UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

FÁBIO LUÍS HENRIQUE

**Ovelhas desafiadas no final da gestação: respostas
comportamentais e reprodutivas de cordeiros**

FÁBIO LUÍS HENRIQUE

**Ovelhas desafiadas no final da gestação: respostas
comportamentais e reprodutivas de cordeiros**

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências do programa de pós-graduação em Zootecnia.

Área de concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Gonçalves Titto

Coorientador: Prof. Dr. Adroaldo José Zanella

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

HH519o Henrique, Fábio Luis
Ovelhas desafiadas no final da gestação:
respostas comportamentais e reprodutivas de
cordeiros / Fábio Luis Henrique ; orientador
Cristiane Gonçalves Titto ; coorientador Adroaldo
José Zanella. -- Pirassununga, 2018.
82 f.

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

1. Desenvolvimento testicular. 2. Estresse. 3.
Lipopolissacarídeo. 4. Ovinos. 5. Relação materno
filial. I. Titto, Cristiane Gonçalves, orient. II.
Zanella, Adroaldo José, coorient. III. Título.

FÁBIO LUÍS HENRIQUE

**Ovelhas desafiadas no final da gestação: respostas
comportamentais e reprodutivas de cordeiros**

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências do programa de pós-graduação em Zootecnia.

Área de concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Data de aprovação: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora:

Prof^a Dr^a Cristiane Gonçalves Titto

Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos/USP

Prof^a Dr^a Camila Raineri

Universidade Federal de Uberlândia

Prof^a Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/USP

Prof^o Dr^o Flávio Moreno Salvador

Instituto Federal do Triângulo Mineiro – Campus Uberaba

Dr^a Paula Pimentel Valente

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/UNESP

Prof^a Dr^a Sarita Bonagurio Gallo

Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos/USP

DEDICATÓRIA

Sempre os meus bons feitos serão dedicados às pessoas mais importantes da minha vida, que além do meu amor merecem de mim todo o respeito e total entrega diária.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Sempre a frente de meus agradecimentos trago Deus e Nossa Senhora do Carmo, por estarem sempre juntos de mim, me guiando, protegendo, iluminando e me oferecendo força e perseverança ao longo de todos os meus desafios.

Aos meus pais, Cláudio e Sônia, ao meu irmão Francisco, por estarem sempre ao meu lado me incentivando e acreditando em minha capacidade.

Aos meus avós Luiz e Herlinda, Getúlio e Aurora, grandes formadores e responsáveis por grande parcela do homem que hoje sou.

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

À minha orientadora, professora Dr(a) Cristiane Gonçalves Titto, pela oportunidade que me ofereceu para a realização do doutorado tornando possível o cumprimento de mais esta etapa em minha carreira profissional.

Ao meu coorientador professor Dr. Adroaldo José Zanella por toda colaboração durante o meus anos de pós-graduação, pelas ideias cedidas e compartilhadas no desenvolvimento do projeto e nas fases experimentais.

Às minhas queridas amigas e companheiras de trabalho, Helena, Heloíse e Arícia, por todo empenho, comprometimento e responsabilidade durante as horas mais árduas e cansativas de dedicação e também pelos momentos ímpares de descontração e divertimento. Muito obrigado por toda confiança depositada em mim.

Ao amigo Me. Júlio Barbosa e à Prof^a Dr^a Anneliese Traldi (Kiky) pelo trabalho emprestado durante todo o protocolo de inseminação artificial e durante a própria inseminação artificial.

Às professoras doutoras Sarita Gallo e Eneiva Carla Celeghini por todo apoio prestado ao longo do experimento.

Aos amigos de pós graduação Maíra e Leonardo por dedicarem parte do seu tempo em todas as análises de ultrassom e durante as colheitas e análises de sêmen. Ao amigo Dione por toda ajuda nos trabalhos do setor de ovinos durante o experimento.

Aos insubstituíveis amigos de morada, convivência e caminhada na querida República Caipira, Juan (Hijo), Guilhermão, Talles (Salsicha), Henrique Hooper, Thiago e Steffan.

Ao Laboratório de Biometeorologia e Etologia da FZEA/USP, em especial as amigas Lina e Thays que sempre levarei comigo e todos os demais membros.

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão e financiamento da bolsa de estudos durante o curso de doutorado.

O Trabalho proporciona a Realidade e diminui as Expectativas.

FELICIDADE = Realidade-Expectativa

Logo,

**O TRABALHO te levará ao encontro da
FELICIDADE.**

RESUMO

HENRIQUE, F. L. **Ovelhas desafiadas no final da gestação: respostas comportamentais e reprodutivas de cordeiros**. 2018. 82 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.

Tendo em vista a importância fisiológica e comportamental da relação entre ovelha e cordeiro, este trabalho teve por objetivo confirmar o perfil de alterações fisiológicas do lipopolissacarídeo (LPS) em ovelhas no terço final da gestação e se mães estressadas durante a gestação apresentam maior disponibilidade e estabilidade quanto aos cuidados maternos com seus filhos, intencionando minimizar prejuízos ao longo da vida como compensação das adversidades sofridas durante a gestação, além de analisar a influência deste estresse na gestação sobre os parâmetros reprodutivos dos cordeiros. Foram utilizadas 39 ovelhas prenhes, mestiças da raça Santa Inês, nulíparas, com idade média de 12 meses e média de 45 kg de peso vivo (PV), dando origem aos 17 cordeiros machos que também fizeram parte do experimento. As ovelhas gestantes foram divididas em dois tratamentos, TF e TC, devido à indução ou não de LPS no final da gestação. Foram avaliadas alterações fisiológicas e a relação materna destes animais até a idade da desmama dos cordeiros, assim como análises do desenvolvimento reprodutivo destes animais até completarem um ano de idade. Os dados comportamentais foram analisados pela teoria de modelos lineares generalizados proposta por Nelder e Wenderburn (1972), as medidas fisiológicas e os parâmetros reprodutivos, após análise de variância foram comparadas pelo teste F e t de student ao nível de 5% de significância, utilizando-se o procedimento GLIMMIX do software SAS para todas as análises. Houve diferenças em relação ao cortisol sanguíneo e a temperatura retal ($P < 0,05$) devido à ação do LPS durante a gestação. Cordeiros desafiados pelo LPS durante a gestação apresentaram maiores dificuldades de aprendizado e memória aos 30 dias de vida durante um teste cognitivo em um labirinto ($P < 0,05$). Sendo encontrados também diferentes perfis ($P < 0,05$), entre os tratamentos, no que diz respeito aos cuidados maternos medidos segundo a interação comportamental entre ovelha e cordeiro, do momento do parto até a idade da desmama destes animais. Os

índices de mamada e o início do consumo de alimentos sólidos pelos cordeiros apresentaram-se como uma boa prática de observação para se mensurar a capacidade de independência dos cordeiros. Para os dados reprodutivos houve efeito de tempo, em relação à idade da puberdade fisiológica ao início da maturidade sexual dos animais, para a maioria das variáveis analisadas ($P < 0,05$), havendo efeito também de tratamento para a qualidade espermática dos cordeiros neste mesmo período ($P < 0,01$). O LPS provoca alterações fisiológicas em ovelhas no final da gestação, influencia nos cuidados maternos e na capacidade cognitiva dos cordeiros, assim como altera a qualidade espermáticas de machos do durante a puberdade fisiológica até o início da maturidade sexual.

Palavras chaves: Desenvolvimento testicular; Estresse; Lipopolissacarídeo; Ovinos, Relação materno filial.

ABSTRACT

HENRIQUE, F. L. **Challenged sheep at the end of gestation: behavioral and reproductive responses of lambs.** 2018. 82 f. Thesis (Doctorate) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.

Considering the physiological and behavioral importance of the relationship between sheep and lamb, this study aimed to confirm the profile of LPS physiological changes in sheep in the final third of gestation, and if mothers who are stressed during pregnancy present greater availability and stability regarding care maternal with their children, intending to minimize losses during the life as compensation of the adversities suffered during the gestation, besides analyzing the influence of this stress in the gestation on the reproductive parameters of the lambs. Thirty - nine pregnant ewes of Santa Inês breed, nulliparous, with a mean age of 12 months and an average of 45 kg of live weight were used, giving birth to the 17 male lambs that were also part of the experiment. Pregnant ewes were divided into two treatments, FT and CT, due to the induction or not of LPS at the end of gestation. Physiological and physiological values were evaluated in relation to the animals up to the weaned age of the lambs, as well as the responses to the reproductive development of the animals until one year of age. The behavioral data were analyzed by the theory of generalized linear models proposed by Nelder and Wenderburn (1972), the physiological measures and the reproductive parameters, after analysis of variance were compared by the test F et de student at the 5% level of significance, the SAS software GLIMMIX procedure is used for all analyzes. There were differences in blood cortisol and rectal temperature ($P<0.05$) due to the action of LPS during pregnancy. Lambs challenged by LPS during gestation presented greater learning difficulties and memory at 30 days of life during a cognitive test in a labyrinth ($P<0.05$). Different profiles ($P<0.05$) were also found among the treatments, in relation to the maternal care measured according to the behavioral interaction between sheep and lamb, from the moment of delivery until the weaning age of these animals. Feeding rates and the onset of solid food intake by lambs were a good observational practice in order to measure lambs' independence. For the reproductive data, there was a time

effect, in relation to the age of physiological puberty at the beginning of the sexual maturity of the animals, for most of the analyzed variables ($P < 0.05$), also having an effect on the sperm quality of the lambs in this same period ($P < 0.01$). LPS causes physiological changes in sheep at the end of gestation, influences maternal care and cognitive ability of lambs, as well as alter the sperm quality of males during physiological puberty until the onset of sexual maturity.

Keywords: Lipopolysaccharide; Maternal filial relationship; Sheep; Stress; Testicular development.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	15
1.1. Objetivo geral	16
1.2. Objetivos específicos.....	16
1.3. Justificativa.....	16
1.4. Revisão de literatura.....	17
1.4.1. Estresse durante a gestação	17
1.4.2. Ação e consequências do LPS.....	18
1.4.3. Comportamento materno filial e desarranjos cognitivos	20
1.4.4. Período de desmama: manejo específico e a interação social.....	22
1.4.5. Atributos do desenvolvimento sexual masculino	23
1.4.6. Comportamento sexual.....	24
2. Mudanças fisiológicas durante o terço final da gestação das ovelhas dificultam a independência dos cordeiros do nascimento ao desmame.....	25
2.1. INTRODUÇÃO	25
2.2. MATERIAL E MÉTODOS	27
2.2.1. Local	27
2.2.2. Animais	27
2.2.3. Tratamentos.....	28
2.2.4. Curvas de cortisol e temperatura retal.....	29
2.2.5. Comportamento materno filial durante o parto e peso ao nascer dos cordeiros (PN)	29
2.2.6. Teste cognitivo aos 30 dias de vida do cordeiro	31
2.2.7. Relação materno filial durante a desmama controlada	32
2.2.8. Análises dos resultados	33
2.3. RESULTADOS.....	34

2.3.1. Dados de temperatura retal e cortisol durante a gestação ..	34
2.3.2. Comportamento materno filial.....	36
2.3.2.1. <i>Postura e atividades de ovelhas</i>	36
2.3.2.2. <i>Postura e atividades dos cordeiros</i>	37
2.3.3. Teste cognitivo aos 30 dias de idade.....	38
2.3.4. Relação materno filial e determinação social durante a desmama controlada.....	40
2.4. DISCUSSÃO	43
2.4.1. Alterações fisiologias causadas pelo LPS na gestação	43
2.4.2. Primeira interação entre ovelha e cordeiro e o peso ao nascer.....	44
2.4.3. Avaliações cognitivas entre os cordeiros (teste de labirinto).....	45
2.4.4. Interação materna e entre cordeiros na desmama	46
2.5. CONCLUSÃO	47
3. Desenvolvimento de atributos reprodutivos de carneiros jovens desafiados no final gestação	48
3.1. INTRODUÇÃO	48
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	49
3.2.1. Local	49
3.2.2. Animais	49
3.2.3. Tratamentos.....	50
3.2.4. Avaliação clínica reprodutiva	51
3.2.5. Colheita e processamento de amostras de sangue para dosagem de testosterona	57
3.2.6. Características do sêmen	57
3.2.7. Análises histopatológicas.....	58
3.2.8. Análises estatística	59
3.3. RESULTADOS.....	60

3.3.1. Avaliações clínicas reprodutivas e de ultrassonografia	60
3.3.2. Dosagem sanguínea de testosterona	62
3.3.3. Características do sêmen	63
3.3.4. Comparação histopatológica do tecido testicular.....	65
3.4. DISCUSSÃO	65
3.4.1. Parâmetros clínicos reprodutivos e avaliações de ultrassonografia	65
3.4.2. Perfil da dosagem de testosterona dos cordeiros.....	66
3.4.3. Características do sêmen e morfologia espermáticas dos cordeiros.....	67
3.4.4. Análise histopatológica testicular	68
3.5. CONCLUSÃO	68
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	69
4.1. Comportamentos reprodutivos em teste de labirinto	69
5. CONCLUSÃO GERAL	70
6. REFERÊNCIAS	71
ANEXO	81

1. INTRODUÇÃO GERAL

Situações estressantes durante a gestação comprometem o desenvolvimento fetal em ovinos. Estresse no terço final da gestação torna-se um problema ainda mais agravante, aumentando consideravelmente o número de natimortos e diminuindo o peso ao nascer destes filhotes que enfrentam este desafio.

Situação de doenças ou de desafios causadores de processos inflamatórios no organismo de ovelhas prenhes altera de maneira significativa a concentração circulante de glicocorticoides e os valores de temperatura retal no período gestacional, expondo estas fêmeas a um estado febril e valores de cortisol na circulação sanguínea acima dos normais da espécie.

O Lipopolissacarídeo (LPS - *E. coli*) quando presente na circulação é um desses causadores. De maneira ativa o LPS incita as células de defesa do organismo, principalmente os monócitos e macrófagos, manifestando uma resposta imunológica através do desencadeamento de ações no sistema nervoso central até a ativação do eixo hipotálamo – pituitário – adrenal, ocasionando a liberação de hormônios que descrevem a situação de estresse, sendo o cortisol o hormônio com maior conceituação para essa resposta.

É presumido que essas alterações fisiológicas, representando este desafio durante a gestação, podem interferir na relação entre mãe e filho. Tornando-se possível que uma ovelha submetida a certas adversidades nesta fase final, busque concentrar e oferecer maior atenção ao seu cordeiro após o nascimento, com o intuito de reverter mesmo que involuntariamente, algum prejuízo que o estresse possa ter vindo a causar na vida do filho quando feto.

Desarranjos cognitivos podem ser identificados como um destes prejuízos, resultando muitas vezes na perda da capacidade de memória e aprendizagem dos cordeiros desafiados, influenciando principalmente na desenvoltura de enfrentarem eventos adversos durante a vida e na própria relação social após a desmama.

Dados preliminares indicam que quando o estresse ocorre durante o período gestacional, há diferenciação das consequências do LPS após o nascimento quando comparados os sexos dos cordeiros, mostrando que os machos são mais suscetíveis a esses efeitos na avaliação do desempenho ao

longo da vida, quando comparados com fêmeas que passaram pelo mesma situação estressante.

A interferência do LPS durante a gestação de ovinos possivelmente pode prejudicar na desenvoltura do comportamento reprodutivo dos machos nascidos, sendo levado em consideração as possíveis alterações morfológicas testiculares, desencadeamento hormonal e qualidade espermática sobre a avaliação etológica, julgando esses machos segundo sua precocidade, a libido e a capacidade de emprenhar uma fêmea.

1.1. Objetivo geral

Avaliar a influência do estresse, gerado pelo LPS, durante o terço final da gestação de ovinos sobre o comportamento materno-filial, sobre a desmama controlada e o desenvolvimento de parâmetros sexuais de carneiros jovens.

1.2. Objetivos específicos

Caracterizar o perfil de alterações fisiológicas do LPS em ovelhas no terço final da gestação e se mães estressadas durante a gestação apresentam maior disponibilidade e estabilidade quanto aos cuidados maternos com seus filhos, intencionando minimizar prejuízos ao longo da vida como compensação das adversidades sofridas durante a gestação.

Avaliar as consequências que a indução pela administração de LPS no terço final da gestação de ovinos, causa sobre os atributos reprodutivos de carneiros jovens entre os 5 e 12 meses de idade.

