



Ambiente inicial

Adroaldo J. Zanella
Dep. de Med. Vet. Prev. e Saúde Animal, FMVZ- USP



Abordagem do conteúdo



- 1) Definição de bem-estar animal
- 2) Desmame de suínos
- 3) Manejo de ovinos
- 4) Desmame de equinos
- 5) Discussão



Bem-estar animal



- Bem-estar animal é o estado de um indivíduo, com relação as suas tentativas de adaptação ao meio-ambiente e inclui saúde e emoções.

Zanella, 2011 – adaptado Broom, 1996; Duncan 1993; Fraser & Duncan, 1993



Bem-estar animal



- A organização do sistema nervoso central determina a habilidade do indivíduo em responder aos desafios do ambiente.



Trajétoria do cérebro e bem-estar animal



- A “arquitetura do cérebro”:
 - 1) Orquestrada por fatores genéticos
 - 2) Modulada nos estágios iniciais de desenvolvimento
 - 3) Alterada em períodos de “plasticidade”



Trajétoria do cérebro e bem-estar animal



- O ambiente social, dado a sua complexidade, é um dos mais importantes aspectos que facilita a organização do cérebro em desenvolvimento.



Trajetória do cérebro e bem-estar animal



- Interações mãe e filhos representam um dos primeiros recursos de informação social recebido pelo cérebro em desenvolvimento.



Medidas relevantes ao cérebro



- Eu vou utilizar o nosso trabalho sobre desmame de suínos e manejo de ovelhas durante a gestação para ilustrar a metodologia que utilizamos.



Medidas relevantes no cérebro



- Nós estudamos mudanças no desenvolvimento (agressão, comportamento anormal, medo), memória, alguns aspectos da organização do sistema nervoso central em leitões e cordeiros.



Michigan State University



Adriana Souza

Kirsty Laughlin

Heather Hodges



Oslo



Marjorie Coulon

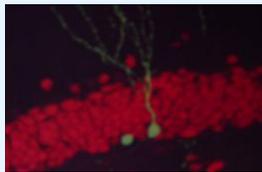
Sophie Hild



Expectativas

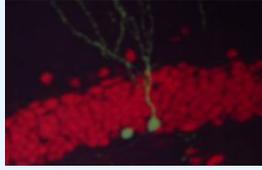


- Ambiente adverso
- **Estresse**
 - Perda de neurônios
 - Atrofia de dendritos
 - Comprometimento cognitivo
 - Problemas emocionais



Expectativas

- Ambiente positivo
- Ajustamento
 - “Proliferação de neurônios
 - Arborização dos dendritos
 - Melhoria na capacidade cognitiva
 - “Homeostase” emocional



Modulação de emoções= neuroesteróides

- Receptores para Glicocorticóides receptors (GR)
 - Glicocorticóides (GC)
 - Cortisol
 - Corticosterona



Modulação de emoções= neuroesteróides

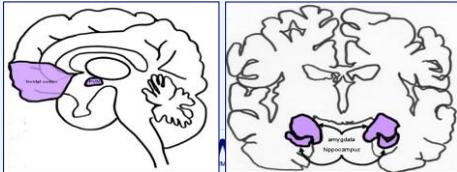
- Mineralocorticoides (MR)
 - Mineralocorticoides (MC)
 - Aldosterona
 - Glicocorticóides (GC)



Estresse e o cérebro



- Densidades elevadas de receptores **GR** e **MR** são encontradas no cortex frontal, amígdala, núcleo paraventricular e hipocampo.
- Distribuição das enzimas **11βHSD1** e **11βHSD2** é menos conhecida



A influência da idade do desmame na agressividade de leitões em crescimento



Yan Yuan, Jarno Jansen Debbie Charles and Adroaldo J. Zanella (AABS-2004)



Objetivo

- Determinar o impacto do desmame precoce (9-12 dias) na ocorrência de agressão às 9 semanas de idade



Hipótese

- Desmame prematuro aumenta os níveis de agressão em suínos



Métodos



Animais

- 48 animais de 6 leitegadas, 4 EW & 4 CW/leitegada
- EW desmamados entre 9-12 dias de idade
- CW desmamados entre 21-23 dias de idade
- 4 leitões de cada leitegada/baia (0.4 m²/animal, 100% piso ripado)



Metodos



Agrupamento

- Re-agrupados as 9 semanas de idade (pêso)
- Transportados por 10 minutos

- 6 EW e 6 CW p/ baia (0.8 m²/animal, 100% piso ripado)



