UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

PRISCILA DOS SANTOS SILVA

**Influência do estresse térmico no final da gestação de cabras:
Alterações da placenta e desempenho dos cabritos**

PRISCILA DOS SANTOS SILVA

**Influência do estresse térmico no final da gestação de cabras:
Alterações da placenta e desempenho dos cabritos**

Versão Corrigida

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

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dr. João Alberto Negrão

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

dos Santos Silva, Priscila
dD722i Influência do estresse térmico no final da
gestação de cabras: Alterações da placenta e
desempenho dos cabritos / Priscila dos Santos Silva
; orientador João Alberto Negrão. -- Pirassununga,
2017.
79 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação
em Zootecnia) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. cortisol. 2. enzima 11 β -HSD. 3. expressão
gênica. 4. parto. I. Alberto Negrão, João, orient.
II. Título.

Universidade de São Paulo

ATA DE DEFESA

Aluno: 74131 - 9095952 - 1 / Página 1 de 1

Ata de defesa pública de Dissertação do(a) Senhor(a) Priscila dos Santos Silva no Programa: Zootecnia, do(a) Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo.

Aos 07 dias do mês de fevereiro de 2018, no(a) Sala Azul do ZAB realizou-se a Defesa da Dissertação do(a) Senhor(a) Priscila dos Santos Silva, apresentada para a obtenção do título de Mestra intitulada:

"Influência do estresse térmico no final da gestação de cabras: Alterações da placenta e desempenho dos cabritos"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra ao candidato para exposição e a seguir aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Função	Sigla da CPG	Resultado
João Alberto Negrao	Presidente	FZEA - USP	Não Votante
Deise Carla Almeida Leite Dellova	Titular	FZEA - USP	<u>APROVADA</u>
Paula Pimentel Valente	Titular	UNESP - Externo	<u>aprovada</u>
Sarita Bonagurio Gallo	Titular	FZEA - USP	<u>Aprovada</u>

Resultado Final: APROVADA

Parecer da Comissão Julgadora *

Eu, Erica Cristina Mello Ferraz, lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as). Pirassununga, aos 07 dias do mês de fevereiro de 2018.

Deise Carla Almeida Leite Dellova

Paula Pimentel Valente

Sarita Bonagurio Gallo

João Alberto Negrao
Presidente da Comissão Julgadora

* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

A defesa foi homologada pela Comissão de Pós-Graduação em 09.02.2018 e, portanto, o(a) aluno(a) faz jus ao título de Mestra em Ciências obtido no Programa Zootecnia - Área de concentração: Qualidade e Produtividade Animal.

Presidente da Comissão de Pós-Graduação

Prof.ª. Dr.ª. Rosemary Ap. de Carvalho
Presidente da Comissão de
Pós-Graduação
FZEA/USP

Agradeço a Deus por ter me concedido sabedoria, força e determinação para realizar este trabalho pois sem Ele, eu nada seria.

Dedico este trabalho a minha família, que mesmo estando longe geograficamente estão sempre ao meu lado, apoiando, incentivando, torcendo e vibrando por cada conquista. Abdicar da convivência de vocês para correr atrás dos sonhos não foi fácil, segurar as lágrimas por causa da saudade e ver os cabelos brancos chegando por meio de uma tela de computador muito menos, mas acredito que nenhum esforço foi em vão e cada momento será celebrado e abençoado.

Dedico aos meus amigos-irmãos, Brenda, Rafael Ceará e Milena, que acompanharam meus passos desde que cheguei em Pirassununga, me apoiaram, aconselharam e viveram vários momentos comigo. Vocês foram minha família aqui e sou muito grata de tê-los em minha vida.

Dedico as meninas da Rep. Hard Roça e Rocio, que dividiram vários momentos e se tornaram muito queridas.

Dedico aos “Cabeças”, meus parceiros de laboratório Henrique e Emanuel, que se tornaram grandes amigos e tornaram o ambiente de trabalho um lugar aconchegante, deixando os meus dias mais felizes. Momentos que irei guardar com muita alegria. Vocês são demais!

Dedico a Equipe LAFA, sem vocês não teria sido possível fazer metade do trabalho realizado. Apreendi muito com cada um, muito obrigada!

AGRADECIMENTO

Ao Prof. Dr. João Alberto Negrão, pela oportunidade, orientação e confiança durante o curso de mestrado.

Ao Laboratório de Fisiologia Animal (LAFA), por ceder os animais e toda a estrutura necessária para a execução deste trabalho.

A Equipe LAFA, Giovana, Sandra e Antônio (China), pelo ensinamento e apoio durante a execução de cada etapa do experimento, análises laboratoriais e manejo com os animais.

Ao Henrique, por ter sido meu parceiro na execução do experimento e todo seu desenvolvimento.

À Professora Annaelise (Prof^ª. Kiki), pelo apoio com os diagnósticos de gestação, espaço do laboratório cedido para guardarmos amostras e ensinamentos.

Ao Departamento de Reprodução Animal da FMVZ-USP, por ceder a câmara climática e possibilitado a realização do experimento.

Ao Emanuel Manica, pelo auxílio no processamento das amostras.

Aos Estagiários, pelo auxílio na coleta das amostras, manejo dos animais e aleitamento dos cabritos, em especial a Vitória que permaneceu conosco durante todo o período do mestrado.

A Lina, Ana Paula e Brenda, pelo auxílio nas coletas.

À CAPES, por conceder a bolsa de estudos.

“E ainda que... conhecesse todos os mistérios e toda a ciência... e não tivesse amor, nada seria.”

I Coríntios 13.2

RESUMO

SILVA, P. dos S. **Influência do estresse térmico no final da gestação de cabras: Alterações da placenta e desempenho dos cabritos**. 2017. 79 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

O estresse por calor influencia a fisiologia da fêmea causando modificações placentárias que interferem no desenvolvimento fetal e desempenho dos cabritos. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do estresse térmico durante o terço final da gestação sobre a placenta de cabras Saanen, o comportamento materno-filial, as respostas termorregulatórias e peso dos cabritos do nascimento até os 60 dias de vida. Neste projeto de pesquisa foram utilizadas 47 cabras no terço final da gestação, 24 animais foram submetidos ao estresse por calor na câmara climática (tratamento estresse térmico – ET) e 23 cabras permaneceram em ambiente de termoneutralidade (tratamento controle – CT). O experimento foi organizado em 3 fases distintas: gestação, parto e desenvolvimento dos cabritos. Em cada fase os animais foram acompanhados diariamente e quinzenalmente, foi obtido plasma para dosagem de cortisol. Todos partos foram acompanhados, sendo colhidas amostras do líquido amniótico e placenta, da qual foi realizado análise histológica e expressão gênica das HSPs 27, 70 e 90, enzima 11 β -HSD tipo 1 e tipo 2, CRH e ACTH-R. No nascimento, foi realizado o escore APGAR dos cabritos e avaliações do comportamento materno-filial. Os cabritos foram pesados semanalmente e acompanhados do nascimento até o desmame. As concentrações de cortisol no líquido amniótico das cabras do tratamento ET ($39,42 \pm 1,3$ ng/mL) foram significativamente maiores que o tratamento CT ($31,87 \pm 2,04$ ng/mL) e o inverso ocorreu para a concentração plasmática dos cabritos no nascimento que foram significativamente maiores para o tratamento CT ($94,83 \pm 5,49$ ng/mL) que para o ET ($70,20 \pm 5,41$ ng/mL). O estresse térmico causou redução significativa na eficiência placentária das cabras ET ($9,98 \pm 0,41$) quando comparada as cabras CT ($13,06 \pm 2,16$), assim como na expressão gênica da enzima 11 β -HSD tipo 2 no tecido placentário das cabras ET ($4,16 \pm 1,79$) e aumento na expressão gênica do ACTH-R ($9,4 \pm 1,00$) quando comparadas ao tecido placentário das cabras CT ($25,06 \pm 3,85$ e $3,44 \pm 1,00$, respectivamente). Como forma de proteção celular, houve maior expressão gênica da HSP 70 no tecido placentário das cabras ET ($5,44 \pm 0,46$) que das cabras CT ($3,05 \pm 0,64$). Os cabritos ET apresentaram maior mobilização dos mecanismos termorregulatórios que os cabritos CT. As cabras ET apresentaram maior frequência na atividade de estímulo a cria a levantar. Os cabritos ET também tiveram maior frequência na tentativa de levantar que os cabritos CT. Houve diferença no peso dos cabritos CT ($3,97 \pm 0,07$ Kg) e ET ($3,71 \pm 0,07$ Kg) aos 8 dias de vida, e tendência no nascimento e 15 dias de vida. No entanto, o tratamento térmico não influenciou o peso ao desmame. Em conclusão, o estresse térmico por calor no terço final de gestação de cabras, estimulou maior atividade de cuidados das cabras com os cabritos, assim como teve impacto negativo na eficiência placentária, tendo como reflexo maior mobilização dos mecanismos termorregulatórios, e menor ganho de peso dos cabritos nos primeiros 15 dias de vida, mas sem interferir no desempenho ao desmame.

Palavras-chave: cortisol, enzima 11 β -HSD, expressão gênica, parto.

ABSTRACT

SILVA, P. dos S. **Influence of heat stress at final gestation period: alterations in placenta and goatlings` performance.** 2017. 79 f. Dissertation (Master) – Faculty of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Pirassununga, 2017.

Heat stress influences the physiology of female causing placental changes that interfere in the fetal development and performance of goatlings. Thus, the aim of the present study was to evaluate the effect of thermal stress during the final third of gestation on the placental of Saanen goats, thermoregulatory responses and goatlings` performance. In this research, 47 goats at final third of gestation were used, 24 animals were submitted to heat stress in climatic chamber (heat stress treatment - HS) and 23 goats remained in thermoneutral environment (control treatment - CT). The experiment was organized in three distinct phases: gestation, kidding and development of kids. At each stage the animals were monitored daily and biweekly, it was obtained the plasma for cortisol analysis. The kidding of all goats was assisted and samples of amniotic fluid and placenta were collected, it was performed histological analysis and gene expression of HSPs 27, 70 and 90, 11 β -HSD enzyme type 1 and type 2, CRH and ACTH-R. At birth, was evaluated the APGAR score of the goatlings and was observed the maternal-filial behaviors. The kids were weighed weekly and were accompanied from birth to weaning at 60 days years old. The concentrations of cortisol in the amniotic fluid for the HS goats (39.42 ± 1.3 ng/mL) were significantly higher than the CT goats (31.87 ± 2.04 ng/mL) and the opposite occurred for the goatlings cortisol plasma concentration at birth that was significantly higher for the CT treatment (94.83 ± 5.49 ng/mL) than for HS (70.20 ± 5.41 ng/mL). The heat treatment promoted a significant reduction in the placental efficiency for HS goats (9.98 ± 0.41) when compared to CT goats (13.06 ± 2.16), there was also a significant reduction in 11b-HSD type 2 enzyme gene expression in placental tissue of HS goats (4.16 ± 1.79) and an increase in the gene expression of ACTH-R ($9.4 \pm 1,00$) when compared to the placental tissue of CT goats (25.06 ± 3.85 and $3.44 \pm 1,00$, respectively). In order to protect cells, there was more gene expression in the HSP 70 in placental tissue of HS goats (5.44 ± 0.46) than the CT goats ($3,05 \pm 0,64$). The HS kids showed greater mobilization of the thermoregulatory mechanisms than the goatlings of the CT treatment. The HS goats showed higher frequency in the stimulation activity of offspring to raise. HS kids had higher frequency in the attempt to raise than those in CT. At 8 days of life, was observed a difference in the goatling`s weight, CT (3.97 ± 0.07 kg) and HS (3.71 ± 0.07 kg). However, the heat treatment did not influence the weight at weaning. In conclusion, heat stress in the final third of gestation of goats stimulated greater goat care with goats, as well as having a negative impact on the placental efficiency, with a greater mobilization of thermoregulatory mechanisms, and the lowest weight gain of kids goats in the first 15 days of life, but without interfering in the performance of animals at weaning.

Key-words: cortisol, 11b-HSD enzyme, gene expression, kidding.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura da placenta sinepteliocorial.....	15
Figura 2 - Esteroidogênese na interface materno-fetal.....	20
Figura 3 - Procedimentos realizados durante o período experimental.....	23
Figura 4 - Imagens ultrassonográficas do diagnóstico de gestação.....	24
Figura 5 - Acomodação do tratamento CT nas baias sombreadas.....	24
Figura 6 - Acomodação do tratamento ET em Câmara Climática do Departamento de Reprodução animal da FMVZ/USP.....	25
Figura 7 - Percurso e transporte das cabras dos tratamentos ET e CT.....	26
Figura 8 - Temperatura máxima do ar para tratamento controle e estresse durante os períodos de adaptação ambiental e térmico.....	27
Figura 9 - Índice de temperatura e umidade (ITU) dos ambientes do tratamento CT e ET durante os períodos de adaptação ambiental e térmico.....	28
Figura 10 - Aleitamento dos cabritos por sistema controlado.....	29
Figura 11 - Procedimentos de avaliação e colheita de amostras na Fase 1: Gestação.....	31
Figura 12 - Procedimentos de avaliação e colheita de amostras da Fase 2: Parto.....	32
Figura 13 - Eventos que indicavam a duração do parto.....	33
Figura 14 - Observação do comportamento materno-filial.....	34
Figura 15 - Pesagem e mensuração dos cotilédones.....	35
Figura 16 - Procedimentos de avaliação e colheita de amostras da Fase 3: Desenvolvimento dos cabritos.....	36
Figura 17 - Variáveis ambientais em relação aos dias de coleta dos parâmetros fisiológicos dos cabritos.....	37
Figura 18 - Avaliação dos parâmetros fisiológicos e pesagem dos cabritos....	37
Figura 19 - Separação dos fragmentos do cotilédone e região intercotiledonária para histologia.....	38
Figura 20 - Identificação das células trofoblásticas dos cotilédones.....	39
Figura 21 - Preparo das amostras do cotilédone e região intercotiledonária para extração do RNA.....	39
Figura 22 - Eletroforese do gel de agarose a 1,5.....	42
Figura 23 - Concentração de cortisol presente no plasma materno, líquido amniótico e plasma dos cabritos dos tratamentos CT e ET no momento do parto.....	44
Figura 24 - Concentração de cortisol plasmático das cabras dos tratamentos CT e ET no parto e 15 dias pré e pós-parto.....	45
Figura 25 - Comparação da concentração de cortisol plasmático em relação tempo de duração do parto (min).....	46
Figura 26 - Influência do tamanho da prole na concentração cortisol no plasma materno, líquido amniótico e plasma dos cabritos.....	47
Figura 27 - Concentração plasmática de cortisol dos cabritos CT e ET no nascimento e aos 15 dias de vida.....	48
Figura 28 - Comparação da contagem e identificação celular cotiledonária entre as categorias múltíparas e primíparas.....	49
Figura 29 - Dendograma das variáveis utilizadas nos cálculos placentários....	49

Figura 30 - Comparação da eficiência placentária entre os tratamentos CT e ET.....	51
Figura 31 - Expressão gênica das HSPs 27, 70 e 90, da enzima 11 β -HSD2 e do receptor para ACTH no tecido placentário das cabras dos tratamentos CT e ET.....	52
Figura 32 - Comparação da frequência das atividades comportamentais das cabras CT e ET com os cabritos nos primeiros 60 minutos após o parto.....	53
Figura 33 - Avaliação comportamental materna.....	54
Figura 34 - Comparação da frequência das atividades comportamentais dos cabritos CT e ET nos primeiros 60 minutos de vida.....	55
Figura 35 - Principais atividades exercidas pelos cabritos que demonstraram diferenças entre os tratamentos.....	55
Figura 36 - Pesagem dos cabritos CT e ET do nascimento aos 60 dias de vida.	56
Figura 37 - Avaliação dos parâmetros fisiológicos dos cabritos dos tratamentos CT e ET dos 15 dias aos 60 dias de vida.....	57

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
bpm	Batimentos por minuto
CBN	Células binucleadas
CL	Corpo lúteo
CMN	Células multinucleadas
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
CT	Controle térmico
DHEA	Sulfato de deidroepiandrosterona
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EIA	Ensaio Imunoenzimático
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ET	Estresse térmico
FC	Frequência cardíaca
FR	Frequência respiratória
GR	Receptor de glicocorticoide
HOP	Co-chaperona HOP
HPA	Hipotálamo-pituitária-adrenal
HSP	Proteínas de choque térmico
ITU	Índice de temperatura e umidade
mrpm	Movimentos respiratórios por minuto
NF-κB	Fator nuclear Kappa B
NRC	National Research Council
PAG	Glicoproteínas associadas à prenhes
PB	Pares de bases
PCR	Reação Polimerase em Cadeia
PV	Peso vivo
P23	Co-chaperona P23
RNA	Ácido ribonucleico
RT	Transcriptase reversa
TDOR	Temperatura dorsal
TDT	Temperatura dorsal com tricotomia
Temp	Temperatura
TM	Temperatura do membro
TMT	Temperatura do membro com tricotomia
TR	Temperatura retal
TS	Temperatura superficial
UBC	Ubiquitina
3β-HSD	3β-hidroxisteroide desidrogenase
11β-HSD1	Enzima 11β-hidroxiesteroide desidrogenase tipo 1
11β-HSD2	Enzima 11β-hidroxiesteroide desidrogenase tipo 2

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVO	14
3	REVISÃO DE LITERATURA	15
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1	Local e período de execução do experimento	23
4.2	Alojamento dos animais	23
4.3	Tratamentos Experimentais:.....	24
4.4	Transporte e Período de adaptação à Câmara Climática.....	25
4.5	Manejo Sanitário e Nutricional das cabras.....	28
4.6	Manejo pós-parto.....	29
4.6.1	Manejo nutricional dos cabritos	29
4.7	Colheitas experimentais	30
4.7.1	Fase 1: Gestação.....	30
4.7.2	Fase 2: Parto.....	32
4.7.3	Fase 3: Desenvolvimento dos cabritos	35
4.8	Análises Laboratoriais.....	38
4.8.1	Determinação do cortisol plasmático e do líquido amniótico por ELISA	38
4.8.2	Histologia	38
4.8.3	Expressão gênica.....	39
4.9	Análise Estatística	42
5	RESULTADOS.....	44
6	DISCUSSÃO.....	59
7	CONCLUSÃO	68
	REFERÊNCIAS	69
	APÊNDICE	77
	ANEXO.....	79

1 INTRODUÇÃO

As mudanças climáticas dos últimos tempos têm preocupado a todos devido ao impacto negativo que pode causar nas plantas e animais e, conseqüentemente, nos nichos econômicos, sociais e sanitários. Desta forma, muitos estudos têm sido desenvolvidos para tentar minimizar este efeito sobre a criação e a produção animal (BUNGLAVAN; CHATURVEDI, 2013; DAS et al., 2016).