1.3. Justificativa

Existem evidências de que a presença do estresse durante a gestação, especificamente a submissão dos efeitos do LPS, causa a ativação do sistema imunológico resultando na síntese e liberação de cortisol e citocinas que podem interromper ou modificar a exibição de comportamentos normais.

Porém, ainda não existiam respostas para a compreensão desses efeitos sobre as proles do sexo masculino em ovinos no que diz respeito as suas interações maternas e sociais, e principalmente do desenvolvimento testicular e alguns parâmetros reprodutivos destes animais.

1.4. Revisão de literatura

1.4.1. Estresse durante a gestação

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

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

O estresse pode ser considerado uma ameaça para o animal, exigindo uma adaptação do corpo do indivíduo, sendo classificado de três maneiras, estresse físico, psicológico ou relativo à sensibilidade a estímulos e variações do organismo, podendo haver frequentes interações entre os três tipos de estresse em determinadas situações, ocasionando em alterações neuroendócrinas, psicológicas e comportamentais em busca da adaptação à adversidades (von BORELL, 1995).

O estresse pré-natal, especificamente, é uma adversidade experimentada pela mãe durante a gestação, que possivelmente poderá afetar o desenvolvimento do feto (BRAASTAD, 1998). A fase em que essa adversidade ocorre também possui notáveis influências nesse desenvolvimento, que podem ser mensuradas por incidências de filhotes que não sobrevivem no pós-parto ou até mesmo que apresentam pesos no nascimento inferiores aos que não foram desafiados no mesmo período gestacional, sendo o terço final da gestação a fase mais crítica e comprometedora no que diz respeito à formação fetal e a manutenção e desenvolvimento do animal ao longo de sua vida (HILD et al., 2011; COULON et al., 2013; HENRIQUE et al., 2017).

Além das influências ambientais após o nascimento, cada vez mais estão sendo consideradas as influências ambientais uterinas sobre o feto, estando os indivíduos expostos a uma plasticidade de desenvolvimento,

processo esse definido por Horton (2005) como “Um programa de base genética que pode ser modificado em respostas às mudanças nas condições ambientais para moldar as características únicas de cada indivíduo”. Desta forma, se o ambiente gestacional é hostil ou estressante, dependendo de sua duração e período da gestação, secreções hormonais desencadeadas devido ao estresse materno (eixo hipotálamo – pituitário – adrenal) podem trazer consequências prejudiciais de curto ou longo prazo para a vida da prole (VILTART; VANBESIEN-MAILLOT, 2007). Essas possíveis consequências prejudiciais também são denominadas como “programming” ou “marca” no desenvolvimento de diferentes sistemas que podem permanecer ao longo da vida. Esse termo foi criado para esclarecer as alterações estáveis no fenótipo como consequências da adaptação de um organismo a eventos ambientais (XIONG; ZHANG, 2013).

Em fases críticas da gestação, o estresse pré-natal pode inclusive influenciar negativamente, promovendo alterações devido a mudanças neuroendócrinas no desenvolvimento reprodutivo dos fetos havendo, por exemplo, indícios de desmasculinização de machos e diminuição da incidência do comportamento copulatório e atraso na puberdade de fêmeas (WARD, 1984; KAISER; SACHSER, 2001).

1.4.2. Ação e consequências do LPS

A atuação de agentes patógenos também pode alterar e interferir no ambiente gestacional, como por exemplo, inflamações geradas por bactérias Gram-negativas (BRODGEN; ACKERMANN DEBEY, 1995; KABAROFF et al., 2006; WINTER, 2008). Parte da membrana celular externa dessas bactérias, conhecida como lipopolissacarídeos (LPS), possui regiões altamente tóxicas que são liberadas após a multiplicação da bactéria ou quando ela é fagocitada pelas células de defesa (TUIN et al., 2006). Evidenciado pela sigla LPS, essa molécula possui uma camada hidrofílica e outra hidrofóbica por ser constituída basicamente por uma fração lipídica – responsável pela maior ação antigênica - e outras frações formadas por um núcleo e uma cadeia lateral polissacarídica (açúcares) (RAETZ; WHITFIELD, 2002; SASSI et al., 2009). De maneira mais específica Aurell e Wistrom (1998) e Robert (2006) definem a molécula de LPS

por um particionamento composto por três frações com ações distintas, sendo a primeira denominada fração “O”, de polissacarídeo polar, muito variável, que possui afinidade com o ambiente aquoso extracelular, possuindo antígenos específicos para cada cepa bacteriana (BENTALA et al., 2002; ROBERT, 2006), a fração “A”, lipídica hidrofóbica que se encontra praticamente toda imersa na membrana bacteriana externa, responsável pelos efeitos fisiopatológicos do LPS (KOYAMA, 1999) e por fim a fração que liga as demais frações, sendo envolvida por ácido polissacarídeo e reguladora da maioria das toxinas chamada de fração central.

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

Algumas proteínas participam da ativação celular induzida por LPS, através de vias de sinalização intracelular, como é o caso do receptor TLR4 (do inglês, Toll-like receptor 4), a LBP (do inglês, lipopolysaccharide binding protein) e os co-receptores MD-2 e CD14 (do inglês, cluster differentiation 14) (CRUZ-MACHADO, 2010).

Estas ligações entre o LPS e os receptores mencionados levam a indução de respostas inflamatórias que são caracterizadas pela liberação de alguns mediadores pró-inflamatórios, também conhecidos como citocinas (TAKEDA; KAISHO; AKIRA, 2003; DONN; RAY, 2004), ativando assim o eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal havendo a liberação do cortisol pela glândula adrenal (glicocorticoide predominante em ovinos) (CHROUSOS, 1995), para atuar como inibidor parcial da inflamação, induzindo a transcrição de moléculas anti-inflamatórias (ADCOCK; CARAMORI, 2001; ELLIOTT; JOHNSTONE, 2004). A injeção experimental de LPS imita a infecção por *Escherichia coli*, mas sem provocar a infecção real. Ela induz o estresse e sintomas de doença imunitária através de uma cascata de síntese e liberação de citocinas (ELMQUIST et al., 1997) podendo interromper ou modificar a exibição de comportamentos normais.

As citocinas diferem dos hormônios convencionais em vários aspectos importantes. Por exemplo, possuem efeitos em uma grande variedade de células e tecidos ao contrário dos hormônios clássicos que tendem a afetar um órgão-alvo único. Em segundo lugar, as células raramente secretam somente uma citocina por vez. Por exemplo, a interação do LPS com as células do sistema imune resultam na liberação de: IL-1 (intraleucina-1), IL-6 (intraleucina-6), IL-12 (intraleucina-12) e TNF- α (Tumoral Necrose Factor- α). Em terceiro lugar, as citocinas parecem ser redundantes em suas atividades biológicas, uma vez que muitas citocinas diferentes podem ter efeitos semelhantes. Por exemplo, a IL-1, TNF- α , TNF- β , IL-6 provocam a febre (ALMAWI; MELEMEDJIAN, 2002; AMSTERDAN; SASSON, 2002; TIZARD, 2002; ESKANDARI WEBSTER; STERNBERG, 2003).

1.4.3. Comportamento materno filial e desarranjos cognitivos

Para os mamíferos os primeiros cuidados maternos momentos após o nascimento são essenciais para a sobrevivência da cria, possuindo fundamental importância para aprimorar a aptidão materna da mãe e a única forma de garantir alimento para o filhote nos primeiros dias de vida (LEVINE; ALPERT; LEWIS, 1958; NOWAK, 2000).

O papel desses cuidados também pode ser demonstrado, por sua influência na regulação e desenvolvimento do eixo hipotálamo-pituitário-adrenal, mediante a liberação de ACTH e conseqüentemente nos níveis de cortisol (LEVINE, 2001; LEVINE, 2002). Em espécies como os ovinos, o sucesso dessa relação é uma interação comportamental entre ovelha e cordeiro (DWYER, 2003).

No terço final da gestação, ocorrem algumas mudanças fisiológicas que facilitam o reconhecimento do cordeiro pela mãe após o parto (POINDRON et al., 1980; NOWAK; LINDSAY, 1990). O desempenho do cordeiro, propriamente dito, se faz como um elo entre todas as fases de sua criação, ou seja, para que este animal atinja o desenvolvimento necessário na etapa final da produção, é importante que ele chegue à idade de desmama tendo suas exigências supridas desde a gestação, passando pelo parto atingindo toda a lactação.

Evidenciando assim a essencial fundamentação de se concretizar uma parceria bem sucedida entre mãe filho (NOWAK, 1996).

O primeiro contato entre ovelha e cordeiro logo após o parto registra a identificação de mãe e filho. O estímulo comportamental materno tem como consequência a resposta imediata da prole à estas atividades onde estes comportamentos são orquestrados por um desencadeamento endócrino neste exato momento, sendo mantidos ao longo da vida através de expressões sensoriais de identificação (POIDRON et al, 1980; MARIZ et al., 2007).

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

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

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

Em alguns casos são relatados prejuízos para os cordeiros que passaram por situações desafiadoras quando fetos, não apenas em relação aos índices produtivos, mas também perdas cognitivas envolvendo alguns desarranjos e disfunções no sistema nervoso central destes animais (HUTTON et al., 2008; COULON et al., 2013; COULON et al., 2015). O terço final da gestação também é fase de maior vulnerabilidade considerando o desenvolvimento do sistema nervoso central dos ovinos, é neste período, dos 90 dias de gestação até o nascimento, que acontece a maior evolução neural (McINTOSH et al., 1979).

A restrição do desenvolvimento intrauterino está também associada com déficits no que diz respeito às dificuldades de aprendizagem e capacidade de memória de cordeiros em algumas fases específicas após o parto, havendo distinção quanto ao sexo destes animais em relação a estas habilidades (BRAUN et al., 2017; HUNTER et al., 2015).

1.4.4. Período de desmama: manejo específico e a interação social

A ação da desmama é um fator causador de estresse para o cordeiro. Segundo Orgeur et al. (1998) esta fase se faz crítica, devido à separação da mãe, em primeiro lugar, e em segundo pela mudança no hábito alimentar do filhote. A liberação do cortisol, resultante da ativação do sistema imunológico, causado pelo estresse da desmama, pode ter relação com a diminuição do hormônio do crescimento (GH) influenciando no crescimento do cordeiro (KUHN; PAUK; SCHANBERG, 1990; ORGEUR et al., 1998).

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

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

do determinado geneticamente, devido à inibição da divisão celular gerada pelos fatores citados.

O evento da desmama também proporciona novas experiências além da separação materna, como por exemplo, a mistura com animais desconhecidos, que podem resultar inclusive, em algumas mudanças comportamentais e fisiológicas dos cordeiros. Essa mudança social pode alterar a estrutura do grupo aumentando as interações agonísticas com o estabelecimento de nova hierarquia social (SEVI et al., 2001; MOUNIER et al., 2006).

1.4.5. Atributos do desenvolvimento sexual masculino

Tratando da exposição materna ao LPS durante a gestação sobre o sistema reprodutivo e a função endócrina em prole masculina, ainda pouco se sabe. Trabalhos realizados com camundongos apresentam alterações desenvolvimento testicular, esteroidogênese, espermatogênese e agregações anormais em algumas células testiculares (WANG, et al. 2014). Pollard e Dyer (1985), avaliando fatores estressantes durante a gestação de ratos, constataram que quando os filhotes estressados foram submetidos ao estresse de curto prazo, sua concentração de testosterona plasmática foi significativamente inferior ao dos filhotes controles. Sugere-se que suprimir a secreção de gonadotrofinas durante períodos críticos de desenvolvimento, altera a função testicular fetal, e que eleva os níveis circulantes de hormônios induzido pelo estresse, que podem ser responsáveis por mudanças na secreção de gonadotrofinas.

O hipotálamo secreta o fator liberador de gonadotrofina (GnRH), que atua na hipófise anterior promovendo a liberação do hormônio luteinizante (LH). Este, por sua vez, atua nas células de Leydig, presentes nos testículos, as quais são responsáveis pela produção de testosterona (CUNNINGHAM, 1999), hormônio sexual masculino responsável pela manifestação das características sexuais secundárias, pelo comportamento sexual (FOURIE et al., 2005) e pelas características de carcaça (WELLINGTON; HOGUE; FOOTE, 2003). Na seleção de reprodutores, a busca por indicadores da fertilidade tem sido alvo de estudos. Parâmetros corporais, testiculares, seminais, hormonais,

comportamentais e suas associações, têm sido avaliados quanto à capacidade reprodutiva (NOTTER et al., 1981).

São evidenciados também, em proles masculinas de porquinhos da Índia, em que mães foram submetidas a uma instabilidade social durante a gestação, alterações comportamentais que demonstravam ações infantilizadas considerando a idade dos machos, porém não sendo observadas mudanças nos níveis de testosterona comparando-os com os que não passaram por essa instabilidade (KAISER; SACHSER, 2001).

1.4.6. Comportamento sexual

Podem-se estudar as possíveis interferências do LPS durante o terço final da gestação em ovinos sobre o desempenho e comportamento sexual do macho, tomando por observação comportamental o que Hafez e Hafez (2004) classificam como expressões do comportamento reprodutivo, tendo como a primeira fase a procura e a identificação do parceiro sexual, seguidas pela verificação do estado fisiológico do parceiro que pode evoluir até a reação de monta e finalmente a cópula. Porém, da mesma forma, a fêmea tem também grande parte da responsabilidade no sucesso do ato reprodutivo, visto que elas exibem um comportamento sexual diferenciado quando estão em proestro ou estro. Durante estas fases, 75% das fêmeas exibem um comportamento peculiar de se manter próxima ao macho, cheirando e lambendo. Estas também costumam abanar e levantar a cauda (GILL, 2008) e urinam com maior frequência, principalmente se o macho a estiver cheirando. Segundo Simitzis, Deligeorgis e Bizelis (2006), esta fase de reconhecimento e cortejo é muito importante para o sucesso da cobertura, pois fêmeas cortejadas permanecem imóveis, enquanto as que não são cortejadas tendem a caminhar.

Desta forma, é importante se conhecer causas do LPS sobre o comportamento entre ovelha e cordeiro e a relação desse fator estressante durante o terço final da gestação no desenvolvimento e comportamento reprodutivos destes machos.

2. Mudanças fisiológicas durante o terço final da gestação das ovelhas dificultam a independência dos cordeiros do nascimento ao desmame

2.1. INTRODUÇÃO

Inflamações causadas por bactérias Gram negativas são extremamente comuns em rebanhos ovinos (BRODGEN; ACKERMANN DEBEY 1995; WINTER, 2008). Sua presença dentro do organismo de um animal faz com que o sistema imune do hospedeiro seja ativado, resultando na liberação da endotoxina, denominada de Lipopolissacarídeo (LPS), presente na membrana externa destas bactérias (RAETZ; WHITFIELD, 2002; TUIN et al., 2006; SASSI et al., 2009).

Desafios sistêmicos como estes podem ter sua gravidade potencializada, se tornando um grande fator estressante, quando relacionados à fase produtiva em que o animal se encontra. Henrique et al., 2017 afirmam que Ovelhas em fase final de gestação, por exemplo, têm consideravelmente alterados seu valor de temperatura retal e o nível de cortisol quando submetidas a uma situação como esta.

Além das alterações nas concentrações de glicocorticoides pela ativação do eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal, o desencadeamento de diversas citocinas pró-inflamatórias é também consequência deste cenário, podendo justificar não apenas o aumento da temperatura corporal dos animais afetados, como interferir em outras propriedades do sistema imune destes organismos (ALMAWI; MELEMEDJIAN, 2002; AMSTERDAN; SASSON, 2002; ESKANDARI WEBSTER; STERNBERG, 2003).

A diminuição do fluxo sanguíneo uterino durante o estresse na gestação de ovelhas, mediada pela catecolamina circulante, pode ser uma das causas da transferência do estresse para feto (RAKERS et al. 2015; DREILING et al., 2016). Assim também como a diminuição deste fluxo na placenta, ocasionando uma baixa referente ao transporte de nutrientes, gases respiratórios, podendo ocasionar um menor desenvolvimento fetal impedindo o ciclo de vida normal pós-parto (REYNOLDS et al., 2006; BAIRAGI et al., 2016).