Métodos



Medidas de agressão

- 3 dias após o reagrupamento
- Duração, iniciador e resultado

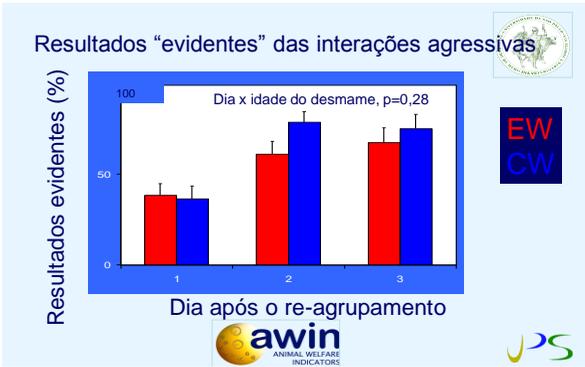
Análise

- General linear mixed model (SAS 8.2)
- Somente pares EW-EW e pares CW-CW











Discussão

No primeiro dia após o reagrupamento leitões desmamados de forma prematura:

- Mostraram tendência de demonstrar agressividade “mais” frequentemente
- Mostraram períodos mais prolongados durante as interações agressivas
- Mostraram tendência de vencer um número mais reduzidos das “brigas” que iniciaram

awin ANIMAL WELFARE INDICATORS UFS

Discussão

Efeitos somente foram encontrados no dia 1 após o re-agrupamento

- Aprendizado social? (Van Putten and Buré 1997)
- Deficiências no processamento de informação durante períodos de estresse ? (Laughlin and Zanella, 2003; Souza & Zanella, 2004)

awin ANIMAL WELFARE INDICATORS UFS



Desmame precoce e agressão: investigando possíveis mecanismos

(Laughlin e Zanella, 2003)

Desmame precoce e algumas medidas cognitivas



- Leitões desmamados precocemente (<12 dias de idade) demonstraram níveis mais elevados de agressão do que animais desmamados de forma convencional (21-23 dias de idade) (Yuan et al., 2004).



Hipótese



Leitões com bom desempenho no labirinto "Morris" utilizarão "informações" sobre encontros prévios para minimizarem agressão quando agrupados com animais familiares.

(Siegford et al., 2004; Souza & Zanella, 2004)



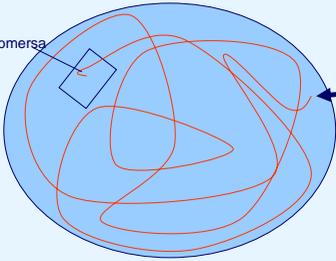
Métodos = labirinto de água



- Os leitões são liberados de pontos diferentes
- O teste encerra quando a plataforma é localizada
- Tempo máximo de 120 segundos
- Os leitões são guiados até a plataforma, caso não tenham sucesso

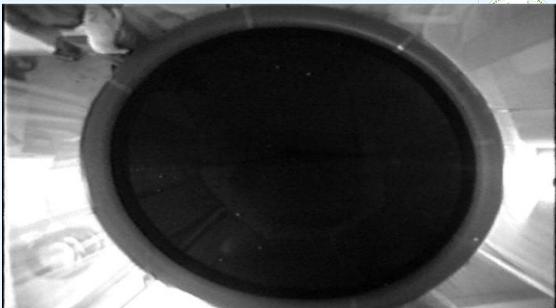


Plataforma submersa



Largada







- Um teste consiste de 7 exposições ao “labirinto”
- 10 minutos de intervalo entre as exposições
- Plataforma e ponto de partida são mantidos

- **Tempo necessário para encontrar a plataforma é anotado e comparado**



Grupos experimentais



- Desmamados precocemente (EW)
 - 12 dias de idade
- Desmamados de forma convencional (CW)
 - 21 dias de idade
- Controle de leitegada e seleção genética
- Leitões foram testados no dia 14 e dia 23 de idade (2 dias após o desmame)



Estresse



- Leitões foram expostos a 15 minutos de isolamento social

- Cortisol na saliva aumenta de forma significativa (estresse)











Análise da expressão de genes em cérebro de suínos desmamados precocemente e submetidos a stress por isolamento social

- 1) Poletto, R.; Steibel, J.P.; Siegford, J. & Zanella, A.J. (Brain Research, 2004)
- 2) Poletto, R.; Steibel, J.P.; Siegford, J. ; Coussens, P. & Zanella, A.J. (Brain Research, 2004)

Genes relacionados com stress



Receptor para glicocorticoide (**GR**) Receptor para mineralocorticoide receptor (**MR**)