Afim de minimizar os efeitos do estresse térmico, está crescendo uma busca intensiva por melhorias que favoreçam a permanência dos animais em um ambiente onde a variação da temperatura ambiental exija um mínimo esforço para manter a regulação térmica corporal. Portanto, meios de promover o bem-estar animal e a compreensão dos mecanismos regulatórios têm sido fundamentais para favorecer maior conforto aos animais (SILANIKOVE, 2000).

A zona de conforto térmico pode ser influenciada pela temperatura ambiental, umidade relativa do ar, velocidade do vento e radiação solar. Para a maioria dos animais a temperatura ambiental ideal pode variar de 4 a 25°C. No entanto, na zona de conforto térmico para caprinos, a faixa de temperatura do ar pode variar entre 13 a 27°C, a umidade relativa de 60-70% e a velocidade do vento de 5 – 8 km/h, desta forma, ambientes que apresentam valores diferentes destes causam estresse térmico (DANGI et al., 2012, 2015).

Mesmo sendo considerada uma espécie rústica, ou seja, mais adaptada às condições climáticas adversas, quando comparada as demais espécies de ruminantes domésticos, as cabras, quando submetidas a elevadas temperaturas ambientais, usam diversos mecanismos de controle da temperatura corporal, entre eles podem ser citados as formas de dissipação do calor por condução, conversão, radiação e evaporação (BUNGLAVAN; CHATURVEDI, 2013).

Além das formas de dissipação, ocorrem mudanças comportamentais, fisiológicas e hormonais afim de compensar os efeitos que o estresse pode causar (SOUZA; SALLES; ARAÚJO, 2012), levando à modificações na expressão gênica destes animais (SALAMA et al., 2014). Sendo assim, os esforços exercidos na tentativa de dissipar o calor e retomar a homeotermia é conhecido como resposta ao estresse por calor (DANGI et al., 2015).

Acredita-se que o estresse crônico por calor em cabras no terço final da gestação, devido ao efeito prolongado da ação do cortisol, possa causar impactos negativos no desempenho funcional placentário resultando no desenvolvimento inadequado dos cabritos.

2 OBJETIVO

Portanto, o objetivo geral do presente estudo foi avaliar o efeito do estresse térmico durante o terço final da gestação sobre a placenta de cabras da raça Saanen, o comportamento materno-filial, as respostas termorregulatórias e peso dos cabritos do nascimento até os 60 dias de vida.

2.1 Objetivos Específicos

Avaliar o efeito do estresse térmico por calor no terço final da gestação sobre a relação cabra-placenta-cabrito por meio das concentrações de cortisol no plasma e no líquido amniótico;

Avaliar o impacto do estresse por calor sobre a eficiência e função placentária;

Estudar o impacto do estresse térmico sobre a população celular;

Avaliar a expressão gênica da HSP27, HSP70 e HSP90, das enzimas 11 β -HSD tipo 1 e tipo 2, CRH e ACTH-R no tecido placentário das cabras;

Avaliar os efeitos do estresse térmico sobre o comportamento materno-filial e vitalidade dos cabritos;

Avaliar as consequências do estresse térmico por calor durante o período gestacional sobre as respostas termorregulatórias, assim como o peso dos cabritos no nascimento até os 60 dias de vida.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Ação do cortisol sobre a estrutura e função placentária

O período gestacional é um dos momentos mais importantes para a fêmea, pois ocorrem muitas mudanças morfofisiológicas para adaptação do organismo, tornando-o apto a receber um novo conceito. A placenta pode ser considerada o principal órgão do período gestacional, pois é um órgão transitório que exerce múltiplas funções, como digestiva, de proteção, circulatória, secretória e excretória (COSTA, 2016; BURTON; FOWDEN, 2015; FTHENAKIS et al. 2012).

Nos ruminantes, com base na anatomia morfológica, a placenta é classificada em cotiledonária, esta característica confere uma segunda classificação baseado na morfologia histológica da interface materno-fetal, sendo classificada, portanto, de sinepteliocorial. A forma em que o tecido materno (carúnculas) e fetal (cotilédones) se relacionam é a principal característica que diferencia a placenta dos ruminantes das demais espécies, pois o tecido fetal é parcialmente separado do tecido materno, sendo a única forma de contato por meio dos placentomas (NAKAYA; MIYAZAWA, 2015).

Na fase de implantação, as células trofodérmicas também conhecidas como células gigantes ou células binucleadas (CBN) se fundem com as células endometriais formando as células multinucleadas (CMN) conhecidas como células híbridas fetomaternal e por meio desta fusão ocorre de fato a implantação e o transporte dos metabólitos necessários para manutenção da gestação (WOODING et al. 1993) (Figura 1).

Figura 1 – Estrutura da placenta sinepteliocorial.

Legenda: BNC; célula binucleada, Hyb; célula híbrida, MTC; célula trofoblástica mononuclear, EmEp; epitélio endometrial, EM; endométrio. Fonte: NAKAYA, Y.; MIYAZAWA, T. The roles of syncytin-like proteins in ruminant placentation. *Viruses*. v 7, p 2928-2942, 2015.

Na placenta de ovinos e caprinos, as células CBNs compõem aproximadamente de 15 a 20% das células do trofoderma fetal e são responsáveis pela produção e armazenamento do lactogênio placentário, que é um dos hormônios responsáveis por regular o crescimento fetal e glicoproteínas associadas à prenhez (PAG) (WARD; WOODING; FOWDEN, 2002).

Após a fusão de múltiplas CBN com as células do epitélio uterino, as células multinucleadas (células híbridas), por estarem em íntimo contato com o tecido materno liberam, via processo de exocitose, grânulos de microvesículas contendo hormônios como o lactogênio placentário na circulação materno-fetal e após este processo iniciam a apoptose celular (BRAUN et al. 2007; WANGO; WOODING et al. 1993; WOODING; HEAP, 1990).

No terço final da gestação, ocorre declínio do número de CBN, ao mesmo tempo que, a concentração de cortisol fetal circulante é elevada, portanto, o cortisol é um hormônio regulador fisiológico da população de células binucleadas (WARD; WOODING; FOWDEN, 2002). Quando as fêmeas gestantes são submetidas a situações nas quais as concentrações de cortisol plasmático são elevadas acima dos níveis fisiológicos, a população de CBN podem ser reduzidas de 24 a 47%, influenciando negativamente a produção do lactogênio placentário que terá como consequência a restrição do crescimento fetal (BRAUN et al. 2007).

3.2 Termorregulação Materno-fetal: reflexo da insuficiência placentária na vitalidade fetal e desenvolvimento do neonato

A temperatura ambiental tem grande influência sobre o desempenho dos animais, principalmente, no terço final da gestação, uma vez que essa fase exige várias adequações do organismo da fêmea. Por ser considerado um momento crítico, é fundamental que o ambiente que estas fêmeas se encontram proporcione bem-estar adequado. Desta forma, climas extremos podem interferir negativamente no desempenho produtivo das cabras e no desenvolvimento fetal (SALAMA et al. 2014). Neste contexto, a placenta desempenha importante função quando tratamos de viabilidade fetal, pois tanto a função quanto o desenvolvimento placentário estão diretamente ligados a vitalidade fetal (DWYER et al. 2005) e desempenho dos cabritos (KONYALI et al. 2007).

Durante o período gestacional, a termorregulação fetal é dependente da produção de calor do feto e troca metabólica que ocorre na relação materno-fetal (LABURN et al. 2002). Uma das principais formas de dissipação do calor é através da circulação uteroplacentária (FAURIE; MITCHELL; LABURN, 2001). No entanto, quando há desequilíbrio térmico materno, a manutenção da temperatura fetal também é influenciada, devido à redução na taxa de fluxo

sanguíneo placentário causando comprometimento na nutrição placentária e fetal, assim como na oxigenação e eliminação de metabólitos (REYNOLDS et al. 2006; ASAKURA, 2004; LABURN et al. 2002).

Alguns estudos desenvolvidos em humanos relatam que a atividade placentária inadequada por período prolongado (seja por hipoglicemia ou redução da oxigenação) pode causar inadequado desenvolvimento do sistema nervoso central do feto e do recém-nascido, levando a deficiência na conectividade da função neuronal (REES; HARDING, 2004), alteração da atividade comportamental e do desenvolvimento, como a ocorrência de déficits motores espásticos em até 10% dos recém-nascidos (REES; INDER, 2005).

O conjunto dessas complicações refletem na vitalidade fetal, devido ao centro termorregulador não ter total desenvolvimento e o feto ser dependente da oxigenação proveniente do fluxo sanguíneo materno (BOVINO et al. 2014). Tendo como referência a avaliação da vitalidade do recém-nascido pela classificação do escore Apgar adotado pela medicina humana (APGAR et al. 1958), a medicina veterinária adaptou esses parâmetros para classificar a vitalidade dos ruminantes ao nascimento, de forma que fosse possível ter uma resposta imediata do grau de comprometimento do neonato (VASSALO et al. 2014).

O escore Apgar permite avaliar de forma prática a resposta do neonato frente a estímulos nervosos motores e sensitivos, através da reação da cabeça à água fria e reflexos palpebral e interdigital, assim como a oxigenação por meio da avaliação da coloração da mucosa, em complemento com a avaliação do ritmo respiratório. Por meio destas avaliações, Vannucchi et al. (2012) consideram que cordeiros que apresentam escore Apgar igual ou superior a 7 (ideal) apresentam boa vitalidade, podendo ser considerados neonatos saudáveis.

Desta forma é possível obter informações sobre a ocorrência de problemas neonatais durante o parto. O tipo de parto, por exemplo, é um dos fatores que podem interferir na vitalidade dos neonatos, em um estudo 93,75% dos cordeiros que nasceram de parto normal apresentaram escore Apgar entre 7 e 8 no momento do nascimento, diferente dos cordeiros que nasceram por meio de cesariana que apresentaram o mesmo escore Apgar somente após 15 minutos de vida (BOVINO et al. 2014).

3.3 Ação das HSPs durante o período gestacional

Além do controle térmico por meio da circulação uteroplacentária, há outros meios que auxiliam na manutenção da homeotermia. O estresse térmico ao qual os animais são submetidos, seja por calor ou frio, induz respostas de proteção celular por meio das proteínas

de choque térmico (HSP), levando a um estado de adaptação, com posterior aclimação (SINGH et al. 2016; MOHANARAO et al. 2014). O estresse a nível celular desestrutura a formação celular prejudicando o desempenho funcional da célula. Então, a célula induz a expressão das HSPs como medida de proteção contra injúrias subsequentes, este fenômeno é conhecido como tolerância ao estresse (NEUER, 2000).

Desta forma, as proteínas de choque térmico (HSPs), são responsáveis pela homeostase e manutenção da integridade celular durante situações de estresse. As HSPs compõem uma família com diversos tipos de proteínas que são identificadas pelo seu tamanho molecular, podendo variar de 10 a 150 kDa (DANGI et al. 2012), a exemplo da HSP 27 (MOHANARAO et al. 2014), HSP 60, HSP 70, HSP 90 e HSP 105/110 (SINGH et al. 2016). Estas HSPs apesar de terem como função principal garantir a viabilidade celular, podem ser expressas com maior ou menor eficiência a depender de fatores como temperatura (DANGI et al., 2012), duração do estresse térmico (DANGI; GUPTA; DANGI, 2015) e idade (DANGI et al. 2012). Nos tecidos reprodutivos, as HSPs estão ligadas diretamente a atividade de hormônios esteroides por meio da regulação exercida sobre os receptores destes hormônios, sendo que as HSP 27, HSP 70 e HSP 90, tem níveis variados ao longo do ciclo reprodutivo (TABIBZADEH et al. 1996).

Em roedores, a HSP 70 desempenha suas funções nas fases de implantação, decidualização e placentação, tendo diferentes níveis de expressão durante o ciclo estral, pelo fato de sua ação ser influenciada de acordo com a variação da sensibilidade das células a esta proteína nas diferentes fases do ciclo, apresentando maior expressão a partir do início da diferenciação celular do oviduto e sendo responsável pelas mudanças hormonais, por meio da modulação de receptores esteroides que ocorrem no infundíbulo e ampola (MARIANI et al. 2000). A HSP 70 tem ligação direta com o ciclo estral, apresentando maior expressão nas células epiteliais durante o diestro, que coincide com o aumento dos receptores de estrógeno. Esta proteína é influenciada por hormônios como estrógeno, progesterona e por outros hormônios que também estão relacionados com a gestação, desta forma, a expressão da HSP 70 é observada tanto nas células do oviduto assim como nas células endometriais (epitélio luminal, estroma decidual e demais células envolvidas na fase de placentação), podendo ser considerada um marcador para fases específicas do ciclo estral (OZAYDIN et al. 2016; MARIANI et al. 2000).

As HSPs 27 e 90 também são expressas em diversas células da placenta e endométrio (NEUER, 2000; SHAH; STANEK; HANDWERGER, 1998) e estão envolvidas na proteção celular em casos de hipóxia e demais complicações gestacionais (HROMADNIKOVA et al. 2015). A HSP 27 por sua vez, é uma pequena proteína da família das HSPs que está relacionada

principalmente com a inibição da apoptose em diversas células, agindo por meio da inibição da caspase 3 e aumentando desta forma a sobrevivência celular (WHITLOCK et al. 2005). Além disto, alguns estudos têm associado a ação da HSP 27 com a contração da musculatura lisa do útero através da regulação da dinâmica do citoesqueleto de actina e da ativação de proteínas contráteis. Desta forma, a HSP 27 tem sido considerada uma importante componente na fase final da gestação e no momento do parto (WHITE et al. 2005).

Por ser a HSP de maior predominância no citosol das células eucarióticas, a HSP 90 está envolvida em diversos processos biológicos como a manutenção celular, transdução de sinal, transporte vesicular, reposta imune, infecção viral, desenvolvimento do câncer e sinalização de esteroides (RÖHL; ROHRBERG; BUCHNER, 2013). Apesar de ser encontrada em maior quantidade no citoplasma, quando a célula eucariótica está sob situação de estresse térmico, ocorre a migração da HSP 90 para o núcleo celular, no entanto, sua atividade não sofre influência de elevadas temperaturas (LANGER; ROSMUS; FASOLD, 2003; FREEMAN; MORIMOTO, 1996).

O receptor de glicocorticoide (GR) é o principal dependente da HSP 90 devido a intrínseca ligação com esta proteína para ativação da sua função. No entanto, para que esta ligação ocorra diversas etapas de acoplamento, desdobramentos e ativações são acionadas, além de envolver outras HSPs, como a HSP 70 e HSP 40 e co-chaperonas, como HOP e P23. Desta forma, a HSP 90 torna-se um dispositivo complexo para que ocorra a ativação do GR e torne-o apto a receber o hormônio (LORENZ et al. 2014).

3.4 Síntese hormonal da placenta na manutenção da gestação

Durante o período gestacional inicial da cabra, a síntese e a mudança dos níveis plasmáticos dos hormônios durante a fase luteal é um evento complexo que ocorre de forma dinâmica, sendo o corpo lúteo (CL) a principal estrutura responsável por essas modificações (WENG et al. 2005).

Apesar da manutenção da gestação da cabra ser CL-dependente, no terço final a placenta desempenha função vital na síntese da inibina, prolactina e estradiol, elevando consideravelmente os níveis desses hormônios que são essenciais para manutenção da gestação, regulação do crescimento e preparação da glândula mamária para fase da lactação (KANDIEL et al. 2010).

Nas cabras, a progesterona placentária é insuficiente para manter a gestação (SHELDRIK; RICKETTS; FLINT, 1980). Este fato é justificado pela falta da enzima 3β -

desidrogenase tipo 1/ $\Delta 5$ - $\Delta 4$ -isomerase. A biossíntese placentária de estrogênios utiliza o sulfato de andrógeno-desidroepiandrosterona como precursor. É fornecido pelas glândulas adrenais maternas e fetal e é metabolizado em androstenediona pelo 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 1/ $\Delta 5$ - $\Delta 4$ -isomerase. A androstenediona é então convertida em estrona pelo citocromo P450 de clivagem de cadeia lateral do colesterol. A enzima 17 β -hidroxiesteroide desidrogenase interconverte a estrona em estradiol e também a androstenediona em testosterona. A testosterona pode também ser convertida em estradiol pela aromatase. O estriol é sintetizado pela aromatase do precursor sulfato 16 α -hidroxideidroepiandrosterona, que tem origem fetal. An = androstenediona; Arom= aromatase; CYP450scc = Citocromo P450 de clivagem de cadeia de colesterol; DHEA-S = sulfato de dehidroepiandrosterona; E1 = estrona; E2 = estradiol; E3 = estriol; P4 = progesterona; P5 = pregnenolona; P5-S = sulfato de pregnenolona; T = testosterona; 3 β -HSD = 3beta-hidroxisteroide desidrogenase/ $\Delta 5$ - $\Delta 4$ -isomerase; 16 α -OHDHEA = 16alfa-hidrox-DHEA-S; 17 β -HSD = 17beta-hidroxisteroide desidrogenase. Fonte: COSTA, M. A. The endocrine function of human placenta: an overview. *Reproductive BioMedicine Online*, v. 32, n. 1, p. 14–43, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.10.005>>

3.5 Ação do cortisol e atuação da enzima 11 β -hidroxiesteróide desidrogenase (11 β -HSD) como barreira placentária

Por ser considerado o estado em que o organismo se encontra na tentativa de se ajustar as variações do meio ambiente (BROOM, 1986), o bem-estar animal tem sido um tópico discutido amplamente por todo o mundo, e tem ganhado cada vez mais espaço nos sistemas de produção. Por este fato, muitos estudos têm sido realizados afim de compreender os marcadores do estresse, como os glicocorticoides e as catecolaminas. Estes hormônios determinam a atividade da adrenal, que tem como principal produto final o cortisol (MÖSTL; PALME, 2002).