Em alguns casos são relatados prejuízos para os cordeiros que passaram por situações desafiadoras quando fetos, não apenas em relação aos índices produtivos, mas também perdas cognitivas envolvendo alguns desarranjos e disfunções no sistema nervoso central destes animais (HUTTON et al., 2008; COULON et al., 2013; COULON et al., 2015). O terço final da gestação também é fase de maior vulnerabilidade considerando o desenvolvimento do sistema nervoso central dos ovinos, é neste período, dos 90 dias de gestação até o nascimento, que acontece a maior evolução neural (McINTOSH et al., 1979).

A restrição do desenvolvimento intrauterino está também associada com déficits no que diz respeito às dificuldades de aprendizagem e capacidade de memória de cordeiros em algumas fases específicas após o parto, havendo distinção quanto ao sexo destes animais em relação a estas habilidades (BRAUN et al., 2017; HUNTER et al., 2015).

A constatação destes prejuízos ou até mesmo o reparo deles, decorrentes de situações desafiadoras, pode ser mesurado através dos cuidados maternos tidos pela relação entre ovelha e cordeiro (HILD; ANDERSEN; ZANELLA, 2010; HILD et al., 2011, COULON et al., 2014), sendo o aleitamento a melhor maneira de se contabilizar este investimento como cuidado parenteral materno entre as comunicações e conflitos do par até a idade da desmama (MARTIN, 1984; ALLEY; FORDHAM; MINOT, 1995).

Tendo em vista a importância fisiológica e comportamental da relação entre ovelha e cordeiro, este trabalho tem por objetivo caracterizar as alterações provocadas pelo LPS nos perfis de temperatura retal e cortisol durante a gestação de ovelhas e se mães estressadas durante a gestação apresentam maior disponibilidade e estabilidade quanto aos cuidados maternos com seus filhos, intencionando minimizar prejuízos ao longo da vida como compensação das adversidades sofridas durante a gestação.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Local

O experimento foi realizado na Unidade Experimental de Comportamento de Ovinos do Laboratório de Biometeorologia e Etologia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo em Pirassununga-SP, em área sob as coordenadas 21° 59' de latitude sul e 47° 26' de longitude oeste (W.Gr) e altitude média de 635 metros. O clima da região é classificado, segundo Koppen, como Cwa, mesotérmico com chuvas predominantemente no verão, apresentando inverno seco e verões quentes, com temperatura média anual de 22°C e pluviosidade média anual próxima a 1363 mm. Seguindo o protocolo de ética sob o CEUA/FZEA nº 2296210915.

2.2.2. Animais

Foram utilizadas 39 ovelhas mestiças da raça Santa Inês, nulíparas, com idade média de 12 meses e 45 kg de peso vivo (PV), mantidas em pastagem de Coast-cross (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.) sobre a exploração de sistema rotacionado, com livre acesso a sombra, água e a suplementação mineral. Todas as fêmeas experimentais tiveram o cio sincronizado para a realização de inseminação artificial (IA) com sêmen fresco da raça White Dorper.

Para a realização do protocolo de sincronização do cio foram utilizadas esponjas intravaginais (Progespon®, Intervet/Schering Plough Animal Health, São Paulo-SP, Brasil) e azul de metileno, implantados na vagina das ovelhas durante 9 dias, seguindo pela aplicação via intramuscular de 1,5 mL (300 UI) de gonadotrofina coriônica equina (ECG/PMSG) (Novormon®, Intervet/Schering Plough Animal Health, São Paulo-SP, Brasil) no dia da retirada das esponjas intravaginais.

A inseminação artificial aconteceu 12 horas após a observação do cio, através do método de laparoscopia. A realização da ultrassonografia para o diagnóstico da gestação ocorreu 60 dias após as fêmeas terem sido inseminadas.

2.2.3. Tratamentos

Das 39 ovelhas diagnosticadas prenhes apenas 36 foram distribuídas de maneira aleatória entre os dois tratamentos, devido à perda dos fetos durante a gestação. A distribuição foi realizada de maneira aleatória entre os animais que passariam ou não pela submissão do estresse imunológico devido a aplicação intravenosa de $0,8 \mu\text{g.kg}^{-1}$ PV de LPS (*E. coli* 0127:B8, Sigma Aldrich, EUA), onde:

Tratamento final (TF – 18 ovelhas) - As fêmeas foram desafiadas através da inoculação de LPS (*E. coli*), durante a fase final da gestação, no 120º dia de gestação, considerando uma média de 148 a 150 dias para a gestação.

Tratamento controle (TC – 18 ovelhas) - Foram aplicadas doses de placebo (5 mL/animal) nas ovelhas deste grupo, para que houvesse igualdade nos processos de manejo entre os dois tratamentos.

Tendo em vista que as avaliações experimentais aconteceriam apenas nos cordeiros nascidos machos, que o conhecimento dos sexos destes animais ocorreu apenas após o parto, e que os animais que não sobreviveram durante todo o experimento (TF = 2 mortos, TC = 2 mortos) não obtiveram seus dados considerados, a distribuição das unidades experimentais dentro de cada tratamento, após os nascimentos ficaram distribuídas desta maneira de acordo com a figura 1.

Figura 1. Distribuição dos animais entre os dois tratamentos experimentais

Fonte: Autoria própria

2.2.4. Curvas de cortisol e temperatura retal

Aos 120 dias de gestação as ovelhas foram submetidas às colheitas de sangue pelo sistema a vácuo através da punção venosa intrajugular para posterior análise de cortisol sanguíneo. Momento antes da aplicação do LPS ou da dose de placebo foi colhido a primeira amostra de sangue classificada como basal. A partir daí, após a aplicação do LPS, as três primeiras colheitas seguiram com intervalos de 60 minutos cada (5h00min; 6h00min; 7h00min), passando esse intervalo para 120 minutos na quarta colheita (9h00min) sendo estabelecida a última colheita as 17h00min. Concomitantemente às colheitas de sangue aconteceram também as medições da temperatura retal (TR) (Figura 2).

Figura 2. Esquema de colheitas de sangue e temperatura retal durante o 120º dia de gestação no momento da indução do LPS (sem escala).

Fonte: Autoria própria

2.2.5. Comportamento materno filial durante o parto e peso ao nascer dos cordeiros (PN)

A averiguação do comportamento materno-filial foi realizada, por equipe previamente treinada, com o intuito de analisar a existência ou não da influência da exposição ao LPS no vínculo maternal entre a ovelha e o cordeiro recém-nascido. Após o parto o par foi observado até o cordeiro realizar a primeira mamada, de acordo com o etograma de trabalho (Tabela 2) pelo método focal individual com registro contínuo (HILD et al. 2011, COULON et al., 2012).

Seguindo a metodologia adaptadas de McGlone e Stobart (1986), Roda et al. (1989) e Toledo et al. (2007) para a observação ao parto, e para as

demaís observações foi utilizada a metodologia adaptada de Paranhos da Costa e Cromberg (1998). Os animais foram mantidos em piquete maternidade cercado por 8 câmeras, onde foi realizado o monitoramento por 24 horas com gravação do comportamento dos animais para eventual e posterior análise.

Após a realização da primeira mamada foi realizada a pesagem dos cordeiros em uma balança digital de até 150 kg com variação de 5 g para a obtenção dos valores de peso ao nascer (PN).

Tabela 2. Etograma de trabalho do parto até o início da primeira mamada.

	Comportamento	Descrição
<i>Postura</i>	01 Em pé	Com os 4 apoios no chão
	02 Deitado	Em decúbito ventral ou dorsal
<i>Atividade</i>	Ovelha	
	01 Limpeza do cordeiro	Ato de lambar e ingerir membranas aderidas no corpo do cordeiro
	02 Ingerindo membranas	Ingerindo membranas não aderidas no corpo do cordeiro
	03 Facilitando a mamada	Acesso aos tetos e ações como cheirar, lambar.
	04 Dificultando a mamada	Não permitindo acesso aos tetos
	05 Estimulando a cria	Contatos com a cabeça, membro dianteiros ou outra forma de aliciamento que estimule a cria
<i>Atividade</i>	06 Agredindo a cria	Ações como cabeçadas e empurrões
	Cordeiro	
	01 Tentando levantar	Ação para conseguir se manter em pé
	02 Procurando úbere	Tentativa de encontrar os tetos
	03 Tentando mamar	Tentativa de sugar o leite dos tetos
	04 Nenhuma atividade aparente	Momento em que apenas recebe a ação da ovelha
	05 Mamada	Ação de sucção do colostro

Adaptado de Raineri, 2008.

2.2.6. Teste cognitivo aos 30 dias de vida do cordeiro

Aos 30 dias de média de idade dos cordeiros, foi proposto um desafio para testar a capacidade cognitiva destes animais em relação ao reconhecimento e importância dos cuidados maternos naquele momento, sem que houvesse qualquer influência física materna. Um labirinto em formato de “T” foi adaptado para o teste (ABECIA et al., 2014), todo construído com armações de metal o labirinto foi revestido com lona plástica preta, para obstruir totalmente a visão do ambiente externo dos animais, tendo 7,5 m de comprimento x 1,0 m de largura x 1,20 m de altura, era ligado a dois braços (1,30 x 1,20 x 0,80 cada) que representavam a extremidade final da instalação, tendo no braço direito a presença dos estímulos sonoro e visual – com a gravação da vocalizando de cada mãe interagindo com seu respectivo filho e pela presença de um espelho com dimensões de 80 cm de comprimento e 50 de largura - e o braço esquerdo, por sua vez, permanecendo vazio durante todo o teste. Sendo as observações realizadas com a utilização de uma plataforma de 3,0 m de comprimento a 2,0 m do chão, para que não houvesse interferência do observador durante o teste (Figura 3).

Os animais foram testados individualmente por três sessões ao dia durante três dias (totalizando nove testes por animal) com tempo limite de 5 minutos por sessão. Optou-se pela utilização das gravações sonoras da vocalização de cada ovelha, capturadas por um estímulo de uma curta separação de seu filho, através de um gravador portátil e digital iOS iPhone Recorder (Apple Inc., Califórnia, Estados Unidos) a uma distância de 30 cm. As gravações foram transferidas para um notebook Sony Vaio (Sony Corporation, Tokyo, Japão) com taxa de amostragem de 44 kHz, salvos em formato mp4 transmitidas durante o teste através do software Windows Media Player (Microsoft, Washington, Estados Unidos), sendo replicado o som da própria mãe como estímulo sonoro para seu filho durante todo o tempo de permanência do cordeiro nas avaliações do teste.

As variáveis analisadas foram o tempo gasto dentro do labirinto, e a observação de atividades comportamentais através do etograma de trabalho que contava com as variáveis “Vocalização” (emissão de efeitos sonoros, por vibração das cordas vocais), “Andar para frente” (deslocamento frontal em sentido

positivo ao trajeto do teste), “Andar para trás” (deslocamento frontal em sentido negativo ao trajeto do teste), “Atividade de fuga” (ações como saltar, rastejar, esbarrar nas estruturas, buscando o escape da arena), “Dificuldade de sair da gaiola” (tentativas de saída acompanhadas de incapacidade, após a abertura da porta), “Nenhuma atividade aparente” (sem manifestação física ou intuitiva), “Acerto” (escolha do lado da gravação materna) “Erro” (escolha do lado vazio) e “Não encontrou o destino” (Indefinição quanto ao acerto ou erro ou escolha em não sair da gaiola).

Figura 3. Esquema da arena para o teste cognitivo aos 30 dias de vida dos cordeiros.

Fonte: Autoria própria

2.2.7. Relação materno filial durante a desmama controlada

O manejo da desmama controlada teve início quando os cordeiros completaram 53 ± 7 dias de vida, sendo finalizado aos 60 ± 7 dias de idade dos animais (HENRIQUE et al., 2017). As ovelhas e os cordeiros tiveram seu comportamento observado durante os sete dias durante a desmama controlada, onde permaneceram separados de suas mães nos períodos diurnos, sem contato visual e auditivo, entre às 7h00min e às 17h00min, sendo observado apenas os comportamentos dos cordeiros, e retornavam a encontrá-las ao entardecer permanecendo em contato durante toda a noite, entre às 17h00min e 7h00min, havendo a observação do comportamento tanto das ovelhas quanto de cordeiros. A observação comportamental dos cordeiros foi

realizada durante os sete dias consecutivos por três horas a partir da separação das mães (7h00min às 10h00min), com o intuito de averiguar as interações sociais entre os animais, através de ações negativas: “Cabeçada”, “Monta”, “Encarada”, “Empurrão” e ações positivas: “Lamber”, “Esfregar/Coçar”, “Mordiscar”, “Cheirar”, “Brincar”, sendo registrados os animais que faziam e os que sofriam cada ação, além das incidências de vocalização e ingestão de concentrado. Após o retorno das mães as observações foram realizadas por uma hora após (17h00min às 18h00min), para ser possível observar o efeito da desmama na interação ovelha–cordeiro através do comportamento da mamada. No sétimo dia houve a real separação, onde as ovelhas não retornaram para encontrar seus cordeiros ao final da tarde, no entanto o comportamento dos cordeiros foi observado isoladamente no mesmo período dos dias anteriores (17h00min às 18h00min), sendo a hora observada dividida em intervalos de 5 minutos. As observações foram realizadas de forma contínua e individual. Foram também avaliados os pesos tanto antes quanto depois dos dias de desmama controlada.

2.2.8. Análises dos resultados

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) com a distribuição dos animais em dois tratamentos (TF, TC).

Os dados de cortisol e reprodutivos foram analisados como medidas repetidas no tempo (CROWDER; HAND, 1990), utilizando animal como efeito aleatório. Foi realizada análise dos efeitos da aplicação do LPS, com teste de comparação de médias pelo Teste-t. Foram estimados coeficientes de correlação simples entre os parâmetros hormonais e de desempenho reprodutivo. Todos os testes foram realizados a 5 % de probabilidade (SAS, 2000).

Para a análise dos dados de comportamento materno-filial e hierarquia foram realizadas análises exploratórias com o propósito de caracterizar a forma de distribuição dos dados e as fontes de variação mais relevantes, sendo que a partir destes resultados serão definidos os modelos matemáticos a serem utilizados nas análises confirmatórias.

O modelo utilizado para a análise de comportamento, por se tratar de modelo não-linear, mas linearizável é foi ajustado utilizando-se a teoria de modelos lineares generalizados proposta por Nelder e Wenderburn (1972), utilizando-se o procedimento GLIMMIX do software SAS. Denotando-se a esperança matemática $E[Y_t]$ por μ_t , pode-se tornar a expressão linear aplicando a função de ligação logit, obtendo-se então um preditor linear, funcionalmente ligado à média μ_t . Desta maneira, o ajuste do modelo foi efetuado considerando que a distribuição dos resultados de cada variável de comportamento estudada é binomial, a função de ligação foi incorporada aos estimadores dos efeitos fixos, preditores dos efeitos aleatórios e estimadores dos componentes de variância. Para a análise das variáveis comportamentais foi considerado o efeito de animal em estrutura de medida repetida e o efeito do tempo (horas do dia).

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Dados de temperatura retal e cortisol durante a gestação

A interação entre tratamento e colheita resultou um efeito significativo para as médias da temperatura retal (TR °C) apresentadas na figura 4. Quando a comparação foi realizada entre os tratamentos, no mesmo horário de colheita, foi possível observar semelhança entre às primeiras medidas basais as 5h00min (TF: 38,86° C; TC: 38,97° C) - antecedendo as aplicações das injeções de LPS e placebo - ($P>0,05$), assim também sendo para as colheitas das 6h00min (TF: 38,03° C; TC: 39,05° C) e das 7h00min (TF: 38,97° C; TC: 38,98° C). Já no horário de colheita das 9h00min (TF: 39,8° C; TC: 39,1° C), as médias se tornam distintas ($P<0,05$), voltando à serem semelhantes na colheita seguinte às 13h00min (TF: 39,42° C; TC: 39,41° C) e permanecendo assim até a última mensuração vinte quatro horas após as injeções (17h00min - TF: 39,42° C; TC: 39,57° C e às 5h00min - TF: 38,45° C; TC: 38,78° C). Quando a avaliação foi realizada dentro de cada tratamento considerando apenas o TC, os únicos horários que diferem estatisticamente do valor basal são os horários das 13h00min e o das 17h00min ($P<0,05$), sendo as outras médias semelhantes ao primeiro valor medido as 5h00min horas ($P>0,05$). Para TF, quando analisado entre suas próprias médias, o valor de pico da temperatura

retal é observado as 9h00min horas sendo significativamente diferente, não apenas da colheita basal, como também de todos os demais valores ($P < 0,05$). Vale ressaltar que para TF a colheita que sucede o valor basal aos sessenta minutos após a aplicação do LPS (6h00min), foi a menor média de temperatura retal dentro do tratamento, não havendo diferença apenas para a última colheita realizada (17h00min $P > 0,05$).