Modula a resposta ao estresse



Genes relacionados com stress



11 β hydroxysteroid dehydrogenase-1 (**11 β -HSD1**)

11 β hydroxysteroid dehydrogenase-2 (**11 β -HSD2**)

Regula a ação dos glicocorticóides
Metabolismo: cortisona=inativo
11 β -HSD1 pode transformar cortisona em glicocorticoide ativo



Metodos: RT-PCR



• Real-Time RT-PCR

- Examinar expressão dos genes relacionados ao estresse:

- "genes relacionado ao estresse"

- 11 β -HSD 1 - 11 β -HSD 2

- MR -GR

- Quantificação relativa (Livak, 1997)

- T-test



Resultados: hipocampo



❖ Genes x idade ($p = 0.006$)

- Leitões de 12-dias \downarrow 11 β HSD2[†], \downarrow GR^{***},
 \downarrow MR[†] comparado com leitões de 23-dias

$p < 0.1 = \dagger$, $p < 0.05 = *$, $p < 0.001 = ***$



Resultados: hipocampo



❖ Desmame precoce diminuiu a expressão dos 4 genes testados ($p=0.004$)

❖ - Desmame convencional não alterou a expressão dos genes testados ($p = 0.17$)

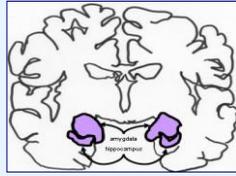
$p < 0.1 = \dagger$, $p < 0.05 = *$, $p < 0.001 = ***$



Discussão



- Nossos dados sobre expressão de genes indicam que os genes associados com a resposta ao estresse são alterados em suínos desmamados precocemente.



Scotland on Sunday, 09/06/2013



Reportagem sobre o trabalho de pesquisa que desenvolvemos (Coulon, et al, 2012)



Relação homem-animal



- A) Resposta dos cordeiro ao tratamento positivo e negativo nas últimas dez semanas de gestação
 - Consequências de desafios no período pré-natal e neonatal no bem-estar e saúde animal



Medidas relevantes ao cérebro



Nós estudamos comportamento, cognição e alguns aspectos da organização do sistema nervoso central em cordeiros, filhos de ovelhas que receberam: interações positivas (POS) ou negativas (NEG) no final da gestação.

Coulon M., Wellman C.L., Marjara I.S., Janczak A.M., A.J. Zanella. (2013);
Hild S, Coulon M, Schroeer A, Andersen IL and Zanella AJ (2011).
Hild S*, Coulon M*, Schroeer A, Janczak AM and Zanella AJ (2011).



Interação homem e animais



❖ Manejo negativo

Bem estar comprometido
(Hemsworth & Coleman, 1998)



❖ Manejo positivo

Melhoria no bem-estar
(Waiblinger et al., 2006)



- Ovelhas durante o período do parto são mantidas, muitas vezes em proximidade com humanos



Nosso estudo



- Estresse durante a gestação:
 - Pode afetar o feto com consequências para aspectos comportamentais e de desenvolvimento (Weinstock, 2008)
 - O cérebro do feto é vulnerável ao excesso de hormônios glicocorticóides, que pode passar pelas barreiras da placenta.



Objetivos do estudo



- Testar o efeito de 5 semanas de manejo positivo ou negativo no período pré-natal
 - Comportamento maternal
 - Comportamento dos cordeiros as 4 semanas
 - Expressão de genes e morfologia do cérebro às 4 semanas



Expectativas



- Tratamento positivo
 - melhor comportamento maternal
 - cordeiros menos estressados
 - cordeiros mais ajustados
- Cordeiros estressados no período pre-natal
 - expostos a hormônios glicocorticóides
 - consequências para a expressão de genes no cérebro, morfologia e comportamento



Tratamento prenatal



- Ovelhas (*Norwegian-dala*), gestação gemelar, foram manejadas por **10 minutos 2 X ao dia** nas últimas 5 semanas de gestação (*McIntosh et al., 1979*)

• Tratamentos:

- **POS:** Ovelhas manejadas positivamente
 - Comportamento calmo, sentado, voz baixa e sem contato direto (olhar)
- **NEG:** Ovelhas manejadas negativamente
 - gritos, pulos, correndo, movimentos bruscos



Resultados



- Tendência para níveis mais elevados de cortisol em ovelhas manejadas negativamente do que as fêmeas manejadas de forma positiva
- Concentração mais elevada de cortisona na placenta de ovelhas tratadas positivamente

➡ – Atividade enzimática (HSD) reduzida em ovelhas tratadas negativamente ?