A elevação nos níveis dos glicocorticoides nem sempre estão associados a situações que causam prejuízos ao bem-estar do animal. Quando ocorrem por motivos fisiológicos, pode melhorar o desempenho do animal, estimular o amadurecimento do sistema endócrino, por meio da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, e favorecer o desenvolvimento do sistema nervoso central fetal e de neurotransmissores, assim como favorecer o desenvolvimento do sistema respiratório, funcionalidade dos órgãos e a homeostasia durante a vida extra-uterina (KAPOOR et al. 2006; MASTORAKOS; ILIAS, 2003).

No entanto, em algumas fases como a gestação, as cabras ficam muito propensas a ocorrência de aborto, quando submetidas a situações de estresse, seja térmico, nutricional ou qualquer outro fator que interfira na homeostase e consequentemente no bem-estar animal (ROMERO-R; LÓPEZ; LUMA-M, 1998). O aumento da concentração de cortisol, proveniente da associação do cortisol materno e fetal, desencadeia o parto que, apesar de ser uma resposta fisiológica, portanto benéfica neste momento, em outros estágios da gestação quando submetidas a situações em que o aumento do cortisol é excessivo ou prolongado, pode causar aborto (LÓPEZ et. al. 2012). Como forma de proteção, a placenta, além de ser responsável pela

regulação térmica e nutrição do feto, também promove uma barreira de proteção reduzindo o efeito do cortisol por meio da enzima 11β -HSD (HONG MA; XUAN WU; NATHANIELSZ, 2003; BENEDIKTSSON et al., 1997).

No terço final da gestação, o requerimento energético do feto aumenta consideravelmente e em consequência desta necessidade energética ocorre a elevação da concentração plasmática de cortisol que, quando acoplado aos receptores de glicocorticoides hepáticos, estimula a ativação da enzima glucose-6-fosfatase aumentando o metabolismo da glicose via gliconeogênese ou glicólise no fígado e disponibilizando mais energia para o feto (LÓPEZ et. al. 2012).

Os glicocorticoides também estimulam a síntese do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) pela placenta que é liberado na corrente sanguínea de mulheres gestantes, podendo atingir níveis de 1000 até 10000 vezes maiores que mulheres não-gestantes (THOMSON, 2013). Pelo fato do CRH ser o hormônio mais potente na estimulação da síntese de ACTH que por sua vez tem como produto final o cortisol, esta via torna-se um ciclo de retroalimentação que tende a aumentar com a proximidade do parto (WANG, 2014). A estimulação da síntese placentária do CRH pelo cortisol ocorre por meio do fator nuclear Kappa B ($\text{NF-}\kappa\text{B}$), que também tem sua ação desencadeada por fatores de estresse, desta forma, quando submetidas a situações de estresse durante a gestação, a elevação das concentrações de CRH precocemente influenciará negativamente o desenvolvimento fetal (THOMSON, 2013).

Associado a estes eventos, na fase gestacional ocorre também o aumento dos GR placentário favorecendo maior ligação do cortisol na placenta que tem como uma das consequências o aborto (LÓPEZ et. al. 2012). Além disso, a exposição excessiva do feto aos glicocorticoides materno causa retardo no desenvolvimento fetal, desta forma, um dos mecanismos de proteção placentária para reduzir a ação do cortisol está relacionado a ação da enzima 11β -hidroxiesteroide desidrogenase (11β -HSD), que inativa o cortisol convertendo-o em cortisona. Quando a placenta está saudável, a enzima 11β -HSD é extremamente eficiente no bloqueio dos efeitos dos glicocorticoides maternos no feto (BENEDIKTSSON et al. 1997). No entanto, quando há insuficiência da atividade placentária, ocorre redução da síntese da enzima 11β -HSD na placenta e aumento da concentração de cortisol no meio intrauterino que consequentemente causa redução do desenvolvimento fetal (MCMULLEN et al. 2004).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Local e período de execução do experimento

Este estudo e suas análises foram conduzidos no Laboratório de Fisiologia Animal do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, com aprovação do Comitê de Ética, cujo número de protocolo é: 3709280316.

De acordo com o esquema apresentado na Figura 3, o período experimental foi executado em três fases, Fase 1: Gestação - durante os 60 dias pré-parto; Fase 2: Parto e Fase 3: Desempenho dos cabritos - durante os 60 dias após o nascimento dos cabritos até o desmame.

Figura 3 – Procedimentos realizados durante o período experimental

Legenda: ET: Estresse térmico; CT: controle; FC: frequência cardíaca; FR: frequência respiratória; TR: temperatura retal; TS: temperatura superficial; HSP: proteína de choque térmico. Fonte: Própria autoria

4.2 Alojamento dos animais

Foram utilizadas 47 cabras da raça Saanen com média de peso de 55 ± 12 kg, pertencentes ao rebanho experimental do Laboratório de Fisiologia Animal. A estação de monta ocorreu de forma controlada utilizando para isso três bodes distintos da mesma raça.

Após 40 dias do término da estação de monta, foi realizado o primeiro diagnóstico de gestação das cabras experimentais para confirmar a idade e número de conceitos, como ilustrado na Figura 4. No final da gestação (60 dias pré-parto), as cabras foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos homogêneos levando em consideração a categoria, peso, escore de condição corporal, data prevista de parto, número de lactações, produção de leite na lactação anterior e número de fetos.

Figura 4 – Imagens ultrassonográficas do diagnóstico de gestação.

Legenda: Imagem ultrassonográfica demonstrando a presença de placentomas (seta preta) e do feto (seta branca) para confirmação da gestação. Fonte: Própria autoria

4.3 Tratamentos Experimentais:

O primeiro tratamento foi o controle térmico (CT), composto por 23 cabras que permaneceram em baias sombreadas e ventilação natural, com temperatura ambiental de aproximadamente 18°C e umidade relativa de 50%, afim de manter a termoneutralidade (Figura 5).

Figura 5 – Acomodação do tratamento CT nas baias sombreadas.

Fonte: Própria autoria

O segundo tratamento foi composto por 24 cabras submetidas ao estresse térmico (ET), em câmara climática pertencente ao Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da USP localizada no Campus Fernando Costa em Pirassununga (Figura 6). Nesta condição, houve o controle da temperatura ambiental para manter uma temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 6 horas diárias, e umidade relativa entre 60 e 70% (DANGI et al. 2015). Nos momentos que a câmara climática estava desligada a temperatura interna manteve-se $22,16 \pm 0,04^\circ\text{C}$, com umidade relativa de $61,76 \pm 0,22\%$. O fotoperíodo não foi modificado, sendo 12 horas de claro e 12 horas de escuro.

Figura 6 – Acomodação do tratamento ET em Câmara Climática do Departamento de Reprodução animal da FMVZ/USP.

Fonte: Própria autoria

4.4 Transporte e Período de adaptação à Câmara Climática

Na separação dos tratamentos, os animais (ET e CT) foram submetidos ao mesmo manejo de transporte e adaptação aos ambientes (câmara climática e baias).

Os animais do tratamento ET foram encaminhados individualmente das baias ao desembarcadouro do Laboratório de Fisiologia Animal e embarcados no caminhão de transporte, com lotação máxima de 12 animais por viagem. O trajeto compreendeu uma distância de 4 Km, que foi realizada na velocidade de 40 km/h, em um período de 15 minutos até chegar na Câmara Climática, onde foi feito o desembarque (Figura 7).

As cabras do tratamento Controle, também fizeram o mesmo percurso de caminhão até completar o tempo de viagem, retornando ao Laboratório de Fisiologia animal, onde foram desembarcadas e encaminhadas para as baias.

Figura 7 – Percurso e transporte das cabras dos tratamentos ET e CT.

Fonte: Própria autoria

Os animais experimentais passaram por um período de adaptação de 10 dias aos novos ambientes e mais 10 dias de adaptação térmica para as cabras do tratamento estresse térmico. Desta forma, para a adaptação térmica, a temperatura da câmara climática foi elevada 1°C diariamente até atingir a temperatura de 37°C, como apresentado na Figura 8. Neste período, foi observado o comportamento dos animais, sinais de exaustão ou qualquer sinal que inviabilizasse a permanência da cabra na câmara. Durante todo período experimental, a temperatura ambiental e umidade relativa de ambos os lugares foram registrados a cada 5 minutos, diariamente por *dataloggers*.

Figura 8 – Temperatura máxima do ar para tratamento controle e estresse durante os períodos de adaptação ambiental e térmico.

Legenda: As variações térmicas apresentadas nos primeiros 10 dias (-60 ao -51 dias) do período de adaptação ambiental, são referentes às variações climáticas ambientais em que não houve mudança na temperatura da câmara climática. Desta forma, a temperatura interna da câmara climática foi influenciada apenas pela temperatura do ambiente externo. A partir dos 50 dias pré-parto (-50), iniciou-se o período de adaptação térmica (linha tracejada), sendo possível observar a aumento gradativo da temperatura interna da câmara climática em contradição com as variações térmicas externas apresentadas pelo ambiente natural. Fonte: Própria autoria

O índice de temperatura e umidade (ITU) dos ambientes dos tratamentos experimentais foi calculado de acordo com a fórmula citada por Buffington et al. (1981). Desta forma, foi observado que a partir da elevação da temperatura da câmara climática no período de adaptação térmica, o ambiente manteve o ITU na faixa de 80 a 85%, que é considerado estado de alerta para caprinos, indicando, portanto, que durante o período experimental as cabras estavam em ambiente de estresse térmico (SILANIKOVE; KOLUMAN, 2015), como demonstrado no gráfico da Figura 9.

Figura 9 – Índice de temperatura e umidade (ITU) dos ambientes do tratamento CT e ET durante os períodos de adaptação ambiental e térmico.

Legenda: A partir dos 60 dias pré-parto (-60), iniciou-se o período de adaptação térmica (linha tracejada), sendo possível observar a aumento gradativo do índice de temperatura e umidade (ITU) da câmara climática comparado com as variações externas apresentadas pelo ambiente natural. Fonte: Própria autoria

4.5 Manejo Sanitário e Nutricional das cabras

A limpeza dos alojamentos foi realizada duas vezes ao dia, antes de ofertar a dieta aos animais. As cabras tiveram livre acesso aos comedouros e bebedouros. O consumo de água diário foi mensurado antes e após a oferta do alimento para os animais de ambos os tratamentos experimentais. A dieta foi oferecida duas vezes ao dia, com base numa proporção de matéria seca de volumoso (50): concentrado (50). Sendo o volumoso, silagem de milho e feno de *coast-cross*, e o concentrado constituído por: grão de milho, farelo de soja, minerais e vitaminas. Esta dieta foi oferecida para manter no mínimo 10% de sobra, sendo ajustada quinzenalmente de acordo com as recomendações no NRC (National Research Council, 2007) em função do peso e das fases de gestação e lactação.

Quinzenalmente, os animais eram pesados em balança portátil para acompanhamento do ganho de peso. As avaliações da condição de escore corporal foram realizadas por inspeção e palpação do peitoral, costado e região lombar e os animais foram classificados de 0 (magro) a 5 (obeso), como proposto por Machado et al. (2008).

Para monitoração dos tratamentos em relação a verminose, foi realizado periodicamente o método FAMACHA, com observação da coloração da mucosa ocular em associação com o

exame coproparasitológico, utilizando a técnica em flutuação, conhecida também como Técnica de Gordon Whitlock modificada.

4.6 Manejo pós-parto

Após o parto foram realizadas as coletas das amostras das cabras e cabritos relacionadas ao período (momento do parto) e logo após as cabras do tratamento ET foram retiradas da câmara climática, transportadas para o Laboratório de Fisiologia Animal e alocadas em baias idênticas às do tratamento CT.

Os cabritos provenientes de ambos tratamentos foram separados das mães 2 horas após o parto e mantidos em baias sombreadas com aquecimento artificial, onde receberam colostro e leite de vaca até os 60 dias de vida.

4.6.1 Manejo nutricional dos cabritos

Após mamarem o colostro da própria mãe, foi ofertado 10% do peso vivo de colostro de vaca por mamadeira. A oferta do colostro foi realizada por dois dias consecutivos, a partir do 3º dia de vida os animais eram ensinados a beber o leite em potes individuais, que possibilitava controlar o volume do leite ofertado de acordo com o peso do lote. Durante os 10 primeiros dias o aleitamento foi realizado 3 vezes ao dia, passando para 2 vezes ao dia até completarem 45 dias de vida, seguindo para 1 vez ao dia até completarem 60 dias de vida e serem desmamados (Figura 10).

Figura 10 – Aleitamento dos cabritos por sistema controlado.

Fonte: Própria autoria

A partir da primeira semana também foi ofertado alimento sólido como feno *coast-cross*, silagem de milho e concentrado para cabritos, cujo os ingredientes e a composição

bromatológica está descrita na Tabela 1. Os alimentos foram fornecidos em cochos e a quantidade foi ajustada periodicamente com base no PV (kg) do lote.

Tabela 1 – Ingredientes e composição bromatológica dos alimentos ofertados aos cabritos.

Ingredientes Análises	MS%	PB (%)	EE (%MS)	MM (%MS)	FDN (%MS)	EB (%MS)
Feno	99,46	6,42	-	-	-	-
Silagem de milho	44,51	15,05	6,17	7,64	53,31	7,64
Milho grão moído	88,52	9,76	5,38	1,53	67,22	1,53
Farelo de soja	89,39	51,97	1,74	7,8	20,52	7,8
Núcleo mineral**	-	-	99,9	-	-	-

**Núcleo mineral: Cálcio (máximo)= 146,00g; Cálcio (mínimo)= 48,00g; Cobre (mínimo)= 500,00mg; Cromo (mínimo)= 10,00mg; Enxofre (mínimo)= 15,00g; Ferro (mínimo)= 2.000,00mg; Flúor (máximo)= 850,00mg; Fósforo (mínimo)= 85,00mg; Iodo (mínimo)= 75,00mg; Magnésio (mínimo)= 15,00mg; Manganês (mínimo)= 1.400,00mg; Selênio (mínimo)= 140,00g; Zinco (mínimo)= 4.400,00mg (solubilidade do Fósforo em ácido cítrico 2% (mínimo): 95%. Fonte: Fábrica de Ração da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP.

4.7 Colheitas experimentais

As colheitas experimentais foram divididas em três fases: gestação, parto e desenvolvimento do cabrito, onde os animais foram acompanhados e realizadas as coletas de amostras.

4.7.1 Fase 1: Gestação

Durante os 60 dias pré parto, foram realizadas as colheitas das amostras periodicamente, como observado na Figura 11.

Figura 11 – Procedimentos de avaliação e colheita de amostras na Fase 1: Gestação.

Fonte: Própria autoria

4.7.1.1 Coleta de sangue

No pré-parto, para mensurar as alterações metabólicas foram colhidas amostras de sangue nos dias -60, -45, -30, -15 em relação a data prevista para o parto, em três horários, 7h, 12h e 21h. As amostras de sangue foram colhidas da veia jugular externa por sistema à vácuo, com agulha 25 x 0,8 mm e tubos heparinizados de 10 mL. Após a coleta, as amostras eram guardadas em caixa de isopor e encaminhadas para o Laboratório de Fisiologia Animal.

Os tubos foram centrifugados na rotação de 1500g a 4°C durante 20 minutos, para obtenção do plasma. O plasma foi aliquotado em microtubos e armazenados em freezer a -20°C para posterior análise de cortisol.

4.7.1.2 Avaliações dos Parâmetros Fisiológicos

Como parâmetros fisiológicos foram aferidos a frequência respiratória (por meio da auscultação do campo pulmonar), temperatura retal (com utilização do termômetro digital) e temperatura superficial da região dorsal e da glândula mamária (por meio do termômetro com infravermelho). Essas avaliações foram realizadas, semanalmente, em três horários, 7h, 15h e 21h.

4.7.2 Fase 2: Parto

Durante o momento do parto, foram realizadas atividades que envolviam o acompanhamento da cabra, do cabrito, assim como o comportamento materno-filial e avaliações placentárias, conforme demonstrado na Figura 12.

Figura 12 – Procedimentos de avaliação e colheita de amostras da Fase 2: Parto.

Fonte: Própria autoria

Desta forma, durante a ocorrência do parto foi avaliada a sua duração, que compreendeu desde o aparecimento da bolsa amniótica até a expulsão de todos os fetos (KONYALI et al. 2007), como demonstrado na Figura 13.

Figura 13 – Eventos que indicavam a duração do parto

Legenda: A imagem à esquerda representa o início do parto com o aparecimento da bolsa amniótica. A imagem à direita representa o término do parto com a expulsão do cabrito. Fonte: Própria autoria

Com o rompimento da bolsa amniótica, o líquido amniótico foi colhido cuidadosamente utilizando potes coletores previamente identificados para posterior dosagem de cortisol. As amostras colhidas foram armazenadas em caixa de isopor com gelo reciclado e encaminhadas para o Laboratório de Fisiologia Animal para análises. Também foi mensurado o tempo para liberação da placenta, que compreendeu desde o início do aparecimento da placenta até a sua completa expulsão.