Figura 4. Valores de temperatura retal durante o terço final de gestação de ovelhas submetidas ou não à indução de LPS. TF: Grupo LPS; TC: Grupo controle.

Para os níveis de cortisol ($\mu\text{g.dL}^{-1}$) durante a gestação a interação entre os tratamentos e os horários de colheita também foi responsável pelo efeito significativo ($P < 0,05$) entre as médias apresentadas na figura 5. Analisando a comparação dos valores de cortisol entre os dois tratamentos foi possível observar uma semelhança entre as colheitas basais (TF: $1,66 \mu\text{g.dL}^{-1}$; TC: $1,04 \mu\text{g.dL}^{-1}$) ($P > 0,05$), porém diferente do que aconteceu com a temperatura retal a apresentação de uma distinção significativa acontece logo a partir dos sessenta minutos, às 6h00min, após a aplicação das injeções (TF: $9,75 \mu\text{g.dL}^{-1}$; TC: $1,34 \mu\text{g.dL}^{-1}$), estendendo-se até a colheita realizada as 9h00min (7h00min - TF: $9,2 \mu\text{g.dL}^{-1}$; TC: $1,27 \mu\text{g.dL}^{-1}$ e 9h00min (TF: $7,4 \mu\text{g.dL}^{-1}$; TC: $1,33 \mu\text{g.dL}^{-1}$) ($P < 0,05$), retornando a igualdade as 13h00min (TF: $1,75 \mu\text{g.dL}^{-1}$; TC: $0,8 \mu\text{g.dL}^{-1}$) e permanecendo até a última

colheita realizada (17h00min - TF: $1,26 \mu\text{g.dL}^{-1}$; TC: $0,9 \mu\text{g.dL}^{-1}$ e 5h00min (TF: $1,8 \mu\text{g.dL}^{-1}$; TC: $1,75 \mu\text{g.dL}^{-1}$) ($P>0,05$). Não houveram diferenças estatísticas quando comparadas as médias dentro de TC. Já para TF a desigualdade significativa abrange os horários de colheitas das 6h00min, 7h00min e 9h00min, tidos como pico da média dos valores de cortisol por não serem distintos entre si ($P>0,05$) e maiores que todos os outros valores dentro de TF ($P<0,05$).

Figura 5. Valores de cortisol durante o terço final de gestação de ovelhas submetidas ou não à indução de LPS. TF - Grupo LPS; TC - Grupo controle.

2.3.2. Comportamento materno filial

2.3.2.1. *Postura e atividades de ovelhas*

Por se tratar da relação materno-filial entre ovelhas e cordeiros as avaliações realizadas pelas posições e atividades dos animais são apresentadas dentro de cada categoria. As ovelhas permaneceram em pé por mais tempo durante o período de avaliação em ambos os tratamentos (Tabela 3; $P<0,05$). Já em relação às atividades, assim como para as posturas, as diferenças estatísticas, foram observadas apenas dentro de cada tratamento ($P<0,05$), com maior tempo utilizado para a atividade de limpeza, tanto para TF quanto para TC ($P<0,05$). Porém é importante ressaltar que, mesmo não tendo havido diferença significativa, quando comparados os tratamentos entre si,

existe uma diferença numérica expressiva para as atividades de facilitar e estimular, como maiores números para TF e para a atividade de dificultar como maior número para TC.

Tabela 3. Posturas e atividades das ovelhas (%) observadas durante a avaliação do comportamento materno filial.

		Em pé	Deitada	Erro padrão	
	TF	82,24 a	17,86 b	10,9	
	TC	98,8 a	1,2 b	11,9	
	Limpeza	Facilitar	Dificultar	Estimular	Erro padrão
TF	72,45 a	18,83 b	2,4 b	5,6 b	6,9
TC	88,85 a	5,45 b	5,33 b	0,36 b	7,56

Letras minúsculas diferem as médias nas linhas ($P < 0,05$), TF: Grupo LPS; TC: Grupo controle.

A importância em ressaltar a diferença numérica destas atividades é devido à presença de algumas correlações significativas ($r=0,68$; $P < 0,05$), como foi o caso, da correlação negativa entre a atividade de limpeza e a de facilitar a mamada, mostrando que quanto maior a incidência de tempo gasto para a limpeza após o nascimento dos cordeiros menor tempo é disposto para facilitar a primeira mamada. Assim como foi observado também uma correlação positiva para os parâmetros colhidos durante a gestação, tanto para os valores de temperatura retal e a atividade de facilitar a mamada quanto para os valores de cortisol e a mesma atividade ($P < 0,05$), ou seja, estes resultados apontam para uma maior facilitação à mamada pela mãe, quando a temperatura retal e o cortisol circulante são crescentes em determinada situação.

2.3.2.2. *Postura e atividades dos cordeiros*

Diferente das ovelhas, na tabela 4 não foi observada diferenças significativas quando comparadas as médias das posturas dos cordeiros ($P > 0,05$). Em relação às atividades dos cordeiros a diferença significativa foi observada para ambos os tratamentos para a ação da tentativa de mamar como menor média ($P < 0,05$), que numericamente obteve maior tempo para TC ($P > 0,05$), sendo todas as outras atividades iguais estatisticamente comparando as médias tanto dentro quando entre os tratamentos ($P > 0,05$).

Tabela 4. Posturas e atividades dos cordeiros (%), observadas durante a avaliação do comportamento materno filial.

	Em pé	Deitado	Erro padrão
TF	49,92	50,09	10,7
TC	61,6	38,4	11,8

	Tenta levantar	Procurando	Tenta mamar	Nenhuma ativ aparente	Erro padrão
TF	24,62 a	42,6 a	2,94 b	29,8 a	6,54
TC	18,6 a	36,7 a	12,31 b	31,98 a	7,17

Letras minúsculas diferem as médias nas linhas ($P < 0,05$). TF: Grupo LPS; TC: Grupo controle.

O tempo para se alcançar a primeira mamada foi estatisticamente semelhante entre os tratamentos ($P > 0,05$). Apresentando uma diferença numérica de 12,6 minutos quando comparadas as médias de tempo de cada grupo, sendo gastos 44,17 minutos e 31,57 minutos para TC e TF respectivamente. Não foi possível também observar diferença significativa para as médias de peso ao nascer (PN) observando-se valores de 3,2 kg para TF e 3,6 kg para TC, porém na tabela 6 pode-se observar, sendo passivo de consideração, que a distinção numérica ultrapassou um valor de 10% do peso vivo dos cordeiros quando realizada a comparação entre os tratamentos ($P > 0,05$).

2.3.3. Teste cognitivo aos 30 dias de idade

Na figura 6 é possível observar que os tempos gastos dentro da arena de teste foram diferentes entre os três dias de aplicação do desafio de capacidade de aprendizagem e memória em que os cordeiros foram submetidos aos 30 dias de idade, sendo apresentada a maior média para o primeiro dia e a menor para o terceiro ($P < 0,05$). Os valores também são demonstrados com grande relevância quando as médias dos tempos entre os tratamentos são confrontadas, sendo possível observar que os animais de TF despenderam maior tempo para finalizarem, ou não, o trajeto proposto para a ocasião quando comparados com os animais de TC ($P < 0,05$).

Figura 6. Diferença entre as médias dos tempos de permanência na arena durante os dias os dias de teste aos 30 dias de vida dos cordeiros e entre tratamentos de cordeiros que passaram ou não pela submissão de LPS no final da gestação. TF – Grupo LPS; TC – Grupo controle.

e t de Student ao nível de 5% de significância.

Em relação às atividades durante o teste cognitivo pode-se observar de acordo com a tabela 5 que houve diferenças entre algumas atividades ($P < 0,05$), podendo ser destacadas as atividades de “Acerto” com maior média para TC e as de “Fuga”, “Não Sair” e “Não Concluiu” onde TF apresentou as maiores médias.

Tabela 5. Número de eventos das atividades durante o teste cognitivo com 30 dias de vida dos cordeiros.

	TF	TC	Erro padrão
Vocalização	3,78	3,37	0,15
Andar frente	1,34 B	1,87 A	0,13
Andar trás	0,52	0,89	0,13
Fuga	0,18 A	0,05 B	0,08
Não sair	0,91 A	0,32 B	0,13
Sem atividade	0,03	0,004	0,13
Acerto	0,77 B	0,95 A	0,04
Erro	0,05 A	0,03 A	0,04
Não Concluiu	0,19 A	0 B	0,03

Letras maiúsculas diferem entre os tratamentos. TF: Grupo LPS; TC: Grupo controle, pelos testes F e t de Student ao nível de 5% de significância.

2.3.4. Relação materno filial e determinação social durante a desmama controlada

Durante a desmama controlada foram avaliadas as relações entre ovelha e cordeiro pelas incidências da mamada durante os dias de manejo. É possível notar na figura 7 que há uma regularidade constante no que diz respeito à relação mãe e filho, em termos de não existir diferenças estatísticas para TF durante os dias da desmama, algo que não é observado em TC, havendo sim, uma flutuação nas médias que aponta uma distinção estatística ($P < 0,05$) entre os valores dos eventos de mamadas, com médias inferiores de mamadas para o primeiro e o último dia em relação aos demais.

Figura 7. Incidências de mamada no retorno das ovelhas durante a desmama controlada de ovelhas e cordeiros que passaram ou não pela submissão de LPS no final da gestação. TF – Grupo LPS; TC – Grupo Controle.

Em relação ao comportamento dos cordeiros quando permaneceram separados das mães durante as avaliações da desmama, as variáveis analisadas foram divididas entre as comparações das médias de incidências de vocalização, consumo de concentrado e comportamentos de relação social durante os dias de manejo. As médias das ações de vocalização e consumo de concentrado (Figura 8) possuem uma crescente inversamente proporcional durante os dias de desmama, sendo possível observar maiores valores das incidências de vocalização no início das avaliações com médias superiores para TF em comparação à TC nos dois primeiros dias ($P < 0,05$). Para as incidências de consumo de concentrado, apesar de não ter havido diferenças

estatísticas durante os dias entre os tratamentos ($P>0,05$) há uma crescente nos últimos dias de avaliação.

Avaliando as médias dentro de cada tratamento, em TF, os dois primeiros dias são estatisticamente maiores que os demais para a vocalização, para TC são os três primeiros ($P<0,05$). Considerando o consumo de concentrado, não foram apresentadas grandes variações nas médias, apenas o sexto dia foi o que diferiu dos demais com maiores médias tanto para TF quanto para TC ($P<0,05$). Na primeira hora em que houve a real separação é possível observar pelas curvas que representam as médias na figura 8 que há uma similaridade muito evidente entre a os tratamentos no que diz respeito aos comportamentos observados não havendo alguma significância entre os mesmo ao longo do tempo avaliado ($P<0,05$).

Figura 8. Incidências de vocalização e consumo de concentrado dos cordeiros quando separados das ovelhas durante os dias de desmama controlada e uma hora após a real separação de ovelhas e cordeiros que passaram ou não pela submissão de LPS no final da gestação. TF – Grupo LPS; TC – Grupo Controle.

Apesar de não ter havido diferenças significativas em relação aos pesos que antecederam e sucederam a desmama ($P>0,05$) entre os tratamentos, é possível constatar uma diferença numérica que se inicia desde o PN (Tabela

6), onde existe uma modesta alteração de valores, e importância biológica, que leva a crer ser devido à interação entre ovelha e cordeiro durante o período de aleitamento.

Tabela 6. Desempenho dos cordeiros pelos valores do peso vivo em diferentes idades entre o nascimento e após a desmama.

	PN	Erro Padrão	PPD	Erro Padrão	PD	Erro Padrão
TF	3,2	0,1	9,6	0,9	12,0	1,0
TC	3,6	0,2	9,6	1,0	12,5	1,2

TF: Grupo LPS; TC: Grupo controle; PN: Peso ao nascer; PPD: Peso pré desmama; PD: Peso a desmama.

Diante da realização de uma análise descritiva dos dados de interações sociais entre os cordeiros durante os sete dias de desmama, se tornou possível observar diferentes perfis entre as ações nos dois grupos de animais. Cordeiros de TF interagiram entre si na maioria do tempo durante os três primeiros dias, apresentando um número maior de atividades positivas nos dois primeiros. A interação com o grupo controle neste mesmo período de tempo foi praticamente na posição de receber as atividades tanto negativas quanto positivas.

Foi a partir do quarto dia de avaliação que as atividades negativas começaram a se destacar em comparação as positivas, havendo uma crescente interação entre os tratamentos durante os dias, sendo estabelecido o início das respostas de TF quando recebiam as atividades impostas por TC, alternando a interação entre os animais de TF, algo que aconteceu para TC durante os sete dias avaliados.

2.4. DISCUSSÃO

2.4.1. Alterações fisiologias causadas pelo LPS na gestação

Os dados de temperatura retal e cortisol que mostraram uma alteração consideravelmente significativa em determinados horários de colheita, apontaram a influência do LPS no organismo de ovelhas gestantes no final da gestação. Em um estudo semelhante Henrique et al. (2017), puderam determinar valores de temperatura retal e cortisol, estreitamente análogos aos observados neste estudo. No que diz respeito ao momento do alcance do pico destas variáveis e também ao retorno similar dos valores basais, considerando à presença e atuação do LPS em ovelhas em fase final de gestação, tanto para temperatura retal quanto para o cortisol, havendo grande similaridade inclusive, não apenas aos tempos de colheitas, mas também aos valores de alcance da temperatura retal e a dosagem de cortisol.

A importância de se identificar o perfil de atuação desta endotoxina possui relação direta com o potencial de resposta do sistema imunológico dos animais e com as consequências que a duração destas respostas pode causar, devido à ativação de algumas reações anti-inflamatórias que prezam pela segurança do organismo (ESKANDARI et al., 2003; RIVIER; GRIGORIADIS; RIVIER., 2003).

A liberação de alguns hormônios como os glicocorticoides, é uma das alternativas para situações como estas, sendo responsáveis inclusive por modularem a expressão de diversas citocinas em uma de suas funções (CHROUSOS, 1995; ALMAWI et al., 2002; AMSTERDAN; SASSON, 2002). Neste estudo, no entanto, foi possível relatar o processo da resposta inflamatória apenas pela variação da temperatura retal e do nível de cortisol, sem a constatação da presença de citocinas pró-inflamatórias devido aos métodos de análise ineficientes que foram utilizados, porém pode – se relacionar o aumento da temperatura interna do animal e a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal diretamente à presença de algumas destas citocinas (TIZARD, 2002; WERNER et al., 2003; TURNBULL; RIVER, 1999; CHESNOKOVA; MELMED, 2002).

2.4.2. Primeira interação entre ovelha e cordeiro e o peso ao nascer

As mudanças fisiológicas apresentadas no final da gestação tornaram-se situações desafiadoras e geraram respostas metabólicas e comportamentais distintas de quem as sofrem (LEVINE; LEWIS; ALPERT, 1958; KAISER; SACHSER, 2001; WEAVER et al., 2004;) podendo tonificar os cuidados maternos pós o nascimento do cordeiro, afim de reverter uma possível perda iniciada durante os percalços na gestação (HILD et al., 2011). Assim como foi demonstrado pela correlação positiva entre a atividade de facilitar a mamada e os valores de temperatura retal e de cortisol, durante as observações do comportamento materno filial no presente estudo.

Apesar de não ter havido diferenças significativas entre os tratamentos perante as atividades de ovelhas e cordeiros - algo também não observado por Coulon et al. (2014) trabalhando com comportamento aversivo com ovelhas em fase final de gestação – vale a ressalva que o tempo da primeira mamada para os cordeiros que foram estressados durante a gestação foi menor do que o controle e abaixo da média observada por Raineri (2008) (46,07 minutos), trabalhando também ovinos deslanados, provavelmente devido as maiores incidências da prática de facilitar e estimular a mamada sem apresentar dificuldades por parte de suas mães (mesmo com maiores deficiências em encontrar o teto por parte do cordeiro). Ainda que estas distinções apenas sejam numéricas, vale destacar a importância do aleitamento como prática de proteção para os cordeiros (McGLONE; STROBART, 1986; VAL-LAILLET; SIMON; NOWAK, 2004; NOWAK; POIDRON, 2006) e consolidação do vínculo entre mãe e filho (MARTIN, 1984; ALLEY et al., 1995).

