro: Grupo Editorial Nacional, 2013. 568 p.

KAWAMURA, T.; CHEN, J.; TAKAHASHI, T.; ICHITANI, Y.; NAKAHARA, D. Prenatal stress suppresses cell proliferation in the early developing brain. **NeuroReport**, v. 17, p. 1515–1518, 2006.

KOENIG, J. I.; KIRKPATRICK, B.; LEE, P. Glucocorticoid hormones and early brain development in schizophrenia. **Neuropsychopharmacology**, v. 27, p. 309-318, 2002.

KRANENDONK, G.; HOPSTER, H.; FILLERUP, M.; EKKEL, E. D.; MULDER, E. J. H.; WIEGANT, V. M.; TAVERNE, M. A. M. Lower birth weight and attenuated adrenocortical response to ACTH in offspring from sows that orally received cortisol during gestation. **Domest. Anim. Endocrinol.** v. 30, p. 218–238, 2006.

KRASZPULSKI, M.; DICKERSON, P. A.; SALM, A. K. Prenatal stress affects the developmental trajectory of the rat amygdala. **Stress**, v. 9, p. 85–95, 2006.

LAY, D. C.; RANDEL, R. D.; FRIEND, T. H.; JENKINS, O. C.; NEUENDORFF, D. A.; BUSHONG, D. M.; LANIER, E. K.; BJORGE, M. K. Effects of prenatal stress on suckling calves. **J. Anim. Sci.** v. 75, p. 3143-3151, 1997a.

LAY, D. C.; RANDEL, R. D.; FRIEND, T. H.; CARROLL, J. A.; WELSH, T. H.; JENKINS, O. C.; NEUENDORFF, D. A.; BUSHONG, D. M.; KAPP, G. M. Effects of prenatal stress on the fetal calf. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v. 14, p. 73–80, 1997b.

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.; 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.

LEY, S. J.; WATERMAN, A. E.; LIVINGSTON, A.; PARKINSON, T. J. Effect of chronic pain associated with lameness on plasma cortisol concentrations in sheep: a field study. **Veterinary Science**, v. 57, p. 332-335, 1994.

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.

LINDSAY, R. S.; LINDSAY, R. M.; EDWARDS, C. R. W.; SECKL, J. R. Inhibition of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in pregnant rats and the programming of blood pressure in the offspring. **Hypertension**. v. 27, p. 1200–1204, 1996.

MACHADO-NETO, R.; GRAVES, C. N.; CURTIS, S. E. Immunoglobulins in piglets from sows heat-stressed prepartum. **J. Anim. Sci.**, v. 65, p. 445– 455, 1987.

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.

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

MOISIADIS, V. G.; MATTHEWS, S. G. Glucocorticoids and fetal programming part 1: Outcomes. **Nat. Rev. Endocrinol.** v. 10, p. 403–411, 2014.

MURMU, M.S.; SALOMON, S.; BIALA, Y.; WEINSTOCK, M.; BRAUN, K.; BOCK, J. Changes of spine density and dendritic complexity in the prefrontal cortex in offspring of mothers exposed to stress during pregnancy. **Eur. J. Neurosci.** v. 24, p. 1477-1487, 2006.

MYCHASIUK, R.; GIBB, R.; KOLB, B. Prenatal stress alters dendritic morphology and synaptic connectivity in the prefrontal cortex and hippocampus of developing offspring. **Synapse**, v. 66, p. 308-314, 2012.

NARDONE, A.; LACETERA, N.; BERNABUCCI, U.; RONCHI, B. Composition of colostrum from dairy heifers exposed to high air temperatures during late pregnancy and the early postpartum period. **J. Dairy Sci.**, v. 80, p. 838–844, 1997.

NICKLES, K. R.; RELLING, A. E.; GARCIA-GUERRA, A.; FLUHARTY, F. L.; PARKER A. J. Environmental stress during the last trimester of gestation in pregnant cows and its effect on offspring growth performance and response to glucose and adrenocorticotrophic hormone. **Journal of Animal Science**, v. 101, 2023

OTTEN, W.; KANITZ, E.; COURET, D.; VEISSIER, I.; PRUNIER, A.; MERLOT, E. Maternal social stress during late pregnancy affects hypothalamic- pituitary-adrenal function and brain neurotransmitter systems in pig offspring. **Domest. Anim. Endocrinol.** v. 8, p. 146-156, 2010.