Com a expulsão do cabrito foi feito o escore Apgar do recém-nascido (Anexo A) nos momentos do nascimento (0 minutos) e com 15 minutos de vida onde foram realizadas atividades de estímulos sensitivos, motores, avaliação da coloração da mucosa e movimentos respiratórios. Dependendo da resposta apresentada às atividades, os animais recebiam pontuações para classificar a vitalidade, que poderia variar de 0-3 pontos (pouca vitalidade), 4-6 pontos (vitalidade moderada) e 7-8 pontos (boa vitalidade).

Simultaneamente, foi realizado o acompanhamento do comportamento materno-filial (Figura 14), o etograma de trabalho (Apêndice A) foi baseado em observações como o tempo de limpeza, estímulos positivos e negativos com a cria e a resposta dos cabritos como tentativa de levantar e procura do úbere. A avaliação comportamental encerrou-se quando a cria mamou o colostro sem auxílio, ou no tempo limite de 60 minutos quando foram separados da mãe e receberam o colostro.

Após o encerramento da avaliação do comportamento materno-filial, o sangue das cabras foi coletado para posterior dosagem de cortisol e obtenção da camada leucocitária para expressão gênica das HSPs. Os cabritos foram identificados com colares coloridos enumerados,

foram pesados e realizada a aferição dos parâmetros fisiológicos (frequência respiratória e temperaturas retal), também foram coletadas amostras de sangue para dosagem de cortisol e análises da expressão gênica das proteínas de choque térmico (HSP) de peso molecular 27, 70 e 90 kDa.

Figura 14 – Observação do comportamento materno-filial

Fonte: Própria autoria

Após liberação completa da placenta, esta foi imediatamente colhida para pesagem. Também foram colhidos 3 cotilédones de tamanhos variados: um pequeno ($< 1,0$ cm), um médio ($1,1 - 5,0$ cm) e um grande ($5,1 - 10$ cm) (DWYER et al. 2005) e 1 fragmento da região intercotiledonária para histologia e análises de expressão gênica das HSP27, HSP70 e HSP90, enzimas 11β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 1 (11β -HSD1) e tipo 2 (11β -HSD2), hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e receptor do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH-R), as amostras colhidas foram armazenadas em freezer -80°C para posterior processamento.

A placenta foi pesada individualmente e foram realizadas mensurações do comprimento, largura e profundidade de cada cotilédone por meio do paquímetro digital, conforme demonstrado na Figura 15. Os mesmos foram classificados em pequeno ($<1,0$ cm), médio ($1,1 - 5$ cm), grande ($5,1 - 10$ cm) e extra-grande (> 10 cm), como proposto por Ocak et al. (2015) e Dwyer et al. (2005). Após a obtenção das medidas foi realizado o cálculo da eficiência placentária que foi definida pela razão do peso da prole (g) pelo peso da placenta (g), como sugerido por Dwyer et al. (2005). A área dos cotilédones e eficiência cotiledonária que foi definida pela razão do peso da prole (g) pela área de superfície total do cotilédone, como

proposto por Ocak et al. (2015). E a densidade cotiledonária definida pela razão do número de cotilédones pelo peso da placenta (g), como proposto por Konyali et al. (2007).

Figura 15 – Pesagem e mensuração dos cotilédones.

Fonte: Própria autoria

4.7.3 Fase 3: Desenvolvimento dos cabritos

Após o nascimento, os 77 cabritos (37 cabritos do tratamento CT e 40 cabritos do tratamento ET) foram distribuídos aleatoriamente em baias, onde receberam o mesmo manejo nutricional e sanitário por todo período experimental, que compreendeu desde o nascimento até o desmame com 60 dias de vida.

O desenvolvimento dos cabritos foi acompanhado por meio da pesagem semanal, avaliações fisiológicas (FC, FR, TR e TS) e colheita de amostras de sangue (para obtenção do plasma), quinzenalmente, durante os 60 dias de vida dos animais, como demonstrado no esquema da Figura 16.

Figura 16 – Procedimentos de avaliação e colheita de amostras da Fase 3: Desenvolvimento dos cabritos.

Legenda: FC, frequência cardíaca; FR, frequência respiratória; TR, temperatura retal; TS, temperatura superficial. Fonte: Própria autoria

Nesta fase, os cabritos dos tratamentos ET e CT permaneceram em ambiente de termoneutralidade (Figura 17) e foram avaliados quinzenalmente (15, 30, 45 e 60 dias de vida) com mensurações duas vezes ao dia (6 e 15 horas) da: frequência respiratória e frequência cardíaca com estetoscópio veterinário Hauptner®, temperatura retal com termômetro clínico digital Geratherm® e temperatura superficial de duas regiões do corpo previamente tosquiadas (fêmur e dorso) e áreas adjacentes à tosquia, com termômetro infravermelho Infrared® (Figura 18). A colheita de sangue para obtenção do plasma para dosagem de cortisol, afim de avaliar as respostas termorregulatórias sob influência das condições climáticas naturais, também foi realizada quinzenalmente até o desmame aos 60 dias de idade.

Semanalmente (nascimento, 8, 15, 21, 30, 37, 45, 54 e 60 dias de vida), foram realizadas pesagens para avaliação do desempenho (ganho de peso), como demonstrados nas imagens da Figura 18.

Figura 17 – Variáveis ambientais em relação aos dias de coleta dos parâmetros fisiológicos dos cabritos.

Fonte: Própria autoria

Figura 18 – Avaliação dos parâmetros fisiológicos e pesagem dos cabritos.

Legenda: A, aferição das frequências cardíaca e respiratória; B, pesagem dos cabritos; C, áreas de tosquia no dorso e fêmur (setas); D, realização da aferição da temperatura superficial com infravermelho.
Fonte: Própria autoria.

4.8 Análises Laboratoriais

4.8.1 Determinação do cortisol plasmático e do líquido amniótico por ELISA

A análise do hormônio cortisol foi realizada por meio de kits imunoenzimáticos (EIA) utilizando kits comerciais da Monobind (Monobind Inc., Lake Forest, Califórnia, USA), com a variação entre 0,4 a 95 $\mu\text{g/dL}$ e a precisão de 0,366 $\mu\text{g/dL}$. As leituras dos resultados das reações foram realizadas no leitor de microplacas de ELISA (Labsystems Diagnostics, Cumbica, Guarulhos, Brasil) alocado no Laboratório de Fisiologia Animal, da FZEA/USP, onde as amostras foram processadas.

4.8.2 Histologia

Para histologia, foram utilizados um fragmento de cotilédone e um fragmento da região intercotiledonária separados previamente com aproximadamente 2 cm, como demonstrado na Figura 19. Os tecidos foram fixados em formol 10% por um período de 24 horas. Em seguida, foram imersos em álcool 70%; álcool absoluto; xilol e por fim incluso na parafina para formação de blocos e posterior corte em micrótomo e coloração básica em HE para observação histológica da população celular em microscópio óptico (400x).

Figura 19 – Separação dos fragmentos do cotilédone e região intercotiledonária para histologia.

Fonte: Própria autoria

A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico foram contadas 100 células trofoblásticas. Com base na quantidade de núcleos presentes, as células foram identificadas e diferenciadas em células binucleadas (CBN) e células multinucleadas (CMN), como demonstrado na Figura 20.

Figura 20 – Identificação das células trofoblásticas dos cotilédones.

Legenda: CBN: células binucleadas (estrela); CMN: células multinucleadas (seta). Fonte: Própria autoria

4.8.3 Expressão gênica

4.8.3.1 Obtenção de fragmentos de cotilédone e região intercotiledonária

Das amostras de cotilédone e região intercotiledonária foi retirado um fragmento de 150 mg, transferidos para microtubos livre de DNase e RNase e armazenados novamente no freezer -80°C (Figura 21).

Figura 21 – Preparo das amostras do cotilédone e região intercotiledonária para extração do RNA.

Fonte: Própria autoria

4.8.3.2 Extração do RNA

Para extração do RNA total do tecido placentário caprino foi empregado o kit de extração de RNA total PureLink RNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). Resumidamente, o protocolo se iniciou com a lise das células na presença de isotiocianato de guanidina. Após homogeneização, foi adicionado etanol e então a amostra foi processada por meio de uma coluna contendo membrana de sílica na qual o RNA se liga. As impurezas foram removidas por subsequentes lavagens. O RNA purificado foi então eluído com água livre de RNases e imediatamente prosseguiu-se com a reação para degradação do DNA e reação de transcrição reversa (RT).

4.8.3.3 Degradação do DNA com DNase

O RNA eluído foi submetido à reação de degradação do DNA para evitar qualquer tipo de contaminação na reação de amplificação do fragmento de interesse na amostra em estudo. Para tanto, o DNA foi degradado com enzima DNase (Promega) em solução tamponada durante 30 minutos a 37°C. Em seguida a DNase foi inativada aquecendo o tubo de reação a 65°C durante 10 minutos.

4.8.3.4 Síntese do cDNA por transcrição reversa (RT)

O RNA total da amostra teste foi reverso-transcrito em um volume final de 20 µL empregando-se a enzima GoScript Reverse Transcriptase (Promega). O protocolo iniciou com a incubação do RNA com oligonucleotídeo oligo-dT (Promega) por 5 minutos a 70°C. Em seguida, foi adicionado, ao tubo de reação, tampão 1X, MgCl₂, dNTP, inibidor de RNases e a enzima transcriptase reversa. A partir desta reação, o cDNA estava pronto para ser utilizado na reação de PCR.

4.8.3.5 Reação da Polimerase em Cadeia em Tempo Real (qPCR)

Foram executadas análises por qPCR para obtenção dos dados de expressão gênica relativa do cDNA sintetizado do tecido placentário, utilizando como marcador fluorescente o SYBR® Green (Power SYBR® Green PCR Master Mix). Cada reação teve o volume total de 20µL. Foram utilizadas placas de 96 poços (MicroAmp® FastOptical 96-Well Reaction Plate)

e fitas adesivas ópticas transparentes para selá-las. As reações foram feitas utilizando-se um ensaio comercial baseado na amplificação com sequências iniciadoras ou primers. Os transcritos alvos foram os genes HSP 27 (proteína de choque térmico 27 kDa), HSP 70 (proteína de choque térmico 70 kDa), HSP 90 (proteína de choque térmico 90 kDa) e 11 β -HSD1 (11 β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 1), 11 β -HSD2 (11 β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 2), CRH (hormônio liberador de corticotrofina) e ACTH-R (receptor do hormônio adrenocorticotrófico) e como referência endógena, foi utilizado o gene constitutivo UBC (ubiquitina) para as células de tecido placentário. As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores estão descritos na tabela 2. Os fragmentos dos genes foram confirmados pela técnica de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, conforme apresentado na Figura 22.

Tabela 2 – Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na expressão gênica.

Genes	Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores (5' $\rightarrow$ 3')	Fragmento (pb)	Eficiência dos primers (%)
11 β -HSD1	D: AAGCAGACCAACGGGAGCATT	111	115,31
	R: GGAGAAGAACCCATCCAGAGCA		
11 β -HSD2	D: CGAGCACTTGAATGGGCAGTT	123	100,83
	R: CCTGGGTAATAGCGGCGGAGT		
CRH	D: CATCACAGCACCCCCAGCC	228	94,34
	R: GCAGCGCTCGGAAAAAGTT		
ACTH-R	D: ACATGGGTTACCTCGAGCC	135	91,91
	R: AGATTGTGATGTAGCGGTCA		
HSP27	D: CGGACGCACCCAGACCAGCCAGCAT	105	114,6
	R: GGCTGTGGGCCGGATACCAGTCGCG		
HSP70	D: AACATGAAGAGCGCCGTGGAGG	171	115,3
	R: GTTACACACCTGCTCCAGCTCC		
HSP90	D: GCATTCTCAGTTCATTGGCTATCC	190	102,2
	R: GTCCTTCTTCTCTTCTCCTCTTC		
UBC	D: ATGCAGATCTTTGTGAAGAC	189	100,62
	R: CTTCTGGATGTTGTAGTC		

Fonte: GenBank (2016)

Figura 22 – Eletroforese do gel de agarose a 1,5%.

Legenda: Eletroforese para confirmação dos genes obtidos no PRC em tempo real. UBC: Ubiquitina (controle endógeno); HSP: proteína de choque térmico; 11 β -HSD1: enzima 11 β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 1; 11 β -HSD2: enzima 11 β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 2; pb: pares de base; CRH: do hormônio liberador de corticotrofina; ACTH-R: receptor de hormônio adrenocorticotrófico. Fonte: Laboratório de Fisiologia Animal, 2017.

4.9 Análise Estatística

O presente projeto adotou o delineamento inteiramente casualizado. Foi realizado o teste de ANOVA pelo pacote estatístico do Statistical Analysis System (SAS, 2008). Os dados foram previamente tratados respeitando as premissas de normalidades dos resíduos pelo procedimento Shapiro-Wilk univariate do SAS e homogeneidade das variâncias.

Para análise do efeito dos tratamentos estresse térmico (ET) e ambiente termoneutro (CT) sobre os níveis de cortisol no plasma da cabra, no líquido amniótico e no plasma dos cabritos foram realizadas análises de variância usando o procedimento mixed do SAS, sendo que o tratamento foi considerado como efeito fixo, dia da coleta e animal como efeitos aleatórios. As interações entre tratamentos e número de lactações, duração do parto, tamanho da prole, peso ao nascimento e peso da placenta sobre os níveis de cortisol também foram testadas no modelo.

Para análise do efeito dos tratamentos ET e CT sobre peso da placenta, morfologia placentária, função placentária e expressão gênica da placenta foram realizadas as análises de variância usando o modelo linear geral do SAS, sendo o tratamento considerado efeito fixo, e o animal como efeito aleatório. As interações entre tratamentos e número de lactações, duração

do parto, tamanho da prole, peso ao nascimento sobre peso da placenta, morfologia placentária, função placentária e expressão gênica da placenta também foram testadas no modelo.

Para análise do efeito dos tratamentos ET e CT sobre as variáveis fisiológicas (FC, FR, TR, Tdor, TDT, TM e TMT) e peso dos cabritos foram realizadas análises de variância usando o procedimento mixed do SAS, sendo que o tratamento foi considerado como efeito fixo; dia da coleta, hora da coleta e animal foram considerados como efeitos aleatórios. As interações entre tratamentos e número de lactações, duração do parto, tamanho da prole, peso ao nascimento e peso da placenta sobre as variáveis fisiológicas e peso dos cabritos também foram testadas no modelo.

Para análise do efeito dos tratamentos ET e CT sobre o comportamento das cabras e cabritos, e APGAR após o parto, foram realizadas as análises de variância usando o procedimento mixed do SAS, sendo que o tratamento foi considerado como efeito fixo; dia, hora do parto e animal foram considerados como efeitos aleatórios. As interações entre tratamentos e duração do parto, tamanho da prole, número de lactações, peso ao nascimento sobre peso da placenta, morfologia placentária, função placentária e expressão gênica da placenta também foram testadas no modelo.

Para os efeitos que apresentaram resultados significativos nas análises de variância ($P < 0,05$), foram realizadas comparações entre as médias pelo teste de Fisher quando os dados que apresentaram distribuição normal e pelo teste de Kruskal-Wallis quando os dados não apresentaram distribuição normal. Os resultados das análises estatísticas são apresentados nesta dissertação, como média e erro padrão médio.

5 RESULTADOS

5.1 Efeito do estresse por calor sobre a concentração do cortisol (ng/mL)

No parto, não houve diferença significativa na concentração plasmática de cortisol das cabras entre os tratamentos controle ($40,03 \pm 2,94$ ng/mL) e estresse térmico ($41,23 \pm 2,56$ ng/mL). A concentração de cortisol no líquido amniótico foi significativamente maior no tratamento ET ($39,42 \pm 1,3$ ng/mL) em comparação ao tratamento CT ($31,87 \pm 2,04$ ng/mL).

No nascimento, o cortisol plasmático dos cabritos provenientes do tratamento ET apresentou concentrações plasmáticas significativamente menores ($70,20 \pm 5,41$ ng/mL) quando comparado com os cabritos nascidos em ambiente de termoneutralidade ($94,83 \pm 5,49$ ng/mL), conforme apresentado na Figura 23. Ao analisar os dados apresentados, é possível observar que houve inversão na concentração de cortisol dos tratamentos CT e ET quando as amostras do líquido amniótico e plasma dos cabritos são comparadas.

Figura 23 – Concentração de cortisol presente no plasma materno, líquido amniótico e plasma dos cabritos dos tratamentos CT e ET no momento do parto

Médias com letras distintas são significativamente diferentes entre si ao nível de confiança de 95% pelo Teste de Fisher.

A exposição ao calor por período prolongado influenciou significativamente a concentração plasmática do cortisol das cabras do tratamento ET ($25,01 \pm 0,72$ ng/mL) em comparação as cabras do tratamento CT ($21,87 \pm 0,72$ ng/mL) nos 15 dias pré-parto. No entanto, na Figura 24 é possível observar que o parto teve impacto tão significativo sobre os níveis de

cortisol das cabras que sobrepôs a influência do ambiente, não havendo diferença entre os tratamentos no parto. Aos 15 dias pós-parto também não houve diferença na concentração do cortisol das cabras CT ($24,2 \pm 0,67$ ng/mL) e ET ($25,17 \pm 0,67$ ng/mL).

Figura 24 – Concentração de cortisol plasmático das cabras dos tratamentos CT e ET no parto e 15 dias pré e pós-parto.

Médias com letras distintas são significativamente diferentes entre si ao nível de confiança de 95% pelo Teste de Fisher.