As médias de peso ao nascer (PN) distinguiram dos resultados observados por outros autores que trabalharam também com estresse pré-natal em ovinos (COULON et al., 2013; HENRIQUE et al., 2017) por não apresentarem significância estatística. Entretanto é justo se fazer uma ressalva em relação à diferença numérica, entre TC e TF, que representa próximo de 14,4% do peso vivo destes animais avaliados, valor fisiologicamente representativo, visto que o peso ao nascer possui uma correlação direta com a

capacidade de sobrevivência e desenvolvimento dos cordeiros durante toda vida (HIGHT; JURY, 1970; NOWAK; POIDRON, 2006).

2.4.3. Avaliações cognitivas entre os cordeiros (teste de labirinto)

Os valores expressivos apresentados em relação à capacidade de memória e aprendizagem dos cordeiros aos 30 dias de vida em média, medidos pelo teste de labirinto, demonstram diferenças cognitivas entre os animais que foram submetidos ao estresse durante a gestação e os animais que não passaram pelo desafio. O estresse pré-natal alterar a expressão de alguns genes envolvidos na morfogênese da coluna vertebral e na transmissão sináptica na amígdala e no córtex pré-frontal resultando em alterações na coluna dendrítica (COULON et al. 2013; PETIT, et al., 2015).

A relação entre o estresse pré-natal e os impactos que esses desafios podem gerar na capacidade cognitiva e consequentemente no desenvolvimento comportamental na vida do indivíduo foi relatado por Braun et al. (2017) associando os prejuízos observados em animais e seres humanos.

Os dados apresentados com distinção na capacidade de movimentação dos cordeiros dentro do labirinto foram similares aos de Abecia et al. (2014) avaliando cordeiros com a mesma média de idade, sendo submetidos à deficiências nutricionais durante a gestação.

Ações que apresentam sentimentos como medo e a incapacidade de tomada de decisões sem a presença materna foram observadas nos cordeiros que durante a gestação passaram pelo estresse, observações também relatadas em cordeiros que passaram por estresse crônico na gestação e segundo grau de reatividade de suas mães (COULON et al., 2015). Hunter et al. (2015) associaram a restrição do crescimento placentário à baixa na capacidade cognitiva em cordeiros com idade entre 18 e 40 semanas. Havendo diferentes respostas entre machos e fêmeas, sendo observada uma correlação inversa entre o crescimento do neonato e o tempo para resolver tarefas de memórias às 40 semanas de vida para o sexo masculino.

2.4.4. Interação materna e entre cordeiros na desmama

Muito se discute, quando o assunto é o método de desmama para cordeiros, os resultados referentes ao desempenho do animal em relação ao início de ingestão de alimentos sólidos e o ganho de peso que este animal estará ao final deste manejo (NOROUZIAN, 2015; PULLIN et al., 2017; CAMPBELL et al., 2017). Porém nem sempre é abordada a relação entre os animais, considerando a transformação do convívio social dos cordeiros, que passa de uma convivência na grande maioria do tempo materna, para um novo engajamento de independência em uma também nova estrutura social.

Os comportamentos distintos das mães em relação ao aleitamento dos cordeiros no retorno após a separação diária durante os seis dias foi um fato interessante para se ressaltar quanto aos dados da desmama. A maior regularidade durante todo o período de manejo para fêmeas de TF mostra que a atenção quanto aos cuidados para seus cordeiros foi mais nítida neste momento quando comparado à TC, que apresentou uma variação distinta entre os dias (HILD et al., 2011; HILD; ANDERSEN; ZANELLA, 2010).

O tipo de manejo escolhido para a desmama provavelmente reduziu o impacto do estresse gerado na separação definitiva entre ovelha e cordeiro (ORGEUR, et al., 1998; NAPOLITANO et al., 1995; NAPOLITANO; DE ROSA; SERVI, 2008; HENRIQUE et al., 2017) podendo-se notar a formação social entre os cordeiros se tornando mais evidente à partir do quarto dia de separação, onde a interação entre os tratamentos foi observada mais precisamente através das atividades positivas e negativas designadas experimentalmente. Durante a primeira hora em que não há mais o retorno das ovelhas a identidade de integração do grupo de animais pela igualdade de comportamentos é referenciada pelas idênticas incidências de vocalização e consumo de concentrado (PULLIN et al., 2017).

O maior vínculo entre ovelhas e cordeiros de TF é evidenciado pelas maiores incidências de vocalização nos primeiros dias de separação, algo que se altera conforme há o aumento da interação com os cordeiros de TC. Pode-se justificar a diferenciação numérica de peso ao final do período de desmama,

entre TC e TF, pela associação do consumo de concentrado e o aleitamento materno durante o período (NOROUZIAN, 2015; CAMPBELL et al., 2017).

2.5. CONCLUSÃO

O LPS no terço final da gestação de ovelhas possui um padrão inflamatório de atuação de acordo com o perfil da temperatura retal e a concentração do cortisol circulante, provoca deficiências cognitivas em cordeiros e estimula maior estabilidade para os cuidados maternos do nascimento a desmama.

3. Desenvolvimento de atributos reprodutivos de carneiros jovens desafiados no final gestação

3.1. INTRODUÇÃO

O estresse pré-natal, especificamente, é uma adversidade experimentada pela mãe durante a gestação, que possivelmente poderá afetar o desenvolvimento do feto (BRAASTAD, 1998; KARROW, 2006; BRAUN, et al., 2017). Além das influências ambientais após o nascimento, cada vez mais estão sendo consideradas as influências ambientais uterinas sobre o feto, estando os indivíduos expostos a uma plasticidade de desenvolvimento (HORTON, 2005).

Desafios sistêmicos, como inflamações causadas por bactérias Gram negativas, podem ter sua gravidade potencializada em ovinos, se tornando um grande fator estressante quando relacionados à fase produtiva em que o animal se encontra (HENRIQUE et al., 2017). Sua presença dentro do organismo de um animal faz com que o sistema imune do hospedeiro seja ativado, resultando na liberação da endotoxina, denominada de Lipopolissacarídeo (LPS), presente na membrana externa destas bactérias (RAETZ; WHITFIELD, 2002; TUIN et al., 2006 SASSI et al., 2009), sendo extremamente comum sua ocorrência em rebanhos ovinos (BRODGEN; ACKERMANN DEBEY, 1995; WINTER, 2008).

A diferenciação do efeito do estresse pré-natal é questionada em relação ao sexo fetal. Em fases críticas da gestação, o estresse pré-natal pode inclusive influenciar negativamente, promovendo alterações devido a mudanças neuroendócrinas no desenvolvimento reprodutivo dos fetos, havendo, por exemplo, indícios de desmasculinização de machos e diminuição da incidência do comportamento copulatório (WARD, 1984; VILTART; VANBESIEN-MAILLIOT, 2007; DAMIÁN et al., 2015; SCULLY et al., 2018).

Em machos, além de evidências apontando alterações no desenvolvimento testicular, esteroidogênese, espermatogênese e agregações anormais em algumas células testiculares (JAFARIAHANGARI et al., 2012; WANG, et al. 2014; NAZARI-ZENOUZA et al., 2016), existem também

comprovações de alterações comportamentais que demonstram ações infantilizadas considerando a idade dos machos, mesmo não havendo mudanças nos níveis de testosterona comparando-os com os que não passaram por essa instabilidade na gestação (KAISER; SACHSER, 2001).

A partir da idade da puberdade à maturidade sexual, parâmetros corporais, testiculares, histológicos, seminais, hormonais, comportamentais e suas associações, têm sido avaliados para classificar capacidade e potencial reprodutivo destes animais (NOTTER et al., 1981; ORGEUR, 1995; ÜLKER et al., 2005; WANG, et al., 2014; BAI et al., 2017; GOULETSOU, 2017; PETRIDIS, et al., 2017; RECABARREN et al., 2017; SCULLY et al., 2018).

Considerando o exposto sobre todas as possíveis influências que o estresse pré-natal pode gerar, o objetivo deste estudo foi avaliar as consequências que a indução pela administração de LPS no terço final da gestação de ovinos, causa sobre os atributos reprodutivos de carneiros jovens entre os 5 e 12 meses de idade.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Local

O experimento foi realizado na Unidade Experimental de Comportamento de Ovinos do Laboratório de Biometeorologia e Etologia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo em Pirassununga-SP, em área sob as coordenadas 21° 59' de latitude sul e 47° 26' de longitude oeste (W.Gr) e altitude média de 635 metros. O clima da região é classificado, segundo Koppen, como Cwa, mesotérmico com chuvas predominantemente no verão, apresentando inverno seco e verões quentes, com temperatura média anual de 22°C e pluviosidade média anual próxima a 1363 mm. Seguindo o protocolo de ética no uso de animais sob o CEUA nº 2296210915.

3.2.2. Animais

Foram utilizadas 39 ovelhas mestiças da raça Santa Inês, nulíparas, com idade média de 12 meses e 45 kg de peso vivo (PV), mantidas em pastagem

de Coast-cross (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.) sobre a exploração de sistema rotacionado, com livre acesso a sombra, água e a suplementação mineral. Todas as fêmeas experimentais tiveram o estro sincronizado para a realização de inseminação artificial (IA) com sêmen fresco da raça White Dorper.

Para a realização do protocolo de sincronização do estro foram utilizadas esponjas intravaginais (Progespon®, Intervet/Schering Plough Animal Health, São Paulo-SP, Brasil) e azul de metileno, mantidas nas ovelhas durante 9 dias, seguindo pela aplicação via intramuscular de 300 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG) (Novormon®, Intervet/Schering Plough Animal Health, São Paulo-SP, Brasil) no dia da retirada das esponjas intravaginais.

A inseminação artificial aconteceu 12 horas após a observação do estro, através do método de laparoscopia. A realização da ultrassonografia para o diagnóstico da gestação ocorreu 60 dias após as fêmeas terem sido inseminadas.

3.2.3. Tratamentos

Das 39 ovelhas diagnosticadas prenhes apenas 36 foram distribuídas de maneira aleatória entre os dois tratamentos, devido à perda dos fetos durante a gestação. A distribuição foi realizada de maneira aleatória entre os animais que passariam ou não pela submissão do estresse imunológico devido a aplicação intravenosa de $0,8 \mu\text{g.kg}^{-1}$ PV de LPS (*E. coli* 0127:B8, Sigma Aldrich, EUA), onde:

Tratamento final (TF = 18 ovelhas) - As fêmeas foram desafiadas através da inoculação de LPS (*E. coli* 0127:B8, Sigma Aldrich, EUA), durante a fase final da gestação, no 120º dia de gestação, considerando uma média de 148 a 150 dias para a gestação.

Tratamento controle (TC = 18 ovelhas) - Foram aplicadas doses de placebo, de solução salina (5 mL/animal), nas ovelhas deste grupo, para que houvesse igualdade nos processos de manejo entre os dois tratamentos.

Tendo em vista que as avaliações experimentais aconteceriam apenas nos cordeiros nascidos machos, que o conhecimento dos sexos destes animais ocorreu apenas após o parto, e que os animais que não sobreviveram durante todo o experimento (TF = 2 mortos, TC = 2 mortos) não obtiveram seus dados

considerados, a distribuição das unidades experimentais dentro de cada tratamento, após os nascimentos ficaram distribuídas desta maneira:

TF – 11 cordeiros machos provenientes dos partos de 10 ovelhas;

TC – 8 cordeiros machos, provenientes dos partos de 7 ovelhas.

3.2.4. Avaliação clínica reprodutiva

A partir do 5º até a 12º meses de vida dos cordeiros foram realizadas avaliações dos testículos e das glândulas sexuais acessórias.

Os testículos foram avaliados quanto à consistência (escores de 1 a 5, sendo 1 o mais flácido, aumentando gradativamente até o escore 5, correspondendo ao mais firme), perímetro escrotal (cm) e características ultrassonográficas.

O exame ultrassonográfico foi feito a partir do ultrassom color doppler M5VET (Mindray, digital diagnostic imaging system). As análises foram feitas nos modos B, Color Doppler e Espectral, utilizando-se uma probe semi-convexa (Mindray, model 6LE5Vs Vet). Todas as análises foram feitas mantendo-se constantes os valores de ganho, filtro e velocidade. A frequência utilizada para o modo B foi de 7,5 Hz e para os modos Color e Espectral 10 Hz.

Primeiramente foi realizada a tricotomia do terço médio de ambos os testículos, assim como do plexo pampiniforme, regiões essas onde a probe foi inserida para o exame. Para as análises no modo B e Color Doppler do parênquima testicular a probe foi incidida no terço médio de cada testículo no sentido horizontal, a partir de tal foi feito o escaneamento angulando-se a probe no sentido vertical, sendo a análise feita da totalidade da área escaneada. A análise do plexo pampiniforme feita nos modos Color Doppler e Espectral também foi feita incidindo a probe no terço médio, porém do plexo pampiniforme, com escaneamento vertical.

No modo B (imagem preto e branco), foram analisadas 2 características de: homogeneidade do parênquima e presença de pontos hiperecóticos (indicativos de calcificação) (Tabela 7; Figuras 10 e 11). O parênquima testicular foi avaliado, por ultrassonografia modo-B, de acordo com Alves (2014), quanto à homogeneidade sendo esta classificação subjetiva feita por

três avaliadores em escores de 0 a 2, sendo 0 para parênquima homogêneo (sem presença de áreas anecoicas), 1 para pouco heterogêneo (com presença de poucas áreas anecoicas) e 2 para muito heterogêneo (com presença de muitas áreas anecoicas). Ainda foi realizada a avaliação quanto à presença de pontos hiperecóticos em escala de 0 a 3, sendo 0: ausência de pontos hiperecóticos no parênquima; 1: presença de até cinco pontos hiperecóticos; 2: presença de mais de cinco pontos hiperecóticos próximos ao mediastino e distanciados; e 3: presença de mais de cinco pontos hiperecóticos difusos no parênquima testicular.

Tabela 7. Escore, classificação e descrição das análises de ultrassonografia modo-B para homogeneidade e presença de pontos hiperecóticos no parênquima testicular.

Escore	Classificação	Descrição
Homogeneidade (baseada na presença de áreas anecóicas)	0	Homogêneo (sem presença de área anecóica)
	1	Pouco heterogêneo
	2	Muito heterogêneo
Pontos hiperecóticos	0	Ausência de pontos hiperecóticos
	1	Presença de até cinco pontos hiperecóticos
	2	Presença de mais de cinco pontos hiperecóticos próximos ao mediastino
	3	Presença de mais de cinco pontos hiperecóticos difusos no parênquima testicular

Figura 10. Imagem ultrassonográfica do parênquima testicular de ovinos quanto a homogeneidade do parênquima testicular, apresentando grau 0 (A) com distribuição homogênea dos túbulos seminíferos, sem presença de vacúolos, com mediastino íntegro; e grau 2 (B) com distribuição heterogênea dos túbulos seminíferos e mediastino desorganizado.

Fonte: Batissaco et al. 2013.

Figura 11. Imagem ultrassonográfica do parênquima testicular de ovinos quanto a presença de pontos hiperecóticos, apresentando grau 0 (A) com ausência total de pontos hiperecóticos; e grau 3 (B) com presença de vários pontos hiperecóticos tanto na porção central quanto na periferia.

Fonte: Batissaco et al. 2013.

Para as avaliações em modo color Doppler, foram realizadas gravações de vídeos durante o exame para posterior análise. As imagens coloridas em modo color-Doppler do fluxo sanguíneo do plexo pampiniforme e do parênquima testicular foram avaliadas em escores por três avaliadores. O plexo pampiniforme (PP) foi avaliado, de acordo com Batissaco et al. (2013), em escores de 1 a 5, sendo 1: 0 a 20% do plexo preenchido por vascularização; 2: 21 a 40% do plexo preenchido por vascularização; 3: 41 a 60% do plexo

preenchido por vascularização; 4: 61 a 80% do plexo preenchido por vascularização; e 5: 81 a 100% do plexo preenchido por vascularização e parênquima testicular (Tabela 8; Figura 12). Já a vascularização do parênquima testicular foi avaliada em escores de 0 a 4, sendo 0: ausência de vascularização; 1: presença de 1 a 2 pontos de vascularização de pequeno calibre; 2: presença de 2 a 4 pontos de vascularização de pequeno calibre; 3: mais de 2 pontos de vascularização de maior calibre que aparecem em pelo menos 1/3 do vídeo; 4: mais de 2 pontos de vascularização de maior calibre que aparecem em pelo menos 2/3 do vídeo (Tabela 8; Figura 13).