Resposta ao experimentador



- Cordeiros **NEG** mostraram-se menos ativos, exploraram o ambiente menos e vocalizaram com menor intensidade na presença de humanos.
- Cordeiros **NEG** demoraram mais para aproximar-se da área onde estava o experimentador



Medo e labirinto



- Os cordeiros **NEG** permaneceram mais tempo longe da área onde o guarda-chuva abriu do que os cordeiros **POS**

M Coulon, S Hild, A Schroeder, A Janczak, AJ Zanella, *Physio & Behav.* 2011



Memória de espaço



➤ Uma redução numérica no tempo para a conclusão do labirinto entre o primeiro e o segundo teste para os cordeiros no tratamento POS (11.43 segundos mais rápidos) comparados com os cordeiros NEG (3.12 segundos)

M Coulon, S Hild, A Schroeder, A Janczak, AJ Zanella, *Physio & Behav.* 2011

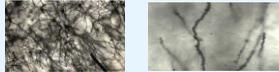


Coulon et al.(2013)

Amostras de 5 cordeiros por tratamento foram coletadas



- Golgi-Cox
- 200 μm do cortex frontal e hipocampo
- Slides montados e revelados
- Morfologia, arborização, estudada

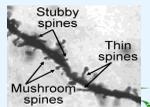
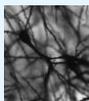


Number of spines in dendrite of apical neurone



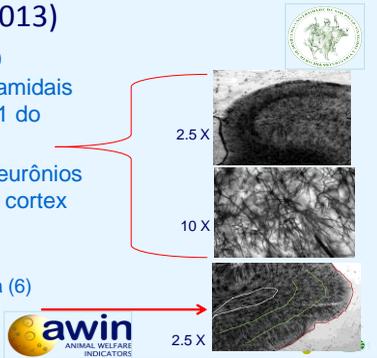
Coulon et al.(2013)

- Nos ramos terminais dos dendritos (min 30μm) em cada neurônio piramidal, os processos de arborização foram:
 - Contados e expressados como número/μm
 - Classificados como mushroom, thin, or stubby (detectar dinâmica das sinapses)

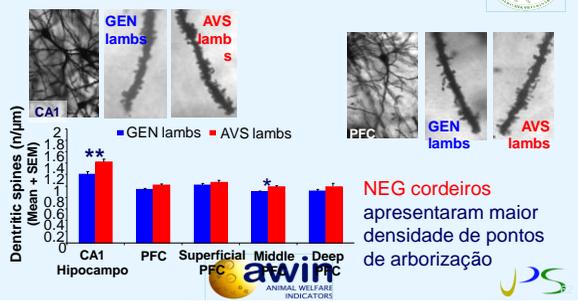


Coulon et al.(2013)

- Seleção de 10 neurônios piramidais na região CA1 do hipocampo
- Seleção de neurônios piramidais no cortex frontal
 - Superior (6)
 - Intermediária (6)
 - Profunda (6)



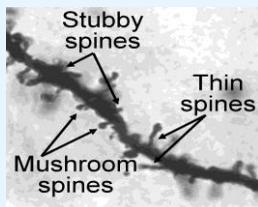
Coulon et al.(2013)



NEG cordeiros apresentaram maior densidade de pontos de arborização

Coulon et al.(2013)

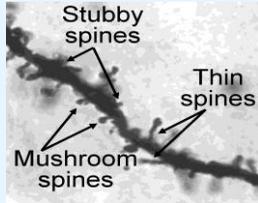
No hipocampo, NEG cordeiros apresentaram uma relação menor de processos de arborização tipo cogumelo (mushroom) do que os POS cordeiros (19% versus 25%, $p=0.047$).



Coulon et al.(2013)



Processos de arborização tipo são consideradas as que formam sinapses mais estáveis e "fortes" do que os outros tipos de processos de arborização.



Resumo dos resultados



- **NEG** cordeiros foram expostos a níveis mais elevados de glicocorticóides durante a gestação.
- **NEG** cordeiros manifestaram níveis mais elevados de comportamento de medo nos testes do que GEN cordeiros

➡ Manejo negativo de ovelhas durante a gestação demonstrou consequências para o comportamento materno, medo de humanos em ovelhas e cordeiros



Resumo dos resultados



- **NEG** cordeiros apresentaram maior densidade de processos de arborização no hipocampo e cortex frontal, mas redução nos processos que induzem sinapses mais estáveis

➡ Manejo negativo de ovelhas em gestação tem consequências na morfologia e expressão de genes no cérebro em áreas importantes para processos de adaptação



Baxter et al., submetido



Quarenta cabras Saanen x Toggenberg ,
primíparas, com gestação gemelar foram
alocadas em três tratamentos de manejo:
semelhante no que utilizamos em ovinos (Coulon
et al., 2013).