A duração do parto, independentemente dos tratamentos impostos, também influenciou a concentração plasmática do cortisol das cabras de ambos os tratamentos. As cabras (52,5%) que tiveram duração normal de parto (>11 e < 60 min), sendo 9 cabras do tratamento CT e 12 do tratamento ET, apresentaram menores concentrações de cortisol ($37,7 \pm 2,0$ ng/mL) que os 17,5% das cabras (sendo 5 do tratamento CT e 2 do tratamento ET) que tiveram a duração do parto acima de 60 minutos ($51,0 \pm 5,68$ ng/mL). No entanto, não houve diferença estatística quando se compara o grupo de cabras com duração maior que 60 minutos com os 30% das cabras (sendo 5 do tratamento CT e 7 do tratamento ET) que tiveram parto rápido (<11 min) $41,3 \pm 3,93$ ng/mL, como demonstrado no gráfico da Figura 25.

Figura 25 – Comparação da concentração de cortisol plasmático em relação tempo de duração do parto (min).

Médias com letras distintas são significativamente diferentes entre si ao nível de confiança de 95% pelo Teste de Fisher.

De acordo com os dados apresentados no gráfico da Figura 26, quando as concentrações plasmáticas de cortisol das cabras foram relacionadas com o número de fetos, observou-se que as cabras que pariram 3 cabritos apresentam maiores concentrações no momento do parto ($52,1 \pm 2,23$ ng/mL) do que as cabras que tiveram partos simples ($36,67 \pm 2,15$ ng/mL). No entanto, as cabras de parto duplo ($40,48 \pm 4,35$ ng/mL) não apresentaram diferença estatística significativa quando comparada com as cabras de parto triplo e simples.

A concentração de cortisol presente no líquido amniótico também apresentou diferença significativa, quando foi relacionada com o tamanho da prole (Figura 26), sendo possível observar que a concentração de cortisol no líquido amniótico dos nascimentos triplos ($27,53 \pm 1,83$ ng/mL) foi significativamente menor em comparação com os nascimentos duplos ($36,86 \pm 1,66$ ng/mL) e simples ($38,39 \pm 2,99$ ng/mL).

No entanto, o tamanho da prole não influenciou a concentração plasmática de cortisol dos cabritos que nasceram de partos simples ($101,07 \pm 12,79$ ng/mL), duplo ($83,14 \pm 5,81$ ng/mL) ou triplo ($90,02 \pm 11,23$ ng/mL) (Figura 26).

Figura 26 – Influência do tamanho da prole na concentração de cortisol no plasma materno, líquido amniótico e plasma dos cabritos.

Médias com letras distintas no mesmo tipo de amostra são significativamente diferentes entre si ao nível de confiança de 95% pelo Teste de Fisher.

Legenda: 1: gestação simples; 2: gestação dupla; 3: gestação tripla.

Não foi observada interação entre a concentração plasmática de cortisol dos cabritos CT e ET em relação a vitalidade ao nascimento por meio do escore Apgar. No entanto, foi observado que um cabrito que apresentou escore Apgar 3 (classificado como baixa vitalidade) também apresentou menor concentração de cortisol plasmático (62,22 ng/mL). Os cabritos que apresentaram escores Apgar 8 e 7 (boa vitalidade) ou escore Apgar 6 (vitalidade moderada), apresentaram concentrações de cortisol similares, $81,82 \pm 8,3$ ng/mL, $91,94 \pm 8,7$ ng/mL e $87,06 \pm 8,1$ ng/mL respectivamente.

As concentrações plasmáticas de cortisol apresentaram redução significativa do nascimento ($87,72 \pm 4,72$ ng/mL) em relação aos 15 dias de vida ($31,96 \pm 1,9$ ng/mL). No dia do nascimento e aos 15 dias de vida, os cabritos do tratamento CT ($32,81 \pm 2,17$ ng/mL) apresentaram concentrações de cortisol plasmático estatisticamente maiores que os cabritos do tratamento ET ($26,37 \pm 2,14$ ng/mL), como demonstrado no gráfico da Figura 27.

Figura 27 – Concentração plasmática de cortisol dos cabritos CT e ET no nascimento e aos 15 dias de vida.

Médias com letras distintas são significativamente diferentes entre si ao nível de confiança de 95% pelo Teste de Fisher.

5.2 Efeito do estresse por calor na morfologia e função placentária

Na análise das lâminas histológicas para identificação e contagem das células trofoblásticas placentárias, foi observado que não houve diferença significativa entre os tratamentos CT ($82,70 \pm 1,38$) e ET ($80,01 \pm 1,26$) para as células binucleares e nem para as células multinucleares, CT ($17,80 \pm 1,28$) e ET ($19,36 \pm 1,19$). No entanto, quando foi considerada a categoria, observou-se que fêmeas múltiparas ($84,76 \pm 1,04$) apresentaram maior contagem de células binucleadas que as fêmeas primíparas ($77,95 \pm 1,55$), sendo que o inverso ocorre para a contagem de células multinucleares, onde para as fêmeas primíparas ($22,05 \pm 1,46$) que foi significativamente maior que para as fêmeas múltiparas ($15,11 \pm 0,96$), como demonstrado na Figura 28.

Figura 28 – Comparação da contagem e identificação celular cotiledonária entre as categorias múltiparas e primíparas.

Médias com letras distintas são significativamente diferentes entre si ao nível de confiança de 95% pelo Teste de Fisher.

A eficiência placentária foi a principal medida utilizada para avaliar o efeito do estresse térmico sobre a atividade placentária. Esta variável apresentou aproximadamente 71% de similaridade com as demais variáveis como demonstrado no dendograma da Figura 29 e correlação significativa como o tamanho da prole ($r: 0,33$) e quantidade total dos cotilédones ($r: -0,45$), como demonstrado na tabela 3.

Figura 29 – Dendograma das variáveis utilizadas nos cálculos placentários

Legenda: COT: cotilédone

Tabela 3 – Valores de P e de correlação das variáveis placentárias pelo método de Pearson.

	Categoria	Nº de cabritos	Nº de placentas	Eficiência Placentária	Peso da placenta	Nº total de cotilédones	Área dos cotilédones	Peso total dos cotilédones	Densidade dos cotilédones
Categoria	1								
Nº de cabritos	-0,33 (0,02)	1							
Nº de placentas	-0,34 (0,02)	0,46 (0,002)	1						
Eficiência Placentária	0,19 (0,23)	0,33 (0,03)	-0,14 (0,37)	1					
Peso da placenta	-0,46 (0,002)	0,62 (0,00)	0,63 (0,00)	-0,34 (0,02)	1				
Nº total de cotilédones	-0,24 (0,12)	0,47 (0,002)	0,36 (0,01)	-0,44 (0,003)	0,60 (0,00)	1			
Área dos cotilédones	-0,42 (0,006)	0,51 (0,001)	0,12 (0,46)	-0,01 (0,93)	0,42 (0,006)	0,23 (0,13)	1		
Peso total dos cotilédones	-0,44 (0,003)	0,60 (0,00)	0,59 (0,00)	-0,06 (0,72)	0,68 (0,00)	0,34 (0,02)	0,69 (0,00)	1	
Densidade dos cotilédones	-0,06 (0,72)	0,17 (0,28)	0,69 (0,00)	-0,12 (0,46)	0,08 (0,62)	0,44 (0,003)	-0,11 (0,49)	0,18 (0,24)	1

Em cada cédula contem: Correlação de Pearson (Valor de P)

Desta forma, como demonstrado na Figura 30, é possível observar que as fêmeas do tratamento CT apresentaram eficiência placentária ($13,06 \pm 2,16$) significativamente maior que as fêmeas do tratamento ET ($9,98 \pm 0,41$).

Figura 30 – Comparação da eficiência placentária entre os tratamentos CT e ET.

Médias com letras distintas são significativamente diferentes entre si ao nível de confiança de 95% pelo Teste de Fisher.

5.3 Expressão gênica do tecido placentário

Quanto à expressão gênica realizada no presente estudo, foi possível observar que a expressão da HSP70 no tecido placentário das cabras ET foi maior $5,44 \pm 0,46$ que no tecido placentário das cabras CT ($3,05 \pm 0,64$), demonstrando, portanto, que houve diferença significativa entre os tratamentos. No entanto, não foi observada diferença significativa na expressão da HSP27 no tecido placentário das cabras do tratamento CT ($4,26 \pm 0,61$) e ET ($3,36 \pm 0,46$), nem na expressão da HSP90 nos tratamentos CT ($3,47 \pm 0,86$) e ET ($1,91 \pm 0,26$) (Figura 31).

Houve maior expressão do gene ACTH-R no tecido placentário das cabras ET ($9,4 \pm 1,00$) do que no tecido placentário das cabras CT ($3,44 \pm 1,00$), sendo esta diferença significativa. Em contrapartida, houve inversão na expressão do gene relacionado à enzima 11β -HSD2, que teve expressão gênica significativamente maior no tecido placentário das cabras CT ($25,06 \pm 3,85$) que no tecido placentário das cabras ET ($4,16 \pm 1,79$).

No presente estudo não houve expressão dos genes CRH e 11β -HSD1 no tecido placentário das cabras CT e ET.

Figura 31 – Expressão gênica das HSPs 27, 70 e 90, da enzima 11 β -HSD2 e do receptor para ACTH no tecido placentário das cabras dos tratamentos CT e ET.

Médias com letras distintas são significativamente diferentes entre si ao nível de confiança de 95% pelo Teste de Fisher.

5.4 Avaliação Comportamental

No acompanhamento do comportamento materno nos primeiros 60 minutos pós-parto, a limpeza dos cabritos foi a atividade realizada com maior frequência em ambos os tratamentos CT (55%) e ET (53%), porém não apresentou diferença significativa entre os tratamentos. O

mesmo ocorreu para as atividades de afastamento e agressão à cria, que foram as atividades com menor frequência em ambos os tratamentos e também não apresentaram diferença entre as cabras CT (1%) e ET (0%), como demonstrado na Figura 32.

Figura 32 – Comparação da frequência das atividades comportamentais das cabras CT e ET com os cabritos nos primeiros 60 minutos após o parto.

No entanto, a atividade de estimular o cabrito a levantar apresentou diferença significativa, sendo realizado com maior frequência pelas cabras ET (16%) que pelas cabras CT (3%), ou seja, as cabras do tratamento ET passaram $9,6 \pm 0,01$ minutos estimulando os cabritos a levantar, enquanto que as cabras do tratamento CT passaram apenas $1,8 \pm 0,02$ minutos executando essa mesma atividade. Em contrapartida, as cabras do tratamento CT realizaram outras atividades (40%) que não estavam relacionadas ao cabrito como, comer, beber água e interagir com outras cabras com maior frequência que as cabras do tratamento ET (30%), ou seja, as cabras do tratamento CT passaram $24 \pm 0,01$ minutos realizando outras atividades que não estavam relacionadas aos cabritos enquanto as cabras do tratamento ET gastaram $18 \pm 0,02$ minutos, conforme apresentado na Figura 33.

Figura 33 – Avaliação comportamental materna.

Médias com letras distintas são significativamente diferentes entre si ao nível de confiança de 95% pelo Teste de Fisher.

Nas atividades realizadas pelos cabritos nos primeiros 60 minutos de vida, observou-se que não houve diferença estatística quanto a frequência da postura em pé (23% e 19%) e deitado (77% e 81%) dos cabritos CT e ET, respectivamente. No entanto, os cabritos nascidos em ambiente de estresse térmico tentaram levantar (32%) com maior frequência que os cabritos nascidos em ambiente termoneutro (21%) como demonstrado na Figura 34, ou seja, dos 60 minutos de avaliação comportamental, os cabritos do tratamento ET passaram $19,2 \pm 0,02$ minutos tentando levantar, enquanto os cabritos do tratamento CT passaram $12,6 \pm 0,02$ minutos. No entanto, os cabritos do ambiente termoneutro ficaram $39 \pm 0,02$ minutos executando outras atividades, como vocalizar por exemplo, que os cabritos nascidos em ambiente de estresse térmico ($33 \pm 0,02$ minutos), como demonstrado no gráfico da Figura 35.

Figura 34 – Comparação da frequência das atividades comportamentais dos cabritos CT e ET nos primeiros 60 minutos de vida

Figura 35 – Principais atividades exercidas pelos cabritos que demonstraram diferenças entre os tratamentos.

Médias com letras distintas são significativamente diferentes entre si ao nível de confiança de 95% pelo Teste de Fisher.

5.5 Desempenho dos Cabritos

Ao analisar os dados de peso dos cabritos, observou-se que o estresse térmico durante o período gestacional não interferiu no desempenho dos cabritos que nasceram em ambiente de elevada temperatura ($5,27 \pm 0,10$ Kg) e ambiente de termoneutralidade ($5,32 \pm 0,10$ Kg) ao longo dos 60 dias de vida.

Apesar de no momento do nascimento não ter sido observada a diferença significativa entre o peso dos cabritos CT ($3,72 \pm 0,11$ Kg) e ET ($3,46 \pm 0,11$ Kg), houve uma tendência ($p=0,09$) dos animais nascidos em ambiente de estresse térmico serem mais leves do que os animais nascidos em ambiente termoneutro. Essa tendência tornou-se significativa estatisticamente com 8 dias de vida dos animais, onde os cabritos CT ($3,97 \pm 0,07$ Kg) estavam 0,26 Kg mais pesados que os cabritos ET ($3,71 \pm 0,07$ Kg). Aos 15 dias de vida esta diferença estatística deixou de existir, no entanto, os cabritos ET continuaram a ter uma tendência ($p=0,08$) a serem mais leves que os cabritos CT. A partir dos 21 dias de vida os animais tiveram ganho de peso estatisticamente semelhante até a desmama (aos 60 dias), como demonstrado no gráfico da Figura 36.

Figura 36 – Pesagem dos cabritos CT e ET do nascimento aos 60 dias de vida.

Médias com letras distintas são significativamente diferentes entre si ao nível de confiança de 95% pelo Teste de Fisher.

5.6 Avaliação dos parâmetros fisiológicos e respostas termorregulatórias dos cabritos

Os parâmetros fisiológicos dos cabritos foram mensurados nos dias 15, 30, 45 e 60 após o nascimento, em dois horários (6:30h e 15:00h). De acordo com os dados obtidos neste estudo, observou-se que houve diferença significativa quanto a frequência cardíaca entre os tratamentos, na qual a frequência cardíaca dos cabritos nascidos em ambiente de estresse térmico ($161,09 \pm 2,16$ bpm) foi maior do que dos cabritos nascidos em ambiente termoneutro ($154,23 \pm 2,18$ bpm) (Figura 37).

Figura 37 – Avaliação dos parâmetros fisiológicos dos cabritos dos tratamentos CT e ET dos 15 dias aos 60 dias de vida.

Legenda: FC: frequência cardíaca; FR: frequência respiratória, TR: temperatura retal; TDOR: temperatura dorsal; TDT: temperatura dorsal com tosquia; TM: temperatura do membro; TMT: temperatura do membro com tosquia; bpm: batimentos por minuto; mrpm: movimentos respiratórios por minuto.

Médias com letras distintas são significativamente diferentes entre si ao nível de confiança de 95% pelo Teste de Fisher.

No entanto, ao ser avaliada a frequência respiratória, não foi observada diferença estatística entre os tratamentos CT ($61,19 \pm 1,13$ mrpm) e ET ($62,28 \pm 1,09$ mrpm) e nem dos tratamentos ao longo do tempo em relação ao nascimento, aos 15, 30, 45 e 60 dias de vida

Apesar da temperatura retal entre os tratamentos CT ($38,66 \pm 0,03^{\circ}\text{C}$) e ET ($38,7 \pm 0,03^{\circ}\text{C}$) não apresentarem diferença estatística, quando os tratamentos foram analisados dentro de cada dia, observou-se diferença significativa entre os tratamentos aos 15, 30 e 45 dias de vida.

Em relação a avaliação das temperaturas corporais superficiais, a temperatura dorsal (TDOR), apresentou diferença significativa entre os tratamentos CT ($25,97 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$) e ET ($26,38 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$). Mas, ao ser analisado ao longo dos dias, apenas aos 60 dias foi observada a diferença entre os tratamentos. No entanto, ao ser avaliada a temperatura dorsal da área tosquiada (TDT), além da temperatura apresentar diferença estatística entre os tratamentos CT ($32 \pm 0,12^{\circ}\text{C}$) e ET ($32,9 \pm 0,12^{\circ}\text{C}$), essa diferença foi relevante também nos dias 30 e 45, onde a temperatura do tratamento CT é menor que a do tratamento ET e aos 60 dias, que apesar de apresentar diferença estatística, a temperatura do tratamento CT é maior que a do tratamento ET.

Na temperatura superficial do membro (TM), os tratamentos CT ($25,3 \pm 0,12^{\circ}\text{C}$) e ET ($25,84 \pm 0,12^{\circ}\text{C}$) também apresentaram diferença estatística, sendo que ao longo dos dias essa diferença só foi observada aos 15 dias de vida. Ao ser analisada a temperatura superficial do membro na área tosquiada (TMT), foi observada diferença estatística entre os tratamentos CT ($30,76 \pm 0,16^{\circ}\text{C}$) e ET ($32,01 \pm 0,16^{\circ}\text{C}$) e também aos 30 e 45 dias de vida.

6 DISCUSSÃO

O parto pode ser considerado um dos eventos mais impactantes da vida da fêmea assim como do feto, pois envolve diversas alterações fisiológicas, incluindo modificações das concentrações hormonais que auxiliam na preparação materna para expulsão do feto e adaptação do neonato à vida extrauterina. No entanto, mesmo com a preparação prévia do útero, placenta e feto durante a gestação, é no parto que ocorrem variações bruscas das concentrações hormonais que distingue este período das demais fases gestacionais (MASTORAKOS; ILIAS, 2003). Como demonstrado na Figura 24, no parto a concentração plasmática de cortisol das cabras de ambos os tratamentos CT e ET foi aproximadamente 2 vezes mais elevada do que 15 dias pré-parto e 15 dias pós-parto.