Além das análises no modo B e Color foi feito também a verificação do índice de resistência dos vasos do plexo pampiniforme, pelo modo perispectral, afim de observar possíveis alterações no fluxo de sangue que irriga os testículos. Para tal foi selecionado dentro do perfil de ondas cardíacas três ondas não consecutivas que apresentavam curvas sistólicas e diastólicas simétricas e distintas (Figura 14) e anotados os valores de RI, para utilização dos mesmos em uma média final de cada testículo.

Tabela 8. Escore, classificação e descrição das análises de ultrassom modo Color Doppler para realização das análises de vascularização do parênquima testicular e vascularização do plexo pampiniforme.

Escore	Classificação	Descrição
Vascularização testicular	0	Ausência de vascularização
	1	Presença de 1 ou 2 pontos de vascularização de pequeno calibre
	2	Presença de 2 a 4 pontos de vascularização de pequeno calibre
	3	Mais de 2 pontos de vascularização de maior calibre que aparecem em pelo menos em 1/3 do vídeo
	4	Mais de 2 pontos de vascularização de maior calibre que aparecem em pelo menos em 2/3 do vídeo
Vascularização do plexo pampiniforme	1	0 a 20% do plexo pampiniforme preenchido por vascularização
	2	21 a 40% do plexo pampiniforme preenchido por vascularização
	3	41 a 60% do plexo pampiniforme preenchido por vascularização
	4	61 a 80% do plexo pampiniforme preenchido por vascularização
	5	81 a 100% do plexo pampiniforme preenchido por vascularização

Figura 12. Exemplo de imagens do fluxo sanguíneo do parênquima testicular de cordeiros colhidas do 5º ao 12º mês de vida por ultrassonografia Doppler em cores (M5vet, Mindray). A: pontuação 1 (0 a 4), B: pontuação 4 (0 a 4).

Figura 13. Amostra de imagens do fluxo sanguíneo do plexo pampiniforme de cordeiros colhidas do 5º ao 12º mês de vida por ultrassonografia Doppler em cores (M5vet, Mindray). A: pontuação 1 (1 a 5), B: pontuação 5 (1 a 5).

Figura 14. Imagem de ultrassonografia de dados coletados de plexo pampiniforme de cordeiros do 5º ao 12º mês de vida para obter índice de resistência (RI) no modo espectral (M5Vet, Mindray).

Fonte: Figuras 12, 13 e 14 Batissaco et al. 2013.

3.2.5. Colheita e processamento de amostras de sangue para dosagem de testosterona

As colheitas de sangue foram realizadas pelo sistema a vácuo através da punção venosa intrajugular também entre o 5º e o 12º meses de vida dos cordeiros, sendo realizada uma colheita a cada quatro semanas de intervalo, para a determinação das dosagens de testosterona pelo método de Eletroquimioluminescência. As amostras de sangue foram colhidas sempre no mesmo horário em todos os dias de cada mês e eram retiradas às 13h00min, horário em que mediava o dia.

As amostras de sangue, 10 mL cada, foram coletadas pela punção da veia jugular (tubos de heparina para extração de plasma e agulha no tamanho de: 25 x 8 mm, BD Vacutainer) para avaliar os níveis de testosterona. Os tubos contendo soro foram armazenados em -20° C até a determinação de testosterona usando um Kit de imunoensaio de eletroquimioluminescência (Roche Cobas Testosterona ensaio, Roche Diagnostics, Suíça). Todas as amostras foram reensaiadas se as duplicatas apresentassem uma diferença de mais de 10%. Os kits foram validados através da demonstração de curvas paralelas entre padrões concentrações e amostras diluídas em série.

3.2.6. Características do sêmen

As análises de qualidade espermáticas foram realizadas através da colheita de sêmen pelo uso de eletroejaculador e foram realizadas nos mesmos dias, após as colheitas de sangue, entre o 7º e a 12º meses de vida dos cordeiros, sendo realizadas as colheitas uma vez a cada quatro semanas.

O sêmen foi avaliado quanto ao volume logo após a colheita (pela graduação no tubo de colheita), concentração espermática (por contagem em câmara de Neubauer), motilidade (%) e vigor (escores de 0 a 5) sob microscopia óptica de forma subjetiva e morfologia espermática.

As amostras espermáticas para morfologia espermática foram fixadas em formol salino com 4% de formol comercial previamente aquecido a 37° C. Foram avaliadas 200 células pela técnica da câmara úmida sob microscopia de

contraste de interferência diferencial (DIC, modelo 80i, Nikon, Tóquio, Japão) com aumento de 1000x e classificadas de acordo com Barth e Oko (1989) em defeitos maiores e menores.

3.2.7. Análises histopatológicas

Após o término do período experimental todos os animais foram abatidos, dentro das normas e legalização em abatedouro inspecionado e certificado para as práticas obrigatórias de abate, tornando-se possível a retirada de uma amostra do tecido testicular de todos os animais. As amostras foram processadas e analisadas no Laboratório de Patologia do Departamento de Medicina Veterinária da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo.

Fragmentos da porção média do testículo foram fixados em solução de formol tamponado a 10% por 48 horas e, em seguida, processados para histopatologia de acordo com as técnicas rotineiras de inclusão em parafina. Cortes de aproximadamente 4 μ m de espessura foram corados pela técnica de hematoxilina e eosina para avaliação histomorfométrica (PROPHET et al., 1992).

A partir de cada corte histológico foram registrados 5 campos, em aumento de 40x, em arquivos, o primeiro ao centro do corte histológico e os demais ao seu redor, a intervalos de 45°. Em seguida, as imagens foram transformadas para figuras binárias (branco e preto) para análise morfométrica da porcentagem de área ocupada por tecido (Figura 15). Os valores médios para cada animal foram considerados como o índice de tecido testicular. As análises foram realizadas com um microscópio Leica DM500 dotado de câmera digital de alta definição ICC50-HD (Leica) e software para análise de imagens *Image J* (versão 1.49, National Institute of Health, EUA).

Figura 15. Imagens de cortes histológicos de testículos de cordeiros, que passaram ou não pela indução de LPS no terço final da gestação avaliados ao 12º mês de vida, transformadas em binárias (branco e preto). A – corte histológico com maior porcentagem de área ocupada por tecido. B – corte histológico com menor área ocupada por tecido.

Fonte: Autoria própria

3.2.8. Análises estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) com a distribuição dos animais em dois tratamentos (TF, TC).

Os dados de testosterona e os reprodutivos foram analisados como medidas repetidas no tempo (CROWDER; HAND, 1990), utilizando animal como efeito aleatório. Foi realizada análise dos efeitos da aplicação do LPS, com teste de comparação de médias pelo Teste-t. Foram estimados coeficientes de correlação simples entre os parâmetros hormonais e de desempenho reprodutivo. Todos os testes foram realizados a 5 % de probabilidade.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Avaliações clínicas reprodutivas e de ultrassonografia

Houve diferença estatística para o perímetro escrotal em relação aos efeitos de tratamento e colheita ($P < 0,01$), com maior média para TF $26,6 \pm 0,33$ cm em relação ao valor de TC que foi de $24,1 \pm 0,38$ cm, tendo o valor do perímetro escrotal aumentado gradativamente ao passar dos meses (Figura 16) com menor valor para a primeira medida de avaliação, $20,4 \pm 0,72$ cm ao 5º mês de idade e o maior valor para a última $29,6 \pm 0,72$ cm ($P < 0,01$) ao 12º mês de idade.

Figura 16. Perímetro escrotal de cordeiros que passaram ou não pela indução de estresse pré-natal por administração de LPS no terço final da gestação avaliados entre o 5º e o 12º meses de vida.

Letras minúsculas diferem estatisticamente entre os meses de idade pelos testes F e t de Student ao nível de 5% de significância.

É possível observar as análises de ultrassonografia de modo-B e a consistência testicular na tabela 9 e consequentemente as médias de ultrassonografia Color Doppler na tabela 10. As tabelas em questão representam as médias da mensuração da medida dos dois testículos dos animais.

Para as análises clínicas reprodutivas foram observados efeitos de colheita para os parâmetros de consistência testicular (CT), homogeneidade testicular, vascularização do parênquima testicular (VPT) assim como para a vascularização e resistência vascular do plexo pampiniforme (RI)

($P < 0,01$), não sendo observadas diferenças estatísticas apenas para o escore de calcificação em nenhum dos dois testículos (EC) ($P > 0,05$).

Tabela 9. Média $\pm$ erro padrão das análises clínicas reprodutivas dos testículos de cordeiros que passaram (TF) ou não (TC) pela indução de LPS no terço final da gestação avaliados entre o 5^o e o 12^o meses de vida por ultrassonografia de modo-B. CT – Consistência testicular (1-5); PHi – Pontos hiperecóticos (0-3); HoP – Homogeneidade do parênquima testicular (0-2).

Idade (meses)	CT		Média	PHi		Média	HoP		Média
	TF	TC		TF	TC		TF	TC	
5	3,22	3,35	3,28 $\pm$0,14ab	0,08	0,14	0,11$\pm$0,08	0,94	1,03	0,99$\pm$0,12a
6	3,55	2,92	3,24 $\pm$0,14bc	0,14	0,07	0,10$\pm$0,08	0,86	0,92	0,89$\pm$0,12ab
7	2,77	2,64	2,71 $\pm$0,14d	0,05	0,07	0,06$\pm$0,08	0,72	0,71	0,71$\pm$0,12ab
8	2,5	2,85	2,67 $\pm$0,14d	0,05	0,07	0,06$\pm$0,08	0,44	0,85	0,65$\pm$0,12bc
9	2,72	3,07	2,89 $\pm$0,14cd	0,27	0,21	0,24$\pm$0,08	0,19	0,36	0,27$\pm$0,12d
10	3,27	3,35	3,31 $\pm$0,14ab	0,25	0,17	0,21$\pm$0,08	0,33	0,32	0,32$\pm$0,12cd
11	3,22	3,5	3,36 $\pm$0,14ab	0,33	0,21	0,27$\pm$0,08	0,19	0,35	0,27$\pm$0,12d
12	3,8	3,57	3,68 $\pm$0,16a	0,65	0,14	0,39$\pm$0,08	0,15	0,57	0,36$\pm$0,14cd
Média	3,13	3,16		0,21	0,13		0,48	0,65	

Letras minúsculas diferem estatisticamente nas colunas pelos testes F e t de Student a 5% de significância.

Tabela 10. Média $\pm$ erro padrão das análises clínicas reprodutivas dos testículos de cordeiros que passaram (TF) ou não (TC) pela indução de LPS no terço final da gestação avaliados entre o 5º e o 12º meses de vida avaliados por ultrassonografia color-Doppler. VPTD – Vascularização do parênquima testicular (0-4); VPPD – Vascularização do plexo pampiniforme direito (1-5); RID – Índice de resistência das artérias suprategesticulares direita.

Idade (meses)	VPT		Média	VPP		Média	RI		Média
	TF	TC		TF	TC		TF	TC	
5	1,41	1,42	1,41$\pm$0,11cd	3,56	2,96	3,26$\pm$0,14e	0,57	0,50	0,53$\pm$0,02ab
6	1,36	1,71	1,26$\pm$0,11d	3,63	3,07	3,35$\pm$0,14de	0,54	0,53	0,53$\pm$0,02ab
7	2,0	2,07	2,03$\pm$0,11bc	4,13	3,31	3,67$\pm$0,14cd	0,52	0,62	0,57$\pm$0,02a
8	2,22	1,71	1,96$\pm$0,11c	4,19	3,71	3,95$\pm$0,14c	0,47	0,57	0,52$\pm$0,02ab
9	2,97	2,85	2,9$\pm$0,11a	4,58	4,46	4,52$\pm$0,14ab	0,47	0,41	0,44$\pm$0,02c
10	2,77	2,75	2,76$\pm$0,11a	4,44	4,39	4,41$\pm$0,14ab	0,54	0,45	0,50$\pm$0,02b
11	2,77	2,35	2,56$\pm$0,11ab	4,41	4,1	4,26$\pm$0,14bc	0,49	0,42	0,45$\pm$0,02c
12	2,85	3,2	3,03$\pm$0,11a	4,70	4,67	4,68$\pm$0,14a	0,38	0,44	0,41$\pm$0,02c
Média	2,28	2,16		4,2	4,0		0,50	0,49	

Letras minúsculas diferem estatisticamente nas colunas pelos testes F e t de Student a 5% de significância.

3.3.2. Dosagem sanguínea de testosterona

Não foram encontradas diferenças significativas para as médias da testosterona entre os tratamentos ($P>0,05$), mas houve distinção entre os meses de colheita ($P<0,05$) podendo ser observadas na tabela 11.

Tabela 11. Valores de testosterona (ng.mL^{-1}) de cordeiros que passaram ou não pela indução de estresse pré-natal por LPS no terço final da gestação avaliados entre o 5º e o 12º meses de vida.

Idade (meses)	Testosterona		
	TF	TC	Média
5	1,99	2,30	2,14$\pm$0,61c
6	3,07	2,73	2,90$\pm$0,61bc
7	4,17	3,71	3,94$\pm$0,61ab
8	3,91	3,92	3,91$\pm$0,61ab
9	4,52	4,90	4,71$\pm$0,61ab
10	5,42	4,59	5,00$\pm$0,61a
11	4,85	4,84	4,84$\pm$0,61ab
12	4,18	3,94	4,06$\pm$0,61ab

Letras minúsculas diferem estatisticamente nas colunas pelos testes F e t de Student a 5% de significância.

A primeira medida se iguala apenas à segunda (5 e 6 meses) ($P < 0,05$), sendo ambas diferentes da maior média de testosterona que é referente à idade em que os cordeiros atingem os 10 meses de vida ($P < 0,05$).

3.3.3. Características do sêmen

Quanto à qualidade espermática, é possível observar pela tabela 12 diferenças estatísticas quanto o efeito das colheitas ($P < 0,01$) em relação aos aspectos e ao volume do sêmen, assim como na tabela 13 para motilidade e para vigor espermático, não havendo diferença entre os tratamentos e de interação ($P > 0,05$) em todas as características.

Tabela 12. Média $\pm$ erro padrão das características do sêmen de cordeiros que passaram (TF) ou não (TC) pela indução de LPS no terço final da gestação avaliados entre o 7º e o 12º meses de vida. Aspecto (1-3: 1 – aquoso; 2 – leitoso; 3 – cremoso); Volume (mL).

Meses de idade	Aspecto		Média	Volume		Média
	TF	TC		TF	TC	
7	1,57	1,66	1,61$\pm$0,19c	0,71	1,00	0,85$\pm$0,12c
8	2,22	2,16	2,19$\pm$0,18b	1,05	1,00	1,02$\pm$0,11bc
9	2,33	2,50	2,41$\pm$0,18ab	1,10	1,33	0,93$\pm$0,11bc
10	2,66	2,33	2,50$\pm$0,18ab	0,86	1,00	1,22$\pm$0,11ab
11	2,77	2,50	2,63$\pm$0,18ab	1,23	1,25	1,24$\pm$0,11ab
12	2,88	2,66	2,77$\pm$0,18a	1,50	1,25	1,37$\pm$0,11a
Média	2,41	2,30		1,08	1,14	

Letras minúsculas diferem estatisticamente nas colunas pelos testes F e t de Student a 5% de significância.

Tabela 13. Média $\pm$ erro padrão das características do sêmen de cordeiros que passaram (TF) ou não (TC) pela indução de LPS no terço final da gestação avaliados entre o 7º e o 12º meses de vida. Aspecto (1-3: 1 – aquoso; 2 – leitoso; 3 – cremoso); Volume (mL). Motilidade (%); Vigor (1-5).

Meses de idade	Motilidade		Média	Vigor		Média
	TF	TC		TF	TC	
7	55,00	44,16	49,58$\pm$4,38c	3,28	2,41	2,85$\pm$0,22c
8	71,11	70,00	70,55$\pm$4,38b	3,05	3,66	3,35$\pm$0,22bc
9	79,44	75,00	77,22$\pm$4,38a	3,94	3,68	3,81$\pm$0,22a
10	77,77	72,50	75,13$\pm$4,38a	3,66	3,75	3,70$\pm$0,22a
11	76,11	80,00	78,05$\pm$4,38a	3,88	4,25	4,06$\pm$0,22a
12	67,20	77,50	72,35$\pm$4,38ab	3,50	3,75	3,62$\pm$0,22ab
Média	71,10	75,00		3,55	3,58	

Letras minúsculas diferem estatisticamente nas colunas pelos testes F e t de Student a 5% de significância.