- 1) mínimo,
- 2) positivo-gentil
- 3) aversivo-negativo



Medidas

- Interação materno-filial (2hrs post-parto)
- Desenvolvimento físico e comportamental da prole
- Amostras de colostro
- Amostras de placenta

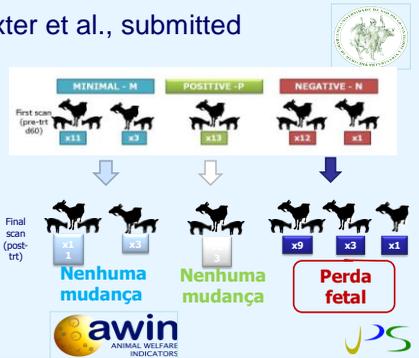


Resultados – Fetos

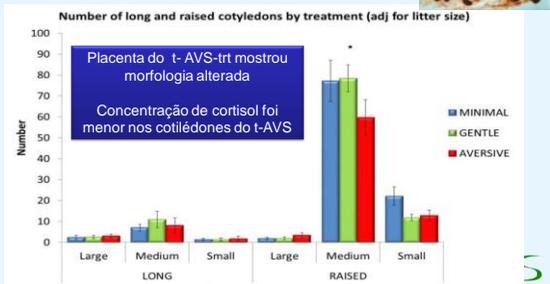


Baxter et al., submitted

As cabras manejadas de forma negativa perderam 4 fetos. Nenhuma perda foi registrada nos outros tratamentos (Fishers exact $P=0.051$).



Resultados-placenta



Implicações

- Estresse pré-natal pode alterar morfologia e função da placenta
 - Redução do suprimento de oxigênio – hipóxia no nascimento
 - Influência no comportamento inicial?



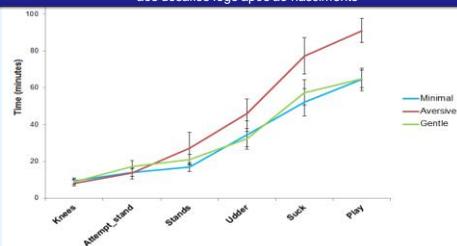
Mensuração de comportamento



Resultados: comportamento



Cabritos nascidos de fêmeas tratadas aversivamente responderam mais vagorosamente aos desafios logo após ao nascimento



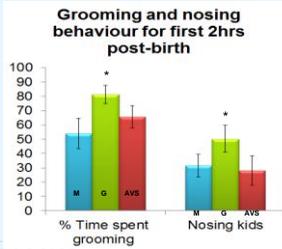
Implicações



- Os neonatos mais rápidos tem acesso ao úbere, alimentação e cuidado de forma mais efetiva (colostro, energia, termoregulação)
- Qual é o significado de “brincar”?
 - Desenvolvimento da coordenação
 - Indicador de bem-estar



Comportamento materno



Desmame precoce de suínos e stress prenatal em ovinos



- Comportamento anormal
- Agressão
- Medo
- Problemas cognitivos
 - Reconhecimento social
 - Memória de navegação



Desmame precoce de suínos e stress prenatal em ovinos



- Biomarcadores de stress
- Alterações na expressão de genes em áreas do cérebro associadas com memória e aprendizado
- Mudança nos mecanismos formadores de sinapses



Discussão



- Animais têm condições de sentirem experiências subjetivas comparáveis com humanos:
 - emoções negativas como medo, dor, ansiedade;
 - emoções positivas como prazer, ligações sociais intensas
- .



Nova abordagem!



- Vida que “vale a pena viver”!
- O conceito no final do século XX era predominantemente baseado na “ausência” de sofrimento.
- Identificar estados afetivos positivos é um dos maiores desafios para a avaliação de bem-estar.



Qual é o desafio?



- Desenvolvimento de protocolos científicos para assegurar o bem-estar dos animais.
- Este desafio está sendo desenvolvido pelo projeto animal welfare indicators (www.animal-welfare-indicators.net).



Obrigado!

adroaldo.zanella@usp.br



animal welfare
science hub

<http://www.animalwelfarehub.com>



Agradecimento



- Marjorie Coulon
- Sophie Hild
- Adriana de Souza
- Kirsty Laughlin
- Rosangela Poletto
- Paul Coussens
- USDA
- Norwegian Research Council
- DG Research (FP7 AWIN Project)