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.

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

PETIT, B.; BOISSY, A.; ZANELLA, A.; CHAILLOU, E.; ANDANSON, S.; BES, S.; LÉVY, F.; COULON, M. Stress during pregnancy alters dendritic spine density and gene expression in the brain of new-born lambs. **Behavioural Brain Research**, v. 291, p. 155-163, 2015.

PRADA, I. **Neuroanatomia Funcional em Medicina Veterinária com correlações clínicas**. 1 ed., Jaboticabal: Terra Molhada, 2014, 616 p.

QUIGLEY, J. D.; LAGO, A.; CHAPMAN, C.; ERICKSON, P.; POLO, J. Evaluation of the Brix refractometer to estimate immunoglobulin G concentration in bovine colostrum. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 2059-2065, 2013.

RICHETTO, J.; RIVA, M. A. Prenatal maternal factors in the development of cognitive impairments in the offspring. **J. Reprod. Immunol.** 2014.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jri.2014.03.005>

ROBERTSON, S. A.; CHIN, P.-Y.; SCHJENKEN, J. E.; THOMPSON, J. G. Female tract cytokines and developmental programming in embryos. **Adv. Exp. Med. Biol.** v. 843, p. 173–213, 2015.

ROBERTSON, S. A.; CHIN, P. Y.; FEMIA, J. G.; BROWN, H. M. Embryotoxic cytokines—Potential roles in embryo loss and fetal programming. **J. Reprod. Immunol.**, v. 125, p. 80–88, 2018.

RODRIGUEZ, N.; MAYER, N.; GAUNA, H. F. Effects of prenatal stress on male offspring sexual maturity. **Biocell**, Mendoza , v. 31, n. 1, p. 67-74, 2007.

- ROSENBERGER, G. **Exame clínico dos bovinos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983. 429 p.
- ROUSSEL, S.; HEMSWORTH, P. H.; LERUSTE, H.; WHITE, C.; DUVAUX-PONTER, C. Does stress imposed on pregnant goats affect the stress physiology and behaviour of their kids?. **J Anim Vet Adv.**, v. 4, p. 287–294, 2005.
- ROUSSEL, S.; HEMSWORTH, P. H.; LERUSTE, H.; WHITE, C.; DUVAUX-PONTER, C.; NOWAK, R.; BOISSY, A. Repeated transport and isolation during pregnancy in ewes: effects on the reactivity to humans and to their offspring after lambing. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 97(2–4), p. 172–189, 2006.
- RUSHEN, J.; TAYLOR, A. A.; DE PASSILLE, A. M. Domestic animals' fear of humans and its effect on their welfare. **Appl. Anim. Behav. Sci.**, v. 65, p. 285–303, 1999.
- RUTHERFORD, K. M. D.; PIASTOWSKA-CIESIELSKA, A.; DONALD, R. D.; ROBSON, S. K.; ISON, S. H.; JARVIS, S.; BRUNTON, P. J.; RUSSELL, J. A.; LAWRENCE, A. B. Prenatal stress produces anxiety prone female offspring and impaired maternal behaviour in the domestic pig. **Physiology and Behavior**, v. 129, p. 255–264, 2014.
- 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. **Scientific Reports**, v. 11, n. 13052, 2021a.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-92507-2>
- SARMIENTO, M. P. **Lameness in sows and the emotional consequences in the offspring**. 2021. 91 f. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021b.
- SCHMIDT, M. J.; PILATUS, U.; WIGGER, A.; KRAMER, M.; OELSCHLÄGER H. A. Neuroanatomy of the Calf Brain as Revealed by High-Resolution Magnetic Resonance Imaging. **Journal of Morphology**, v. 270, p. 745–758, 2009.
- SCHMITZ, C.; RHODES, M. E.; BLUDAU, M.; KAPLAN, S.; ONG, P.; UEFFING, I.; VEHOFF, J.; KORR, H.; FRYE, C. A. Depression: reduced number of granule cells in the hippocampus of female, but not male, rats due to prenatal restraint stress. **Mol. Psychiatry**, v. 7, p. 810–813, 2002.
- SCHREINER, D. A.; RUEGG, P. L. Effects of tail docking on milk quality and cow cleanliness. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 2503–2511, 2002.
- SCHWERIN, M.; KANITZ, E.; TUCHSCHERER, M.; BRÜSSOW, K. P.; NÜRNBERG, G.; OTTEN, W. Stress-related gene expression in brain and adrenal gland of porcine fetuses and neonates. **Theriogenology**, v. 63, p. 1220–1234, 2005.