Em relação aos defeitos espermáticos (Tabela 14) foi possível observar diferenças significativas entre os tratamentos para os defeitos maiores ($P<0,05$) e menores, com maiores médias de defeitos para TF em relação à TC ($P<0,01$) havendo também efeito de colheita entre os meses de avaliação ($P<0,01$) tanto para os defeitos maiores quanto para os defeitos menores.

Tabela 14. Média $\pm$ erro padrão dos defeitos espermáticos maiores (%), menores (%) em relação à idade e ao tratamento de cordeiros que passaram (TF) ou não (TC) pela indução de LPS no terço final da gestação avaliados entre o 7º e o 12º meses de vida.

Meses de idade	Defeitos maiores		Média	Defeitos menores		Média
	TF	TC		TF	TC	
7	38,44	20,71	29,50 $\pm$8,9b	3,00	0,35	1,67$\pm$2,0b
8	72,66	46,71	59,60$\pm$8,9a	8,22	6,85	7,53$\pm$2,0a
9	87,11	47,00	67,00$\pm$8,9a	17,44	5,00	11,22$\pm$2,0a
10	19,55	11,57	15,50$\pm$8,9b	16,11	8,28	12,19$\pm$2,0a
11	13,05	9,28	11,17$\pm$8,9b	12,38	10,57	11,48$\pm$2,0a
12	14,11	15,71	14,91$\pm$8,9b	11,33	11,42	11,38$\pm$2,0a
Médias	40,80$\pm$4,8A	25,10$\pm$4,8B		11,40$\pm$1,1A	7,08$\pm$1,2B	

Letras minúsculas diferem as médias nas colunas e letras maiúsculas diferem as médias nas linhas, todas as médias foram comparadas pelos testes F e t de Student a 5% de significância.

Em relação aos defeitos totais (soma dos defeitos maiores e menores) foram observadas diferenças nas médias em relação aos efeitos fixos de tratamentos, assim como em relação aos defeitos maiores e de feitos menores avaliados separadamente, onde TF apresentou uma média

de 52,4% e TC 32,25% ($P < 0,05$) e de colheita entre o 7º e 12º mês de idade dos cordeiros, respectivamente com as médias 31,25% $\pm 9,6$, 67,23% $\pm 9,6$, 78,27% $\pm 9,6$, 27,76% $\pm 9,6$, 22,65% $\pm 9,6$, 26,69% $\pm 9,6$ com as maiores médias apresentadas no 8º e no 9º mês.

3.3.4. Comparação histopatológica do tecido testicular

Os dados referentes às análises histopatológicas não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos quando comparadas as médias de porcentagem com área ocupada por tecido ($P > 0,05$). Em comparação entre os dois tratamentos TF apresentou uma área média de 46,1% de área ocupada enquanto TC teve média de 47,1%, havendo, no entanto, uma maior variação de ocupação de área por tecido quando considerados os dados de TF. O preciso ressaltar que o peso corporal dos animais aos 12 meses de idade era de 43,6 kg para TF e 45,7 para TC, não havendo diferença estatística ($P > 0,05$).

3.4. DISCUSSÃO

3.4.1. Parâmetros clínicos reprodutivos e avaliações de ultrassonografia

Considerando os aspectos reprodutivos analisados neste estudo foi possível observar que a idade dos cordeiros apresentou-se como o efeito de maior significância quando se considerou a maioria dos parâmetros estudados relacionados às avaliações clínicas e por ultrassonografia. Estes resultados já eram esperados devido o crescimento dos cordeiros.

Em relação às medidas de perímetro escrotal, como forma de mensurar o desenvolvimento testicular, os resultados obtidos quando os tratamentos foram comparados são diferentes aos observados em ratos expostos ou não ao LPS durante a gestação (WANG et al., 2014). Já em relação aos meses de idade, a evolução do tamanho testicular também pôde ser apresentada de maneira gradativa de acordo com o crescimento corporal do animal, sendo apresentada uma correlação significativa com o peso corporal dos cordeiros em uma situação em que não houve qualquer desafio durante a gestação ($r = 0,98$, $P < 0,01$) (JAFARIAHANGARI et al., 2012; NAZARI-ZENOUZA et al., 2016).

As avaliações do escore da consistência testicular demonstram pouca variação em relação à flacidez ou rigidez dos testículos com o passar dos meses de idade dos animais, os dados apresentados, apesar de diferirem estatisticamente, estão bem próximo da média na escala proposta para classificar o escore de consistência (1 – 5), as médias são semelhantes às do grupo controle apresentas por Alves et al. (2016a) quando às comparou com animais que apresentavam degeneração testicular ou não.

As validações das técnicas e da utilização dos métodos de ultrassonografia auxiliam na demonstração da possível evolução ou retrocesso testicular quando imposto algum desafio aos cordeiros, através, por exemplo, de dados de homogeneidade ou vascularização de formadores testiculares (GOULESTOU, 2017; PETRIDIS, 2017).

A não diferença quanto às médias de calcificação e seus baixos valores de escore também apontam que não houve situação de degeneração testicular com o passar dos meses (ÜLKER et al., 2005; GOULESTOU, 2017).

De maneira crescente as médias de vascularizações dos parênquimas testiculares e dos plexos pampiniformes, aumentaram com o passar dos meses de idade demonstrando uma crescente irrigação testicular de acordo com o tamanho do testículo, independente do tratamento aplicado. Já as médias do índice de resistência das artérias suprategiculares apesar de apresentarem seus menores valores nos últimos meses de colheita, são observadas como uma variação mais homogênea. Batissaco et al. (2013) trabalhando com as mesmas avaliações de vascularização testicular, pela utilização da ultrassonografia Doppler colorida e espectral do Doppler, observaram correlação positiva entre a vascularização testicular e o aumento dos defeitos espermáticos.

3.4.2. Perfil da dosagem de testosterona dos cordeiros

A concentração de testosterona aumentou de acordo com a proximidade com a idade à puberdade, sendo possível observar uma crescente constante até o sétimo mês de vida dos cordeiros e depois uma estabilidade durante as outras colheitas com o pico de testosterona sendo atingida no décimo mês,

idade considerada a de alcance da maturidade sexual (CIEŚLAK et al., 2015; NAZARI-ZENOUEZ et al., 2016; RECABARREN et al., 2017). Neste caso o tratamento imposto durante a gestação não alterou a testosterona circulante no metabolismo dos animais.

Valores semelhantes aos níveis de testosterona deste presente estudo, foram observados por Rodrigues et al. (2010), que trabalhando com a oferta de diferentes dietas para cordeiros deslanados apresentaram um aumento do hormônio em relação às idades pré e pós púberes, constatando índices mais acentuados a partir do sexto mês de vida em relação aos meses anteriores em uma curva ascendente. Considerando as concentrações de testosterona a partir da maturidade sexual dos animais tanto TF quanto TC as médias estavam dentro do padrão da idade e teoricamente alcançaria ainda um aumento se alcançassem idade de maiores rendimentos reprodutivos (ALVES, et al., 2016b).

Em relação à sazonalidade é discutível que tenha havido interferência do fotoperíodo nas concentrações de testosterona ao longo tempo, principalmente por se tratarem de animais adaptados as regiões tropicais e por terem sido analisados ainda no início da fase púbere (EVANS; MAXWELL 1987; SCHANBACHER; FORD, 1979; DICKSON; SANFORD, 2005; GÜNDOĞAN, 2007; RODRÍGUES et al., 2010).

3.4.3. Características do sêmen e morfologia espermáticas dos cordeiros

Na variação das médias de caracterização do sêmen da puberdade à maturidade sexual dos cordeiros o esperado também ocorre, assim como os níveis de testosterona, havendo melhor padrão seminífero com a maturação sexual destes animais. Valores do aspecto, volume, motilidade e vigor se tornam superiores com o passar dos meses atingindo seus melhores valores nos últimos meses, algo que também não foi alterado pelo estresse sofrido pelos cordeiros quando feto durante a gestação. A indução de LPS e a presença de citocinas inflamatórias foram determinantes influentes pejorativos na qualidade do sêmen e no potencial de fertilidade de coelhos machos quanto receberam injeções já no período de potencial reprodutivo. Assim como a

presença de macrófagos no sêmen de animais da mesma espécie apresentou relação negativa com a qualidade do sêmen destes machos (BRECCHIA et al., 2014; COLLODEL et al., 2015; HE et al., 2017; KUŽELOVA, et al., 2017).

Já sobre a morfologia espermática de ovinos, é possível referir-se a ela como influenciável pelo LPS de acordo com o efeito observado dos tratamentos. Defeitos maiores, menores e totais são encontrados em espermatozoides dos cordeiros que passaram pelo desafio do estresse durante a gestação. Trabalhando com degeneração com carneiros em fase adulta Alves et al. (2015) apresentou valores em relação a qualidade de sêmen e defeitos maiores, menores e totais deste animais quando submetidos ou não à um estresse testicular por calor, apresentando diferença entre eles. Devido a estas notórias diferenças pode-se afirmar consequentemente que os defeitos totais também se fazem distintos.

3.4.4. Análise histopatológica testicular

Apesar de não ter havido uma significativa diferença entre os tratamentos, houve uma maior variação nos dados dos animais tratados em relação à média geral de área ocupada por tecido nos testículos destes animais. Mesmo não tendo sido realizada a contagem de células testiculares, pode-se supor ter havido algum prejuízo em relação à capacidade na produção espermática, no que diz respeito às funções das células de Sertoli, uma vez que existiu uma diferença considerável na morfologia espermática, em que foi possível notar um maior agravo quando considerados os defeitos constatados nos espermatozoides dos animais de TF.

3.5. CONCLUSÃO

A indução do LPS não traz prejuízos em longo prazo em relação ao desenvolvimento testicular, entre o início da puberdade até a maturidade sexual, mas afeta a morfologia espermática de cordeiros que passaram pelo estresse gestacional durante a gestação.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

4.1. Comportamentos reprodutivos em teste de labirinto

A suma importância de ter havido um teste de provação quanto a capacidade de relacionamento, em consideração a libido, comportamentos sexuais da espécie e a pro atividade de monta dos machos mantidos em experimento era essencial para completar o trabalho desenvolvido para a tese em questão. Abaixo segue a metodologia aplicada, de forma resumida, e a justificativa da não inclusão dos dados em questão no item de resultados da presente tese.

Os comportamentos reprodutivos foram analisados para comprovar a possível interferência do estresse gestacional causado pelo LPS na precocidade sexual e na libido dos machos. Esses comportamentos foram avaliados através do etograma de trabalho (Tabela 13) e do escore de monta (adaptado de Souza 2007; Tabela 14), desenvolvidos para classificar as atividades relacionadas ao desempenho reprodutivo dos cordeiros do durante a maturidade sexual inicial (12 meses).

Tabela 13. Etograma de atividades do comportamento reprodutivo.

<u>Atividades machos</u>	1. Cheirar genitália externa	<u>Atividades fêmeas</u>	1. Aceitando aproximação
	2. Reflexo de Flehmen		2. Inquietação
	3. Lambidas		3. Facilitando o cortejo
	4. Interação com fêmeas (membros anteriores)		4. Dificultando monta
	5. Apoio da cabeça na fêmea		5. Facilitando monta
	6. Emissão de sons		6. Aceitação da cópula
	7. Monta		
	8. Cópula e ejaculação		
	9. Comportamento agressivo		

Tabela 14. Escore de monta

Escore	1. Salto acima de 5 min
	2. Salto entre 4 e 5 min
	3. Salto entre 3 e 4 min
	4. Salto entre 2 e 3 min
	5. Salto entre 1 e 2 min
	6. Salto abaixo de 1 min

Adaptado de Souza, 2007.

A metodologia de aplicação do teste comportamental reprodutivo e de monta, resumiu-se em comparar 2 cordeiros em um labirinto, sendo 1 pertencente à TF e outro à TC, julgados nas mesmas condições e submetidos à escolha de uma fêmea com estro sincronizado para aplicação dos etogramas descritos acima. Porém não foi possível finalizar a colheita de dados devido ao não favorecimento do ambiente escolhido para a construção do labirinto e consequentemente a aplicação do teste. Interferências externas de outros animais (vocalizações) o aumento da temperatura no decorrer do dia, a contenção do grupo de animais no curral e o acesso à pastagem durante a aplicação do teste foram os principais empecilhos para a aquisição dos dados, não se tornando dados precisos e viáveis para serem apresentados na seção de resultados desta tese. Porém trata-se de uma metodologia bem definida, que futuramente será replicada, com os ajustes ambientais necessários, para ser possível colher e analisar os dados em questão.

Na seção dos anexos é possível observar figuras que mostram o local e o labirinto construído para aplicação do teste comportamental.

5. CONCLUSÃO GERAL

O LPS provoca alterações fisiológicas em ovelhas no final da gestação, influencia nos cuidados maternos e na capacidade cognitiva dos cordeiros, assim como altera a qualidade espermática de machos do durante a puberdade fisiológica até o início da maturidade sexual.

6. REFERÊNCIAS

ABECIA, J. A. et al. The effect of periconceptional undernutrition of sheep on the cognitive/emotional response and oocyte quality of offspring at 30 days of age. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**. v. 2, p. 79-87, 2014.

ADCOCK, I. M.; CARAMORI, G. Cross-talk between pro-inflammatory transcription factors and glucocorticoids. **Immunology and Cell Biology**, v. 79 p. 376–384, 2001.

ALEXANDER, G.; PETERSON, J. E. Neonatal mortality in lambs. **Australian Veterinary Journal**, v.37, p. 371-381, 1961.

ALEXANDER, G. Role of auditory cues in mutual recognition between ewes and lambs in Merino sheep. **Applied Animal Ethology**, v.3, p. 65–81, 1977.

ALLEY J. C.; FORDHAM R. A.; MINOT E. O. Mother-offspring interactions in feral goats—a behavioural perspective of maternal investment. **New Zealand Journal of Zoology**. v. 22, p. 17-23, 1995.

ALMAWI, W.Y.; MELEMEDJIAN, O.K. Molecular mechanisms of glucocorticoid antiproliferative effects: antagonism of transcription factor activity by glucocorticoid receptor. **Journal of Leukocyte Biology**. v. 71, p. 9–15, 2002.

ALVES, M.B.R. et al. An efficient technique to detect sperm reactive oxygen species: the cellroxx deep red® fluorescent probe. **Biochemistry & Physiology**, 4: 157. doi: 10.4172/2168-9652.1000157, 2015.

ALVES, M.B.R. et al. Low-level laser therapy to recovery testicular degeneration in rams: effects on seminal characteristics, scrotal temperature, plasma testosterone concentration, and testes histopathology. **Lasers in Medical Science**, v. 4, p.695-704, 2016a.

ALVES, M.B.R. et al. Recovery of normal testicular temperature after scrotal heat stress in rams assessed by infrared thermography and its effects on seminal characteristics and testosterone blood serum concentration. **Theriogenology**, v. 86, p. 795–805, 2016b.

AMSTERDAM, A., SASSON, R.,. The anti-inflammatory action of glucocorticoids is mediated by cell type specific regulation of apoptosis. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v. 189, p. 1–9, 2002.

AURELL, C. A; WISTROM, A. O. Critical Aggregation Concentrations of Gram-Negative Bacterial Lipopolysaccharides (LPS). **Biochemical and biophysical research communications**, v. 253, n. 1, p.119 – 123,1998.

BAIRAGI et al. Maternal environment and placental vascularization in small ruminants. **Theriogenology**. v. 86, p. 288–305, 2016.

BARTH, A.D. OKO, R.J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. 1. ed. Ames, Iowa, EUA: Iowa State University Press, p. 3-6, 1989.

BAI, M. et al. Histological analysis and identification of spermatogenesis-related genes in 2-, 6-, and 12-month-old sheep testes. **The Science of Nature**, v. 104 p. 84, 2017.

BATISSACO, L. Correlations between testicular hemodynamic and sperm characteristics in rams. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 50, n. 5, p. 384-395, 2013.

BENTALA, H. et al. Removal off phosphate from lipid A as a strategy to detoxify lipopolysaccharide. **Shock**, v.18, n. 6, p. 561-566, 2002.