Apesar dos dados apresentados na Figura 24 demonstrarem que o tratamento com a alta temperatura influenciou a maior concentração plasmática de cortisol das cabras, indicando que estes animais estavam em estresse térmico crônico quando comparada as cabras CT, o evento do parto sobrepôs esta influência causada pelo ambiente, mascarando desta forma a diferença entre os tratamentos neste momento. Isto indica que as adaptações causadas pelo estresse do parto tiveram maior impacto sobre o animal do que o estresse por calor durante o final da gestação. Em concordância com os dados encontrados neste estudo, outros autores (LÓPEZ et al. 2012; PELTONEN; VIINIKKA; LAATIKAINEN, 1977), observaram que ocorre aumento das concentrações plasmáticas de cortisol no final da gestação em consequência das respostas fisiológicas relacionadas à preparação da cabra para o momento do parto.

A análise dos dados apresentados na Figura 23, relacionada a concentração de cortisol no plasma materno, líquido amniótico e plasma dos cabritos, demonstra que o estresse térmico ao qual os animais foram submetidos ao longo dos 60 dias influenciou as relações materno-placentária-fetal. Assim, os resultados obtidos no líquido amniótico sugerem que o estresse causado pela alta temperatura ambiental influenciou negativamente a função placentária como barreira de proteção via conversão do cortisol em cortisona, o que causou aumento na concentração de cortisol no líquido amniótico das cabras ET em relação às cabras CT.

O aumento da concentração de cortisol no líquido amniótico pode ter influenciado a resposta do eixo pituitária-adrenal fetal. Pois a exposição dos fetos do tratamento ET ao elevado nível de cortisol presente no líquido amniótico reduziu a síntese de cortisol plasmático dos cabritos diminuindo a concentração deste hormônio quando os animais tiveram contato com o meio extrauterino. No entanto, o inverso ocorreu com os cabritos do tratamento CT, pois pelo fato de não terem sido expostos a altas concentrações de cortisol no líquido amniótico,

apresentaram melhor resposta ao estresse fisiológico, quando exposto ao meio extrauterino no nascimento, conforme apresentado na Figura 23.

A transição fetal do ambiente intrauterino para o ambiente extrauterino, provoca estresse e modificações do eixo hipotálamo-hipófise-adrenocortical e estimula a liberação de cortisol, causando uma série de respostas fisiológicas que auxiliam no funcionamento dos órgãos e na adaptação do cabrito ao novo ambiente (MASTORAKOS; ILIAS, 2003).

Desta forma, com base nos dados apresentados neste estudo, é possível observar que a exposição aos elevados níveis de cortisol pode interferir na resposta do neonato diante dos estímulos provocados pelo ambiente extrauterino. Autores que avaliaram os efeitos do estresse por calor em vacas no final da gestação, sugeriram que a exposição ao calor no período pré-natal pode afetar o desenvolvimento do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal do feto e a resposta do bezerro neonato ao estresse (TAO et al. 2012).

Contudo, Ng et al. (1997) afirmaram que a exposição do feto ao cortisol não causa exaustão do eixo pituitária-adrenal, indicando que o órgão continua responsivo aos estímulos estressores. Em concordância com a afirmação apresentada, nos resultados obtidos neste estudo (Figura 27) a concentração de cortisol dos cabritos de ambos os tratamentos CT e ET apresentam o mesmo perfil, com redução significativa aos 15 dias quando comparado ao momento do nascimento. No entanto, as concentrações plasmáticas dos cabritos do tratamento ET sempre estiveram significativamente inferiores aos dos cabritos do tratamento CT, indicando que a exposição durante a vida intrauterina ao cortisol placentário desencadeia mecanismos inibitórios sobre o eixo HPA dos cabritos.

Hanna et al. (1993) ao avaliarem a função do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal em neonatos com baixo peso ao nascer, observaram que a incapacidade de alguns prematuros em responder às situações de estresse estava relacionada aos baixos níveis de cortisol. Sendo assim, vale ressaltar a importância em avaliar os níveis de cortisol e a resposta adaptativa ao meio extrauterino do neonato logo após o nascimento. Deste modo, os testes aplicados por meio do escore Apgar fornecem informações sobre a vitalidade do recém-nascido (VASSALO et al. 2014; APGAR et al. 1958).

No presente estudo quando foi avaliada a relação da concentração de cortisol em relação ao menor Apgar apresentado pelos cabritos após o nascimento de ambos os tratamentos, foi observado que o cabrito que apresentou baixa vitalidade ao nascimento com escore Apgar 3, também apresentava menor nível plasmático de cortisol, quando comparado com os demais cabritos que apresentavam moderada e boa vitalidade.

Esses dados sugerem que há uma associação entre a concentração de cortisol e escore Apgar, onde o animal que apresentava baixa concentração plasmática de cortisol demonstrou baixa resposta ao estresse provocado pelo ambiente extrauterino e escore Apgar com baixa vitalidade. Em contradição com o presente estudo, outros autores encontraram resultados de relação inversa quando associaram a concentração de cortisol com escore Apgar, onde os recém-nascidos que apresentaram baixa vitalidade tinham maiores níveis de cortisol. No entanto, esses dados foram atribuídos ao estresse causado pela assistência mecânica realizada nos neonatos (ELBAY et al. 2016; NG et al. 1997), fator que não ocorreu no presente estudo. Semelhante ao observado nos nossos resultados, Groppetti et al. (2015) observaram que o cortisol não demonstrou diferença entre os animais que apresentavam baixa, moderada e alta vitalidade ao nascimento quando avaliaram a vitalidade de cães recém-nascidos por meio do escore Apgar e associaram com as concentrações de cortisol presentes no líquido amniótico.

Outro fator que pode estar associado à sobrevivência do neonato e variação da concentração de cortisol materno é o tempo de duração do parto, este pode ser influenciado pela quantidade de fetos (simples, duplo ou triplo), a postura da fêmea (deitada ou em pé), a apresentação do feto, e o peso do neonato. Partos duplos e triplos têm a tendência de menor duração em comparação aos partos simples. Da mesma forma, fêmeas que tendem a parir em pé apresentam partos mais rápidos do que as fêmeas que assumem a postura deitada. Entretanto, neonatos pesados favorecem o prolongamento da duração do parto, em relação aos neonatos leves (EVERETT-HINCKS; DODDS; KERSLAKE, 2007).

Quando as concentrações plasmáticas de cortisol maternas foram avaliadas em relação ao tempo de duração do parto foi observado que as cabras que tiveram partos prolongados, ou seja, acima de 60 minutos apresentaram maiores concentrações de cortisol que as cabras que tiveram duração de parto normal (entre 11 e 60 minutos), como demonstrado na Figura 25. Segundo Hydbring et al. (1999), a combinação do estresse provocado pelo parto associado com a dor da expulsão do(s) feto(s) eleva significativamente as concentrações plasmáticas de cortisol, concordando os resultados obtidos nesse estudo. Por outro lado, as cabras que tiveram baixa duração do parto (< 11 minutos) não diferiram estatisticamente daquelas que tiveram a duração de partos demorados ou normal.

Além do tamanho da prole influenciar na duração do parto, este fator reflete sobre os próprios fetos, pois a menor distribuição de nutrientes e oxigenação (FENELL; REYNOLDS, 1992) podem ser fatores que contribuem com a ocorrência do estresse. No entanto, quando foi avaliada a concentração plasmática de cortisol dos cabritos em relação ao tamanho da prole não foi observada diferença significativa entre os animais que nasceram de parto simples, duplo e

triplo, como apresentado na Figura 26. Em contradição com os dados apresentados neste estudo, Edwards e Mcmillen (2002), observaram que as concentrações plasmáticas de cortisol em fetos gêmeos são mais elevadas do que os apresentadas por fetos de gestação simples. No entanto, as cabras que tiveram gestação tripla apresentaram maiores concentrações de cortisol plasmático que as cabras que tiveram gestação simples e o inverso ocorreu com a concentração de cortisol no líquido amniótico, onde o líquido amniótico das fêmeas de gestação tripla apresentam menores concentrações de cortisol que as fêmeas que tiveram gestação simples e dupla.

A nível placentário, o cortisol é um hormônio que desempenha diversas funções, além de ser um biomarcador em situações de estresse e bem-estar (MÖSTL; PALME, 2002), ele também atua como regulador fisiológico populacional das células binucleadas (CBN) do trofoderma placentário (WARD; WOODING; FOWDEN, 2002). No entanto, no presente estudo não foi observada diferença significativa entre a porcentagem de CBN na placenta das cabras do tratamento ET com o tratamento CT. Sendo assim, o aumento da concentração do cortisol materno causado pelo estresse térmico por crônico não provocou a redução da população das CBN nas placentas dessas cabras. Mas no estudo realizado por Braun et al. (2007) foi observado que a administração de 0,5mg/Kg de betametasona em ovelhas em diferentes estágios da gestação foi suficiente para causar a redução de 24% a 47% das células binucleadas em comparação ao grupo controle, o que pode levar a alterações na produção do lactogênio placentário nesses animais.

Ao ser realizada a contagem e identificação das células binucleadas e multinucleadas (CMN) em relação a categoria primíparas e múltiparas, foi observado que a categoria influenciou na porcentagem da população dos dois tipos celulares (CBN e CMN), como apresentado na Figura 28. No entanto, os dados apresentados no presente estudo contradizem aos achados de Wooding et al. (1984) que não observaram diferença estatística da população de células binucleadas na placenta de cabras e ovelhas quando considerou as categorias primípara e múltiparas.

Embora no presente estudo não houve efeito dos tratamentos sobre a análise histológica dos cotilédones, o estresse térmico teve influência significativa sobre a eficiência placentária. Como demonstrado na Figura 30, a placenta do tratamento ET foi significativamente menos eficiente que a placenta do tratamento controle. No estudo realizado por Galan et al. (1999), foi demonstrado que a exposição precoce de ovelhas prenhes ao estresse por calor interferiu tanto no peso da placenta quanto no desempenho funcional permanente da mesma. De acordo com Gagnon (2003), a insuficiência placentária é um fator que interfere negativa e progressivamente no desempenho da função da placenta.

Como forma de proteção para manter a integridade celular, o tecido placentário promove a expressão de proteínas de choque térmico (HSPs) que sinalizam um estresse induzido pelo calor (NEUER, 2000). Entre as HSPs estudadas, a HSP27 não apresentou diferença na expressão gênica do tecido placentário de ambos os tratamentos. Diferentemente aos resultados encontrados nesse estudo, Bahr; Galan; Arroyo, (2014) ao avaliarem o tecido placentário de mulheres que tiveram restrição de crescimento intrauterino (IUGR), observaram que a expressão gênica da HSP27 foi menor na placenta de mulheres que tiveram IUGR do que as do grupo controle. No mesmo estudo, foi avaliado também o tecido placentário de ovelhas que tiveram hipertermia induzida em diferentes períodos gestacionais, e foi observado que no grupo das ovelhas tratadas, o tecido placentário apresentou menor expressão da HSP27. Por ser uma chaperona envolvida com o processo de inibição dos fatores de apoptose, à medida que a expressão da HSP27 é reduzida ocorre o aumento da apoptose (BAHR; GALAN; ARROYO, 2014).

Também não houve diferença estatística na expressão gênica da HSP90 entre os tratamentos CT e ET. Este resultado pode estar relacionado com sua complexa conformação estrutural que a torna uma das HSPs mais conservadas (TAIPALE; JAROSZ; LINDQUIST, 2010; RICHTER et al. 2008). No estudo realizado por Dangi et al. (2014), ao submeterem seis cabras ao estresse térmico agudo, foi observado que a HSP90 apresentou elevação na expressão com 1 hora após o estresse, mas sua expressão reduziu significativamente 2 horas pós-exposição. Lei; Yu; Bao, (2009) também observaram que, após a exposição ao estresse por calor, a HSP90 apresentou um pico de expressão até 2 horas após o estresse com redução dessa expressão a partir das 3 horas pós-exposição, mantendo esse perfil até 10 horas pós-exposição. A redução da expressão da HSP90 a valores basais após um período de exposição ao calor apresentado pelos autores citados, juntamente com os resultados obtidos em nossa pesquisa, indica que a exposição prolongada ao calor não altera efetivamente a expressão gênica da HSP90.

A HSP70 por sua vez, foi aproximadamente 2 vezes mais expressa no tecido placentário do tratamento ET do que no tratamento CT, fato que fundamenta a hipótese do presente estudo, pois a exposição crônica ao calor desencadeou respostas celulares de proteção afim de evitar maiores danos à integridade e homeostasia das células. A diferença na expressão gênica da HSP70 entre os tratamentos, pode estar relacionada a maior sensibilidade que esta proteína tem às variações térmicas quando comparada às demais HSPs (DANGI et al. 2014). No estudo realizado por Bharati et al. (2017) em bovinos submetidos ao estresse crônico por calor, foi

observado aumento da expressão da HSP70 em função da temperatura e tempo de exposição ao calor de forma dependente, corroborando com os resultados obtidos no presente estudo.

A redução significativa na expressão gênica da enzima 11 β -HSD2 no tecido placentário das cabras ET em comparação as cabras CT, indica que a exposição crônica a elevadas temperaturas influenciou negativamente a função placentária. A enzima 11 β -HSD2 age na conversão unidirecional de cortisol em cortisona e é considerada uma importante barreira placentária no controle do metabolismo do cortisol, que inibe o efeito que o excesso de cortisol poderia causar no feto (BENEDIKTSSON et al. 1997).

O comprometimento da função placentária devido à redução na expressão gênica da enzima 11 β -HSD2, nos leva a sugerir que este pode ter sido um dos fatores que causou o aumento na concentração do cortisol no líquido amniótico das cabras do tratamento ET. Resultados semelhantes ao do presente estudo foram encontrados por Marca-Ghaemmaghami et al. (2015), que observaram redução da atividade da enzima 11 β -HSD2 na unidade placentária de mulheres que passaram por estresse psicológico durante o período gestacional.

Em contradição ao perfil apresentado pelos tratamentos em relação a expressão gênica da enzima 11 β -HSD2, ao ser analisada a expressão gênica do ACTH-R no tecido placentário das cabras, observou-se que o tecido placentário do tratamento ET apresentou maior expressão gênica do ACTH-R que o tratamento CT. Ou seja, o estresse térmico induziu maior transcrição do RNAm do receptor de ACTH, o que pode levar a produção endógena do cortisol pelo tecido placentário, como observado também por Su; Carey; Rose, (2017), que ao pesquisar a expressão do receptor de ACTH no tecido placentário sugeriram que a ligação do ACTH placentário ao seu receptor pode ter ação tanto parácrina quanto autócrina estimulando um aumento na secreção de cortisol placentário.

Desta forma, na placenta das cabras do tratamento ET, a associação dos resultados obtidos pela baixa eficiência placentária com a menor expressão gênica da enzima 11 β -HSD2 e maior expressão gênica do receptor de ACTH e HSP70 explicam a elevação da concentração de cortisol presente no líquido amniótico destes animais.

Diferente ao que ocorre na placenta humana, onde há produção e secreção de CRH placentário (WANG et al. 2014; PETRAGLIA et al. 1987), no presente estudo não houve expressão gênica de CRH no tecido placentário das cabras de ambos os tratamentos CT e ET.

Algumas pesquisas relatam que situações estressantes durante o período gestacional podem influenciar negativamente algumas atividades relacionadas ao comportamento materno-filial, como aumento das atividades agressivas e cuidados com a prole (KLAUS; SCHÖPPER; HUBER, 2013; PATIN et al. 2002). No presente estudo, foi observado que o estresse por calor

durante o período gestacional não influenciou o tempo dedicado pelas cabras à limpeza dos cabritos. No entanto, as cabras do tratamento ET passaram aproximadamente 10 vezes mais tempo estimulando os cabritos a levantar que as cabras do tratamento CT. Ou seja, as cabras que sofreram estresse crônico dedicaram mais tempo realizando comportamentos positivos em relação aos cabritos que as cabras que permaneceram em ambiente termoneutro durante o terço final da gestação. Em concordância com os nossos dados, Meek et al. (2001) ao acompanharem o comportamento materno-filial de ratas, também observaram que as ratas submetidas a situações estressantes foram mais cuidadosas e protetoras com os filhotes do que as ratas que não sofreram estresse.

Em resposta ao comportamento materno, foi observado que os cabritos do tratamento ET que receberam mais estímulo para levantar também passaram mais tempo tentando levantar que os cabritos do tratamento CT. Mas, diferente dos nossos resultados, Coulon et al. (2014) observaram que os cordeiros nascidos que passaram por estresse durante a fase gestacional não apresentaram diferença no comportamento, quando comparado aos cordeiros que não sofreram estresse na vida intrauterina.

Alguns estudos (COULON et al. 2014; HILD et al. 2011; JARVIS et al. 2006), mostram que fêmeas gestantes que passam por situações de estresse tendem a estimular mais seus filhotes e em contrapartida esses filhotes também são mais hábeis a responder aos estímulos estressantes quando passam por adversidades para sobreviver. Sendo que, uma das causas relacionadas ao tipo de comportamento materno-filial que os animais irão adotar pode ser influenciada principalmente pelos níveis circulantes de glicocorticoides. Desta forma, as respostas que a relação materno-filial podem apresentar como resultado de uma exposição prévia ao estresse (durante o período gestacional) podem ser tanto positivas para sobrevivência do neonato, quanto negativas para produção da mãe (COULON et al. 2014; KLAUS; SCHÖPPER; HUBER, 2013; PATIN et al. 2002; MEEK et al. 2001).

O estresse durante o período gestacional, em especial o estresse por calor, além de influenciar negativamente o desenvolvimento fetal de diversas formas, causando alterações no desenvolvimento do sistema nervoso central e crescimento do feto, essa influência pode ter reflexos a curto e longo prazos (RUTHERFORD et al. 2014; PATIN et al. 2004).