SCOTT, T. D.; NAYLOR, J. M.; GREENOUGH P. R. A Simple Formula for Predicting Claw Volume of Cattle. **The Veterinary Journal**, v. 158, p. 190–195, 1999

SECKL, J. R. Prenatal glucocorticoids and long-term programming. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 151(Suppl3), p. U49–U62, 2004.

SECKL, J. R.; HOLMES, M. C. Mechanisms of disease: Glucocorticoids, their placental metabolism and fetal ‘programming’ of adult pathophysiology. **Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.**, v. 3, p. 479–488, 2007.

SECKL, J. R.; MEANEY, M.J. Glucocorticoid “Programming” and PTSD Risk. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 1071, p. 351-378, 2006.

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 testes. **Applied Animal Behavior Science**, v. 110, n. 1-2, p. 189-202, 2008.

SZURAN, T.; ZIMMERMANN, E.; WELZL, H. Water maze performance and hippocampal weight of prenatally stressed rats. **Behav. Brain Res.**, v. 65, p. 153–155, 1994.

TADICH, N. Bienestar animal en bovinos lecheros. **Rev. Colomb. Cienc. Pecu.**, v. 24, n. 3, p. 293-300, 2011.

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.

TUCHSCHERER, M.; KANITZ, E.; OTTEN, W.; TUCHSCHERER, A. Effects of prenatal stress on cellular and humoral immune responses in neonatal pigs. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 86, p. 195–203, 2002.

ULUPINAR, E.; YUCEL, F. Prenatal stress reduces interneuronal connectivity in the rat cerebellar granular layer. **Neurotoxicol. Teratol.**, v. 27, p. 475–484, 2005.

ULUPINAR, E.; YUCEL, F.; ORTUG, G. The effects of prenatal stress on the Purkinje cell neurogenesis. **Neurotoxicol. Teratol.**, v. 28, p. 86–94, 2006.

UNO, H.; LOHMILLER, L.; THIEME, C.; KEMNITZ, J. W.; ENGLE, M. J.; ROECKER, E. B.; FARRELL, P. M. Brain damage induced by prenatal exposure to

dexamethasone in fetal rhesus macaques, 1. Hippocampus. **Dev. Brain Res.**, v. 53, p. 157–167, 1990.

UNO, H.; EISELE, S.; SAKAI, A.; SHELTON, S.; BAKER, E.; DEJESUS, O.; HOLDEN, J. Neurotoxicity of glucocorticoids in the primate brain. **Horm Behav.**, v. 28, n. 4, p. 336-348, 1994.

USDA - United States Department of Agriculture - Economic Research Service.
VALDES, C. **Brazil's Momentum as a Global Agricultural Supplier Faces Headwinds**, 2022. ([USDA ERS - Brazil's Momentum as a Global Agricultural Supplier Faces Headwinds](#)). Acesso em 30 de setembro de 2023.

VAN DEN BERGH, B.R.H.; VAN CALSTER, B.; SMITS, T.; VAN HUFFEL, S.; LAGAE, L. Antenatal maternal anxiety is related to HPA-axis dysregulation and self-reported depressive symptoms in adolescence: a prospective study on the fetal origins of depressed mood. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, p. 536-545, 2007.

VILTART, O.; VANBESIEN-MAILLIOT, C. A. Impact of prenatal stress on neuroendocrine programming. **Scientific World Journal**, v. 7, p. 1493-1537, 2007.

WASSINK, G. J.; KING, E. M.; GROGONO-THOMAS, R.; BROWN, J. C.; MOORE, L.J.; GREEN, L. E. A within farm clinical trial to compare two treatments (parenteral antibacterials and hoof trimming) for sheep lame with footrot. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 96, p. 93-103, 2010.

WELBERG, L. A. M.; SECKL, J. R. Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of the brain. **J. Neuroendocrinology**, n. 13, p. 113–128, 2001.

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. **Vet Rec.**, v. 153, n. 7, 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.

YANG, S.; CHANG, M. C. Chronic Pain: Structural and Functional Changes in Brain Structures and Associated Negative Affective States. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 20, p. 3130, 2019.