



Manejo de animais e consequências para o bem-estar

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.



Trajetória 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”



Trajetória 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



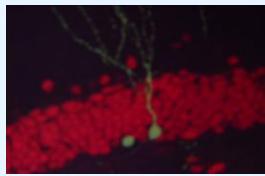
Marjorie Coulon

Sophie Hild



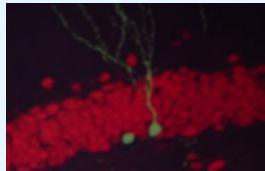
Expectativas

- 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



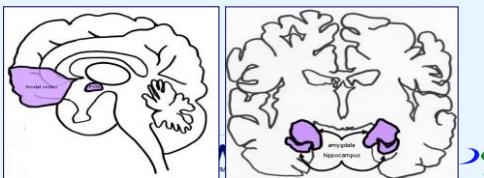
Modulação de emoções= neuroesteróides

- 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 11 β HSD1 e 11 β HSD2 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

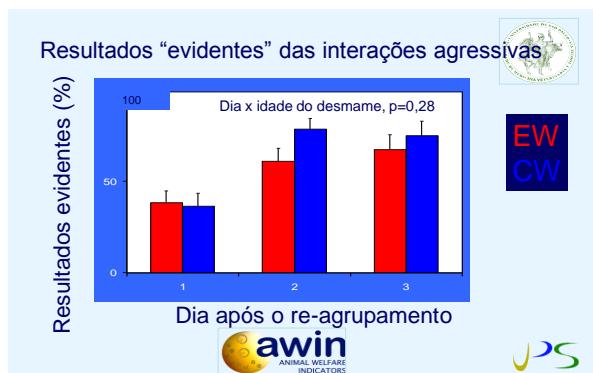
- 3 dias após o reagrupamento
- Duração, iniciador e resultado



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



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)





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.

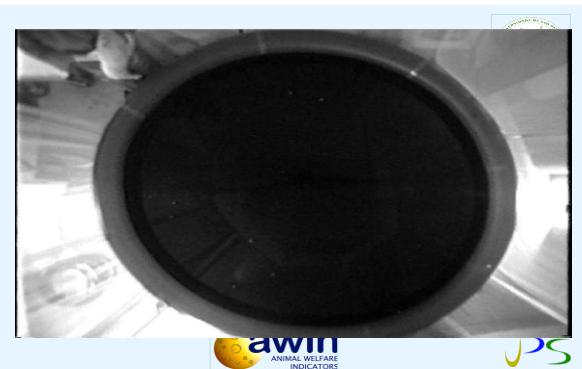
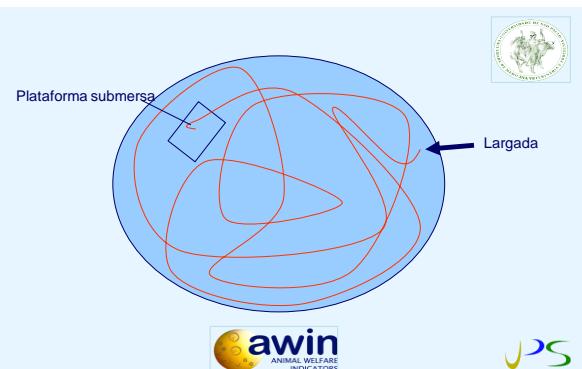
(Siegford et al., 2004; Souza & Zanella, 2004)



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



- 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)



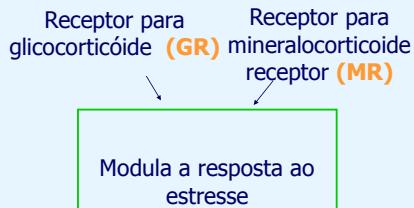




Análise da expressão de genes em cérebro de suínos desmamados precocemente e submetidos a stress por isolamento social

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

Genes relacionados com stress



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=ativo

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 diminui a expressão dos 4 genes testados ($p=0.004$)

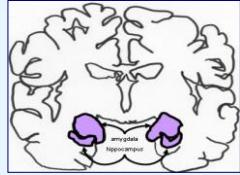
- Desmame convencional não alterou a expressão dos genes testados ($p = 0.17$)

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



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)

Two side-by-side photographs. The left one shows a white lamb standing in a field. The right one shows a baby being held by an adult's hands. Below the images is a newspaper clipping from "Scotland on Sunday" dated June 9, 2013, with the headline "Sheep reveal harm of pre-natal stress". The clipping includes text about the study and the AWI logo at the bottom.



Relação homem-animal

- A) Resposta dos cordeiros 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., Schroer A., Andersen IL and Zanella AJ (2011).
Hild S*, Coulon M*, Schroer 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 glicocorticoides, 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 às 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 pré-natal
 - expostos a hormônios glicocorticoides
 - 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



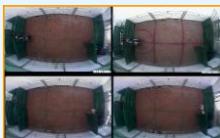
Resultados

- 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 Schroer, 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 Schroer, A Janczak, AJ Zanella, Physio & Behav. 2011

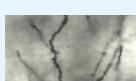


Coulon et al.(2013)

Amostras de 5 cordeiros por tratamento foram coletadas



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

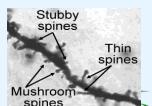


Number of spines
in dentrite of
apical neurone



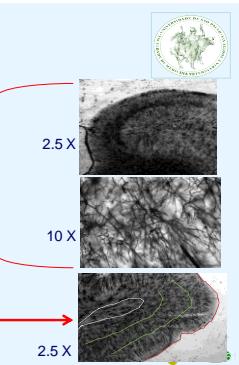
Coulon et al.(2013)

- 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)

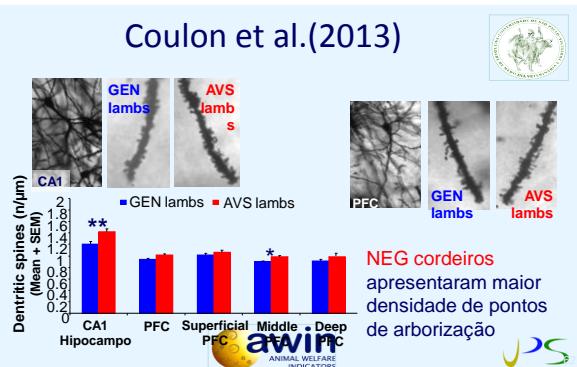


Coulon et al.(2013)

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

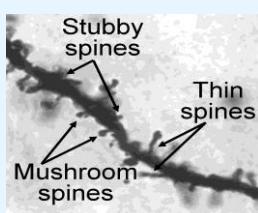


Coulon et al.(2013)



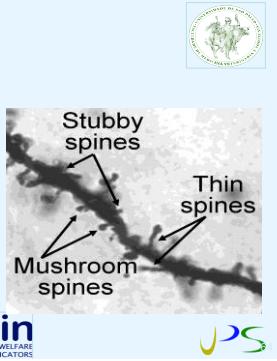
Coulon et al.(2013)

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 glicocorticoids 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 córtex 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



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



<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)