Em muitos estudos foi observado que a permanência em ambientes que causam estresse em fêmeas no terço final da gestação tem como consequência a redução do peso ao nascer do neonato (LAPORTA et al. 2017; TAO et al. 2012; MILLER et al. 2009). No presente estudo, o peso ao nascimento dos cabritos não diferiu significativamente para os cabritos que nasceram em ambiente de estresse térmico ou termoneutralidade. Entretanto, os cabritos do tratamento

ET tiveram uma tendência a serem mais leves tanto no nascimento como aos 15 dias de vida, fato que foi comprovado aos 8 dias de vida dos animais, momento em que os cabritos ET estavam significativamente mais leves que os cabritos CT.

Mesmo com a diferença do peso entre os tratamentos nas primeiras semanas de vida, o estresse crônico no final da gestação não afetou o peso ao desmame dos cabritos ET, os quais apresentaram o mesmo desempenho que os cabritos CT nos 60 dias de vida. Resultado semelhante foi observado por Miller et al. (2009), onde os cordeiros do tratamento com dexametasona durante o período gestacional apresentaram menor peso ao nascer que o controle, mas no desmame, os animais de ambos os grupos apresentavam peso corporal semelhante, não havendo influência do tratamento inicial no desempenho dos cordeiros.

O baixo peso na primeira semana de vida dos neonatos pode ter ligação com a menor eficiência placentária, como apresentado por Bell et al. (1989) que observou que o baixo crescimento fetal dos animais provenientes de ambiente de estresse térmico foi reflexo do desenvolvimento inadequado da placenta causado pelo ambiente térmico que tinha como consequência menor síntese de hormônios, como lactogênio placentário ovino e progesterona que são necessários para o crescimento fetal.

Alguns estudos relatam ainda que a restrição crônica de nutrientes durante a vida intrauterina estimula uma série de adaptações metabólicas como a alterações na atividade da insulina e estímulo da gliconeogênese hepática que tem como consequência o retardo no desenvolvimento fetal (YATES; GREEN; LINESAND, 2011), mas após o nascimento, esses mecanismos compensatórios estimulam o crescimento acelerado do neonato como resposta adaptativa (MUHLHAUSLER et al. 2009).

Ao nascimento, a temperatura do neonato cai drasticamente, sendo o frio um fator estressante significativo que afeta a sobrevivência do indivíduo. Por não ter capacidade de manter a homeotermia de forma eficiente, o organismo recorre a medidas compensatória para produção de calor, por meio do tremor da musculatura esquelética que ainda é uma medida ineficiente pelo fato dos músculos serem relativamente imaturos para produzir calor e aumento do metabolismo energético, por meio do metabolismo da gordura marrom (ASAKURA, 2004).

Devido ao comprometimento no desenvolvimento do sistema nervoso central do feto causado pelo estresse térmico durante o terço final da gestação, a função termorregulatória do hipotálamo também pode demonstrar respostas inadequadas frente às variações climáticas no momento do nascimento, como dificuldade de se termorregularem principalmente em climas muito frios (ASAKURA, 2004). No presente estudo, apesar da frequência cardíaca e temperatura retal permanecerem dentro dos valores de normalidade para a espécie e categoria,

esses parâmetros diferiram estatisticamente entre os cabritos do tratamento ET e CT aos 15 dias de vida. Estes resultados nos levam a sugerir que o estresse por calor pode ter causado alterações nos mecanismos de termorregulação destes animais quando ainda eram fetos, dificultando a eficiência destes após o nascimento, pois, mesmo com a elevação da frequência cardíaca, a temperatura retal estava menor que a dos animais do tratamento CT.

Nos dias 30, 45 e 60 de vida, os cabritos apesar de estarem em um ambiente que proporcionava conforto térmico, os animais que nasceram em ambiente de estresse térmico apresentaram maior mobilização dos mecanismos de troca de calor, como o aumento da frequência cardíaca e aumento das temperaturas superficiais que os cabritos do tratamento CT, afim de promover a perda de calor para o meio externo devido à alta temperatura corporal. Assim como no estudo realizado por Tzschentke e Nichelmann (1997), que observaram que a temperatura a qual os animais foram submetidos no período pré-natal causou mudanças no comportamento termorregulatório após o nascimento, modificando o limiar de aclimação dos animais para perda e ganho de calor no ambiente.

Esses dados sugerem que, o tratamento térmico durante o período gestacional dificultou o processo de adaptação e aclimação dos cabritos, pois, mesmo em termoneutralidade, esses animais necessitaram elevar seus parâmetros fisiológicos para realizar a troca térmica por meio da convecção e radiação, como abordado por Kadzere et al. (2002) e Silanikove (2000).

No estudo realizado por Mahjoubi et al. (2014) foi observado que os animais que permaneceram em ambiente de estresse térmico durante o dia e ambiente de termoneutralidade a noite, não conseguiam retornar ao estado de homeotermia, mantendo as temperaturas superficiais da pele elevadas, o que demonstra dificuldade em manter sua homeotermia dos animais.

Desta forma, com base nos dados apresentados é possível sugerir que a exposição crônica ao calor durante a fase intra-uterina, influenciou negativamente o funcionamento do sistema termorregulatório dos cabritos, dificultando a manutenção da homeotermia destes animais mesmo em ambiente de termoneutralidade.

7 CONCLUSÃO

O estresse térmico crônico durante o terço final da gestação causou aumento nas concentrações plasmáticas de cortisol materno antes do parto, que retornaram aos níveis basais após a retirada dos animais do ambiente estressor. O líquido amniótico das cabras submetidas ao estresse térmico também apresentou elevação nas concentrações de cortisol. No entanto, o parto elevou as concentrações plasmáticas de cortisol das cabras que estavam tanto em ambiente de termoneutralidade quanto em ambiente de estresse térmico.

O estresse por calor teve impacto negativo sobre a eficiência placentária, além de reduzir a expressão gênica da enzima 11 β -HSD tipo 2 e estimular o aumento da expressão gênica do receptor de ACTH. Em contrapartida, para manter a integridade celular, houve maior expressão gênica da HSP70 no tecido placentário dos animais submetidos ao estresse térmico.

O estresse térmico ao qual os cabritos foram submetidos durante a vida intrauterina causou redução nas concentrações plasmáticas de cortisol desde o nascimento até aos 15 dias de vida.

As alterações placentárias influenciaram o ganho de peso no início de vida do cabrito, apresentando menor ganho até os 8 dias de vida, no entanto, não houve influência do desempenho no peso ao desmame dos cabritos com 60 dias de vida.

Durante os primeiros 60 dias de vida dos cabritos, os animais nascidos em ambiente de estresse por calor apresentaram maior mobilização dos mecanismos de termorregulação que os cabritos nascidos em ambiente de termoneutralidade.

REFERÊNCIAS

- APGAR, V.; HOLADAY, D. A.; JAMES, L. S.; ERISBROT, I. M.; BERRIEN, C. Evaluation of the newborn infant - Second report. **Journal of the American Medical Association**, v. 168, p. 207–209, 1958.
- ASAKURA, H. Fetal and Neonatal Thermoregulation. **Journal of Nippon Medical School**, v. 71, p. 360–370, 2004.
- BAHR, B.; GALAN, H. L.; ARROYO, J. A. Decreased expression of phosphorylated placental heat shock protein 27 in human and ovine intrauterine growth restriction (IUGR). **Placenta**, v. 35, n. 6, p. 404–410, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2014.03.001>>.
- BELL, A. W.; MCBRIDE, B. W.; SLEPETIS, R.; EARLY, R. J.; CURRIE, W. B. Chronic heat stress and prenatal development in sheep: I. Conceptus growth and maternal plasma hormones and metabolites. **Journal of Animal Science**, v. 67, n. 12, p. 3289–3299, 1989.
- BENEDIKTSSON, R.; CALDER, a a; EDWARDS, C. R.; SECKL, J. R. Placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: a key regulator of fetal glucocorticoid exposure. **Clinical Endocrinology**, v. 46, n. 2, p. 161–166, 1997.
- BHARATI, J.; DANGI, S. S.; CHOUHAN, V. S.; MISHRA, S. R.; BHARTI, M. K.; VERMA, V.; SHANKAR, O.; YADAV, V. P.; DAS, K.; PAUL, A.; BAG, S.; MAURYA, V. P.; SINGH, G.; KUMAR, P.; SARKAR, M. Expression dynamics of HSP70 during chronic heat stress in Tharparkar cattle. **International Journal of Biometeorology**, v. 61, p. 1017–1027, 2017.
- BOVINO, F.; CAMARGO, D. G. De; ARAÚJO, M. A. De; COSTA, F. de P.; SANTOS, P. S. P. dos; MENDES, L. C. N.; PEIRÓ, J. R.; FEITOSA, L. F. Avaliação da vitalidade de cordeiros nascidos de partos eutócicos e cesarianas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, p. 11–16, 2014.
- BRAUN, T.; LI, S.; MOSS, T. J. M.; NEWNHAM, J. P.; CHALLIS, J. R. G.; GLUCKMAN, P. D.; SLOBODA, D. M. Maternal betamethasone administration reduces binucleate cell number and placental lactogen in sheep. **Journal of Endocrinology**, v. 194, n. 2, p. 337–347, 2007.
- BROOM, D. M. Indicators of poor welfare. **British Veterinary Journal**, v. 142, p. 524–526, 1986.
- BUFFINGTON, D. E.; COLLOAZO-AROCHO, A.; CANTON, G. H.; PITT, D.; THATCHER, W. W.; COLLIER, R. J. Black Globe Humidity Index (BGHI) as Comfort Equation for Dairy Cows. **Transactions of the ASABE**, v. 24, p. 711–714, 1981.
- BUNGLAVAN, S. J.; CHATURVEDI, V. B. Heat Stress : Impact on Animal Production and Nutritional Strategies for Mitigation of Heat Stress in Dairy Heat Stress : Impact on Animal Production and Nutritional. **Livestock Line**, n. December, p. 46–49, 2013.
- BURTON, G. J.; FOWDEN, A. L. The placenta : a multifaceted, transient organ. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 370, p. 1–8, 2015.

COSTA, M. A. The endocrine function of human placenta : an overview. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 32, n. 1, p. 14–43, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.10.005>>.

COULON, M.; LÉVY, F.; RAVEL, C.; NOWAK, R.; BOISSY, A. Mild effects of gestational stress and social reactivity on the onset of mother–young interactions and bonding in sheep. **Stress**, v. 17, n. 6, p. 460–470, 2014.

DANGI, S. S.; GUPTA, M.; DANGI, S. K.; CHOUHAN, V. S.; MAURYA, V. P.; KUMAR, P.; SINGH, G.; SARKAR, M. Expression of HSPs: an adaptive mechanism during long-term heat stress in goats (*Capra hircus*). **International Journal of Biometeorology**, v. 59, n. 8, p. 1095–1106, 2015.

DANGI, S. S.; GUPTA, M.; MAURYA, D.; YADAV, V. P.; PANDA, R. P.; SINGH, G.; MOHAN, N. H.; BHURE, S. K.; DAS, B. C.; BAG, S.; MAHAPATRA, R.; TARU SHARMA, G.; SARKAR, M. Expression profile of HSP genes during different seasons in goats (*Capra hircus*). **Tropical Animal Health and Production**, v. 44, n. 8, p. 1905–1912, 2012.

DANGI, S. S.; GUPTA, M.; NAGAR, V.; YADAV, V. P.; DANGI, S. K.; SHANKAR, O.; CHOUHAN, V. S.; KUMAR, P.; SINGH, G.; SARKAR, M. Impact of short-term heat stress on physiological responses and expression profile of HSPs in Barbari goats. **International Journal of Biometeorology**, v. 58, p. 2085–2093, 2014.

DAS, R.; SAILO, L.; VERMA, N.; BHARTI, P.; SAIKIA, J.; IMTIWATI; KUMAR, R. Impact of heat stress on health and performance of dairy animals: A review. **Veterinary World**, v. 9, n. 3, p. 260–268, 2016.

DWYER, C. M.; CALVERT, S. K.; FARISH, M.; DONBAVAND, J.; PICKUP, H. E. Breed, litter and parity effects on placental weight and placentome number, and consequences for the neonatal behaviour of the lamb. **Theriogenology**, v. 63, n. 4, p. 1092–1110, 2005.

EDWARDS, L. J.; MCMILLEN, I. C. Impact of Maternal Undernutrition During the Periconceptional Period , Fetal Number , and Fetal Sex on the Development of the Hypothalamo-Pituitary Adrenal Axis in Sheep During Late Gestation. **BIOLOGY OF REPRODUCTION**, v. 66, p. 1562–1569, 2002.

ELBAY, A.; CELIK, U.; CELIK, B.; OZER, O. F.; KILIC, G.; AKKAN, J. C. U.; BAYRAKTAR, B. T.; KAYMAK, N. Z. Intraocular pressure in infants and its association with hormonal changes with vaginal birth versus cesarean section. **International Ophthalmology**, v. 36, n. 6, p. 855–860, 2016.

EVERETT-HINCKS, J. M.; DODDS, K. G.; KERSLAKE, J. I. Parturition duration and birthing difficulty in twin and triplet lambs. **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**, v. 67, p. 55–60, 2007.

FAURIE, a S.; MITCHELL, D.; LABURN, H. P. Feto-maternal relationships in goats during heat and cold exposure. **Experimental Physiology**, v. 86, n. 2, p. 199–204, 2001.

FENELL, C. L.; REYNOLDS, L. P. Uterine and Umbilical Blood Flows and Net Nutrient Uptake by Fetuses and Uteroplacental Tissues of Cows Gravid with Either Single or Twin

Fetuses. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 426–433, 1992.

FTHENAKIS, G. C.; ARSENOS, G.; BROZOS, C.; FRAGKOU, I. A.; GIADINIS, N. D.; GIANNENAS, I.; MAVROGIANNI, V. S.; PAPADOPOULOS, E.; VALASI, I. Health management of ewes during pregnancy. **Animal Reproduction Science**, v. 130, n. 3–4, p. 198–212, 2012.

GAGNON, R. Placental insufficiency and its consequences. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology**, v. 110, n. SUPPL., p. 99–107, 2003.

GALAN, H. L.; HUSSEY, M. J.; BARBERA, A.; FERRAZZI, E.; CHUNG, M.; HOBBS, J. C.; BATTAGLIA, F. C. Relationship of fetal growth to duration of heat stress in an ovine model of placental insufficiency. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 180, n. 5, p. 1278–1282, 1999.

GROPETTI, D.; MARTINO, P. A.; RAVASIO, G.; BRONZO, V.; PECILE, A. Prognostic potential of amniotic fluid analysis at birth on canine neonatal outcomes. **The Veterinary Journal**, v. 206, n. 3, p. 423–425, 2015.

HANNA, C. E.; KEITH, L. D.; COLASURDO, M. A.; BUFFKIN, D. C.; LAIRD, M. R.; MANDEL, S. H.; COOK, D. M.; LAFRANCHI, S. H.; REYNOLDS, J. W. Hypothalamic Pituitary Adrenal function in the extremely low birth weight infant*. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 76, p. 384–387, 1993.

HILD, S.; COULON, M.; SCHROEER, A.; ANDERSEN, I. L.; ZANELLA, A. J. Gentle vs. aversive handling of pregnant ewes: I. Maternal cortisol and behavior. **Physiology and Behavior**, v. 104, n. 3, p. 384–391, 2011.

HONG MA, X.; XUAN WU, W.; NATHANIELSZ, P. W. Gestation-related and betamethasone-induced changes in 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 in the baboon placenta. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 188, p. 13–21, 2003.

HROMADNIKOVA, I.; DVORAKOVA, L.; KOTLABOVA, K.; KESTLEROVA, A.; HYMPANOVA, L.; NOVOTNA, V.; DOUCHA, J.; KROFTA, L. Assessment of placental and maternal stress responses in patients with pregnancy related complications via monitoring of heat shock protein mRNA levels. **Molecular Biology Reports**, v. 42, p. 625–637, 2015.

HYDBRING, E.; MADEJ, A.; MACDONALD, E.; DRUGGE-BOHOLM, G.; BERGLUND, B.; OLSSON, K. Hormonal changes during parturition in heifers and goats are related to the phases and severity of labour. **Journal of Endocrinology**, v. 160, p. 75–85, 1999.

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. **Hormones and Behavior**, v. 49, n. 1, p. 68–80, 2006.

KADZERE, C. T.; MURPHY, M. R.; SILANIKOVE, N.; MALTZ, E. Heat stress in lactating dairy cows: A review. **Livestock Production Science**, v. 77, n. 1, p. 59–91, 2002.

KANDIEL, M. M. M.; WATANABE, G.; SOSA, G. A.; EL-ROOS, M. E. A. A.; ABDEL-

GHAFFAR, A. E.; LI, J. Y.; MANABE, N.; AZAB, A. E. S. I. EL; TAYA, K. Profiles of circulating steroid hormones , gonadotropins , immunoreactive inhibin and prolactin during pregnancy in goats and immunolocalization of inhibin subunits , steroidogenic enzymes and prolactin in the corpus luteum and placenta. **Journal of Reproduction and Development**, v. 56, n. 2, 2010.

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

KLAUS, T.; SCHÖPPER, H.; HUBER, S. Effects of chronic stress during pregnancy on maternal performance in the guinea pig (*Cavia aperea f. porcellus*). **Behavioural Processes**, v. 94, p. 83–88, 2013.

KONYALI, A.; TÖLÜ, C.; DAS, G.; SAVAS, T. Factors affecting placental traits and relationships of placental traits with neonatal behaviour in goat. **Animal Reproduction Science**, v. 97, n. 3–4, p. 394–401, 2007.