BLASS E. M. et al. Mother as shield — differential-effects of contact and nursing on pain responsivity in infant rats —evidence for nonopioid mediation. **Behavior Neuroscience**, v.109 (2) p.342–53, 1995.

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

BRECCHIA, G. et al. Effects of a bacterial lipopolysaccharide on the reproductive functions of rabbit does. **Animal Reproduction Science**, v. 147, p. 128-134, 2014.

BRAUN, K. Experience-induced transgenerational (re-)programming of neuronal structure and functions: Impact of stress prior and during pregnancy. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.05.021>, 2017.

BROGDEN, K.A.; ACKERMANN M. R.; DEBEY B.M. *Pasteurella haemolytica* lipopolysaccharide-associated protein induces pulmonary inflammation after bronchoscope deposition in calves and sheep. **Infection Immunology Journal**, v. 63, p. 3595-3599, 1995.

BROOM, D. M. A usable definition of animal welfare. **Journal of Agriculture and Environmental Ethics**, v.6, p.15-25, 1993.

BROOM, D. M.; MOLENTO, C. F. M. Bem-estar animal: conceito e questões relacionadas – Revisão. **Archives of Veterinary Science**, v. 9, n. 2, p. 1-11, 2004.

CAMPBELL, B.J. et al. The effects of alternative weaning strategies on lamb health and performance. **Small Ruminant Research**. v. 156, p. 57–65, 2017.

CIEŚLAK et al. Sex-dependent differences in the effect of early weaning on the chosen hormones secretion in sheep during the postnatal transition to puberty--preliminary results. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v.18 p. 71-80, 2015.

CHESNOKOVA, V.; MELMED, S. Minireview: Neuro-immuno-endocrine modulation of the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis by gp130 signalling molecules. **Endocrinology** 143, 1571–1574, 2002.

CHROUSOS, G.P., The hypothalamic–pituitary–adrenal axis and immune-mediated inflammation. **The New England Journal of Medicine**. v. 332, p. 1351–1362, 1995.

COLLODEL et al. Cytokines release and oxidative status in semen samples from rabbits treated with bacterial lipopolysaccharide. **Theriogenology**, v. 83, p. 1233-1240, 2015.

COULON, M. et al. Early adverse experience alters dendritic spine density and gene expression in prefrontal cortex and hippocampus in lambs. **Psychoneuroendocrinology**, v. 38, p.1112-1121, 2013.

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

COULON, et al. Effects of prenatal stress and emotional reactivity of the mother on emotional and cognitive abilities in lambs. **Developmental Psychobiology**. v. 57, p. 626-636, 2015.

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

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

CUNNINGHAM JG. **Tratado de fisiologia veterinária**. 2.ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara, p. 528, 1999.

DAMIÁN, J.P. et al. Reproductive and sexual behaviour development of dam or artificially reared male lambs. **Physiology & Behavior**, v. 147, p. 47-53, 2015.

DICKSON, K.A.; SANFORD, L.M. Breed diversity in FSH, LH and testosterone regulation of testicular function and in libido of young adult rams on the southeastern Canadian prairies. **Small Ruminant Research**, v. 56, p. 189-203, 2005.

DREILING et al. Stress-induced decrease of uterine blood flow in sheep is mediated by alpha 1-adrenergic receptors. **Stress**. v. 19, n. 5, p. 547–551, 2016.

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

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

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

- ELMQUIST, J.K.; SCAMMELL, T.E.; SAPER, C.B. Mechanisms of CNS response to systemic immune challenge: the febrile response. **Trends Neuroscience**, v. 20, p. 565–570, 1997.
- ENCARNAÇÃO, E. O. **Estresse e produção animal**. 3.ed. Campo Grande: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – CNPGC, 1997, 32p.
- ESKANDARI, F.; WEBSTER, J.I.; STERNBERG, E.M.. Neural immune pathways and their connection to inflammatory diseases. **Arthritis Research & Therapy**. v. 5, p. 251–265, 2003.
- EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. **Salamon's artificial insemination of sheep and goats**. Sydney: Butterworths, 1987.
- FOURIE P.J. et al. Relationship between body measurements and serum testosterone levels of Dorper rams. **Small Ruminants Research**, v.56, p.75-80, 2005.
- GLUCKMAN, P.D. The regulation of fetal growth. In: P. J. Buttery, N. B. Haynes, and D. B. Lindsay (Ed.), **Control and Manipulation of Animal Growth**. Buttenvorths, London, p. 85-104, 1986.
- GILL, W. Applied sheep behavior. **Agricultural Extension Service**. Disponível em: <http://animalscience.ag.utk.edu/sheep/pdf/AppliedSheepBehavior-WWG-2-04.pdf>. Acessado em 18 out. 2014.
- GOULETSOU P.G. Ultrasonographic examination of the scrotal contents in rams. **Small Ruminant Research**, v.152 p.100-106, 2017.
- GÜNDOĞAN, M. Seasonal variation in serum testosterone, T3 and andrological parameters of two Turkish sheep breeds. **Small Ruminant Research**, v. 67, p. 312-316, 2007.
- HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. In: JAINUDEEN, M.R.; HAFEZ, E.S.E. Ovinos e caprinos. São Paulo: Manole, 2004 p. 173-182.
- HE, B. et al. Lipopolysaccharide-induced mitochondrial dysfunction in boar sperm is mediated by activation of oxidative phosphorylation. **Theriogenology**, v. 87, p. 1-8, 2017.
- HENRIQUE et al. Simulated disease process during late pregnancy compromises developmental outcomes of lambs independently of the weaning method applied. **Small Ruminants Research**, v. 155, p. 39–44, 2017.
- HIGHT, G. K.; Jury, K. E. Hill country sheep production. II. Lamb mortality and birth weights in Romney and Border Leicester x Romney flocks. **New Zealand Journal Agriculture Research**, v. 13, p. 735–752, 1970.
- HILD S., ANDERSEN I. L., ZANELLA A. J. The relationship between thermal nociceptive threshold in lambs and ewe–lamb interactions. **Small Ruminant Research**, v. 90 (1–3) p.142–5, 2010.

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

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

HORTON, T.H. Fetal origins of developmental plasticity: animal models of induced life history variation. **American Journal of Human Biology**, 17, 34–43, 2005.

HUNTER, D. S. Placental and fetal growth restriction, size at birth and neonatal growth alter cognitive function and behaviour in sheep in an age- and sex-specific manner. **Physiology & Behavior**. v. 152, p. 1–10, 2015.

HUTTON, L. C. et al. Microglial activation, macrophage infiltration, and evidence of cell death in the fetal brain after uteroplacental administration of lipopolysaccharide in sheep in late gestation. **American Journal Obstetrics & Gynecology**. v. 198, p.117.e1-117.e11, 2008.

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

JAFARIAHANGARI, Y. et al. The effect of pre-natal maternal environment on live weight, reproductive and semen characteristics in ram lambs. **Small Ruminant Research**, v. 103 p.200– 204, 2012.

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

KAISER, S.; SACHSER, N. Social stress during pregnancy and lactation affects in guinea pigs the male offspring's endocrine status and infantilizes their behaviour. **Psychoneuroendocrinology**, v. 26, p. 503-519, 2001.

KARROW, N.A. Activation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis and autonomic nervous system during inflammation and altered programming of the neuroendocrine–immune axis during fetal and neonatal development: Lessons learned from the model inflammagen, lipopolysaccharide. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 20, p. 144–158, 2006.

KOYAMA, S. et al., The potential of various lipopolysaccharides to release IL-8 and G-CSF. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 278, p.658–666, 2000.

KUŽELOVA, et al. Detection of macrophages in rabbit semen and their relationship with semen quality. **Theriogenology**, v. 97, p. 148-153, 2017.

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

LEVINE, S., ALPERT, M., LEWIS, G.W. Differential maturation of an adrenal response to cold stress in rats manipulated in infancy. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**. v.51, p. 774–777, 1958.

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

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

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

MARTIN, P. The meaning of weaning. **Animal Behaviour**. v. 32, p.1257–1259, 1984.

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

McINTOSH, G.H. Foetal brain development in the sheep. **Neuropathology and Applied Neurobiology**. v. 5, p.103–114, 1979.

MOUNIER, L. et al. Mixing at the beginning of fattening moderates social buffering in beef bulls. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 96, p. 185–200, 2006.

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

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

NAZARI-ZENOUZA, F. et al. Postnatal testicular development and testosterone changes in Ghezelram lambs. **Small Ruminant Research**, v. 141p. 70–76 2016.

NOROUZIAN, M. A. Effect of weaning method on lamb behaviour and weight gain. **Small Ruminant Research**. v. 133, p. 17–20, 2015.

NOTTER, D.R.; LUCAS, J.R.; McCLAUGHERTY, F. S. Accuracy or estimation of testis weight from in situ testis measures in ram lambs. **Theriogenology**, Stonehan, v.15, n.3, p.227-234, 1981.

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

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

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

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

ORGEUR, P. Sexual play behavior in lambs androgenized in utero. **Physiology & Behavior**, v. 57, no. 1, p. 185-187, 1995.

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

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

PARANHOS DA COSTA, M. J. R.; CROMBERG, V. U. Relações materno-filiais em bovinos de corte nas primeiras horas após o parto. In: PARANHOS DA COSTA, M. J. R., CROMBERG, V. U. **Comportamento materno em mamíferos**: bases teóricas e aplicações aos ruminantes domésticos. São Paulo: Sociedade Brasileira de Etologia, p. 215-235, 1998.

PETRIDIS, I. G. et al. Doppler ultrasonographic examination in sheep. **Small Ruminant Research**, v. 152, p.22–32, 2017.

PETIT, B., et al. Stress during pregnancy alters dendritic spine density and gene expression in the brain of new-born lambs. **Behavioural Brain Research**. v. 291, p. 155-163, 2015.

POIDRON, P. et al. Influence of the blood concentration of prolactin on the length of the sensitive period for establishing maternal behavior in sheep at parturition. **Hormonal Behavior**, v.14, n.3, p.173-177, 1980.

POLLARD, I.; DYER, S. L. Effect of stress administered during pregnancy on the development of fetal testes and their subsequent function in the adult rat. **Journal Endocrinology**, v. 107, p. 241-245, 1985.

PROPHET, E. B. et al. **Laboratory methods in histotechnology**. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, p. 279 1992.

PULLIN, A. N. et al. The effect of social dynamics and environment at time of early weaning on short- and long-term lamb behavior in a pasture and feedlot setting. **Applied Animal Behaviour Science**. v. 197, p. 32–39, 2017.

RAETZ, C. R.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins. **Annual Review Biochemistry**, v.71, p.635-700, 2002.

- RAINERI, C. **Perfil do comportamento materno-filial de ovinos da raça Santa Inês e sua influência no desempenho dos cordeiros ao desmame.** 2008. 72f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.
- RAKERS et al. Role of catecholamines in maternal-fetal stress transfer in sheep. **American Journal Obstetrics & Gynecology**. v. 213, p.1-9, 2015.
- RECABARREN, S.E. et al. Puberty arises with testicular alterations and defective AMH expression in rams prenatally exposed to testosterone. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 61 p.100–107, 2017.
- REYNOLDS, L. P. et al. Evidence for altered placental blood flow and vascularity in compromised pregnancies. **The Journal of Physiology**. v. 572, p. 51–58, 2006.
- RIVIER, C.L., GRIGORIADIS, D.E., RIVIER, J.E. Role of corticotropinreleasing factor receptors type 1 and 2 in modulating the rat adrenocorticotropin response to stressors. **Endocrinology**. v.144, p. 2396–2403, 2003.
- ROBERT, J. M. In: SMITH. **Enfermidades do Trato Alimentar.** Medicina Interna de Grandes Animais. 3 ed. São Paulo: Manole, 2006, cap.30, p.633-641.
- RODA, D.S.; SANTOS, L. e OLIVERIA, A.A.D. Performance of lambs with different periods of suckling and feed supplementation. **Boletim de Industria Animal**, v.41, p.85-101, 1984.
- RODRIGUES, M.R.C. et al. Utilização do bagaço de caju (anacardium occidentale) na alimentação de cordeiros do desmame à puberdade: respostas metabólicas, hormonais e sexuais. **Ciência Animal**, v. 20(1), p.17-26, 2010.
- SASSI, N. et al. Lipid A-induced responses in vivo. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 667, p.69-80, 2009.
- SCHANBACHER, B.D; FORD, F.F. Photoperiodic regulation of ovine spermatogenesis: relationship to serum hormones. **Biology of Reproduction**, v. 20, p. 719-726, 1979.
- SCULLY, C.M. et al. Early prenatal androgen exposure reduces testes size and sperm concentration in sheep without altering neuroendocrine differentiation and masculine sexual behavior. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 62, p. 1–9, 2018.
- SEVI, A., et al. Behavioral, adrenal, immune, and productive responses of lactating ewes to regrouping and relocation. **Journal of Animal Science**, v. 79, p. 1457–1465, 2001.
- SIMITZIS P. E.; DELIGEORGIS S. G.; BIZELIS J. A. Effect of breed and age on sexual behaviour of rams. **Theriogenology**, v.65, p.1480-1491, 2006.

TAKEDA K.; KAISHO T.; AKIRA S. Toll-like receptors. **Annual Review Immunology**, v. 21, p. 335–376, 2003.

TIZARD, I. R. *Imunologia veterinária: uma introdução*/Ian R. Tizard; tradução para o português Lúcia Jamli Abel. 6 ed. São Paulo:Roca, 2002.

TOLEDO, L. F. et al. A new species of *Sphaenorhynchus* (Anura; Hylidae) from Brazil. **Zootaxa**, v. 1658, p.57-68, 2007.

TORRES-HERNANDEZ, G. HOHENBOKEN, W. An attempt to assess traits of emotionality in crossbred ewes. **Applied Animal Ethology**, v. 5, 71–83, 1979.

TUIN, A. et al. On the role and fate of LPS-dephosphorylating activity in the rat liver. **American Journal Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 290, p.377-385, 2006.

TURNBULL, A.V., RIVIER, C.L. Regulation of the hypothalamicpituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. **Physiological Reviews**, v. 79, p. 1–71, 1999.

ÜLKER et al. Testicular development, ultrasonographic and histological appearance of the testis in RAM lambs immunized against recombinant LHRH fusion proteins. **Animal Reproduction Science**, v. 86, p. 205–219, 2005.

VAL-LAILLET, D.; SIOMN, M.; NOWAK, R. A full belly and colostrum: two major determinants of filial love. **Developmental Psychobiology**, v.45, p. 163-173, 2004.

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

von BORELL, E. Neuroendocrine integration of stress and significance of stress for the performance of farm animals. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 44, p. 219-227, 1995.

WALKER C. D. et al. Repeated neonatal pain influences maternal behavior, but not stress responsiveness in rat offspring. **Developmental Brain Research**, v.140 (2) p.253–61, 2003.

WARD, I. L. The prenatal stress syndrome: current status. **Psychoneuroendocrinology**, v.6, p. 3-11, 1984.

WANG, H. et al. Maternal LPS exposure during pregnancy impairs testicular development, steroidogenesis and spermatogenesis in male offspring. **Plos One**, v. 9, n.9, e.106786, 2014.

WEAVER, I. C. G. et al. Epigenetic programming by maternal behavior. **Nature Neuroscience**. v. 7, n. 8, p. 847-854, 2004.

WELLINGTON, G.H.; HOUGE, D.E.; FOOTE, R.H. Growth, carcass characteristics and androgen concentrations of gonad-altered ram lambs. **Small Ruminant Research**, v. 48, p. 51-59, 2003.

WERNER, M.F. et al. Importance of the vagus nerve for fever and neutrophil migration induced by intraperitoneal LPS injection. **Inflammation Research**. v. 52, p. 291–296, 2003.

WIDDOWSON, E. M. **Definitions of growth**. In: T.L.J. Lawrence (Ed.) *Growth in Animals*. Butterworths, London, p. 1-9, 1980.

WINTER, A. C. Lameness in sheep. **Small Ruminant Research**, v. 76, p. 149–153, 2008.

XIONG F.; ZHANG L. Role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in developmental programming of health and disease. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 34 p. 27-46, 2013.

ANEXO

Anexo A. Vista frontal da arena construída para o teste de comportamento sexual.

Anexo B. Vista lateral da arena construída para o teste de comportamento sexual.

Anexo C. Opção da fêmea para a escolha entre os dois machos.

Anexo D. Avaliação das atividades reprodutivas de fêmeas e machos e escore de monta (aplicação dos etogramas, tabelas 13 e 14).