LABURN, H. P.; FAURIE, A.; GOELST, K.; MITCHELL, D. Effects on fetal and maternal body temperatures of exposure of pregnant ewes to heat , cold , and exercise Effects on fetal and maternal body temperatures of exposure of pregnant ewes to heat , cold , and exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 92, p. 802–808, 2002.

LANGER, T.; ROSMUS, S.; FASOLD, H. Intracellular localization of the 90 kDA heat shock protein (HSP90kDA) determined by expression of a EGFP-HSP90a-fusion protein in unstressed and heat stressed 3T3 cells. **Cell Biology International**, v. 27, n. 1, p. 47–52, 2003.

LAPORTA, J.; FABRIS, T. F.; SKIBIEL, A. L.; POWELL, J. L.; HAYEN, M. J.; HORVATH, K.; MILLER-CUSHON, E. K.; DAHL, G. E. In utero exposure to heat stress during late gestation has prolonged effects on the activity patterns and growth of dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 1–9, 2017.

LEI, L.; YU, J.; BAO, E. Expression of heat shock protein 90 (Hsp90) and transcription of its corresponding mRNA in broilers exposed to high temperature. **British Poultry Science**, v. 50, n. 4, p. 504–511, 2009.

LÓPEZ, G.; DÍAZ V. L.; SERRANO, B. A.; MUÑOZ, M. L.; CARTAGENA, T. M.; RAMÍREZ, C. M. R. Blood levels of cortisol and glucocorticoid receptors in liver and placenta of goats at different stages of gestation. **Veterinária México**, v. 43, n. 3, p. 213–221, 2012.

LORENZ, O. R.; FREIBURGER, L.; RUTZ, D. A.; KRAUSE, M.; ZIERER, B. K.; ALVIRA, S.; CUÉLLAR, J.; VALPUESTA, J.; MADL, T.; SATTLER, M.; BUCHNER, J. Modulation of the Hsp90 chaperone cycle by a stringent client protein. **Molecular Cell**, v. 53, n. 6, p. 941–953, 2014.

MACHADO, R.; CORRÊA, R. F.; BARCOSA, R. T.; BERGAMASCHI, M. A. C. M. Escore da condição corporal e sua aplicação no manejo reprodutivo de ruminantes. **Circular Técnica - Embrapa**, p. 1–16, 2008.

MAHJOUBI, E.; AMANLOU, H.; MIRZAEI-ALAMOUTI, H. R.; AGHAZIARATI, N.;

YAZDI, M. H.; NOORI, G. R.; YUAN, K.; BAUMGARD, L. H. The effect of cyclical and mild heat stress on productivity and metabolism in Afshari lambs. **Journal of Animal Science**, v. 92, p. 1007–1014, 2014.

MARCA-GHAEMMAGHAMI, P. La; DAINESE, S. M.; MARCA, R. La; ZIMMERMANN, R.; EHLERT, U. The acute autonomic stress response and amniotic fluid glucocorticoids in second-trimester pregnant women. **Psychosomatic Medicine**, v. 77, n. 18, p. 41–49, 2015.

MARIANI, M. L.; SOUTO, M.; FANELLI, M. A.; CIOCCA, D. R. Constitutive expression of heat shock proteins hsp25 and hsp70 in the rat oviduct during neonatal development, the oestrous cycle and early pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility (2000)**, v. 120, p. 217–223, 2000.

MASTORAKOS, G.; ILIAS, I. Maternal and fetal hypothalamic-pituitary-adrenal axes during pregnancy and postpartum. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 997, p. 136–149, 2003.

MCMULLEN, S.; OSGERBY, J. C.; THURSTON, L. M.; GADD, T. S.; WOOD, P. J.; WATHES, D. C.; MICHAEL, A. E. Alterations in placental 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β HSD) activities and fetal cortisol:cortisone ratios induced by nutritional restriction prior to conception and at defined stages of gestation in ewes. **Reproduction**, v. 127, n. 6, p. 717–725, 2004.

MEEK, L. R.; DITTEL, P. L.; SHEEHAN, M. C.; CHAN, J. Y.; KJOLHAUG, S. R. Effects of stress during pregnancy on maternal behavior in mice. **Physiology & Behavior**, v. 72, n. 4, p. 473–9., 2001.

MILLER, D. R.; JACKSON, R. B.; BLACHE, D.; ROCHE, J. R. Metabolic maturity at birth and neonate lamb survival and growth: The effects of maternal low-dose dexamethasone treatment. **Journal of Animal Science**, v. 87, p. 3167–3178, 2009.

MONDRAGÓN, J. A.; VALDEZ, R. A.; GÓMEZ, Y.; ROSALES, A. M.; ROMANO, M. C. Study of the steroidogenic pathways involved in goat placental androgen and estrogen synthesis. **Small Ruminant Research**, v. 106, n. 2–3, p. 173–177, 2012.

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

MUHLHAUSLER, B. S.; DUFFIELD, J. A.; OZANNE, S. E.; PILGRIM, C.; TURNER, N.; MORRISON, J. L.; MCMILLEN, I. C. The transition from fetal growth restriction to accelerated postnatal growth: a potential role for insulin signalling in skeletal muscle. **The Journal of Physiology**, v. 587, n. 17, p. 4199–4211, 2009.

NAKAYA, Y.; MIYAZAWA, T. The Roles of Syncytin-Like Proteins in Ruminant Placentation. **Viruses**, v. 7, n. 6, p. 2928–42, 2015.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Nutrients Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids**. Washington, D.C: National Academies Press, 2007.

NEUER, A. The role of heat shock proteins in reproduction. **Human Reproduction Update**, v. 6, n. 2, p. 149–159, 2000.

NG, P. C.; WONG, G. W. K.; LAM, C. W. K.; LEE, C. H.; WONG, M. Y.; FOK, T. F.; WONG, W.; CHAN, D. C. F. Pituitary-Adrenal Response in Preterm Very Low Birth Weight Infants after Treatment with Antenatal Corticosteroids. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 82, n. 11, p. 3548–3552, 1997.

OCAK, S.; OGUN, S.; GUNDUZ, Z.; ONDER, H. Goat placental efficiency determination by comparing litter weight to the surface area of the cotyledons. **Animal Reproduction Science**, v. 12, p. 920–926, 2015.

OZAYDIN, T.; SUR, E.; OZNURLU, Y.; CELIK, I.; ULUISIK, D. Immunohistochemical distribution of heat shock protein 70 and proliferating cell nuclear antigen in mouse placenta at different gestational stages. **Microscopy Research and Technique**, v. 79, p. 251–257, 2016.

PATIN, V.; LORDI, B.; VINCENT, A.; THOUMAS, J. .; VAUDRY, H.; CASTON, J. Effects of prenatal stress on maternal behavior in the rat. **Developmental Brain Research**, v. 139, n. 1, p. 1–8, 2002.

PATIN, V.; VINCENT, A.; LORDI, B.; CASTON, J. Does prenatal stress affect the motoric development of rat pups? **Developmental Brain Research**, v. 149, n. 2, p. 85–92, 2004.

PELTONEN, J.; VIINIKKA, L.; LAATIKAINEN, T. Amniotic fluid cortisol during gestation and its relation to fetal lung maturation. **Journal of Steroid Biochemistry**, v. 8, p. 1159–1163, 1977.

PETRAGLIA, F.; SAWCHENKO, P. E.; RIVIER, J.; VALE, W. Evidence for local stimulation of ACTH secretion by corticotropin-releasing factor in human placenta. **Nature**, v. 328, p. 717–719, 1987.

REES, S.; HARDING, R. Brain development during fetal life: Influences of the intra-uterine environment. **Neuroscience Letters**, v. 361, n. 1–3, p. 111–114, 2004.

REES, S.; INDER, T. Fetal and neonatal origins of altered brain development. **Early Human Development**, v. 81, n. 9, p. 753–761, 2005.

REYNOLDS, L. P.; CATON, J. S.; REDMER, D. a; GRAZUL-BILSKA, A. T.; VONNAHME, K. A; BOROWICZ, P. P.; LUTHER, J. S.; WALLACE, J. M.; WU, G.; SPENCER, T. E. Evidence for altered placental blood flow and vascularity in compromised pregnancies. **The Journal of Physiology**, v. 572, n. Pt 1, p. 51–8, 2006.

RICHTER, K.; SOROKA, J.; SKALNIAK, L.; LESKOVAR, A.; HESSLING, M.; REINSTEIN, J.; BUCHNER, J. Conserved conformational changes in the ATPase cycle of human Hsp90. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 26, p. 17757–17765, 2008.

RÖHL, A.; ROHRBERG, J.; BUCHNER, J. The chaperone Hsp90: Changing partners for demanding clients. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 38, n. 5, p. 253–262, 2013.

ROMERO-R, C. M.; LÓPEZ, G.; LUMA-M, M. Abortion in goats associated with increased

maternal cortisol. **Small Ruminant Research**, v. 30, p. 7–12, 1998.

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.

SALAMA, A. A. K.; CAJA, G.; HAMZAOU, S.; BADAOU, B.; CASTRO-COSTA, A.; FAÇANHA, D. A. E.; GUILHERMINO, M. M.; BOZZI, R. Different levels of response to heat stress in dairy goats. **Small Ruminant Research**, v. 121, n. 1, p. 73–79, 2014.

SAWADA, T.; NAKATANI, T.; TAMADA, H.; MORI, J. Secretion of progesterone and pregnancy in goats. **Steroids**, v. 59, p. 468–471, 1994.

SHELDRIK, E. L.; RICKETTS, A. P.; FLINT, A. P. F. Placental production of progesterone in ovariectomized goats treated with a synthetic progestagen to maintain pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 60, p. 339–348, 1980.

SILANIKOVE, N. Effects of heat stress on the welfare of extensively managed domestic ruminants. **Livestock Production Science**, v. 67, n. 1–2, p. 1–18, 2000.

SILANIKOVE, N.; KOLUMAN, D. N. Impact of climate change on the dairy industry in temperate zones: Predications on the overall negative impact and on the positive role of dairy goats in adaptation to earth warming. **Small Ruminant Research**, v. 123, n. 1, p. 27–34, 2015.

SINGH, S.; DANGI, S. K.; CHOUHAN, V. S.; VERMA, M. R.; KUMAR, P.; SINGH, G.; SARKAR, M. Modulatory effect of betaine on expression dynamics of HSPs during heat stress acclimation in goat (*Capra hircus*). **Gene**, v. 575, n. 2, p. 543–550, 2016.

SOUZA, P. T. de; SALLES, M. G. F.; ARAÚJO, A. A. de. Impacto do estresse térmico sobre a fisiologia, reprodução e produção de caprinos. **Ciência Rural**, v. 42, n. 10, p. 1888–1895, 2012.

SU, Y. X.; CAREY, L. C.; ROSE, J. C. Ontogeny of StAR and ACTH-R genes in ovine placenta. **Placenta**, v. 25, n. 2004, p. 658–663, 2017.

TABIBZADEH, S.; KONG, Q. F.; SATYASWAROOP, P. G.; BABAKNIA, A. Heat shock proteins in human endometrium throughout the menstrual cycle. **Human Reproduction**, v. 11, p. 633–640, 1996.

TAIPALE, M.; JAROSZ, D. F.; LINDQUIST, S. HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 7, p. 515–528, 2010.

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, n. 12, p. 7128–36, 2012.

THOMSON, M. The physiological roles of placental corticotropin releasing hormone in pregnancy and childbirth. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 69, n. 3, p. 559–573,

2013.

TZSCHENTKE, B.; NICHELMANN, M. Influence of prenatal and postnatal acclimation on nervous and peripheral thermoregulation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 813, p. 87–94, 1997.

VANNUCCHI, C. I.; RODRIGUES, J. A.; SILVA, L. C. G.; LÚCIO, C. F.; VEIGA, G. A. L. A clinical and hemogasometric survey of neonatal lambs. **Small Ruminant Research**, v. 108, n. 1–3, p. 107–112, 2012.

VASSALO, F. G.; SILVA, L. P.; LOURENÇO, M. L. G.; CHIACCHIO, S. B. Escore de Apgar: história e importância na medicina veterinária. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 38, p. 54–59, 2014.

WANG, W. S.; LIU, C.; LI, W. J.; ZHU, P.; LI, J. N.; SUN, K. Involvement of CRH and hCG in the induction of aromatase by cortisol in human placental syncytiotrophoblasts. **Placenta**, v. 35, n. 1, p. 30–36, 2014.

WANGO, E. O.; WOODING, F. B.; HEAP, R. B. The role of trophoblastic binucleate cells in implantation in the goat: a morphological study. **Journal of Anatomy**, v. 171, p. 241–57, 1990.

WARD, J. W.; WOODING, F. B. P.; FOWDEN, A. L. The Effects of Cortisol on the Binucleate Cell Population in the Ovine Placenta During Late Gestation. **Placenta**, v. 23, p. 451–458, 2002.

WENG, Q.; MEDAN, M. S.; REN, L.; WATANABE, G.; TSUBOTA, T.; TAYA, K. Immunolocalization of Steroidogenic Enzymes in the Corpus Luteum and Placenta of the Japanese Shiba Goat. **Journal of Reproduction and Development**, v. 51, n. 2, 2005.

WHITE, B. G.; WILLIAMS, S. J.; HIGHMORE, K.; MACPHEE, D. J. Small heat shock protein 27 (Hsp27) expression is highly induced in rat myometrium during late pregnancy and labour. **Reproduction**, v. 129, n. 1, p. 115–126, 2005.

WHITLOCK, N. A.; LINDSEY, K.; AGARWAL, N.; CROSSON, C. E.; MA, J. X. Heat shock protein 27 delays Ca²⁺-induced cell death in a caspase-dependent and -independent manner in rat retinal ganglion cells. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 46, n. 3, p. 1085–1091, 2005.

WOODING, F. B.; HOBBS, T.; MORGAN, G.; HEAP, R. B.; FLINT, A. P. Cellular dynamics of growth in sheep and goat synepitheliochorial placentomes: an autoradiographic study. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 98, n. 1, p. 275–83, 1993.

WOODING, F. B. P.; FLINT, A. P. F.; HEAP, R. B.; MORGAN, G.; BUTTLE, H. L.; YOUNG, I. R. Control of binucleate cell migration in the placenta of sheep and goats. **Journal of Reproduction & Fertility**, v. 76, p. 499–512, 1984.

YATES, D. T.; GREEN, A. S.; LIMESAND, S. W. Catecholamines Mediate Multiple Fetal Adaptations during Placental Insufficiency That Contribute to Intrauterine Growth Restriction: Lessons from Hyperthermic Sheep. **Journal of Pregnancy**, v. 2011, p. 1–9, 2011.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Etograma desde o trabalho do parto até 60 min de avaliação ou 1ª mamada

	COMPORTAMENTO	DESCRIÇÃO
CABRA	Limpeza do cabrito	Ato de lamber e ingerir membranas aderidas no corpo do cabrito, secar o cabrito
	Estimulando o cabrito a levantar	Aproximando-se do cabrito, cheirando, lambendo, empurrando com a cabeça ou membros anteriores de forma delicada
	Afastando-se da cria	Distância que não permite contato com a cria
	Agredindo a cria	Ações como cabeçadas e empurrões
	Outro	Atividade não descrita anteriormente
CABRITO	Tentando levantar	Ação para conseguir se manter em pé
	Procurando úbere	Tentativa de encontrar os tetos
	Tentando mamar	Tentativa de sugar o leite dos tetos
	Mamada sozinho	Ação de sucção do colostro dos tetos
	Mamada com auxílio	Ação de mamada com auxílio externo
	Outro	Atividade não descrita anteriormente

Continuação do APÊNDICE A.

FICHA DE ACOMPANHAMENTO AO PARTO	
Tratamento de avaliação: () ET () CT	
Identificação da Cabra: _____	Dia do parto: _____
Tipo de Parto: () Eutócico () Distócico	
Horário do início do parto: _____	Expulsão do feto 1: _____
	Expulsão do feto 2: _____
	Expulsão do feto 3: _____
Horário do nascimento: _____	
Horário da liberação da placenta: _____ às _____	Peso: _____
Identificação do Cabrito: _____	Peso: _____ Sexo: () F () M
Tº retal: _____	FR: _____

Apgar

Variáveis	Tempo: 0 min	Hora: _____
Reação da cabeça à água fria	() Ausente	() Diminuída () Ativos
Reflexos palpebral e interdigital	() Ausente	() 1 reflexo () 2 reflexos
Cor das mucosas	() Branca/Azulada	() Azul () Rosa/Vermelha
Respiração	() Rítmica	() Arrítmica () Ausente
Variáveis	Tempo: 15 min	Hora: _____
Reação da cabeça à água fria	() Ausente	() Diminuída () Ativos
Reflexos palpebral e interdigital	() Ausente	() 1 reflexo () 2 reflexos
Cor das mucosas	() Branca/Azulada	() Azul () Rosa/Vermelha
Respiração	() Rítmica	() Arrítmica () Ausente

Comportamento Materno-filial

[illegible]

ANEXO

ANEXO A – Índice de Apgar para neonatos bovinos.

Variáveis	Escore		
	0 pontos	1 ponto	2 pontos
Atividade – reação da cabeça à água fria	Ausente	Diminuída	Movimentos espontâneos, ativos
Resposta os reflexos óculo-palpebral e interdígito	Ausente	Um dos reflexos presentes	Ambos os reflexos presentes
Aparência - cor das mucosas	Branca, azulada	Azul	Rosa, vermelha
Respiração	Ausente	Arritmica	Rítmica

Pontuação: 0-3: Pouca vitalidade; 4-6: vitalidade moderada; 7-8: vitalidade normal.

Fonte: BORN (1981) *apud* VASSALO, F. G.; SILVA, L. P.; LOURENÇO, M. L. G.; CHIACCHIO, S. B. Escore de Apgar : história e importância na medicina veterinária. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 38, p. 54–59, 2014.